

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2018

Bc. Kateřina Skýpalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Střevní zánětlivá onemocnění, jejich etiologie
a molekulární charakterizace**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Skýpalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Spiros Tavandzis

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Spirose Tavandzise za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Souhrn

Diplomová práce se věnuje problematice idiopatických střevních zánětů (ISZ) jako jsou Crohnova nemoc (CN) a ulcerózní kolitida (UC), a dále pak také celiakální sprue. U CN a UC se jedná o nespecifické záněty střev, jejichž příčinou může být genetická predispozice, porucha funkce střevní lymfatické tkáně (GALT - z angl. Gut-associated lymphoid tissue), která představuje imunitní složku střeva, dále pak osídlení střev patogenními bakteriemi, strava. Správná a včasná diagnostika a léčba těchto onemocnění je velmi důležitá pro další vývoj nemoci a život pacienta. Za tímto účelem se nejdříve vyšetřují markery charakteristické pro každé onemocnění.

V experimentální části byl zhotoven a statisticky vyhodnocen soubor pacientů indikovaných k vyšetření markerů pro CN, UC a celiakie. Tento soubor byl porovnán s publikovanými daty a studii. K vyšetření se využily molekulárně-genetické a imunologické metody. Sledovanými parametry byl věk pacientů, zastoupení u mužů a žen, a genetické predispozice. Celiakie se vyskytuje častěji u žen než u mužů, u CN a UC je výskyt u obou pohlaví přibližně stejný. Z genetického hlediska byly mutace 3020insC, G908R a R702W detekovány v souvislosti s CN, nikoliv s UC. Celiakie se vyskytovala přibližně 2 - 3x více u žen než u mužů. Na HLA-DQ2/DQ8 genetickou predispozici bylo testováno 288 pacientů, z nichž u 29 % tato predispozice byla potvrzena.

Summary

Diploma thesis is devoted of inflammatory bowel diseases problems such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and further also celiac disease. Crohn's disease and ulcerative colitis are non-specific inflammation of intestines, and their causation could be genetic predisposition, disorder of function Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT), which represent immune component of the intestines, further also colonization of intestines by pathogenic bacteria or food. Correct and timely diagnosis and treatment of these diseases is very important for further development of diseases and the patient's life. For this purpose, firstly are investigated characteristic markers for these diseases.

In experimental part, it was assemble a statistically evaluated a set of patients who were indicated to investigate markers for Crohn's disease, ulcerative colitis and celiac disease. This set of patients as compare with publicated data and studies. For investigation we used molecular-genetic and immunological methods. The monitored parameters were age of patients, representation of men and women, and genetic predisposition. Celiac disease was more often detected in women, Crohn's disease and ulcerative colitis were found in men and women about the same. From genetic aspect there were mutations 3020insC, G908R a R702W and these mutations were related with Crohn's disease, but not with ulcerative colitis. Celiac disease was approximately 2 - 3x more in women. The 288 patients were testing for a HLA-D2Q/DQ8 genetic predisposition. This predisposition was detected in 29 % of these patients.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Spirosi Tavandzisovi a také Ing. Radce Sítkové za trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnovali při zpracování této práce. Děkuji také pracovníkům Laboratoří AGEL v Novém Jičíně.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1 Gastrointestinální trakt (GIT)	3
3.1.1 Stavba stěny trávicí trubice.....	4
3.1.2 Tenké střevo (Intestinum tenue)	5
3.1.3 Tlusté střevo (Intestinum crassum).....	7
3.1.4 Stolice	8
3.1.5 Bakteriální osídlení gastrointestinálního traktu	8
3.1.6 Imunitní systém gastrointestinálního traktu.....	11
3.2 Idiopatické střevní záněty	15
3.2.1 Historie.....	15
3.2.2 Obecná charakteristika idiopatických střevních zánětů.....	16
3.2.3 Léčba idiopatických střevních zánětů	17
3.2.4 Epidemiologie idiopatických střevních zánětů	19
3.2.5 Rizikové faktory	20
3.2.6 Diagnostika	21
3.2.7 Imunologie a genetiky idiopatických střevních zánětů.....	23
3.2.8 Komplikace, těhotenství, plodnost.....	25
3.3 Crohnova nemoc	27
3.3.1 Definice.....	27
3.3.2 Genetika a patogeneze Crohnovy nemoci	27
3.4 Ulcerózní kolitida	30
3.4.1 Definice.....	30
3.4.2 Genetika a patogeneze ulcerózní kolitidy	31
3.5 Celiakální sprue	32
3.5.1 Charakteristika a epidemiologie	32
3.5.2 Diagnostika	34
3.5.3 Genetika, patogeneze a faktory hrající roli u celiakie.....	36
3.5.4 Imunologie	38
3.5.5 Nemoci nebo poruchy vyskytující se v asociaci s celiakií	38
3.5.6 Přístupy v terapii a léčba.....	39

4.	Materiál a metody.....	43
4.1	Studování jedinci a materiál.....	43
4.2	Stanovení kalprotektinu ve stolici pomocí ELISA testu.....	43
4.2.1	Princip metody	43
4.2.2	Biologický materiál.....	44
4.2.3	Použité chemikálie	44
4.2.4	Použité přístroje	44
4.2.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	44
4.3	Stanovení autoprotilátek proti endomyzium ve třídě IgA metodou nepřímé imunofluorescence - technika TITERPLANE.....	45
4.3.1	Princip metody	45
4.3.2	Biologický materiál.....	46
4.3.3	Použité chemikálie	46
4.3.4	Použité přístroje	46
4.3.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	47
4.4	Stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA metodou ELISA	48
4.4.1	Princip metody	48
4.4.2	Biologický materiál.....	48
4.4.3	Použité chemikálie a roztoky	48
4.4.4	Použité přístroje	49
4.4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	49
4.5	Vyšetření HLA alel asociovaných s celiakální sprue analýzou DNA - metoda PCR s elektroforetickou detekcí produktu.....	50
4.5.1	Biologický materiál.....	50
4.5.2	Použité chemikálie a roztoky	50
4.5.3	Použité přístroje	50
4.5.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	50
5.	Výsledky.....	52
6.	Diskuze.....	59
7.	Závěr.....	62
8.	Použité zdroje.....	63

Seznam zkratek

AGA	antigliadinové protilátky
Ala	alanin
AMP	antimikrobiální peptidy
anti-TNF α	anti-tumor nekrotizující faktor α
anti-tTG	protilátky proti tkáňové transglutamináze
APC	antigen prezentující buňka
Arg	arginin
CD	antigeny molekul na povrchu buněk (cluster of differentiation)
CN	Crohnova nemoc
CRP	C-reaktivní protein
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	endomyzium
FITC	fluorescein isothiokyanát
GALT	imunitní tkáň střeva (gut-associated lymphoid tissue)
GIT	gastrointestinální trakt
Gln	kyselina glutamová
GWAS	genomové asociační studie (genom-wide association study)
HLA	human leukocyte systém (MHC systém u lidí)
IBD	inflammatory bowel disease
IgA	protilátky třídy IgA
IgG	protilátky třídy IgG
IL	interleukin
INF- γ	interferon γ
ISZ	idiopatické střevní záněty
JAK2	janusova kináza 2
K509	Crohnova nemoc NS (non specificatus)
K513	ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida
K519	ulcerózní kolitida NS
K900	celiakie
LC3	light chain
LPS	lipopolysacharid
LRR	doména bohatá na leucin

MDP	Muramyl-dipeptid
MDR	multidrug-resistant transporter 1
MHC	Major histocompatibility system
MSK	Moravskoslezský kraj
NfκB	nukleární faktor kappa B
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
pANCA	autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů (perinuclear neutrophil cytoplasmic antibodies)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	fosfatidylethanolamin
PMN	polymorfonukleární neutrofilní granulocyty
REG3γ	Regenerating Islet Derived Protein 3 Gamma
Relmβ	Resistin-Like Molecule-beta
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT3	protein (signal transducer and activator of transcription 3)
TGF-β	transforming growth factor beta
T _H	pomocné T buňky
Thr	threonin
TNF	tumor nekrotizující faktor
T _{REG}	regulační T buňky
T _S	supresorová T buňka
tTG	tkáňová transglutamináza
UC	ulcerózní kolitida
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Stavba a popis jednotlivých částí trávicího traktu u člověka.....	3
Obrázek 2 - Stavba stěny trávicí trubice.....	4
Obrázek 3 - Stavba stěny tenkého střeva. Na řezu lze pozorovat základní vrstvy tenkého střeva (klky, podslizniční vazivo, svalovinu a pobřišnici).	6
Obrázek 4 - Anatomická stavba tlustého střeva. Lze pozorovat všechny části tlustého střeva - slepé střevo s červovitým výběžkem, tračník vzestupný, tračník sestupný, tračník příčný a esovitý, konečník.	8
Obrázek 5 - Stavba a složení střevního systému GALT (gut-associated lymphoid tissue). 14	
Obrázek 6 - Stenóza střeva po vyšetření kolonoskopií. Lze pozorovat zúžení průchodnosti střeva.....	25
Obrázek 7 - Perforace tenkého střeva po vyšetření endoskopickou retrográdní cholangiopankreatografií.....	26
Obrázek 8 - Perianální absces a píštěl v okolí řitního kanálu.....	26
Obrázek 9 - Model ledovce při diagnostikování celiakie	34
Obrázek 10 - Fotografie exktrakčních zkumavek při extrakci kalprotektinu ze stolice.....	45
Obrázek 11 - Fotografie pozitivní fluorescence endomysia na substrátu opičích jater při stanovení IgA protilátek proti endomysiu. (Fotografie: Manuela Trojáčková)	47
Obrázek 12 - Fotografie gelu pod UV světlem - rozdělení PCR produktů u pozitivního pacienta na celiakii. (Fotografie: Irena Uhliariková)	51

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Shrnutí typů léčby ISZ a příklady léčebných přípravků	17
Tabulka 2 - Charakteristika typů celiakie.....	33
Tabulka 3 - Shrnutí vyšetřovacích strategií používaných v diagnostice celiakie.....	35
Tabulka 4 - Typy terapií u celiakie a u pacientů nereagujících na dietu a jejich funkce v organismu	40
Tabulka 5 - Interpretace výsledků nepřímého imunofluorescenčního testu na přítomnost autoprotilátek proti endomyzium ve třídě IgA	48
Tabulka 6 - Kvantitativní interpretace dat v jednotkách U/ml	49
Tabulka 7 - Teplotní program v termocykléru pro amplifikaci DNA	51
Tabulka 8 - Zastoupení mužů a žen v hodnoceném souboru pacientů.....	52
Tabulka 9 - Shrnutí diagnóz u vyšetřovaných pacientů a jejich zastoupení u mužů a žen .	53
Tabulka 10 - Shrnutí provedených testů onemocnění vyskytujících se v hodnoceném souboru a jejich četnost a zastoupení	54
Tabulka 11 - Shrnutí výsledků vyšetření pro genetickou predispozici a přítomnost mutace u jednotlivých onemocnění a jejich zastoupení u obou pohlaví.....	55
Tabulka 12 - Přehled a výsledky provedených laboratorních testů u 2 446 pacientů	57
Tabulka 13 - Procentuální vyjádření základních výsledků testovaných pacientů pro jednotlivá onemocnění počítané zvlášť pro muže a ženy.....	58

1. Úvod

Skupina idiopatických střevních zánětů (ISZ), do které patří Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida, jsou v dnešní době nemocemi vyskytujícími se především ve vyspělých zemích. Jedná se o onemocnění způsobené narušením imunitní tkáně střeva (GALT z ang. gut-associated lymphoid tissue), kdy příčinou může být genetická predispozice, osídlení střeva patogenními bakteriemi popřípadě i strava. Obecně se dá říci, že výskyt ISZ má rostoucí tendenci nejen ve světě, ale i v České republice, každý rokem se počet pacientů zvyšuje. Celiakie je chronické onemocnění se silnou genetickou predispozicí, které u pacientů trvá celý život a je vyvoláno glutenem. Velmi účinnou léčbou je dodržování celoživotní bezlepkové diety. Včasná a správná diagnóza může po nastavení správné léčby výrazně zlepšit život pacientů jak po fyzické, tak psychické stránce. K vyšetření ISZ a celiakie se využívají molekulárně-genetické a imunologické metody, které pomáhají určit markery související s těmito nemocemi.

2. Cíle práce

V teoretické části zpracovat přehled o idiopatických střevních zánětech a celiakii se zaměřením na:

- 1) Fyziologickou stavbu střevní stěny.
- 2) Charakteristiku Crohnovy nemoci, ulcerózní kolitidy a celiakie.
- 3) Patogenezi, imunologii a genetiku těchto onemocnění.
- 4) Komplikace a léčbu.

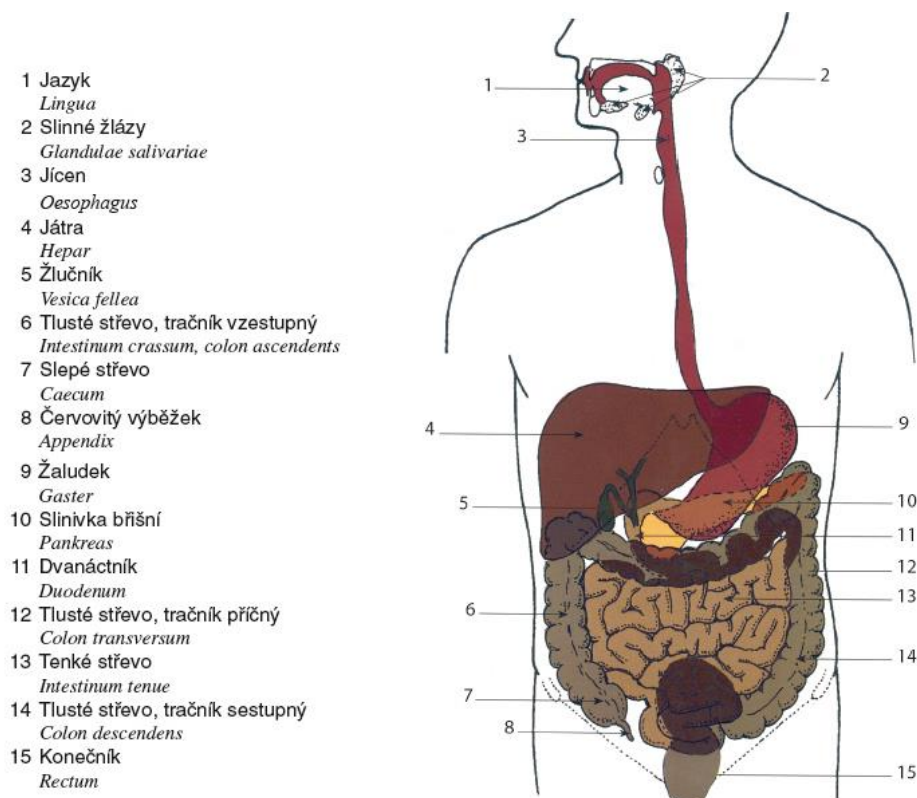
V praktické části:

- 1) Popsat metodiku vyšetření markerů pro CN, UC a celiakii.
- 2) Sestavit a statisticky analyzovat soubor pacientů indikovaných k vyšetření CN, UC a celiakie.
- 3) Porovnat získaná data s dalšími studiiemi z hlediska demografických a genetických parametrů.

3. Literární přehled

3.1 Gastrointestinální trakt (GIT)

Do trávicí trubice vyměšuje mnoho žláz a žlázových orgánů různé látky, jimiž se rozkládají složité chemické struktury, které jsou přítomné ve stravě, na základní jednotky, které jsou na buněčné úrovni snadno vstřebatelné (Riutti, 2016). Některé tyto molekuly slouží v těle jako zdroj energie, která pohání biochemické procesy v buňkách, z jiných molekul se stávají stavební kameny pro stavbu nových tkání nebo opravu opotřebovaných tkání. V případě dostatečného příjmu potravy, se některé látky ukládají v podobě zásobních látek. Samotné trávení se skládá ze složité kaskády chemických pochodů probíhajících v trávicí trubici o délce přibližně 8 metrů. Trávicí trubice se různě člení, kroutí, či rozšiřuje (kolektiv autorů, 1992) a skládá se z ústní dutiny, hltanu, jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva (viz obrázek 1) Dále se sem řadí slinné žlázy, játra, slinivka břišní, které vylučují svoje produkty do trávicí trubice. Základní funkcí trávicí soustavy je tedy zásobování organismu živinami, vodou, minerály a vitaminy (Švíglarová *et al*, 2008).



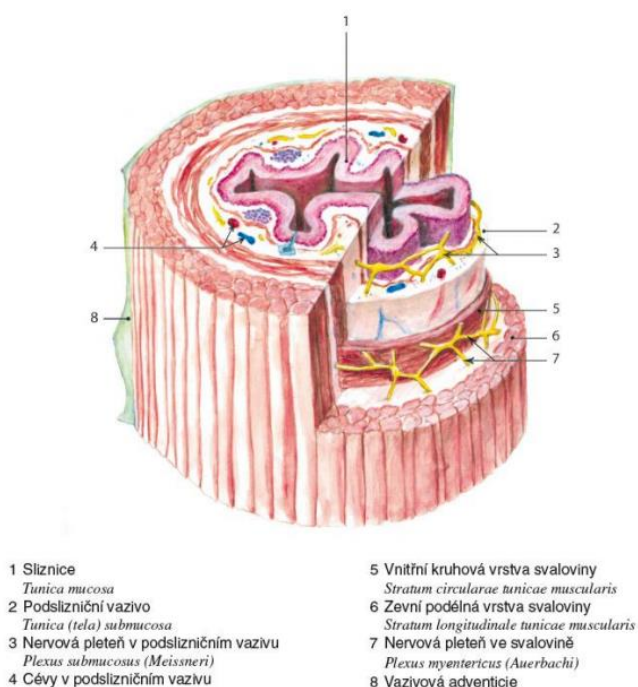
Obrázek 1 - Stavba a popis jednotlivých částí trávicího traktu u člověka

(Zdroj: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/soustava_travici.html

Navštívené 30. 10. 2017)

3.1.1 Stavba stěny trávicí trubice

Ačkoliv každá část trávicí trubice má specifickou funkci, stavba její stěny se od jícnu po konečník příliš neliší (viz obrázek 2). Nejvnitřnější vrstvu trubice tvoří sliznice (mucosa). Vnitřní vrstva sliznice je tvořena epiteliálními buňkami. Pod touto vrstvou se nachází vrstva slizničního vaziva (lamina propria mucosae) a tenká vrstva hladké svaloviny (lamina muscularis mucosae). V některých částech trávicí trubice vytváří sliznice řasy nebo klky, které zvětšují slizniční plochu. Pod sliznicí je přítomna vrstva kolagenního vaziva (tela submucosa) obsahující bohatou síť krevních i lymfatických cév a nervovou pletěň (plexus submucosus Meissneri). Svalová vrstva může být tvořena hladkou nebo příčně pruhovanou svalovinou. Příčně pruhovaná svalovina se vyskytuje v dutině ústní, hltanu, horní části jícnu a v oblasti análního otvoru. V ostatních částech trubice je svalová vrstva tvořena hladkou svalovinou, která je tvořena cirkulární a podélná svalovinou. V některých místech je cirkulární hladká svalovina specificky zesílena a vytváří tzv. svěrač (sfinkter). Druhá nervová pletěň (plexus myentericus Auerbachi) se nachází mezi cirkulární a podélnou svalovinou. Část trubice nacházející se mimo dutinu břišní (jícen a část rekta) je kryta řídkým vazivovým obalem (tunica adventitia). V břišní dutině je tento řídký vazivový obal nahrazen jednovrstevným epitelem (tunica serosa) (Švíglerová *et al.*, 2008).



Obrázek 2 - Stavba stěny trávicí trubice

(Zdroj: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/soustava_travici.html)

Navštívené 30. 10. 2017)

Pobřišnice kryje téměř celé střevo, i ostatní vnitřní orgány, usnadňuje jejich pohyb a také chrání břišní dutinu před patogenními činiteli (Riutti, 2016). Skládá se ze dvou vrstev: nástěnného listu (peritoneum parietale), který připevňuje orgány k zadní stěně břicha, a listu povlékajícího břišní orgány (Vigué, 2015).

3.1.2 Tenké střevo (*Intestinum tenue*)

Tenké střevo se dělí na proximální část (duodenum), střední část (jejunum) a distální část (ileum), které ústí do tlustého střeva. Z hlediska morfologie je sliznice tenkého střeva přizpůsobena resorpční činnosti, je uspořádána do příčných řas (Kerckringovy řasy) a je pokryta střevními klky (Švíglerová *et al*, 2008). Klky jsou vysoké 0,3-1 mm a směrem k ileu se snižují (Vigué, 2015).

Stěna tenkého střeva se skládá ze 4 vrstev (viz obrázek 3).

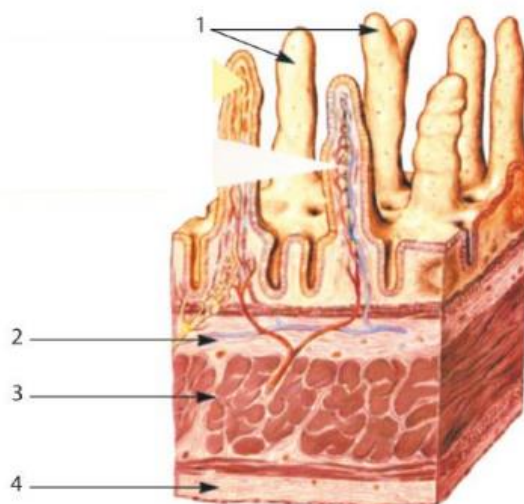
Sliznice tenkého střeva je tvořena jednovrstevným cylindrickým epitelem (Hanzlová *et Hemza*, 2006). Enterocyty tvořící většinu buněk střevní sliznice jsou vybaveny na luminální straně kartáčovým lemem, což umožňuje využít pro resorpci v tenkém střevě plochu až 250 m². Na povrchu slizničního klku se ještě vyskytují hlenotvorné pohárkové buňky. Tubulární žlázy (Lieberkühnovy krypty) jsou přítomny v celé sliznici tenkého střeva a zanořují se pod slizniční povrch. V těchto kryptách se nacházejí enterocyty, nediferencované kmenové buňky, pohárkové buňky, endokrinní buňky. Sliznice proximální části tenkého střeva je navíc vybavena Brunnerovými žlázami. Enterocyty hrají důležitou roli při resorpci látek z potravy a sekreci střevní šťávy. Jejich životnost je 2 – 5 dnů a jsou neustále obnovovány z nediferencovaných kmenových buněk ve střevních kryptách. Odtud jsou postupně posouvány na povrch střevního klku, kde poté dojde k jejich odloučení do střevního obsahu (Švíglerová *et al*, 2008).

- Podslizniční vazivo je řídké vazivo, které obsahuje krevní a mízní cévy a nervové pleteně.
- Svalovina se skládá ze dvou vrstev, a to vnitřní cirkulární a zevní podélné vrstvy.

Vrstva serózní je tvořena jednovrstevným plochým epitelem, který pokrývá povrch střeva. Ke svalovině je připevněna subserózním vazivem obsahujícím subserózní pletěň (Hanzlová *et Hemza*, 2006).

Dále se tenké střevo se dělí na 3 úseky:

1. dvanáctník – zde jsou vylučovány šťávy ze slinivky a žluč z jater,
2. lačník,
3. kyčelník – ten je propojený s tlustým střevem kyčelníkovou chlopní (Riutti, 2016).



1 Klky
Villi intestinales
2. Podslizniční vazivo
Tunica submucosa

3 Svalovina
Tunica muscularis
4 Pobřišnice
Peritoneum (mesenterium)

Obrázek 3 - Stavba stěny tenkého střeva. Na řezu lze pozorovat základní vrstvy tenkého střeva (klky, podslizniční vazivo, svalovinu a pobřišnici).

(Zdroj:

https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/brisi_panevni_cast.html.

Navštívené 30. 10. 2017)

Tenké střevo u dospělého jedince měří přibližně 6,8 metrů. Množství a hustota záhybů a klků na vnitřním povrchu tenkého střeva stoupá směrem k tlustému střevu. Dvanáctník o délce asi 25-30 cm je první částí tenkého střeva, která přímo navazuje na vrátník. Střevní šťávy, které dvanáctník vylučuje, jsou alkalické povahy a obsahují mnoho enzymů (př. enterokináza). Sliznice dvanáctníku také vylučuje hormony (sekretin a pankreozymín-cholecystokinin). Lačník je tvořen mnoha střevními klky, které vstřebávají živiny. Kyčelník obsahuje ještě větší množství klků, kdy na 1 cm² připadá přibližně 1 000 klků (Riutti, 2016). Hlavními funkcemi tenkého střeva jsou:

- intenzivní trávení všech živin a následná resorpce natrávených látek
- resorpce minerálů, vitaminů a vody,
- imunitní činnost (GALT, M-buňky),
- endokrinní sekrece (především v oblasti duodena), která má významný podíl na regulaci sekrece a motility téměř celého trávicího traktu (Švíglerová *et al*, 2008).

Mesenterické spojení

Tenké střevo se v břišní dutině volně nevznáší. Jeho četné kličky jsou ukotveny na zadní straně břicha díky struktuře známé jako mesenterium neboli okruží. Okruží střevo nejen udržuje ve správné pozici, také slouží k zásobení krví a podporuje rozsáhlou sítí krevních a lymfatických cév, které ze střeva transportují vstřebané živiny (kolektiv autorů, 1992).

3.1.3 Tlusté střevo (*Intestinum crassum*)

Tlusté střevo se z anatomického hlediska dělí na slepé střevo s červovitým výběžkem (Švíglerová *et al*, 2008), tračník vzestupný, tračník sestupný, tračník příčný a esovitý (Riutti, 2016) a konečník (rectum) (Švíglerová *et al*, 2008) (viz obrázek 4).

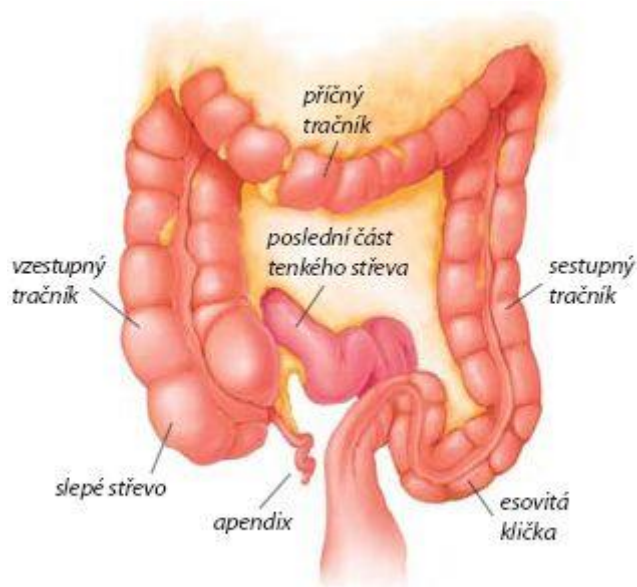
Tračník sice není důležitý pro trávení, ale má nenahraditelnou funkci pro tvorbu vitaminů a zpětné vstřebávání tekutin (Riutti, 2016). Jaterní ohbí (flexura hepatica) tvoří přechod mezi vzestupným a příčným tračníkem, slezinné ohbí (flexura lienalis) se pak nachází mezi příčným a sestupným tračníkem. Tlusté střevo má obdobnou stavbu stěny jako střevo tenké, nicméně podélná hladká svalovina je na povrchu střeva zesílena do 3 podélných pruhů (taeniae coli). Zevní stěna tlustého střeva (haustra coli) je pravidelně vyklenutá a udává charakteristický vzhled tlustého střeva (Švíglerová *et al*, 2008). Šířka tlustého střeva je 5-8 cm a postupně se zúžuje až na 4 cm. Oproti tenkému střevu je pro něj charakteristická našedlá barva, větší průsvit, podélná svalovina koncentrovaná do 3 pruhů sbíhajících se na appendixu (Hanzlová *et Hemza*, 2006). Délka tlustého střeva se udává okolo 1,8 metrů (Riutti, 2016). Konečník je dlouhý přibližně 12-16 cm a 4 cm široký (Hanzlová *et Hemza*, 2006).

Hlavními funkcemi tlustého střeva jsou:

- resorpce vody, elektrolytů a některých vitaminů (především v proximální části střeva), v tlustém střevě už nedochází k vstřebávání živin z potravy (Švíglerová *et al*, 2008),
- formování, skladování a následné vypuzení stolice (distální část střeva) (Riutti, 2016).

I když se ve sliznici tlustého střeva nenachází klky, tak i zde dochází ke vstřebávání některých látek. Buňky sliznice tlustého střeva tvoří enterocyty, které jsou podobné enterocytům tenkého střeva, ale mají méně vyvinutý kartáčový lem, a pohárkové buňky vylučující hlen. Do sliznice se zanořují Lieberkühnovy krypty, ve kterých se nacházejí enterocyty, pohárkové buňky, endokrinní buňky (produkující některé hormony) a nediferencované kmenové buňky. Díky resorpční schopnosti je sliznice tlustého střeva

také využívána k resorpci některých léčiv aplikovaných per rectum (Švíglerová *et al*, 2008).



Obrázek 4 - Anatomická stavba tlustého střeva. Lze pozorovat všechny části tlustého střeva - slepé střevo s červovitým výběžkem, tračník vzestupný, tračník sestupný, tračník příčný a esovitý, konečník.

(Zdroj: <http://strevni-nep Duchodnost.webnode.cz/anatomie-a-fyziologie/>. Navštívené 1. 11. 2017)

3.1.4 Stolice

Stolici tvoří ze $\frac{3}{4}$ voda a zbytek pak pevné látky. Největší podíl pevné hmoty zauímají mrtvé bakterie, oloupané slizniční buňky, nestrávené části potravy, zbytky trávicích šťáv, žlučové pigmenty, malém množství tuků a bílkovin. Dospělý člověk vyloučí průměrně 150g stolice za den. Strava bohatá na vlákninu má velký význam pro prevenci vzniku zánětlivých a nádorových chorob tlustého střeva (Švíglerová *et al*, 2008).

3.1.5 Bakteriální osídlení gastrointestinálního traktu

Lidé a jiní savci se narodí ze sterilního prostředí a střevní bakterie získávají během prvních měsíců života (Stark *et Lee*, 1982). Také matčina mikroflóra může být zdrojem bakterií kolonizující střevo novorozence (Nanthakumar *et al.*, 2003). Existují dvě fáze kolonizace střev bakteriemi. První fáze je během výživy mateřským mlékem nebo vyrobenou

novorozeneckou výživou. Druhá fáze nastává po odstavení od mléka a učení se na pevné potraviny (Diaz *et al.*, 2004). Kojení je proto považováno za důležité při vývoji a udržování normální střevní mikroflóry (Martin *et al.*, 2007). Časové a prostorové mechanismy střevní kolonizace u kojenců jsou mezi jednotlivci variabilní a závisí na mnoha faktorech jako například země narození, předčasné narození, způsob narození, historie hospitalizace, používání antibiotik, kojenecká strava, vegetariánská strava, stáří, genetika, pohlaví. Například přirozeně narozené děti, které měly jako stravu mateřské mléko, mají ve střevě převahu *Bifidobacterií*, s malým množstvím *Escherichia coli*, *Bacteroides* a druhů *Clostridia* (Bullen *et al.*, 1976).

V tlustém střevě se nachází velké množství převážně anaerobních bakterií, které se dělí na kvasné a hnilobné (Švíglerová *et al.*, 2008). Tyto bakterie postrádají enzymy nezbytné k detoxikaci kyslíku. Proto se odhaduje, že za ideálních podmínek je pouze polovina bakterií přítomných ve stolici kultivovatelná (Adlerberth *et Wold*, 2009). Činností některých bakteriálních kmenů vznikají vitaminy B₁, B₂, B₁₂ a K. Kvasné bakterie jsou schopné zpracovávat dietní vlákninu tvořenou nestravitelnými polysacharidy v lidské stravě. Tuto vlákninu bakterie rozkládají za vzniku plynů (CO₂, H₂ a methanu), mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina octová, propionová a máselná). Tyto mastné kyseliny jsou hlavním zdrojem energie pro buňky sliznice tlustého střeva a působí protizánětlivě proti poškození sliznice a vzniku nádorových buněk. Hnilobné bakterie jsou schopné produkce některých toxických látek (amoniak, indol, skatol, merkaptan). Některé tyto produkty jsou resorbovány do portální krve a u zdravého jedince pak vychytávány a detoxikovány v hepatocytech (Švíglerová *et al.*, 2008).

Mikrobiom

Jako mikrobiota se označuje společenství komenzálních symbiotických a patogenních mikroorganismů, které se nacházejí uvnitř GIT, kde se kombinuje genetický materiál z těchto mikroorganismů. Mikrobiom se skládá z přibližně 500-1000 druhů bakterií. Nečastějšími kmeny jsou *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, ale objevují se zde i zástupci kmenů *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Bowcutt *et al.*, 2014). Mikrobiom GIT se postupně v délce GIT zvětšuje, kdy v tlustém střevě se nachází 10¹⁰-10¹¹ bakterií na gram střevního obsahu, zatímco ve dvanáctníku a tenkém střevě je jich jen 10³-10⁴ bakterií na gram střevního obsahu (Berg, 1996). Bakteriální hustota a množství se také zvyšuje v příčném směru z hlenu do lumenu (Sommer *et Bäckhed*, 2013). Ve srovnání s lumen, na slizničním povrchu tlustého střeva převládá kmen *Firmicutes*, konkrétně rodiny

Lachnospiraceae a *Ruminococcaceae* (Nava *et al.*, 2011). Mikrobiom tenkého střeva je přizpůsoben metabolismu jednoduchých sacharidů, zatímco mikrobiom tlustého střeva je schopen efektivně degradovat komplexy polysacharidů (Zoetendal *et al.*, 2012). Ve srovnání s tenkým střevem je imunitní tolerance stanovena dříve než v tlustém střevě (El Aidy *et al.*, 2012). Také různé kmeny bakterií mohou mít různé účinky, v rámci imunitní odpovědi, v různých částech střeva. Například podávání probiotik *Lactobacillus salivarius* UCC118 vyvolává reakci T_{REG} lymfocytů v tenkém střevě, zatímco v tlustém střevě aktivuje zánětlivou odpověď (Smelt *et al.*, 2013). Počáteční imunitní odpověď na kolonizaci je charakterizována obecnou zánětlivou reakcí, která vrcholí během 1. týdne od narození a následně se stabilizuje během 1. roku života (Shroff *et al.*, 1995). Charakteristickým znakem kolonizace je produkce a sekrece IgA protilátek v reakci na malé množství bakterií, které pronikají do střevního epitelu (Hill *et Artis*, 2010).

Kolonizace GIT přirozenou bakteriální flórou je považováno za základní obranný mechanismus těla proti infekcím způsobenými patogeny (Cebra, 1999). Je také důležité, aby kolonizující bakterie komunikovala se střevním epitelem. Tato komunikace pak vede k metabolickým či imunologickým reakcím mezi epiteliálními buňkami a lymfoidními buňkami (Steege *et al.*, 1997). Střevní epitel má různorodý soubor fyziologických funkcí, včetně trávení a absorpce živin, vytváření fyzické bariéry mezi vnějším a vnitřním prostředím a imunologický dohled nad střevními bakteriemi a potencionálními patogeny. Epitelové buňky jsou neustále nahrazovány z množství multipotentních kmenových buněk typu Lgr5+ (Hill *et Artis*, 2010).

Jednou z hlavních obtíží při charakterizaci mikrobiomu u CN je porozumění účinkům léčby - včetně léčby antibiotiky. Antibiotika byly prokázány, že významně snižují ekologickou rozmanitost v GIT pacientů s CN a bez CN (Wright *et al.*, 2015). Nicméně pokud podávání antibiotik trvá kratší dobu, lze pozorovat okamžité znovuzískání střevní mikroflóry (Antunes, 2011). Opakovaná expozice organismu vůči antibiotikům však může vést k dlouhodobé perturbaci střev (Dethlefsen *et Relman*, 2011). Další studie také prokázala vliv antibiotik na idiopatické střevní záněty (= ISZ), tím že zjistili, že přítomnost některých bakterií byla významně snížena nebo úplně chyběly - *Collinsella*, *Dorea*, *Butyricoccus*, *Subdoligranulum*, *Acetivibrio* (Wright *et al.*, 2015). Účinek ne-antibiotické léčby ISZ na střevní mikrobiom zatím nebyl příliš prozkoumán. Jedna studie ukázala, že mesalamin je spojen s významným snížením počtu bakterií *Escherichia*, *Shigella*,

že léčba kyselinou 5-aminosalicylovou a imunosupresivy je spojena s mírným zvýšením počtu bakterií *Enterococcus* (Morgan, 2012).

V polovině 80. let se prokázalo, že u některých nemocných Crohnovou nemocí je přítomná infekce *Mycobacterium paratuberculosis*. Dále se také potvrdilo, že vznik této nemoci je spíše výjimečný než běžný a nejspíš se jedná o superinfekci způsobenou chronickými zánětlivými změnami než o primární účinek bakterie (Lukáš, 1997). V poslední době byly provedeny studie pomocí metody DNA barcoding sekvenování 16S ribozomálních RNA genových segmentů, které poskytly přesnější charakterizaci bakteriálního osídlení střeva u zdravých jedinců. Tyto studie identifikovaly kmene *Firmicutes* a *Bacteroidetes* jako hlavní skupiny přítomné v savčím střevě. Z kmene *Firmicutes* patří 95 % do třídy *Clostridia*, zatímco zástupci z kmene *Bacteroidetes* vykazují větší rozmanitost. Ostatní kmene jsou přítomné v relativně nízkém počtu - *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* (Hill et Artis, 2010). Nové metody sekvenování také umožňují metagenomickou analýzu střevních komunit a poskytují nové poznatky o vlivu mikrobiálních genů a genových produktů (Frank et Pace, 2008).

3.1.6 Imunitní systém gastrointestinálního traktu

Střevní sliznice patří mezi tkáně, které jsou kryté epitelem. Epitely tak představují místo kontaktu mezi vnitřním a zevním prostředím a neustále jsou vystaveny toku látek antigenní a mitogenní povahy. Proto je organismus vybaven mechanismy, které regulují průnik těchto látek do vnitřního prostředí. Především se jedná o mechanické, chemické či imunologické bariéry. Imunitní systém střevní sliznice tak plní funkci bariéry proti patogenním mikroorganismům, proti proniknutí imunogenů přijatých skrz trávicí trakt a nereaktivitu organismu vůči složkám potravy, které do těla pronikly v imunogenní podobě (Tlaskalová-Hogenová, 1994).

Každá bakterie z celkového počtu 10^{13} má svůj vlastní identifikační kód, tzv. antigenní determinantu. Správný imunitní systém je schopen každého mikroba identifikovat a rozpoznat je-li patogenní či nikoliv. K rozpoznávání patogenních a nepatogenních mikrobů využívá imunitní systém dvou složek – nespecifické (přirozené) a specifické imunity. Buňky a struktury nespecifické imunity jako první reagují na patogenního mikroba a po kontaktu s ním jej zničí. Tuto informaci předávají buňkám specifické imunity prostřednictvím různých látek, které uvolňují (např. TNF – tumor nekrotizující faktor). Za rozpoznáním mikroba stojí geny získané od obou rodičů. Specifická imunita nastupuje s určitým zpožděním a jejími hlavními složkami jsou T a B lymfocyty (Červenková, 2009).

O významu i výkonosti imunitního systému GIT svědčí i skutečnost, že téměř tři čtvrtiny protilátek (především imunoglobuliny typu A = IgA) vznikají právě zde. Imunitní systém GIT plní tedy 2 základní funkce. Tou první je obrana organismu pomocí slizničního imunitního systému střeva (= GALT) proti antigenům přicházejících do těla s potravou, jako jsou bakterie, viry, prvoci apod. Druhou funkcí je tzv. „imunitní tolerance“ těla k jednotlivým složkám potravy a k bakteriím, které přirozeně osidlují střevo. GIT využívá v boji proti patogenům také nespecifické imunity. Patří zde přítomnost lysozymů ve slinách, produkce hlenu mucinózními buňkami, nízké pH žaludeční šťávy, mechanické čištění střeva peristaltickými pohyby, přítomnost fagocytů, neporušená bariéra střevní sliznice (Švíglerová *et al*, 2008).

Složitý imunitní systém střev dozrává ve věku okolo 2 let. V případě, že následkem vnějších vlivů imunitní systém střev nedozraje nebo jedinec nese ve své genetické výbavě vlohu pro chybné rozpoznávání mikrobů, dochází k nepřirozené reakci na mikrobiální osídlení střev. Imunitní systém tak reaguje i na některé druhy, které jsou pro člověka prospěšné a tím dochází k poškození vlastní tkáně, vzniku vředů a chronického zánětu střevní sliznice (Červenková, 2009).

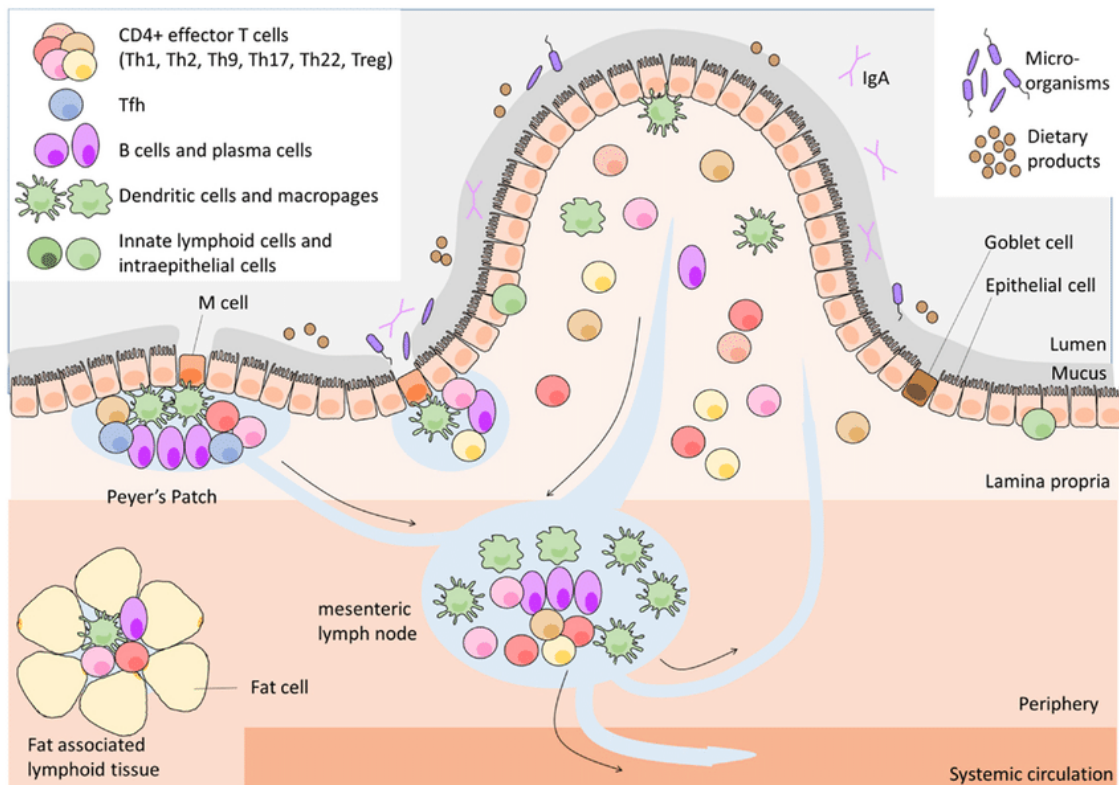
Aktivované CD4 Th17 a Th1 T-lymfocyty reagují na autoantigeny střeva a mikrobiálními střevními antigeny. Tyto antigeny jsou prezentovány T-lymfocytům pomocí APC buněk. Th-lymfocyty následně proliferují, dochází k produkci cytokinů a imunitní odpovědi, která je cílena proti normální bakteriální flóře. Také dochází ke snížení počtu T_{REG} lymfocytů, které za normálních okolností poskytují vyváženou supresi zánětlivých Th1 a Th17 lymfocytů, hrají roli při modulaci imunitní odpovědi, kdy v jejich nepřítomnosti působí střevní bakterie jako spouštěcí faktor pro ISZ. Za masivní pronikání komenzálních bakterií skrz střevní sliznici může zvýšená negativní regulace komenzálních bakterií a poruchy defenzinů (Hořejší *et al.*, 2013).

GALT (gut-associated lymphoid tissue)

V roce 1977 popsal švýcarský lékař Johan Peyer malé ostrůvky lymfatické tkáně v tenkém střevě - podle něj jsou dnes známy jako Peyerovy pláty. Tyto pláty představují účinnou obranu střeva proti invazi bakterií, které přežily průchod přes žaludeční kyseliny. Obsahují velké množství lymfocytů a M-buňky (kolektiv autorů, 1992). Slizniční lymfatická tkáň střeva se označuje jako

GALT (z angl. Gut-Associated Lymphoid Tissue) a skládá se z Peyerových plátů, což jsou uzlíky lymfatické tkáně (Švíglerová *et al.*, 2008), lokalizované především ve sliznici tenkého střeva, a difúzně rozptýlených imunitních buněk (složení GALT viz obrázek 5). Tato lymfoidní tkáň střeva je složena z T-lymfocytů (především T_H CD4, T_S CD8/CD5), které hrají zřejmě roli v antimikrobiální ochraně sliznic a reagují na autoantigeny (Ferenčík *et al.*, 1994). Subpopulace CD4⁺ T-buněk, která koexprimuje CD25 (α -řetězec IL-2R) a má regulační funkci, byla identifikována ve sliznici po vystavení střevního imunitního systému luminálním antigenům. Tyto buňky hrají důležitou roli při indukci a udržování tolerance v normálním střevě, tím že produkují TGF- β a IL-10 (Shevach, 2000). Dále obsahuje M-buňky, které pohlcují antigeny, bez toho aniž by byly vybaveny znaky MHC II. třídy (Ferenčík *et al.*, 1994), potom také B-lymfocyty, plazmatické a žírné buňky lokalizované ve vrstvě slizničního vaziva (Švíglerová *et al.*, 2008) a také velké množství IgA⁺ plasmoblastů. Polymerní IgA, jeden z charakteristických znaků střevního humorálního imunitního systému, je produkován na obranu mukózních povrchů před patologickými mikroby (Moreau *et al.*, 1988). Pro správnou činnost složek GALT je nutná přítomnost tzv. M-buněk (membránové buňky), které se nacházejí na povrchu střevní sliznice a transportují makromolekuly z lumen střeva k imunokompetentním buňkám a k lymfatické tkáni. Jejich funkcí je tedy transport potencionálních antigenů k imunitním buňkám (Švíglerová *et al.*, 2008).

Jednou z klíčových funkcí GALT je rozlišovat neškodné antigeny z patogenních mikroorganismů a reagovat na ně (vyvolat příslušnou odezvu). Tyto reakce mohou být významně ovlivněny střevní mikroflórou. Vývoj a funkce GALT jsou přesně regulované mechanismy, které stále nejsou zcela pochopeny. Předpokládá se, že regulační T-buňky (T_{REG}) mohou hrát roli při změně imunitní odpovědi ve střevní sliznici. V nepřítomnosti T_{REG} působí střevní bakterie jako spouštěč těžkého vývoje idiopatických střevních zánětů (Mottet *et al.*, 2003). Selhání přesné regulace imunitního systému střevní sliznice může vést také k vývoji imunitní odpovědi na potravinové bílkoviny (= alergie) nebo k vyvolání odpovědi proti vlastním antigenům (= autoimunitní nemoc) (Khoo *et al.*, 1997). Jak bylo výše zmíněno, T_{REG} jsou silné imunitní supresory, které kontrolují a zabraňují vzniku spontánních autoimunitních onemocnění (Suri-Payer *et al.*, 1998). Bylo také prokázáno, že T_{REG} buňky reagují přímo na prozánětlivé bakteriální produkty, přesněji na LPS (= lipopolysacharid) (Caramalho *et al.*, 2003).



Obrázek 5 - Stavba a složení střevního systému GALT (gut-associated lymphoid tissue)

(Zdroj: https://www.researchgate.net/figure/267739558_fig2_Figure-1-Architecture-of-gut-associated-lymphoid-tissue. Navštívené: 7. 11. 2017)

Antimikrobiální proteiny

Přímou roli v obraně střevní sliznice hraje také produkce tzv. antimikrobiálních peptidů (= AMP). Tvorba různých typů AMP se liší podle požadavků GIT, který odráží potřebu reagovat na různé patogeny napadající GIT (El Aidy *et al.*, 2012; Bevins *et Salzman*, 2011; Gallo *et Hooper*, 2012; Munitz *et al.*, 2012). Panethovy buňky jsou specializované linie buněk jedinečné pro tenké střevo a jsou hlavním zdrojem AMP včetně α -defenzinů, lysozymů, ribonukleáz (př. angiogenin 4), sekreční fosfolipázy A2 a lektinů typu C (př. REG3) (Bevins *et Salzman*, 2011; Gallo *et Hooper*, 2012; Munitz *et al.*, 2012). Panethovy buňky také kromě produkce AMP mohou přímo rozpoznat patogeny pomocí vrozené imunitní odpovědi (Bowcutt *et al.*, 2014). Rozložení Panethových buněk v rámci GIT je nerovnoměrné, existují rozdíly například mezi tenkým a tlustým střevem. Enterocyty a celý GIT mohou indukovat expresi odlišných skupin AMP (Gallo *et Hooper*, 2012; Munitz *et al.*, 2012). AMP jako třeba REG3 γ a REG3 β podporují prostorovou

segregaci mikrobiálních populací z povrchu epitelu tenkého střeva (El Aidy *et al.*, 2012; Vaishnava *et al.*, 2011). Enterocyty v tenkém střevě stimulují produkci REG3 γ a REG3 β , zatímco v tlustém střevě řídí syntézu β -defenziny (O'Neil *et al.*, 1999) a katelikidiny (Koon *et al.*, 2011). Rozdíl v AMP je také mezi proximální a distální částí střeva, což také souvisí s bakteriálním osídlením (Burger-van Passen *et al.*, 2012).

Pohárkové buňky také vykazují nehomogenní distribuci, v rámci GIT je jich nejvíce v tlustém střevě. Uvolňují bioaktivní látky obsahující muciny, AMP, angiogenin-4, REG3 γ , REG3 β a trefoil peptidy, které dále přispívají k vrozené imunitní obraně (Bowcutt *et al.*, 2014). Exprese REG3 γ je v tlustém střevě, ve srovnání s tenkým střevem, minimální (El Aidy *et al.*, 2012; Vaishnava *et al.*, 2011). Naopak v tlustém střevě je hlavně exprimován AMP, přesněji typ Relm β , pouze malé množství je přítomno v normálním terminálním ileu a žádný Relm β není exprimován v oblastech tenkého střeva (He *et al.*, 2003). Relm β proteiny mají podobnou funkci jako proteiny REG3 v tenkém střevě (El Aidy *et al.*, 2012). Změna exprese AMP může také nastat v důsledku změn v mikrobiálním osídlení (za fyziologických či patologických stavů) (Bowcutt *et al.*, 2014).

3.2 Idiopatické střevní záněty

3.2.1 Historie

Idiopatické střevní záněty (= ISZ, angl. Inflammatory Bowel Diseases) jsou choroby 20. století (Kohout, 2003). Již Hippokrates (460 – 377 př. n. l.) a Areatus z Cappadocia (80 – 138 n. l.) rozpoznávali různé druhy průjmů (Lukáš, 1997).

První případ Crohnovy nemoci tenkého a tlustého střeva nejspíš již v roce 1769 popsal G. G. Morgagni v práci „De Sedibus et Causis Morborum“ (Kohout, 2003). Oprotiulcerózní kolitidě je Crohnova choroba historicky mladší onemocnění a datuje se k roku 1932 (Lukáš, 1997). Na počátku 20. let 20. století působilo v newyorské nemocnici Mount Sinai několik skupin lékařů zabývajících se problematikou zánětlivých onemocnění střev – Moschowitz a Wilensky, Ginzburg, Oppenheimer a tehdy uznávaný chirurg Berg a do třetice Crohn, který léčil od roku 1930 pouze dva pacienty. Všem skupinám bylo řečeno, ať společně připraví článek do prestižního odborného časopisu Journal of the American Medical Association. Redakce tehdy podpisovala autory ne podle zásluh, ale podle abecedního pořádku. Navíc Berg se odmítl podepsat, protože se na sepisování článku nepodílel, jinak by byl podepsaný na prvním místě a dnes by se mluvilo o Bergově nemoci. V 90. letech se ukázalo, že se jedná o heterogenní onemocnění s různorodou

lokalizací, projevy a komplikacemi, že je nutné klasifikovat ho přesněji (Červenková, 2009).

V roce 1909 se konalo v Londýně první velké symposium na téma ulcerózní kolitida, na kterém lékaři prezentovali případy 317 pacientů s podobnými potížemi, které v letech 1888 – 1907 léčili v tamních nemocnicích (Červenková, 2009). V první polovině 20. století byla více populární ulcerózní kolitida, naopak v závěru 20. století pak dominovala Crohnova nemoc nejen díky zvyšující se incidenci, ale také díky velkému polymorfismu jejích projevů. Nebylo objeveno žádné infekční agens, tudíž se přijalo tvrzení, že se jedná o psychosomatické onemocnění (Kohout, 2003). Až po 2. světové válce, díky rozvoji imunologie, označili tuto nemoc za autoimunitní. V dnešní době se ulcerózní kolitida neřadí k typickým autoimunitním onemocněním, nicméně má jasné autoimunitní rysy. Dodnes také je nevyřešena otázka jejího původu a příčin (Červenková, 2009).

3.2.2 *Obecná charakteristika idiopatických střevních zánětů*

Jako zánětlivé onemocnění střev se označují nemoci zánětlivé nenádorové povahy, které postihují tenké a tlusté střevo. V této široké škále onemocnění rozlišujeme dvě větší skupiny, a to záněty tlustého a tenkého střeva se známou příčinou nebo záněty idiopatické povahy, kdy příčina je zatím neznámá (Lukáš *et* Starnovská, 1998). Jedná se o choroby trávicího traktu související s výživou. Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida jsou především ve fázi relapsu často sdruženy s malnutricí (přibližně 70 – 85 %), která má multifaktoriální etiologii způsobenou například poklesem chuti k jídlu, bolestí břicha při jídle, zvýšenou zánětlivou aktivitou, zvýšením energetického výdeje, zhoršením absorpce jednotlivých živin, ztrátami krve a bílkovin při průjemových stolicích a enteroragii, píštělemi či stomii nebo snížením absorpční plochy po opakovaných resekcích (Kohout, 2003). Tyto symptomy vedou často ke špatnému psychosociálnímu životu, jako jsou problémy v zaměstnání, problémy ve vztazích, i co se týká sexuálního zdraví (Neovius *et al.*, 2013). Do této skupiny střevních zánětů se řadí onemocnění ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc a tzv. neurčitá kolitida (Lukáš, 1997). Asi 15 % pacientů nese znaky obou nemocí – Crohnovy nemoci i ulcerózní kolitidy, v tom případě hovoříme o indeterminované kolitidě (Čierna, 2015). Jedná se o zánět tlustého střeva, kde jsou nacházeny překrývající se rysy ulcerózní kolitidy i Crohnovy nemoci, nebo různé atypické známky, takže je nemožné stanovit jistou a důvěryhodnou diagnózu (Lukáš, 1997). K lepšímu porozumění ISZ bylo v rámci komplexních onemocnění dosud identifikováno 163 lokusů (Jostins *et al.*, 2012).

Rozdělení ISZ - akutní a chronické záněty

ISZ lze rozdělit do dvou skupin, podle jejich původu a průběhu. Do skupiny akutních zánětů, které představují akutní reakci organismu na antigenní a mitogenní podněty, lze zařadit - záněty infekční (způsobené patogeny, mikroorganismy a narušením homeostáze mikrobiálního systému trávicího traktu), zánětlivé reakce na antigenní složky potravy, postradiační záněty a chemické záněty (Macfarlane *et* Macfarlane, 1997).

Do druhé skupiny chronických střevních zánětů se řadí nemoci s odlišnou genezí - ischemické kolitidy a enteritidy, enteritidy a kolitidy při autoimunních chorobách, kolitidy při séronegativní spondylartritidě, Behcetův syndrom, alergické enterokolitidy, divertikulitidy, vředové léze tenkého střeva při celiakii, amyloidová kolitida, uremická kolitida, kolitidy při AIDS, imunodeficiencích, po transplantacích kostní dřeně, kolitida při Hisprungově nemoci, diverzní kolitida (obvykle vzniká ve vyřazeném úseku střeva), neutropenní kolitidy a eosinofilní kolitidy (vyskytuje se u mužů kolem 30. - 60. roku života, mezi symptomy patří průjmy, enterorhagie, horečky a bolesti břicha s eozinofilií), Colitis cystica profunda (jedná se o benigní, nepříliš časté onemocnění), přechodná kolitida (self limited acute colitis) (Allan, 1997).

3.2.3 Léčba idiopatických střevních zánětů

Medikamentózní terapie poskytuje k terapii aminosalicyláty, kortikosteroidy, i některá imunosupresiva, léky interferující s mediátory zánětu nebo jiné postupy jako je plazmaferéza (viz tabulka 1) (Zbořil *et al.*, 1991).

Tabulka 1 - Shrnutí typů léčby ISZ a příklady léčebných přípravků

Typ léčby	Příklad léčebného přípravku
Aminosalicyláty	Pentasa
Kortikosteroidy (+ topické steroidy)	Butesonid
Imunosupresiva	Azathioprin, methotrexát, cyclosporin, takrolimus, mykofenolát
Léky interferující s mediátory zánětu	Anti-TNF α
Antibiotika	Chinoliny, metronidazol
Helministická terapie	<i>Necator americanus</i> , <i>Trichuris suis</i>
Plazmaferéza	-

Aminosalicyláty jsou základem léčby Crohnovy nemoci i ulcerózní kolitidy (př. léčivo Pentasa) (Dítě, 2001). Kortikosteroidy jsou v posledních letech obohaceny o skupinu

tzv. topických steroidů, které díky různým způsobům biodegradace dosahují vysoké lokální účinnosti a minimálních vedlejších účinků (př. Budesonid) (Lukáš *et al.*, 2001). Kortikosteroidy působí jak na mimobuněčné, tak na buněčné úrovni kombinací protizánětlivých a imunomodulačních, hlavně imunosupresivních účinků. K působení kortikosteroidů na subcelulární úrovni je nutná přítomnost zinku. Protizánětlivé účinky nastupují zčásti okamžitě, dominují účinky 6 hodin po injekčním podání, do 24 hodin však odezní a souvisí s kvantitativními změnami cirkulujících leukocytů. Ve vysokých dávkách působí kortikosteroidy na B lymfocyty, čímž mohou způsobit pokles tvorby IgA a IgG po 2-3 týdnech trvání léčby. Dlouhodobé účinky, které nastupují později, se uplatňují vlivem na T lymfocyty, především na helperové, méně potom na supresorové buňky. NK buňky nebývají ovlivněny. Hlavní nevýhodou léčby je snížená obranná imunitní reakce způsobená především tlumením funkčních schopností monocytů a makrofágů (Zbořil *et al.*, 2001).

Imunosupresiva byla vedle známého azathioprinu obohacena o metotrexát a ve světě frekventovaný cyklosporin (u nás se cyklosporin zatím užívá jen minimálně). Dále se užívá také takrolimus, mykofenolát aj. (Zbořil *et al.*, 2001). Z látek interferujících s mediátory zánětu (cytokiny a anticytokiny) se jako první začal používat anti-TNF α pro klinicky nezvladatelné formy Crohnovy nemoci (Stack *et al.*, 1996). U pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou nemocí, kteří nereagují dobře na léčbu pomocí aminosalicylátů a kortikosteroidů, se osvědčila mnohaměsíční léčba antibiotiky, především chinoliny nebo metronidazolem (Lukáš, 1997).

Helmintická terapie

Helmintové kolonizují více než třetinu světové populace. Jak vyplývá z epidemiologických studií, existuje vztah mezi četností kolonizace škůdců a prevalencí ISZ (Weinstock *et al.*, 2004).

Nejdříve bylo potřeba identifikovat helminty, kteří by mohli být bezpečně podávány pacientům. Byl zvolen *Trichuris suis* (tenkohlavec prasečí), pro kterého je prase přirozeným hostitelem, ale může také kolonizovat lidi (Beer, 1976). Nejdříve byl účinek kolonizace *T. suis* studován u 4 pacientů s CN a 3 pacientů s UC, kteří dostali v 1 dávce 2 500 životaschopných vajíček. Výsledky ukázaly zlepšení pacientů bez vedlejších účinků (Summers *et al.*, 2003). Druhá studie zahrnovala 29 pacientů s CN, kdy u 66 % pacientů došlo během 12 týdnů k ústupu onemocnění (Summers *et al.*, 2005). U 9 pacientů s CN byla provedena studie s využitím *Necator americanus* (měchovec americký). V tomto

případě 2 pacienti s aktivním onemocněním zaznamenali zlepšení symptomů (Croese *et al.*, 2006). V dnešní době se v helmintické terapii používají *Necator americanus*, *Trichuris suis*, *Trichuris muris*, *Trichuris trichiura* ova, *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Taghipour *et al.*, 2014).

Střevní helminti musí také překonat epiteliální bariéru střev, aby ovlivnil imunitu hostitele. Hlísti procházejí několika larválními stádii před tím, než se z nich vyvinou dospělí jedinci. Tyto larvy žijí uvnitř epiteliální vrstvy střeva a jsou úzce spojeny s hostitelskými intestinálními leukocyty. V některých případech je tedy možné, že larvy spíše než dospělci, interagují s hostitelským imunitním systémem a kontrolují ISZ (Weinstock *et Elliot*, 2013). I když se zdá, že helmintická infekce je účinná proti ISZ, léčba může představovat i řadu nevýhod. Měla by se zvážit přetrvávající infekce nebo invaze parazita do jiných tkání pacienta. Někteří helminti také mohou ovlivnit gastrointestinální fyziologii, kdy mohou ovlivnit hyperplazii pohárkových buněk a sekreci hlenu, což může mít za následek změnu GIT motility a příznaky jako je průjem a břišní křeče. Navíc je pro některé pacienty myšlenka infekce živým parazitem psychologicky těžko přijatelná. Proto by mohla léčba imunologicky účinnými helmintovými molekulami překonat nevýhody léčby živými parazity (Ruyssers *et al.*, 2008). Helminti vylučují inhibitory cysteinových proteáz, které interferují s prezentovanými antigeny a zvyšují sekreci IL-10 z makrofágů (Manoury *et al.*, 2001). Také sacharidy (například glykan lakto-N-fukopentaosa III) odvozené od helmintů přispívají k indukci imunitní odpovědi Th2 buněk (Fallon *et Alcami*, 2006).

3.2.4 Epidemiologie idiopatických střevních zánětů

Geografie

Z hlediska geografie se střevní záněty vyskytují častěji v severnějších státech v oblasti s vyspělejší ekonomikou - v Evropě se jedná o skandinávské státy a Velkou Británii, v USA především v severovýchodní části. Nízký výskyt se udává v Africe, Asii a Jižní Americe. Pravděpodobně zde hrají úlohu klimatické podmínky, jiný způsob výživy a nižší sociálně-ekonomický standard v jižních krajinách. Také rasové a etnické faktory ovlivňují výskyt nespecifických střevních zánětů (Čierna, 2015). Také se u těchto onemocnění vyskytují rasové rozdíly, kdy idiopatické střevní záněty jsou častější u bělošského obyvatelstva než u černošského. V Izraeli jsou více postiženi Aškenázové než Sefardové, obecně jsou však postiženi židé narození mimo Izrael (Lukáš, 1997).

Také častěji městského obyvatelstva než u venkovského. K prvním projevům nejčastěji dochází v mladém věku, v období dospívání, nebo v období mezi 50. až 80. rokem života (Lukáš *et* Šatrová, 2004).

Incidence a epidemiologie

Zajímavostí je, že v severní Evropě, Velké Británii a USA onemocní ulcerózní kolitidou o 30 % více žen než mužů. V ostatních státech se incidence téměř neliší (Lukáš *et* Šatrová, 2004). Incidence ulcerózní kolitidy v České republice je 3-5/100 000 obyvatel, prevalence je 21-47/100 000 obyvatel (prevalence = podíl počtu jedinců trpících danou nemocí a počtu všech jedinců ve sledované populaci v daném čase).

U Crohnovy nemoci je incidence 1-2/100 000 obyvatel a prevalence je 11-22/100 000 obyvatel. Existuje také přímá úměra mezi incidencí UC/CN a socioekonomickou úrovní. Onemocnění propuká buď mezi 15. - 25. rokem života, nebo mezi později 50. - 80. rokem života a není závislé na pohlaví (Ehrmann *et* Konečný, 2011).

Tyto onemocnění mají familiární výskyt v 15 – 20 % případů (Lukáš, 1997).

Během posledních padesáti let se počet pacientů trpících zánětlivými nemocemi střeva zvýšil až patnáctinásobně, navíc více postihuje malé děti a mladé lidi (Čierna, 2015). V případě genetické predispozice, mohou onemocnění vypuknout již před 20. rokem života. Onemocnění se také mohou objevit v prvním trimestru těhotenství, po ukončení šestinedělí, po infekci horních cest dýchacích, pokud je jedinec vystaven dlouhodobému stresu, nebo v případě ulcerózní kolitidy po přerušení kouření. K projevům těchto nemocí dochází velmi často na jaře a na podzim, což souvisí s častějším výskytem zánětů horních cest dýchacích (Lukáš *et* Starnovská, 1998).

3.2.5 Rizikové faktory

U obou onemocnění nebyly etiologie ani patogeneze uspokojivě vysvětleny. Ale v současnosti se předpokládá, že největší vliv mají genetické vlivy, faktory vnějšího prostředí a infekce (Kohout, 2003).

Strava

Jako jeden z možných faktorů je považována strava. Nemocní mají nižší spotřebu zeleniny a ovoce a vyšší spotřebu masa, mléka a vajec (Lukáš *et* Šatrová, 2004). Za protektivní účinek proti vzniku střevních zánětů jsou považovány omega-3 mastné kyseliny, které jsou obsaženy v rybím oleji (Lukáš, 1997).

Kouření

Prokázaným faktorem, který ovlivňuje vznik a průběh onemocnění je kouření. Je prokázáno, že u mnoha postižených ulcerózní kolitidou došlo k projevům onemocnění v době, kdy přestali kouřit. Naopak u kuřáků má tato nemoc lepší průběh, kdy nedochází k tak masivnímu poškození tlustého střeva. Ovšem v případě Crohnovy nemoci je vliv kouření na vznik a průběh nemoci naprosto opačný, kdy pacienti kuřáci trpí komplikacemi i těžším průběhem nemoci (Lukáš *et* Starnovská, 1998).

Psychogeneze

Psychosomatické faktory byly dříve považovány za velmi významné především u ulcerózní kolitidy, kdežto v dnešní době se jim přisuzuje spíše podpurný vliv na průběh imunologických pochodů, které jsou pod vlivem centrálně nervové regulace (Lukáš, 1997).

Infekce

V dnešní době je u Crohnovy nemoci zájem o infekční příčinu zaměřen na mykobakterie, *Campylobacter*, některé viry a zvláště L organismy, nicméně skutečný průkaz u žádného nebyl podán (Lukáš, 1997).

Ostatní rizikové faktory

Za další rizikové faktory jsou považovány infekční agens, příslušnost k vyšší (nebo naopak nižší) socioekonomické třídě, pobyt v klimatizovaných místnostech, dlouhá a nepravidelná pracovní doba, stres, kontraceptiva, nesteroidní antirevmatika, hygienické návyky, používání zubní pasty, alergie (He *et al.*, 2003), cesta do ciziny (souvisí s jiným bakteriálním osídlením trávicího traktu). Také vyšší konzumace rafinovaného cukru může asociovat se vznikem CN (Lukáš *et* Šatrová, 2004).

3.2.6 Diagnostika

Diagnostika ISZ bývá stanovena na základě klinických, endoskopických, histologických, radiodiagnostických a radionuklidových nálezů.

Klinické nálezy

Diagnóza ISZ by se měla vyšetřovat u pacientů trpících průjmem, nebo krvavým průjmem, zácpou, tenesmy (bolestivé a neefektivní vyprazdňování stolice), bolestmi břicha, teplotou a úbytkem na váze.

Endoskopie

Prvořadou roli v diagnostice ISZ hraje endoskopické vyšetření, zejména kolonoskopie. Jedná se o přímé vyšetření slizničních lézí a odběr tkáně pro následnou histologii. Nicméně

kolonoskopické vyšetření v době vysoké aktivity nemoci může být nebezpečné, kdy díky menší elasticitě stěny může dojít k perforaci střeva. V těchto případech se místo kolonoskopie využívá rektoskopie. Jako kontraindikace kolonoskopie se uvádí vznik toxické megakolon.

Radiodiagnostika

Role radiodiagnostiky spočívá ve stanovení diagnózy onemocnění, jeho lokalizace a rozsahu či v rozpoznání komplikací.

Irrigografie - ulcerózní kolitida

Irrigografie je metoda zobrazení tlustého střeva pomocí dvojího kontrastu. Do konečníku pacienta je aplikována baryová kontrastní látka a dále vzduch (pro dosažení roztažení střeva). Jako jediná kontraindikace vyšetření se uvádí perforace střeva. Pokud se u UC jedná o akutní stav, může se využít nativního snímku břicha místo irrigografie, který má význam při podezření na toxické megakolon.

Dále se k vyšetření UC může použít endosonografie, počítačová tomografie, magnetická rezonance a arteriografie.

Rentgenové vyšetření

V současnosti existují 2 přístupy rentgenového vyšetření CN – klasická pasáž a enteroklýza. Enteroklýza přináší přesnější informace, kvalitnější obraz orálních partií a zachycuje i minimální změny. Nevýhodou je zavedení sondy do dvanáctníku a delší čas vyšetření.

Dále se CN vyšetřuje pomocí ultrasonografie, počítačové tomografie, fistulografie, popřípadě radioizotopové vyšetření. Scintigrafie pomocí značených leukocytů slouží k detekci zánětu, posuzuje rozsah postižení, aktivitu zánětu a přítomnost komplikací. Jedná se o neinvazivní vyšetření, nevyžaduje přípravu pacienta, nicméně nevýhodou je radiační zátěž a falešně pozitivní/negativní výsledky.

Laboratorní vyšetření

Ulcerózní kolitida

Z laboratorních nálezů je u 70 % pacientů s UC nacházena v různých stupních anémie (z nedostatku železa, nebo kyseliny listové). V závislosti na aktivitě nemoci a přítomnosti infekcí je zvýšena sedimentace červených krvinek. U nemocných s těžkým průběhem dochází ke změnám acidobazické rovnováhy a koncentraci elektrolytů (snížení koncentrace kationtů sodíku, draslíku a hořčíku). Také u těžkého průběhu nastává snížená koncentrace bílkovin v krvi a nízké hladina sérového albuminu. Proteiny jako markery

akutní fáze jsou vyšetřovány – orosomukoid, alfa 1-antichymotrypsin, alfa 1-antitrypsin, C reaktivní protein (CRP), haptoglobin. Nicméně obvykle stačí sledovat krevní obraz (hemoglobin, leukocyt), sedimentaci erytrocytů a CRP. U 70 % nemocných s UC je také zvýšena pANCA (autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů).

Crohnova nemoc

Laboratorní nálezy jsou podobné jako u UC. U nemocných s CN dochází také k anémii a leukocytóze (zvýšený počet leukocytů v krvi) (Lukáš, 1997).

3.2.7 Imunologie a genetika idiopatických střevních zánětů

Z hlediska imunologie je známo mnoho faktorů, které se účastní ISZ a mají na ně vliv. Zpravidla se jedná o složky imunitního systému - imunitní komplexy, krevní buňky, chemotaktické peptidy, bakteriální produkty, cytokiny, eikosanoidy, oxidanty, komplement, interferon, HLA systém, faktor aktivující destičky, koagulační faktor (Lukáš, 1997).

Dominantní postavení v patogenezi CN a UC mají T lymfocyty, především jejich subpopulace CD4+ lymfocyty (jsou to pomocné T-helper lymfocyty). Dle tvorby cytokinů se CD4+ lymfocyty rozdělují do 3 skupin.

1. První skupina je Th1 subpopulace CD4+ lymfocytů tvořících protizánětlivé cytokiny (př. TNF α a interferon γ).
2. Druhou skupinou jsou Th2 buňky tvořící cytokiny s imunomodulačním účinkem (IL-4 a IL-5). Diferenciace CD4+ na Th1 a Th2 je determinována účinkem IL-12, který uvolňuje APC buňky (makrofágy a monocyty) po kontaktu s antigenem. Po diferenciaci CD4+ na Th2 je nutná přítomnost IL-4 a IL-6, které jsou také tvořeny APC buňkami. Zastoupení Th1 a Th2 u obou nemocí je naprosto odlišné. U CN jsou v převaze CD4+ buňky s fenotypem Th1, naopak u nemocných s ulcerózní kolitidou jsou v převaze CD4+ buňky s Th2 fenotypem.
3. Třetí skupina je malá subpopulace CD4+ buněk označovaná jako Th3 nebo T_{REG1}, které produkují hlavně TGF β , látku, která blokuje uvolňování protizánětlivě působících cytokinů.

V experimentálních modelech kolitid dochází po podání neutralizačních protilátek proti určitým cytokinům ke zmenšení nebo zhojení zánětu. Jako významné se prokázalo podávání protilátek proti TNF α a IL-12. Ke vzniku chronického střevního zánětu dochází v případě, je-li narušena přirozená rovnováha mezi Th1 a Th2 cytokiny (Kohout, 2003).

Časté jsou odchylky v různých imunitních mechanismech jako například časná hypersenzitivita (atopie), místní tkáňová reaktivita, protilátková a autoprotilátkou cytotoxicita zprostředkovaná buňkami, pozdní buněčná hypersenzitivita, imunitní komplexy, imunodeficience. Tyto odchylky byly prokázány u obou nemocí, avšak v různé kvalitě a kvantitě. Obě nemoci mají značné poruchy v syntéze a sekreci imunoglobulinů, především typ IgA (Lukáš, 1997).

Genetika:

Lokusy asociované s ISZ kódují geny podílející se na udržování epiteliální bariérové integrity, rozpoznávání antigenu, vrozené imunitní odpovědi a koordinaci adaptivní imunitní odpovědi (Sarlos *et al.*, 2014). V dnešní době je všeobecně uznávaný názor, že CN a UC vznikají v důsledku porušení geneticky determinované slizniční rovnováhy mezi mohutným imunitním systémem střeva a velkým lumenálním antigenním potenciálem mikrobů a potravin (Ehrmann *et Konečný*, 2011) .

Během minulého desetiletí se uskutečnily studie genomu (GWAS) s následnými meta-analýzami a měly velký úspěch při identifikaci nových lokusů spojených s ISZ. Dosud bylo identifikováno 163 lokusů (místo na chromozomu, kde se nachází gen či geny) souvisejících s ISZ (Jostins *et al.*, 2012), často včetně oblastí, které regulují genovou expresi v imunitních buňkách a intestinálním epitelu (Mokry *et al.*, 2014). Z těchto 163 lokusů bylo prokázáno, že 110 lokusů souvisí s oběma nemocemi, s CN i UC. Dalších 30 lokusů je v asociaci pouze s CN a 23 lokusů s UC (Jostins *et al.*, 2012).

Na druhou stranu existují i geny s protektivním účinkem vůči ISZ. Například v oblasti genu *IL23R* existuje nezávislé působení vícečetných alel, kdy nejvýznamnější variantou je Arg181Gln (rs11209096), kde vedlejší glutaminová alela poskytuje dvou- až trojnásobnou ochranu proti rozvoji ISZ (Duerr *et al.*, 2006). Tato alela s ochrannou funkcí má také za následek i další funkční změny, například snížení počtu IL-23 závislých CD4+Th17 a CD8+Tc17 buněk (Sarin *et al.*, 2011). Také dosud nebylo prokázáno, že by přenášení Arg381Gln alely vyvolalo zvýšené riziko dalších komplikací (např. Infekčních onemocnění). Znamená to teda, že snížení signalizace IL-23 může být prospěšné při léčbě ISZ (McGovern *et al.*, 2015). Tento ochranný účinek je u CN větší než u UC (Jostins *et al.*, 2012).

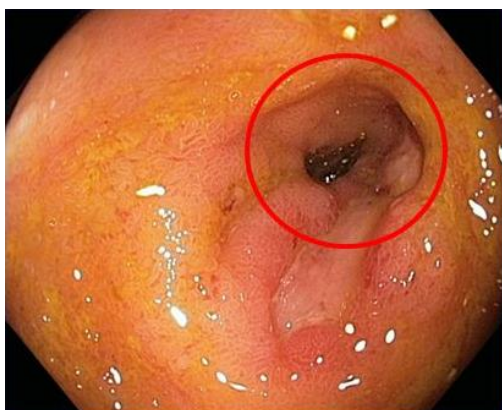
3.2.8 *Komplikace, těhotenství, plodnost*

Komplikace idiopatických střevních zánětů:

V průběhu idiopatických střevních zánětů se mohou projevit různé komplikace, za které může především těžký zánět ve střevě, imunitní reakce nebo narušení vstřebávání některých živin nebo žlučových kyselin. Jedny z možných komplikací - krvácení, proděravění střeva, zúžení střevního průsvitu, ohraničená hnisavá ložiska, píštěle (u Crohnovy nemoci), toxické rozšíření tračníku nebo zhoubná přeměna na nádor (Lukáš *et* Šatrová, 2004).

Nejčastější lokální střevní komplikace:

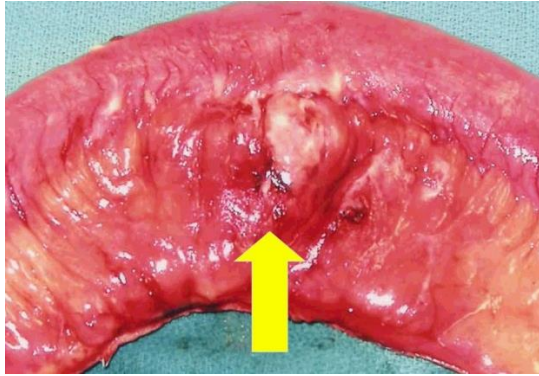
Stenóza - Jedná se o zúžení průsvitu střeva (viz obrázek 6), které vyústí v poruchu střevní průchodnosti, což se projevuje křečovitými bolestmi břicha, zvracením a nápadnými střevními zvuky. Vyskytuje se u 30 – 40 % lidí s Crohnovou nemocí a velmi často postihuje tenké střevo (Lukáš *et* Šatrová, 2004).



Obrázek 6 - Stenóza střeva po vyšetření kolonoskopií. Lze pozorovat zúžení průchodnosti střeva.

(Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/2703775/>. Navštívené 30. 11. 2017)

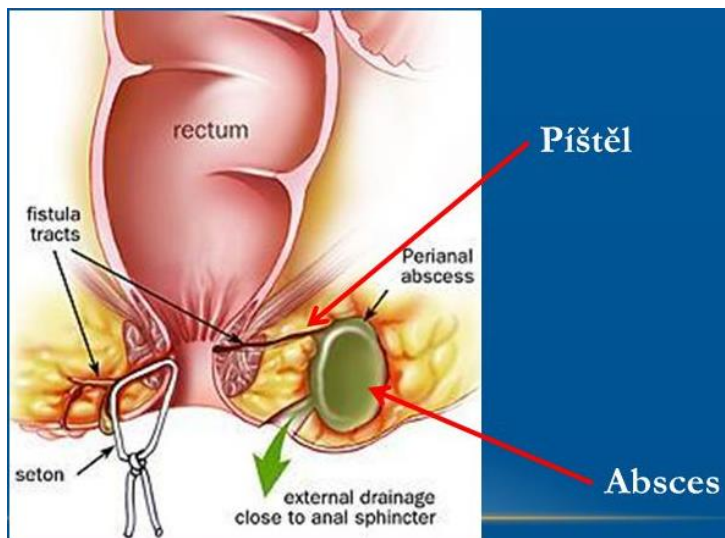
Perforace - Častá komplikace Crohnovy nemoci rozvíjející se v průběhu silného zánětu, kdy dochází k proděravění či protržení střeva a obsah dostane do okolních tkání (viz obrázek 7). Konečným výsledkem je vznik píštěle a abscesu, který je mimo střevní stěnu. Jedinou možnou léčbou je chirurgický zákrok (Lukáš *et* Šatrová, 2004).



Obrázek 7 - Perforace tenkého střeva po vyšetření endoskopickou retrográdní cholangiopankreatografií

(Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/2342807/>. Navštívené 30. 11. 2017)

Perianální absces a píštěl - Opět se jedná o typickou komplikaci Crohnovy nemoci. Jsou velmi časté a někteří odborníci je považují za projev určitého podtypu nemoci. Dochází ke vzniku neohrazeného hnisavého zánětu v oblasti hráze (tzv. vznik flegmóny) a k poškození funkce análních svěračů (viz obrázek 8). Kombinovaná chirurgická léčba s podáváním antibiotik, imunosupresiv a biologickou léčbou (Lukáš *et* Šatrová, 2004).



Obrázek 8 - Perianální absces a píštěl v okolí řitního kanálu

(Zdroj: <http://slideplayer.cz/slide/2703775/>. Navštívené 30. 11. 2017)

Mezi další lokální komplikace střeva můžeme zařadit septický průběh střevního zánětu, toxické megakolon, masivní krvácení či rakovinu tlustého střeva (Lukáš *et* Šatrová, 2004). Následkem imunitní reakce organismu mohou být také vzdálené projevy postihující kůži (u CN - nodózní erytém, u UC - pyoderma gangrenozum), oči (záněty spojivky či rohovky), klouby (artritida) a játra (vznik chronického zánětu). U pacientů se také vyskytují metabolické

komplikace jako například osteoporóza, chudokrevnost, nedostatek zinku a selenu, žlučové kameny či ledvinové kameny (Červenková, 2009).

Těhotenství a plodnost:

Plodnost u žen těmito nemocemi bývá téměř nenarušena, pouze v případě těžké aktivity nemoci, přestupu zánětu na vejcovody nebo vaječníky může dojít k poruchám plodnosti. U mužů bývá plodnost narušena v případě užívání léku sulfasalazinu, nicméně po vysazení léku se plodnost vrací do normálu. Pokud je nemoc v klidovém období u těhotné pacientky, je velmi pravděpodobné, že nemoc zůstane v klidu v průběhu celého těhotenství. Většina těhotenství končí porodem zdravého dítěte, nicméně je mírně zvýšený výskyt spontánních potratů (Lukáš *et* Šatrová, 2004).

3.3 Crohnova nemoc

3.3.1 Definice

Jedná se o chronické onemocnění postihující celou trávicí trubici bez zjevné příčiny. Nejčastěji je však postižena oblast přechodu tenkého a tlustého střeva. Postižený většinou utrpí bolestmi břicha, průjmy a váhovým úbytkem (Lukáš *et* Starnovská, 1998). Podle nedávných studií se výskyt CN u dětí a dospělých zvyšuje, kdy právě asi 25 % případů je diagnostikováno v období pediatrické péče (Day *et al.*, 2012). Jedna pediatrická studie v USA ukázala, že pacienti se ztenčenou střevní stěnou, mají více než 99% pravděpodobnost vzniku zánětlivého onemocnění střev, v případě pozitivních laboratorních nálezů zahrnujících zvýšenou hladinu calprotektinu ve stolici) (Canami *et al.*, 2006).

Co se týká klasifikace, CN se vyskytuje ve 2 typech - typ A a typ B. Typ A je agresivnější, tvoří se při něm píštěle a abscesy. Typ B je méně komplikovaný, na druhou stranu dochází ke vzniku stenóz (De Dombal *et al.*, 1971).

3.3.2 Genetika a patogeneze Crohnovy nemoci

S patogenezí Crohnovy nemoci je spojeno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), které jsou lokalizovány v genech, které se účastní procesů hrajících důležitou roli v mechanismech vrozené i získané imunity (Nys *et al.*, 2013). Mikrobiom proto hraje rozhodující roli v patogenezi CN (Wright *et al.*, 2015). Oblast zájmu ohledně ISZ a především CN je na chromozomech 1 a 16. Pericentromerická oblast chromozomu 16, která vykazovala spojení s genotypickými projevy CN, byla označena jako „locus ISZ-1“

V roce 2001 tři pracovní skupiny specifikovaly „locus ISZ-1“ a označily jej jako *NOD-2* (Kohout, 2003).

S Crohnovou nemocí souvisejí také tyto geny: *ATG16L1*, *IRGM* (souvisí s autofágií), *PTPN2*, *XBPI*, *LRRK2*, *ULK1* (Salem *et al.*, 2015).

Gen *ATG16L1*

Gen *ATG16L1* existuje ve 3 izoformách (α , β , γ) a *ATG16L1* protein, který je tímto genem kodovaný je adaptérovým proteinem složeným z N-terminální *ATG-5* vazebné oblasti a amino-terminální oblasti (podílí se na self-dimerizaci), po které následuje 7 domén tryptofan-asparagové kyseliny (Mizushima *et al.*, 2003) a dohromady tvoří 350 kDa tetramerní komplex (Kuma *et al.*, 2002). *ATG16L1* protein hraje zásadní roli při autofagii, interaguje s *ATG12-ATG5*, aby zprostředkoval konjugaci fosfatidylethanolaminu (PE) s LC3 (light chain 3) váčky, které jsou morfologicky podobné autofagozomům, a vzniká tak aktivovaná forma LC3-II. Tímto způsobem se řídí prodlužování vznikající autofagosomální membrány (UniProt, 2018).

Níže vypsány varianty genu *ATG16L1* souvisí s narušením buněčného procesu autofagie. Autofagosomy pravděpodobně vznikají aktivně, dynamickým procesem, kdy dochází k expanzi buněčné membrány. Tento proces umožňuje buňce oddělit a rozložit téměř jakkoliv velkou složku, kterou obsahuje včetně patogenu. Tato funkce je klíčová pro imunitní buňky střevního epitelu, které se na likvidaci bakterie podílejí. Ztráta schopnosti likvidovat střevní patogeny je spojena s CN, což prokázala mutace genu *ATG16L1*. Přesněji je tato mutace spojena s poruchou Panethových buněk, které pak vykazují poruchy exocytózy. Obsahují také degenerované mitochondrie a abnormální endoplazmatické retikulum. V těchto narušených Panethových buňkách dochází k up-regulaci genů spojených se zánětlivou odpovědí, což pak vede ke klinickým příznakům CN (Medical Tribune CZ, 2018).

Jedním z klíčových pokroků v rámci CN bylo spojení polymorfismu (SNPs) v *ATG16L1* se zvýšeným rizikem Crohnovy nemoci (Hampe *et al.*, 2007), především polymorfismus Thr300Ala (Levine *et al.*, 2015). Tato varianta označovaná rs2241880, která kóduje missense variantu (změna aminokyseliny v polypeptidovém řetězci) a vede k substituci threonin-alanin v aminokyselině na pozici 300. Jedná se o nejvíce převládající variantu Thr300Ala genu *ATG16L1*, což představuje přibližně 55 % alel v evropské populaci a 20 - 40 % alel v jiných populacích (Hampe *et al.*, 2007). Nicméně i tyto další varianty

ATG16L1 je spojováno s Crohnovou nemocí, ačkoliv varianta rs6431660 je spojována také s ulcerózní kolitidou. Varianty nalezené u CN:

- rs13412102
- rs12471449
- rs6431660
- rs1441090
- rs2289472
- rs2241880
- rs2241879
- rs3792106
- rs4663396 (Glas *et al.*, 2008).

Gen *ATG16L2*

Nedávno byla objevena nová izoforma *ATG16L2*, která obsahuje 2 možné sestřihové formy (α , β) (Nys *et al.*, 2013).

SNPs v *ATG16L2* jsou také spojovány s Crohnovou nemocí a také tvoří tetramerní komplexy s *ATG5* a *ATG12*. Nicméně není schopna nahradit funkci *ATG16L1* při tvorbě autofagozomu (Salem *et al.*, 2015).

Gen *NOD2*

U 25 % pacientů s CN se vyskytuje mutace v genu *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2), ale není zcela jasné, jak přesně se tato mutace podílí na vzniku a průběhu nemoci (Coulombe *et al.*, 2009). V tomto genu existují 3 spontánní nukleotidové polymorfismy spojeny s Crohnovou nemocí. Gen *NOD2* kóduje protein obsahující 1031 aminokyselin, jehož funkcí je regulace apoptózy a aktivace Nf κ B (nukleární faktor kappa B). Gen *NOD2* se strukturně skládá ze dvou oblastí, které jsou štěpitelné kaspázou - oblast vázající nukleotidy a část bohatou na leucin (LRR). Delecí v oblasti genu bohaté na leucin dochází k stimulaci aktivace NF κ B (Kohout, 2003). Pokud není funkce *NOD2* narušena, kóduje vznik receptoru, který rozpoznává bakterie napadající organismus a pak dochází ke spuštění obranné imunitní odpovědi. Receptor kódovaný *NOD2* (přesněji jeho část LRR) přednostně rozpoznává N-glykoly-MDP (muramyldipeptid), který se vyskytuje u mykobakterií. V případě napadení organismu mykobakteriální infekcí, dochází k silné imunitní odpovědi prostřednictvím *NOD2*

receptoru. Přítomnost mykobakteriální infekce je spolu s mutací v *NOD2* predispozicí CN (Coulombe *et al.*, 2009). Studie také prokázaly, že rizikové alely *NOD2* a *ATG16L1* lokusů byly spojeny s významným posunem ve složení střevního mikrobiomu, včetně snížení hladin *Faecalibacterium* a zvýšených hladin *Escherichia* (Kennedy *et al.*, 2014).

Pozitivní rodinná anamnéza je tedy nejsilnějším rizikovým faktorem pro vznik tohoto onemocnění (Kohout, 2003). Zkoumáním vztahu genotypu s fenotypem u Crohnovy nemoci byla zjištěna asociace genu *NOD2* s postižením ilea a stenózujícím typem choroby. U homozygotů propuká nemoc velmi brzo, zpravidla v ještě v dětském věku (Kohout, 2003). Z hlediska výskytu onemocnění se riziko vývoje CN zvyšuje 2x - 4x, v případě že se přenese 1 riziková alela. Pokud dojde k přenosu 2 rizikových alel, zvyšuje se riziko výskytu 20x - 40x (Cooney *et Jewell*, 2009).

HLA geny

HLA oblast nacházející se na chromozomu 16p21 obsahuje mnoho genů, které souvisí s imunitní funkcí. Mnoho let bylo studováno spojení mezi HLA a ISZ a také bylo potvrzeno několik souvisejících lokusů. Bylo prokázáno, že SNP rs9264942 nacházející se v blízkosti genu HLA-B vykazuje silnou asociaci s CN. Také bylo identifikováno několik rizikových alel souvisejících s CN a UC a genovým lokusem HLA-DRB1 (nejsilnější varianta spojována s ISZ je HLA-DRB1*01:03) (Ye *et McGovern*, 2016).

3.4 Ulcerózní kolitida

3.4.1 Definice

Jedná se o chronické onemocnění sliznice tlustého střeva, přesněji o zánět povrchových vrstev střevní stěny s výrazným rozptýleným krvácením ze sliznice. Dle postižení tlustého střeva lze tuto nemoc rozlišit do několika možných forem:

- proktitida - nejlehčí forma, zánět je omezen na oblast konečníku,
- levostranná ulcerózní kolitida - postižena je levá polovina tlustého střeva ke slezinnému ohbí tračnicku, extenzivní nebo difúzní ulcerózní kolitida - postižení více než 2/3 tlustého střeva (Lukáš *et Starnovská*, 1998).

V průběhu 20. století se změnily klinické projevy obou nemocí. Na počátku 20. století představovala ulcerózní kolitida smrtelné onemocnění s častými hnisavými komplikacemi, nicméně v současnosti je úmrtnost téměř nulová (Kohout, 2003).

Projevy:

Projevy nemoci určují tři hlavní faktory – rozsah zánětu, intenzita zánětlivých změn a doprovodná porucha funkce střeva. Vzájemnou kombinací vznikají klinické obtíže, které mají u každého pacienta sice jinou intenzitu, ale charakter těchto obtíží je velmi stereotypní. Podle rozsahu zánětu jsou rozlišovány 3 tvary – proktitida (distální tvar), ohraničený (levostranný) tvar a rozsáhlý (extenzivní) tvar (Červenková, 2009).

3.4.2 Genetika a patogeneze ulcerózní kolitidy

HLA geny

Bylo prokázáno, že SNP rs6927022 nacházející se v blízkosti genu HLA-DQA1 vykazuje silnou asociaci s UC (Ye *et* McGovern, 2016). HLA geny II. třídy - *DR2*, *DR9* a *DRB1*01:03*, byly identifikovány především v asociaci s UC. Jako gen s ochrannou funkcí byl identifikovaný gen *HLA-DR4* (Sarlos *et al.*, 2014).

Gen *CTLA4*

Cytotoxický T-lymfocytový antigen 4 (CTLA4) je inhibiční receptor exprimovaný aktivovanými T buňkami a také se jedná o důležitý downregulátor aktivace T buněk. *CTLA4* gen je dobrý kandidátní gen pro citlivost v rámci UC, protože působí jako negativní regulátor aktivace T buněk. Vyskytuje se na chromozomu 2q23 a bylo u něj zjištěno několik genetických polymorfismů.

Gen pro janus kinázu 2 Janus kináza 2 (JAK2) patří do rodiny tyrosinkináz. Bylo zjištěno, že SNP rs10758669, rs10975003 a rs10974944 v lokusu JAK2 jsou silně asociovány s UC.

Gen *STAT3*

STAT3 protein (signal transducer and activator of transcription 3) hraje klíčovou roli v různých buněčných procesech jako je růst buněk a apoptóza. Mezi SNPs ve STAT3 lokusu, které jsou spojené s UC, patří rs12948909 a rs744166.

Gen pro TNF α

TNF α (tumor necrosis factor alpha) je protizánětlivý cytokin a má významnou patogenní roli jak u CN, tak u UC. Gen *TNF α* se nachází v lokusu IBD3. Polymorfismus v poloze -308 je bodová mutace, kdy přítomnost G definuje běžnou variantu TNF1 a varianta A méně obvyklý typ TNF2. TNF α polymorfismy A-308G a T-857C zvyšují produkci TNF α a mohou korelovat s odlišným průběhem onemocnění nebo odezvou na léčbu.

Gen *MDR1*

Gen *MDR1* (multidrug-resistant transporter-1) je vynikající kandidátní gen pro patogenezi ISZ. Jednou z nevýznamnějších mutací genu je C3435T, který je spojen s UC, především u pacientů s rozsáhlou kolitidou.

Gen *NOD1*

Produktem genu *NOD1* je členem fylogeneticky konzervativní skupiny receptorů a jsou exprimovány v epiteliálních buňkách v celém GIT. Polymorfismus v LRR doméně ukázal souvislost se závažností onemocnění pacientů s UC.

Geny pro interleukiny

Nejvíce byly vyšetřovány geny *IL-10*, *IL-18* a *IL-23*. *IL-10* je hlavní protizánětlivý cytokin, který tlumí aktivovaný imunitní systém - inhibice prezentace antigenu a následné uvolňování protizánětlivých cytokinů. *IL-10* je rizikový gen jak pro UC, tak pro CN (Sarlos *et al.*, 2014).

3.5 Celiakální sprue

3.5.1 Charakteristika a epidemiologie

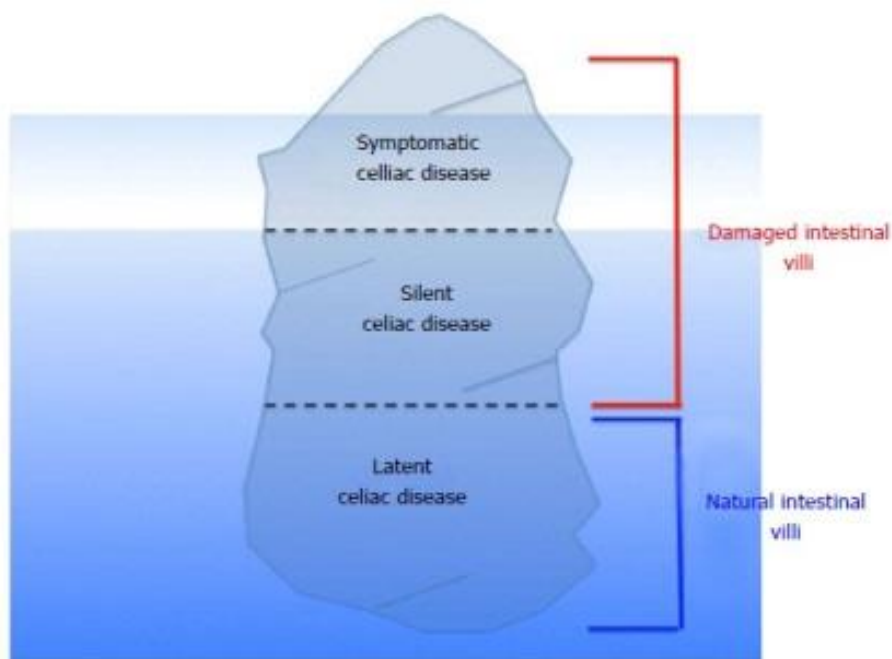
Celiakie také známá jako „celiakální sprue“, je chronické střevní zánětlivé onemocnění, které je vyvoláno glutenem, což je protein nalezený u pšenice, ječmene a žita, u geneticky náchylných jedinců (Troncone *et Jabri*, 2011). Celiakii popsal poprvé v roce 1888 Samuel Gee, ale až v roce 1953 se ukázalo, že důležitou roli v patologii hraje gluten (Losowsky, 2008). Gluten byl spojen s celiakií holandskými lékaři, kteří během hladomoru v letech 1944-1945, kdy byl nedostatek pšenice a žito, zjistili, že symptomy dětí s celiakií, zlepšily (Dicke *et al.*, 1953). Patofyziologie a patogenese onemocnění nejsou zcela jasné, předpokládá se, že onemocnění vzniká souhrou genetických, environmentálních a imunologických faktorů (Kupfer *et Jabri*, 2012). Nejčastějším projevem celiakie je únava, ztráta hmotnosti, průjem, anemie, osteoporóza a deprese. U pacientů s dlouhodobě neléčenou celiakií se navíc mohou objevit závažné komplikace - osteoporóza nebo maligní lymfom (Green, 2005).

Celiakie je velmi heterogenní nemoc závislá na věku pacienta, délce a rozsahu onemocnění (Parzanese *et al.*, 2017). V tabulce 2 jsou uvedeny nejčastější formy celiakie a jejich charakteristika.

Tabulka 2 - Charakteristika typů celiakie

Forma (typ) celiakie	Charakteristika
Typická	Nadýmání, chronický průjem, zácpa, meteorismus (zvýšená plynatost), bolest břicha, nauzea, zvracení, bolesti břicha
Atypická	Obvykle u starších dětí nebo dospělých, bez/velmi málo GIT příznaků
Tichá nebo asymptomatická	Sérologické a histologické abnormality bez klinických příznaků, často u jedinců s rodinnou anamnézou celiakie, u pacientů s autoimunitními nemocemi (např. Diabetes mellitus I.) nebo genetickými poruchami (např. Downův/Turnerův/Williamsův syndrom)
Latentní	Pozitivní sérologie
Potencionální	U jedinců, kteří nikdy neměli diagnózu celiakie, ale vykazují genetické pozadí spojené s celiakií, pozitivní sérologie
Refrakterní	Přítomnost malabsorpčních symptomů, které trvají 1 rok po přísné dietě

Celiakie je dnes jednou z nejčastějších geneticky podmíněných onemocnění u lidí (Parzanese *et al.*, 2017). Navzdory pokroku v diagnostice zůstává celková prevalence této nemoci dosud nejasná. Diagnostiku celiakie ukazuje tzv. model ledovce (viz obrázek 9), kdy některé případy jsou identifikovány díky typickým příznakům, zatímco ponořená část ledovce představuje všechny nediodagnostikované případy, které obvykle vykazují atypické, minimálně nebo dokonce žádné příznaky. (16)



Obrázek 9 - Model ledovce při diagnostikování celiakie

(Zdroj: <https://gottliebgi.com/gluten-sensitivity-and-celiac-disease/>. Navštívené 19. 3. 2018)

3.5.2 Diagnostika

Pokud je podezření na celiakii, pro potvrzení diagnózy je nutné provést sérologické vyšetření a následnou biopsii duodena (dvanáctník) (Abdulkarim *et al.*, 2003). U dětí se provádí odběr vzorku tkáně pomocí Coombsovy nebo Carreyovy kapsle. Jedná se o kapsli velikosti bonbónu, která je zavedena do oblasti 1. kličky tenkého střeva, kde se odebere vzorek. U dospělých se provádí odběr vzorku většinou pomocí gastroscopie (Kohout, 2006). Všechny níže uvedené metody jsou pro přehled shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 - Shrnutí vyšetřovacích strategií používaných v diagnostice celiakie

Sérologické testy	Anti-tkáňové transglutaminázové protilátky	ELISA
	Anti-endomysialní protilátky	Nepřímá imunofluorescence
	Anti-gliadinové protilátky	ELISA
	Protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům	ELISA
Histologie	Střevní biopsie	Endoskopie
Genetická analýza	HLA testování (HLA-DQ2 / - D8)	HLA typizace

Vysvětlivky:

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

HLA - Human leukocyte antigens

Sérologické testy:

Anti-tkáňové transglutaminázové protilátky

Nejlepší strategií v sérologii je detekce anti-tkáňových transglutaminázových protilátek IgA (at-TG) přítomných v krvi na základě metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Tyto protilátky vykazují až 97% citlivost, 96% specifitu a až 98% přesnost. Pro potvrzení testu se používají IgA anti-endomysialní protilátky (IgA EMA) díky jejich vyšší specifitě (až 100% specifita, 94% citlivost a 97% přesnost) (Volta *et Villanacci*, 2011). IgA EMA jsou rutinně detekovány nepřímou imunofluorescencí (Ludvigsson *et Green*, 2011).

Anti-gliadinové protilátky

Anti-gliadinové protilátky (AGA) především typu IgG a IgA se dnes již kvůli nízké citlivosti, specifitě a špatné přesnosti používat příliš nedoporučují, s výjimkou mladších dětí (Rubio-Tapia *et al.*, 2013).

Protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům

Detekce protilátek proti gliadinu byla nově nahrazena vyvinutými imunoanalýzami, které využívají protilátky proti deamidovaným gliadinovým peptidům (IgA a IgG) (Parzanese *et al.*, 2017).

Stanovení fekálního calprotectinu

Calprotectin je citlivý marker pro zánětlivé patologické onemocnění střev. Vyšetření fekálního calprotectinu je jednoduchý neinvazivní test, který může pomoci vyhnout se kolonoskopii (EUC laboratoře, 2018).

Histologie:

Standardem pro diagnostiku celiakie u dospělých je také střevní biopsie pomocí endoskopie, kdy se sledují patologické vlastnosti střevní sliznice (Parzanese *et al.*, 2017).

Genetická analýza

HLA testování není prováděno rutinně u všech případů celiakie, ale jen tehdy je-li sporná diagnóza. Studie prokázaly, že pouze 0,4 % pacientů s celiakií je HLA-DQ2/-DQ8 negativní (Catassi *et Fasano*, 2010).

3.5.3 Genetika, patogeneze a faktory hrající roli u celiakie

Nejsilnějšími a nejlépe charakterizovanými genetickými faktory citlivosti na celiakii jsou geny lidského leukocytového antigenu (HLA) II. třídy známé jako *HLA-DQ2* a *HLA-DQ8*, které jsou nezbytné pro rozvoj onemocnění. Přibližně 25 - 30 % jedinců evropské populace nese náchylnost k celiakii v genu *HLA-DQ2*, ale pouze u 4 % z těchto jedinců se celiakie opravdu vyvine, což podtrhuje roli dalších faktorů (Mearin *et al.*, 1983). Studie GWAS identifikovaly i řadu non-HLA genetických faktorů spojených s celiakií, které k riziku vzniku nemoci zásadně nepřispívají, ale mají velký potenciál při studiu patogeneze celiakie (Kupfer *et Jabri*, 2012).

HLA-DQ2 a HLA-DQ8 geny

HLA (Human Leukocyte Antigens) je název hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) u lidí. Tyto geny se nacházejí na chromozomu 6 a jsou rozděleny do tříd (I. - III.). HLA-DQ je molekula II. třídy na chromozomu 6p21.3 zodpovědná za prezentaci peptidů (antigenů) exogenního původu. HLA-DQ se skládá z heterodiméru kódovaného *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1*. Genetika celiakie je složitá, protože počet, typ a konfigurace alel DQA1 a DQB1 určují riziko onemocnění. Nejvyšší rizikovou skupinou jsou homozygoti nesoucí DQB1*02 u obou chromozomů, kdy je tato skupina také spojena s mladším věkem nástupu onemocnění a složitějším klinickým průběhem. Studie prokázaly, že odpověď CD4+ pomocných T buněk u homozygotních jedinců DQB1*02 je silnější než reakce u heterozygotních jedinců.

Vývoj celiakie u jedinců, kteří jsou HLA-DQ2 a HLA-DQ8 negativní, je extrémně vzácný.

Při celiakii tyto molekuly HLA předkládají glutenové peptidy CD4+ T buňkám a tím je aktivují (Kupfer *et Jabri*, 2012).

Non-HLA genetické faktory

Dosud bylo zkoumáno 115 genů non-HLA genetické povahy souvisejících s celiakií, které mají význam při studiu patogeneze (Kupfer *et Jabri*, 2012). Například jeden z těchto genů se může vztahovat ke genetickým variantám na chromozomu 19 v genu *MYO9B* kódující protein myosin IXB, který může potencionálně reagovat na bezlepkovou dietu (Parzanese *et al.*, 2017).

Environmentální faktory

Environmentální faktory hrají důležitou roli v patogenezi celiakie. Primárním spouštěcím faktorem tohoto onemocnění je gluten, který obsahuje dva různé typy proteinů - gliadiny a gluteniny, schopné vyvolat onemocnění. Peptidy obsažené v sóji a žitu - hordeiny a secaliny, jsou také schopné vyvolat celiakii (Vader *et al.*, 2003), na rozdíl od ovesných peptidů - aveninů, které celiakii vyvolávají zřídka (Arentz-Hansen *et al.*, 2004). Gliadiny, gluteniny, hordeiny a secaliny obsahují vysoký obsah prolinů a glutaminů, které je činí odolnými proti degradaci žaludečních kyselin, pankreatických enzymů, protože tyto látky postrádají prolyl-endopeptidázovou aktivitu (Kupfer *et Jabri*, 2012). Peptidové fragmenty, které byly odolné vůči degradaci, mohou být transportovány přes epitel primárně transcelulárními cestami (Heyman *et al.*, 2011). Nicméně není zcela jasné, zda je změněná střevní propustnost primární příčinou nebo důsledkem střevního zánětu (Kupfer *et Jabri*, 2012).

Mikrobiom

Studie intestinálního mikrobiomu u celiakie jsou stále v počátečních stádiích výzkumu. Dosud studie prokázaly rozdíly v přítomnosti bakterií *Bacteroides*, *clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus* ve stolici nebo střevní sliznici. Navzdory technologickému pokroku při studiu mikroorganismů v GIT zůstává řada otázek nezodpovězených. Nejdůležitější je asi otázka, zda jsou změny ve střevní mikroflóře příčinou nebo důsledkem střevního zánětu (Kupfer *et Jabri*, 2012).

Další environmentální faktory:

Vedle střevní mikroflóry byla zkoumána celá řada dalších faktorů - dětské infekce (především rotaviry), kojení / umělá výživa, délka kojení. Nejnovější studie potvrzují

úlohu rotavirů v patogenezi celiakie, kdy časté rotavirové infekce v dětském věku přispívají ke zvýšenému riziku celiakie (Stene *et al.*, 2006).

Jako další environmentální faktory můžeme uvést typ stravy u dětí (kojení mateřským mlékem nebo podávané umělá výživa) či délku kojení, která hraje roli ovlivňující střevní mikrobiom (Silano *et al.*, 2010). Obecně kojení mateřským mlékem má protektivní účinek, kdy v závislosti na délce kojení snižuje riziko celiakie až o 52 %. Hypotézy pro protektivní účinek kojení u celiakie zahrnují ochranu před infekcemi, sníženou imunitní odpověď v důsledku IgA protilátek v mateřském mléce a nepřítomnost glutenu ve stravě (Akobeng *et al.*, 2006).

U nemocných s celiakií byly také nalezeny zvýšené počty intestinálních gramnegativních bifidobakterií (Bevins *et Salzman*, 2011). Dalšími faktory související s celiakií mohou být těžké kovy a bakteriální tTG (tkáňová transglutamináza) přítomná v potravinách (Kupfer *et Jabri*, 2012).

3.5.4 Imunologie

Imunitní dysregulace je jádrem patogeneze, protože vysvětluje průběh zánětu tenkého střeva. Jakmile jsou nestrávené peptidové fragmenty z pšenice, žita a ječmene transportovány do vrstvy slizničního vaziva (lamina propria), jsou podrobeny deaminaci pomocí tkáňové transglutaminázy 2 (tTG2), která konvertuje glutamin na glutamát, čímž dochází k zavedení negativních nábojů, které mají silnější vazebnou afinitu k HLA-DQ2 a -DQ8 molekul na APC buňkách (Liu *et al.*, 2002). Za normálních fyziologických podmínek se tTG2 rychle inaktivuje oxidací. Zatímco v redukujícím prostředí, jako je probíhající zánět, tTG2 zůstává v aktivní formě (Sollid *et Jabri*, 2011). Jak bylo zmíněno výše, charakteristickým znakem celiakie je přítomnost anti-tTG2 protilátek (hlavně IgA). Roli těchto protilátek v patogenezi podporují extra-intestinální projevy celiakie jako například dermatitis herpetiformis. V tomto dermatologickém stavu spojeném s celiakií se anti-tTG3 protilátky exprimují v dermálních papilách a předpokládá se, že zprostředkovávají tvorbu lézí (Sardy *et al.*, 2002).

3.5.5 Nemoci nebo poruchy vyskytující se v asociaci s celiakií

Termín související stavy, se týká stavů, které se často vyskytují v asociaci s celiakií. Patří sem také genetické poruchy jako je Downův syndrom, Turnerův syndrom a Williamsův syndrom, či autoimunitní nebo neurologické poruchy. Pokud je celiakie diagnostikována pozdě, mohou se u pacienta vyvinout různé typy komplikace - osteoporóza, lymfom

intestinálních T-lymfocytů spojených s enteropatií, kolagenní sprue, ulcerózní jejunoleitida, non-Hodgkinův lymfom, adenokarcinom tenkého střeva, reprodukční poruchy (snížená plodnost u mužů i žen) (Parzanese *et al.*, 2017).

Diabetes mellitus typu 1

Jedním z nejrozšířenějších a široce prozkoumávaným onemocněním spojeným s celiakií je Diabetes mellitus typu 1. Studie uvádějí, že u dětí představuje diabetes 5 - 10 násobné zvýšení rizika celiakie. Toto zvýšení může být částečně vysvětleno genetickým rizikem představovaným HLA systémem (Bao *et al.*, 1999).

Autoimunitní poruchy štítné žlázy

U pacientů s celiakií byla hlášena zvýšená prevalence (2 - 5 %) poruch štítné žlázy (hypertyreóza - Gravesova choroba nebo hypotyreóza - Hashimotova tyreoiditida) (Chn'ng *et al.*, 2007).

S těmito poruchami štítné žlázy byly také spojené rizikové genetické faktory představované HLA-DQ2 a HLA-DQ8 haplotypy. Dalším mechanismem souvisejícím s těmito dvěma stavy je abnormální absorpce s následným nedostatkem selenu. Abnormální absorpce selenu při celiakii může být faktorem, který vede přímo k poškození štítné žlázy, protože štítná žláza je obzvláště citlivá na nedostatek selenu (Stazi *et Trinti*, 2010).

Autoimunitní hepatitida a další formy postižení jater

Předpokládá se, že mechanismus vedoucí k poškození jater souvisí se vstupem zánětlivých molekul a antigenů do portálního oběhu (portální oběh jater - kapiláry ve střevech odvádějí látky z potravy do vrátnicové žíly, ta se zanořuje do jater a větví se do dalšího řečiště - játra) (Parzanese *et al.*, 2017).

Neurologické poruchy

Zaznamenán byl také potencionální vztah mezi celiakií a různými neurologickými poruchami. Nejčastějším neurologickým stavem u pacientů s celiakií bývá epilepsie (Gobbi, 2005).

3.5.6 Přístupy v terapii a léčba

Všechny níže uvedené přístupy v terapii a možnosti léčby celiakie jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tabulka 4 - Typy terapií u celiakie a u pacientů nereagujících na dietu a jejich funkce v organismu

Typ terapie	Využívané látky	Funkce
Celoživotní dieta	-	Absence glutenu ve stravě
Imunoregulační léčba	Protizánětlivé sloučeniny - kortikosteroidy (budesonid), imunosupresiva	Tlumení zánětlivé reakce vyvolané imunitním systémem v GIT
	Protilátky proti interferonu γ (anti-INF- γ)	INF- γ vyvolává zánětlivou reakci, aktivuje metaloproteinázy, které poškozují sliznici, anti- INF- γ zabraňují poškození zdravé střevní sliznice
	Protilátky proti tumor necrosis factoru α (anti-TNF- α), např. infliximab	Podobná funkce jako protilátky proti INF- γ
	Protilátky proti interleukinu 15 (IL-15)	Vyšší hladina IL-15 vede ke stimulaci a proliferaci cytotoxických T-lymfocytů, které indukují apoptózu, rozvoj celiakie
	Interleukin 10 (IL-10)	Imunoregulační cytokin potlačující sekreci zánětlivých cytokinů z Th1 buněk, léčba IBD a celiakie
Enzymy degradující gluten	Enzym prolyl-endorpeptidáza	Urychlení štěpení glutenu v GIT
Selektivní inhibice tTG2	Inhibitory - cystamin, dihydroisoxalové sloučeniny (zatím studie na zvířecích modelech)	Snížení imunitní odpovědi T buněk
Blokace vstupu glutenu do střevního epitelu	Zonulinový inhibitor larazotid	Oprava střevní bariéry
Inhibice Rho kinázy	-	Regulace permeability intestinálních buněk
Vakcinace	Soubor glutenových peptidů	-

Celoživotní bezlepková dieta

Obecně ke klinickému zlepšení dojde během několika týdnů, ale poškozená tkáň sliznice se obnoví přibližně za 1 - 2 roky (Lionetti *et* Catassi, 2011). Vzhledem k tomu, že pacienti s celiakií mohou mít také nedostatek laktázy (sekundární poškození epiteliálních buněk) je třeba se v prvních týdnech léčby vyhnout i mléku a mléčným výrobkům (Ludvigsson *et* Green, 2011).

Selektivní inhibice tTG 2 a blokace procesu deaminace

V budoucnu by jedním z možných přístupů k léčbě celiakie mohla být selektivní inhibice tTG 2 a následná blokáda procesu deaminace. Dosud bylo identifikováno několik typů kompetitivních reverzibilních i ireverzibilních inhibitorů tTG2 jako potencionálních sloučenin pro léčbu celiakie, neurologických poruch a některých druhů rakoviny (Klöck *et al.*, 2010). Nedávné studie u myši prokázaly, že cystamin působí jak inhibitor tTG2 a jeho přítomnost vede ke snížení odpovědi T buněk (Molberg *et al.*, 2001). Také dihydroisoxalové sloučeniny jsou ve studiích na zvířecích modelech velkým příslibem do budoucna (Choi *et al.*, 2005). Nicméně klinické studie u člověka, kvůli potencionální interakci s životně důležitými biologickými cestami, nebyly provedeny. Dalším možným přístupem je blokace vazebného místa pro gliadin v molekulách HLA-DQ2/DQ8 pomocí gliadinových antagonistů, což by mohlo potlačit proces prezentace T buňkám a následně poskytnout další přístup k léčbě celiakie.

V případě, že pacienti nereagují na dietní léčbu, mohou jim být nasazeny imunomodulátory k inhibici zánětlivého procesu (Rashtak *et* Murray, 2012).

Enzymy degradující gluten

Tato terapie využívá enzymu prolyl-endopeptidázy, který je exprimovaný různými mikroorganismy, byla navržena k urychlení štěpení glutenu v GIT a tím i k eliminaci odpovědi T buněk (Fasano *et al.*, 2008).

Blokace vstupu glutenu do střevního epitelu

Zonulinový inhibitor larazotid opravuje chyby střevní bariéry (Parzanese *et al.*, 2017).

Inhibice Rho kinázy

Zvýšení intestinální permeability závisí na aktivitě Rho kinázy. Lék by mohl být použit ke zjištění, zda inhibice Rho kinázy může u pacientů zvrátit zvyšování intestinální permeability závislé na glutenu (McKerracher *et* Higuchi, 2006).

Vakcinace

Byly založeny klinické studie založené na vakcinaci souboru glutenových peptidů, které jsou rozpoznávány HLA-DQ2 molekulami. Nicméně jsou nutné další studie kvůli riziku aktivace imunitního systému v souvislosti s vakcinací a možnými vedlejšími účinky (Sollid *et* Khosla, 2011).

4. Materiál a metody

4.1 Studovaní jedinci a materiál

V experimentální části byl sestaven v anonymní formě soubor 2 446 pacientů, kteří byli vyšetřeni pro podezření na CN, UC nebo celiakii v Laboratořích AGEL Nový Jičín v letech 2014 - 2017. Z hlediska biologického materiálu se jednalo o fekálie, plazmu nebo krevní sérum pacientů.

4.2 Stanovení kalprotektinu ve stolici pomocí ELISA testu

4.2.1 Princip metody

Kalprotektin ELISA je kvantitativní metoda ke stanovení kalprotektinu ve vzorcích stolice a využívá se ke stanovení aktivity a sledování odpovědi na léčbu pacientů s UC nebo CN. Kalprotektin je vápník a zinek-vazebný protein o molekulové hmotnosti 36 kDa a je produkován polymorfonukleárními neutrofilními granulocyty (PMN), monocyty a buňkami dlaždicového epitelu. Po navázání vápníku může dojít k odolání degradace leukocytárních a mikrobiálních enzymů. Tím, že soutěží s mnoha odlišnými enzymy, kalprotektin může inhibovat mnoho na zinku závislých enzymů. Je zvláště důležité, aby koncentrace kalprotektinu ve stolici korelovala s počtem PMN putujících do lumen střeva. Dále zánětlivé onemocnění střeva poskytují silný signál kalprotektinu tj. nárůst referenčních hodnot je pětikrát až tisíckrát vyšší než u zdravých jedinců.

Kalprotektin ELISA je založen na přípravě extraktu ze stolice s využitím patentovaného pufru Feacal Extraction Buffer. Hladina kalprotektinu je determinována testováním tohoto extraktu pomocí ELISA testu specifického pro kalprotektin. V ELISA testu jsou vzorky a standardy inkubovány v separovaných mikrotitračních jamkách potažených 0,2monoklonálními protilátkami, které vážou kalprotektin. Po inkubaci a promytí jamek se nechá navázaný kalprotektin reagovat s enzymově značenými, imunoafinitně-purifikovanými kalprotektin-specifickými protilátkami. Po této reakci je množství enzymu vázaného v mikrotitračních jamkách úměrné množství kalprotektinu ve vzorku nebo standardu, který je determinován inkubací se substrátem pro enzym za vzniku barevného produktu. Intenzita zbarvení je stanovena absorbancí s využitím ELISA readeru a je úměrná koncentraci kalprotektinu ve standardech a vzorcích. Test se kalibruje použitím kalprotektinu purifikovaného z extraktu leukocytů.

4.2.2 Biologický materiál

Vzorky stolice pacientů (1 - 5 g)

4.2.3 Použité chemikálie

Reagencie obsažené v kitu CALPROLAB Calprotectin ELISA (ALP)

Mikrotitrační destička s 96 jamkami potažená afinitně-purifikovanými myšími monoklonálními protilátkami specifickými pro kalprotektin

5x vzorkovací ředící pufr (pH 8,0 ± 0,2): ředění 20 ml vzorkovacího pufru + 80 ml destilované H₂O

20x promývací pufr (pH 7,8 ± 0,2): ředění 50 ml promývacího pufru + 950 ml destilované H₂O

2,5x extrakční pufr ((pH 8,0 ± 0,2): ředění 90 ml extrakčního pufru + 135 ml destilované H₂O

Standardy kalprotektinu: standard A (0 ng/ ml); standard B (7,8 ng/ ml); standard C (31,3 ng/ ml); standard D (62,5 ng/ ml); standard E (125 ng/ ml); standard F (500 ng/ ml)

Kontroly pro kalprotektin (pozitivní/negativní)

Konjugát: značená alkalická fosfatasa, imunoafinitně-purifikované polyklonální králičí protilátky proti kalprotektinu

Enzymový substrátový roztok

Destilovaná voda

4.2.4 Použité přístroje

Extrakční trubička se spirálou (součást kitu)

Vortex (Biosan)

Automatické pipety - 10 - 1000 µl (Eppendorf)

Multikanálová pipeta 100 µl (Eppendorf)

Třepačka

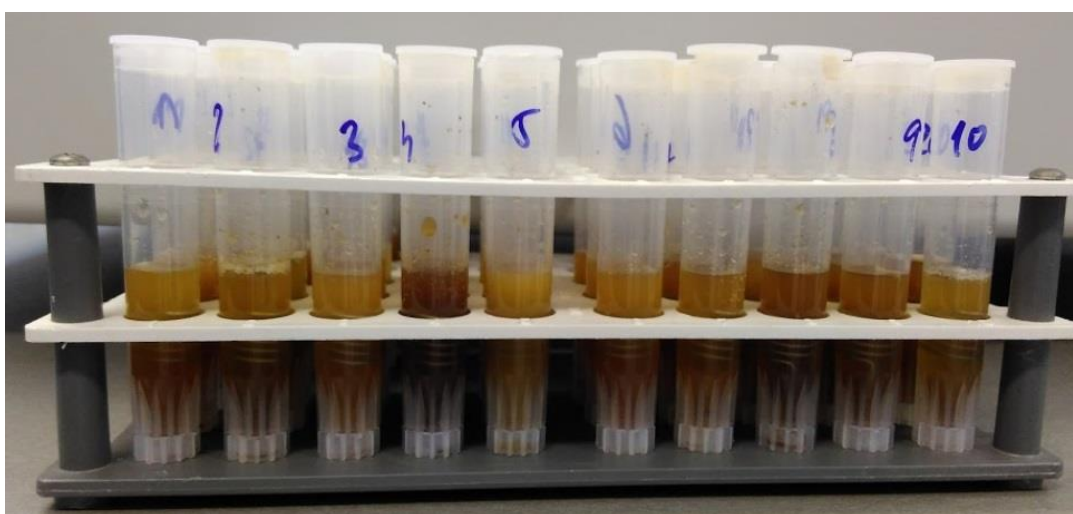
Stopky

ELISA reader (BioTek)

4.2.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Do jamek v extrakčních zkumavkách se nabralo malé množství stolice pacientů a do každé zkumavky se přidaly 4 ml 2,5x naředěného extrakčního pufru (viz Obrázek 10). Po řádném promíchání na vortexu se připravil 5x zředěný vzorkovací pufr, pomocí kterého se ředily

vzorky stolice v poměru 1 : 100 (tj. 10 μ l vzorku stolice a 990 μ l připraveného vzorkovacího pufru). Následně se do jamek mikrotitrační destičky podle schématu napipetovalo 100 μ l standardů, kontrol a naředěných vzorků. Mikrotitrační destička se poté nechala inkubovat 35 minut na třepače při 500 - 700 rpm. Po uplynutí této doby se mikrotitrační destička 3x promyla připraveným 20 zředěným promývacím pufrům. Do jamek se připipetovalo 100 μ l konjugátu a opět se inkubovalo na třepače 35 minut při 500 - 700 rpm. Po inkubaci se destička opět 3x promyla promývacím pufrům, do jamek se připipetovalo 100 μ l substrátu a destička se nechala inkubovat 30 minut bez třepání a ve tmě. Takto připravená destička se změřila na fotometru při 405 nm a pro lepší čtení se výsledky vynásobily 5x.



Obrázek 10 - Fotografie extrakčních zkumavek při extrakci kalprotektinu ze stolice.
(Fotografie: Manuela Trojáčková)

4.3 Stanovení autoprotilátek proti endomyziu ve třídě IgA metodou nepřímé imunofluorescence - technika TITERPLANE

4.3.1 Princip metody

Stanovení autoprotilátek proti endomyziu (EM) ve třídě IgA je vysoce senzitivní a specifický test při diagnostice celiakie, kdy specifita pro neléčenou celiakii je 98 – 100 %. Důležité je také monitorování hladiny těchto protilátek při sledování úspěšnosti bezlepkové diety. Vyšetření autoprotilátek proti endomyziu ve třídě IgG má malý diagnostický význam a hodí se především k monitorování pacientů s celiakií, kteří trpí zároveň selektivním IgA deficitem.

Technika TITERPLANE byla vyvinuta ke standardizaci imunologické analýzy. Vzorky nebo značené protilátky se aplikují na reakční políčka reagenčních nosičů a poté se na tyto nosiče pokládají sklíčka s biočipy. Všechny biočipy přicházejí do kontaktu s okolní tekutinou a jednotlivé reakce jsou zahájeny současně. Kapalina je uzavřena v omezeném prostoru, proto se nemusí používat vlhkostní komůrky. Díky tomu je možné inkubovat jakýkoliv počet vzorků vedle sebe a to za stejných podmínek.

Tato metody byla využita k *in vitro* stanovení lidských protilátek v séru nebo plazmě. Zmrazené řezy jater primátů se inkubují s naředěným vzorkem pacienta, kdy při pozitivní reakci se na antigeny navážou specifické protilátky třídy IgA, IgG a IgM. V dalším kroku se poté tyto navázané protilátky detekují pomocí fluoresceinem značených anti-lidských protilátek a výsledky se odečtou pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Stanovení autoprotiátek proti endomyzium (EM) ve třídě IgA je vysoce senzitivní a specifický test při diagnostice celiakie. Specifita pro neléčenou celiakii je 98 – 100 %. Důležité je také monitorování hladiny těchto protilátek, které rychle reagují na bezlepkovou dietu a slouží tak ke sledování úspěšnosti dietního režimu. Vyšetření autoprotiátek proti endomyzium ve třídě IgG má malý diagnostický význam a hodí se především k monitorování pacientů s celiakií, kteří trpí zároveň selektivním IgA deficitem.

4.3.2 Biologický materiál

Sérum vyšetřovaných pacientů naředěných v PBS pufru v poměru 1 : 10 (90 μ l PBS pufru a 10 μ l séra)

4.3.3 Použité chemikálie

Souprava Liver (monkey) IgA (Euroimmun)

Sůl pro PBS (pH 7,2) (Euroimmun)

PBS pufr (pH 7,2 - 7,4): Balení soli pro PBS se rozpustí v 1 litru destilované vody a přidá se 2 ml Tween 20

Tween 20 (Euroimmun)

FITC (fluorescein isothiokyanát) značená protilátka IgA (Euroimmun)

Montovací medium (glycerol) (Euroimmun)

Destilovaná voda

4.3.4 Použité přístroje

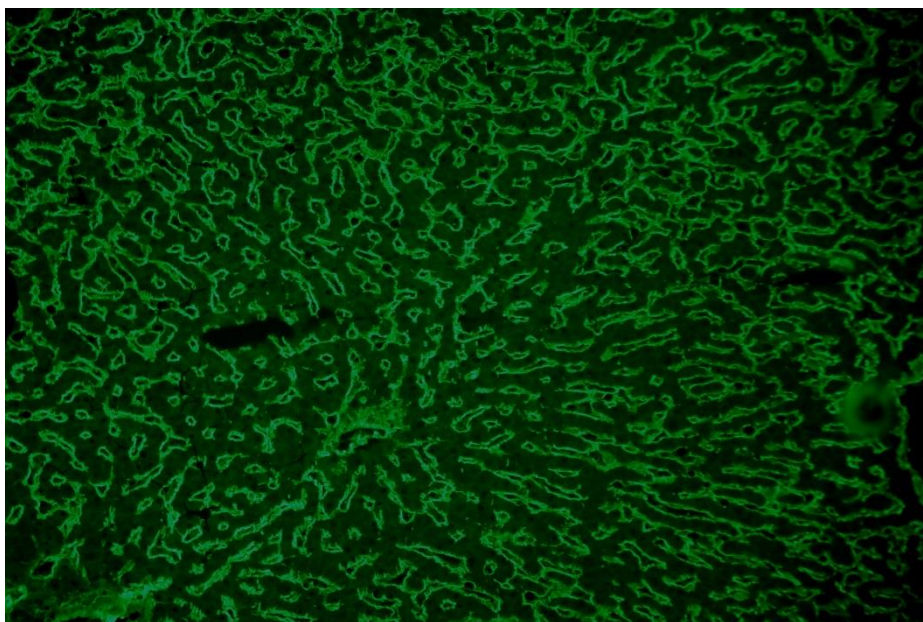
Fluorescenční mikroskop Olympus BX41

Vortex V-1 plus (Biosan)

Automatické pipety: 0,5 - 10 μ l; 10 - 100 μ l; 20 - 200 μ l; 100 - 1000 μ l; 500 - 5000 μ l
(Eppendorf)

4.3.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Na skleněnou kapací podložku se pipetovalo 25 μ l naředěného séra pacientů, pozitivní a negativní kontroly a opatrně se na ni přiložilo sklíčko se substráty otočené dolů. Po 30 minutové inkubaci ve tmě se opatrně uvolnilo sklíčko se substráty z kapací destičky, opláchlo se proudem PBS pufru a na 5 minut se vložilo do dózy s PBS pufrům. Na připravené pozice na destičce se napipetovalo 20 μ l FITC konjugátu IgA a opatrně se přiložilo sklíčko se substráty. Následovala další inkubace 30 minut při laboratorní teplotě a poté se opět sklíčko se substráty z kapací destičky opláchlo pod proudem PBS pufru a na 5 minut vložilo do dózy s PBS pufrům. Na krycí sklíčko se na číselné pozice nakapalo co nejmenší kapky montovacího média (roztok glycerolu a PBS pufru) a opatrně se na ně přiložilo sklíčko se substráty. Takto připravené sklíčka se popsaly datem přípravy a pořadovým číslem a byly připraveny k vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem (viz Obrázek 11). V tabulce 5 je shrnuta interpretace výsledků testu.



Obrázek 11 - Fotografie pozitivní fluorescence endomysia na substrátu opičích jater při stanovení IgA protilátek proti endomysiu. (Fotografie: Manuela Trojáčková)

Tabulka 5 - Interpretace výsledků nepřímého imunofluorescenčního testu na přítomnost autoprotilátek proti endomyziu ve třídě IgA

Výsledek	Značení	Vysvětlivka
Negativní	-	není pozorována žádná fluorescence očekávaných struktur
Hraniční	+ / -	nezřetelná, ale patrná fluorescence
Slabě pozitivní	+	zřetelná, ale slabá fluorescence
Pozitivní	++	zřetelná, jasná fluorescence
Silně pozitivní	+++	velmi silná fluorescence, může způsobovat splývání očekávaných struktur (zrnění)

4.4 Stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA metodou ELISA

4.4.1 Princip metody

Základem ELISA metody je komplex specifické protilátky s molekulou enzymu (křenová peroxidáza), která štěpí molekulu substrátu a při tom vznikají barevné produkty, které se fotometricky měří. Stěny jamek mikrotitrační destičky jsou potaženy rekombinantní lidskou tkáňovou transglutaminázou (antigen). Do těchto jamek se přidá naředěný vzorek, a pokud jsou přítomny protilátky, dojde k navázání na antigen. K detekci navázaných protilátek se používají zvířecí imunoglobuliny proti lidským IgA (značené protilátky) a jako konjugát křenová peroxidáza. Výsledek reakce je vizualizován přidáním substrátu (TMB - v případě pozitivity zmodrá), který je enzymem rozštěpen za vzniku barevných produktů. Tyto barevné produkty jsou spektrofotometricky měřeny v podobě absorbance.

4.4.2 Biologický materiál

Sérum nebo plazma vyšetřovaných pacientů naředěné v poměru 1 : 101
(10 µl vzorku : 1 ml ředícího roztoku)

4.4.3 Použité chemikálie a roztoky

Souprava SmartEIA Transglutaminase IgA (TestLine s.r.o. Clinical Diagnostics):

Mikrotitrační destička s navázaným antigenem - rekombinantní antigen lidská tkáňová transglutamináza (h-tTG)

Negativní kontrola - kalibrátor 1 (5 U/ml)

CUT-OFF kalibrátor 2 (20 U/ml)

Pozitivní kontrola - kalibrátor 3 (100 U/ml)

Kalibrátor 4 (200 U/ml)

Konjugát - zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgA značený křenovou peroxidázou

Ředící roztok vzorků - pufr se stabilizátory bílkovin

Substrát TMB

20x promývací roztok: ředění 1:20 (množství podle potřeby)

Zastavovací roztok

4.4.4 Použité přístroje

Automatický přístroj DYNEX Agility pro zpracování mikrotitračních destiček (Dynex)

4.4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Stanovení protilátek proti IgA proti h-tTG metodou ELISA je prováděno na automatickém přístroji pro zpracování mikrotitračních destiček DYNEX Agility. Automatizace je dosaženo použitím souprav TestLine SmartKits, který obsahuje reagentie k provedení testu a QR kód, který obsahuje údaje o testu, informace o objemech, použití a rozložení reagentií v balení. Po spuštění programu Agility v počítači a inicializaci přístroje se do přístroje vložil spotřební materiál a poté připravený SmartEIA Transglutaminase IgA kit. Následně se do přístroje přidaly séra pacientů a zadaly se požadavky na provedení testů. Podle pracovního schématu se do přístroje vložily mikrotitrační destičky a spustilo se automatické provedení testu. Vynesením koncentrací kalibrátorů proti jejich absorbanci se vytvořila kalibrační řada. Koncentrace protilátek v jednotkách U/ml se získává interpolací (proložením) z kalibrační křivky a v následující tabulce 6 je shrnuta kvantitativní interpretace získaných dat v jednotkách U/ml.

Tabulka 6 - Kvantitativní interpretace dat v jednotkách U/ml

Hladina protilátek	Hodnocení
< 18	negativní
18 - 22	hraniční
22<	pozitivní

4.5 Vyšetření HLA alel asociovaných s celiakální sprue analýzou DNA - metoda PCR s elektroforetickou detekcí produktu

4.5.1 Biologický materiál

Izolovaná DNA z krve pacientů

4.5.2 Použité chemikálie a roztoky

Kit Olerup SSP DQA1*02,05;DQB1*02,03:02 (Olerup)

My Taq DNA Polymerase (Bioline)

PCR voda (Top-Bio)

2% agarózový gel

4.5.3 Použité přístroje

Automatický izolátor DNA MagCore

Termocycler Mastercycler pro S (Eppendorf)

Vortex V-1 plus (Biosan)

Automatické pipety: 0,5 - 10 μ l; 10 - 100 μ l; 20 - 200 μ l; 100 - 1000 μ l; 500 - 5000 μ l (Eppendorf)

Elektroforetický zdroj Consort E815 (Scie-Plas)

Elektroforetická vana (Scie-Plas)

Fotoaparát (Olympus)

Transiluminátor (Scie-Plas)

4.5.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

DNA byla izolovaná z periferní krve na automatickém přístroji MagCore. Izolovaná DNA se naředila PCR vodou na koncentraci 30 ng/ μ l. Potřebné hodnoty jsme získali doplněním do vzorce:

$$V_2 = (c_1 \cdot V_1) / c_2 [\mu\text{l}]$$

(c_1 = potřebná koncentrace 50 ng/ μ l, c_2 = naměřená koncentrace, V_1 = potřebný celkový objem, V_2 = množství DNA).

Master mix pro PCR se připravil z 118,1 μ l PCR vody, 72 μ l master mixu a 1,9 μ l DNA polymerázy. Dále se ve stripech do jamky pro blank napipetovalo 10 μ l master mixu. Do zbytku master mixu se připipetovalo 48 μ l DNA a stočilo na vortexu. Poté se do ostatních jamek ve stripu napipetovalo 10 μ l master mixu s DNA, kromě blanku,

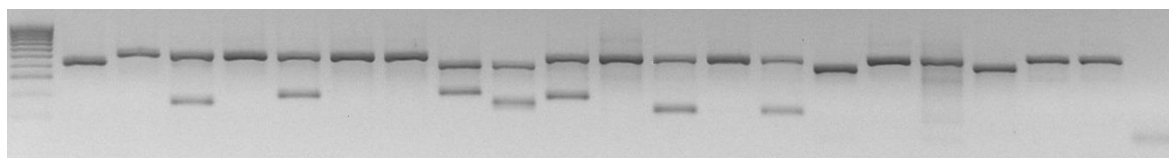
a stripy se stočily na vortexu. Potom se vložily do termocykléru s programem (viz tabulka 7).

Tabulka 7 - Teplotní program v termocykléru pro amplifikaci DNA

Amplifikační program (Olerup)		
Teplota [°C]	Čas [min:s]	Opakování
94	2:00	
94	0:10	10x
65	1:00	
94	0:10	20x
61	0:50	
72	0:30	
4	hold	

Detekce PCR produktů proběhla na 2% agarózovém gelu, kdy se do jamek přenesl celý objem (10 μ l) PCR produktů v daném pořadí. Výsledný gel se vyfotografoval pod UV světlem, označily se pozice, které byly pozitivní a následně se provedlo vyhodnocení v programu SCORE (viz obrázek č.12)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 13 14 15 16 17 18 19 20



Obrázek 12 - Fotografie gelu pod UV světlem - rozdělení PCR produktů u pozitivního pacienta na celiakii. (Fotografie: Irena Uhliariková)

Vysvětlivky:

M...marker molekulové hmotnosti

1 - 20...jamky s rozdělenými PCR produkty

5. Výsledky

V praktické části diplomové práce byl sestaven soubor 2 446 pacientů, kteří v roce 2014 až 2017 byli indikováni k vyšetření markerů pro diagnózu ISZ (CN, UC) nebo celiakie. Pro diagnostiku těchto střevních onemocnění byly u pacientů využity molekulárně-genetické nebo imunologické metody. Z celkového počtu 2 446 pacientů bylo 1 487 mužů a 959 žen (viz tabulka 8). Také jsou v tabulce sestaveny skupiny pacientů podle jejich data narození a rozdělení podle četnosti. Nejvíce zastoupenou skupinou jsou pacienti narození v letech 1971 - 1998, ve věku 20 - 47 let. Dále jsou také početně zastoupeny skupiny pacientů narozených v letech 1955 - 1970, ve věku 46 - 63 let, a pacientů narozených 1999 - 2012, ve věku 6 - 19 let. Méně zastoupenou skupinou jsou pacienti narození v roce 1927 - 1954, ve věku 62 - 91 let. Nejméně početnou skupinou jsou nejmladší pacienti narození roku 2013 - 2016, ve věku 2 - 5 let.

Tabulka 8 - Zastoupení mužů a žen v hodnoceném souboru pacientů

Zastoupení mužů a žen	
Muži	959
Ženy	1 487
Celkem	2 446
Skupiny pacientů podle roku narození	
Rok narození	Počet pacientů
1971 - 1998	1382
1955 - 1970	429
1999 - 2012	379
1927 - 1954	217
2013 - 2016	39

V tabulce 9 jsou shrnuty typy onemocnění vyskytující se v hodnoceném souboru pacientů a jejich zastoupení u obou pohlaví. Nejčastěji vyskytujícím se onemocněním byla celiakie, která se vyšetřovala u 1 403 pacientů z toho u 445 mužů a 958 žen. Dále se u 649 pacientů prováděly testy na Crohnovu nemoc, jednalo se o 311 mužů a 338 žen. Ulcerózní kolitida se vyšetřovala u 421 pacientů, ze kterých 235 bylo mužů a 196 žen. Nejméně vyšetřovanou nemocí byla ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida (zánět konečníku a esovité kličky tlustého střeva), která byla testována u 49 pacientů, z toho bylo 25 mužů a 24 žen.

Tabulka 9 - Shrnutí diagnóz u vyšetřovaných pacientů a jejich zastoupení u mužů a žen

Kód onemocnění	Název onemocnění	Celkový počet pacientů	Počet mužů	Počet žen
K509	Crohova nemoc NS (non specificatus)	649	311	338
K513	Ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida (zánět konečníku a esovité kličky tlustého střeva)	49	25	24
K519	Ulcerózní kolitida NS (non specificatus)	421	235	186
K900	Celiakie	1 403	445	958

Vysvětlivky:

K900 - Celiakie

K509 - Crohova nemoc NS (non specificatus)

K513 - Ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida (zánět konečníku a esovité kličky tlustého střeva)

K519 - Ulcerózní kolitida NS (non specificatus)

V hodnoceném souboru bylo vyšetřeno 959 mužů a 1 487 žen (celkem 2 446 pacientů) s podezřením na CN, UC nebo celiakii. Celkem bylo provedeno 10 324 testů na tyto onemocnění (viz tabulka 10). Nečastějším vyšetřením bylo stanovení fekálního kalprotektinu. Dále se také velmi často určovaly protilátky proti tkáňové transglutamináze třídy IgA a protilátky proti endomyziu třídy IgA ze séra nebo plazmy. Méně početné je zastoupení vyšetření protilátek proti deamidovanému gliadinu třídy IgA a IgG v séru nebo plazmě, a protilátky proti ASCA ve třídě IgG v séru. Ještě méně se vyšetřovala genetická predispozice pro celiakální sprue, a vyšetření ze séra - protilátky proti ANCA, protilátky proti pankreas exokrinní (IBD), protilátky proti pohárkovým buňkám (IBD) a protilátky proti ASCA ve třídě IgA. Ve 13 případech se vyšetřovaly mutace 3020insC, G908R, R702W a ve 2 případech mutace v genu *ATG16L1*.

Tabulka 10 - Shrnutí provedených testů onemocnění vyskytujících se v hodnoceném souboru a jejich četnost a zastoupení

Typ testu	Počet	K900	K509	K513	K519
Fekální kalprotektin	3 501	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti tkáňové transglutamináze IgA	2 442	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti endomyziu IgA	1 810	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti deamid.gliadinu třídy IgA	434	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti ASCA ve třídě IgG	434	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti deamid.gliadinu třídy IgG	411	ano	ano	ano	ano
Celiakální sprue	288	ano	ano	ne	ne
Protilátky proti ANCA	258	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti pankreas exokrinní (IBD)	258	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti pohárkovým buňkám (IBD)	258	ano	ano	ano	ano
Protilátky proti ASCA ve třídě IgA	189	ano	ano	ano	ano
Mutace 3020insC	13	ano	ano	ne	ano
Mutace G908R	13	ano	ano	ne	ano
Mutace R702W	13	ano	ano	ne	ano
Mutace ATG16L1	2	ne	ano	ne	ano
Celkem		10 324			

Vysvětlivky:

ANCA - autoprotilátky proti některým strukturám v buňce neutrofilů (typ bílých krvinek)

IBD - idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease)

ASCA - protilátky proti *Saccharomyces cerevisie*

Z hlediska genetické predispozice pro celiakii bylo celkem hodnoceno 288 pacientů, z čehož u 84 z nich byla HLA-DQ2/DQ8 genetická predispozice potvrzena a u 204 pacientů se predispozice nepotvrdila. Genetická predispozice HLA-DQ2/DQ8 pro celiakii byla detekována u 32 mužů a 52 žen (viz tabulka 11). Specifické mutace pro CN - 3020insC, G908R, R702W (jedná se o mutace genu *NOD2/CARD15*, která změní funkci proteinu, což má za důsledek ztrátu kontroly organismu na bakteriální infekci) se vyšetřovaly vždy společně a byly provedeny u 13 pacientů. U 1 muže a 1 ženy byly provedeny testy na přítomnost mutace *ATG16L1* a v obou případech byli pacienti heterozygoti. U mutace 3020insC byli heterozygoti 2 pacienti, také 1 muž a 1 žena. Mutace G908R nebyla prokázána u žádného pacienta. V případě mutace R702W byl 1 muž identifikován jako heterozygot. Z hlediska jednotlivých onemocnění byli pro celiakii vyšetřeni 1 muž a 1 žena, pro CN 4 muži a 5 žen a pro UC 1 muž a 1 žena. Z těchto pacientů byl 1 muž

heterozygot pro celiakii, 2 muži a 1 žena heterozygoti pro CN a 1 žena pro UC (viz tabulka 11).

Tabulka 11 - Shrnutí výsledků vyšetření pro genetickou predispozici a přítomnost mutace u jednotlivých onemocnění a jejich zastoupení u obou pohlaví

Vyšetření mutací (pro CN a UC) u pacientů								
Typ mutace	3020insC		G908R	R702W		ATG16L1		
Počet pacientů	13 (vždy vyšetřeni pro všechny 3 mutace)						2	
Neprokázaná mutace u pacientů	11		13	12		0		
Heterozygoti	2		0	1		2		
	1 muž	1 žena	-	1 muž	-	1 muž	1 žena	
Kód nemoci	Zastoupení pohlaví u vyšetřovaných pacientů v rámci detekce mutací							
K900	1 muž			1 žena				
K509	4 muži			5 žen				
K519	1 muž			1 žena				
Vyšetření genetické predispozice HLA-DQ2/DQ8 pro celiakii								
Celkem pacientů	288							
	Predispozice prokázána			Predispozice neprokázaná				
Počet pacientů	84			204				
	32 mužů	52 žen		-				

Vysvětlivky:

K900 - Celiakie

K509 - Crohnova nemoc NS (non specificatus)

K513 - Ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida (zánět konečníku a esovité kličky tlustého střeva)

K519 - Ulcerózní kolitida NS (non specificatus)

U pacientů bylo provedeno celkem 2 522 testů k potvrzení nebo vyvrácení diagnózy, přičemž někteří pacienti byli indikováni k testům na více než 1 typ onemocnění, z tohoto důvodu nesedí celkový počet pacientů a počet provedených testů (viz tabulka 12). Trend vývoje onemocnění není specifický pro jednotlivé pacienty, ale jen orientační pro celý soubor pacientů.

Obecně lze říci, že u celiakie bylo téměř dvakrát více testovaných žen než mužů. U CN byly zastoupení v testování mužů a žen přibližně stejné, stejně tak i u ulcerózní (chronické) rektosigmoiditidy. Naopak u UC bylo testováno více mužů než žen.

Testování celiakie bylo provedeno celkem u 445 mužů a 958 žen, jedná se tedy o nejčastěji testované onemocnění. U některých pacientů se také testovala přítomnost genetické predispozice na celiakii, kdy u většiny pacientů s predispozicí následné testy celiakii nepotvrdily. U pacientů s predispozicí a následnými hraničními nebo pozitivními výsledky testů, nebo u pacientů s pouze potvrzenou predispozicí k celiakii, se opakovaně provádějí testy a sleduje se vývoj onemocnění. V rámci celiakie u některých pacientů bylo také možné sledovat progres nebo regres onemocnění. K významnému ústupu celiakie po zavedení vhodné léčby z pozitivních výsledků na negativní došlo u 9 mužů a 15 žen. U 26 mužů a 8 žen se výsledky pouze mírně zlepšily a u 2 mužů a 23 žen byly počáteční hraniční výsledky po opakovaném testování negativní (viz tabulka 12).

Dalším často testovaným onemocněním byla CN, které se provádělo u 311 mužů a 338 žen. U některých testovaných pacientů byl také zaznamenán vývoj nemoci, kdy u většiny z těchto pacientů počáteční pozitivní výsledky byly po opakování testů, po určité době, negativní.

Testování UC bylo provedeno u 235 mužů a 186 žen. U 13 mužů a 12 žen došlo k regresi onemocnění.

Nejméně častým onemocněním v hodnoceném souboru byla ulcerózní (chronická) rektosigmoiditida, která se testovala pouze u 25 mužů a 24 žen. Progrese onemocnění byla zaznamenána u 2 pacientů, 1 ženy a 1 muže, u kterých také došlo k regresi nemoci.

Tabulka 12 - Přehled a výsledky provedených laboratorních testů u 2 446 pacientů

Název onemocnění	Celiakie		Crohnova nemoc		Ulcerózní rektosigmoiditida		Ulcerózní kolitida	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
Výsledky imunologických testů								
negativní	275	632	97	114	14	14	87	82
hraniční	26	49	17	26	1	0	26	14
pozitivní	42	95	172	170	9	9	109	78
Výsledky genetických testů								
predispozice + negativní	22	65	-	-	-	-	-	-
predispozice + hraniční	7	10	-	-	-	-	-	-
predispozice + pozitivní	4	9	-	-	-	-	-	-
pouze predispozice	32	52	-	-	-	-	-	-
Vývoj jednotlivých onemocnění								
hraniční-negativní	2	23	0	1	0	0	0	0
pozitivní-negativní	9	15	23	27	1	1	13	12
pozitivní-hraniční	26	8	2	0	0	0	0	0
celkem	445	958	311	338	25	24	235	186

Vysvětlivky:

Hraniční-negativní: Testované markery neprokázaly přítomnost onemocnění

Pozitivní-negativní: Testované markery neprokázaly přítomnost onemocnění, i když prvotní výsledky byly pozitivní onemocnění na ústupu

Pozitivní-hraniční: Onemocnění na ústupu, ale ještě některé testované markery vykazují přítomnost onemocnění

Pro větší přehled a představu byly negativní, pozitivní a hraniční výsledky převedeny na procentuální zastoupení viz tabulka 13 (procentuální vyjádření počítané z celkového počtu mužů nebo žen pro dané onemocnění, započítaní jsou i pacienti, u kterých došlo k progresi nemoci). Jako hraniční výsledek se uvádí ten, kdy některé imunologické markery vyšly negativně a jiné pozitivně, nelze tedy se stoprocentní jistotou říci, zda se jedná o pozitivní či negativní výsledek. U testů na celiakii byly u 62 % mužů a 65 % žen negativní výsledky, a u 9 % mužů a 10 % žen byly výsledky pozitivní. Zajímavé je, že u testování CN bylo u obou pohlaví více než 50 % pozitivních pacientů,

negativní výsledky byly u 31 % mužů a 34 % žen. Podobná situace byla zaznamenána u testování UC, kdy se pozitivní výsledky pacientů u obou pohlaví blížily hranici 50 %, 46 % mužů a 42 % žen. Negativní výsledky CU vyšly u 37 % mužů a 44 % žen. V rámci testování ulcerózní (chronické) rektosigmoiditidy bylo 56 % mužů a 58 % žen negativních, a 36 % mužů a 37,5 % žen pozitivních. U všech testovaných onemocnění se výsledky, které vyšly hraničně, pohybovaly v rozmezí 0 - 11 % pacientů.

Tabulka 13 - Procentuální vyjádření základních výsledků testovaných pacientů pro jednotlivá onemocnění počítané zvlášť pro muže a ženy

Název onemocnění	Celiakie		Crohnova nemoc		Ulcerózní rektosigmoiditida		Ulcerózní kolitida		
	Pohlaví	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
Výsledky [%]									
negativní		62	65	31	34	56	58	37	44
hraniční		6	5	5,5	7,8	4	0	11	7,5
pozitivní		9	10	55	50	36	37,5	46	42

6. Diskuze

V roce 2003 byla průměrná incidence CN v České republice 8,54/100 000 obyvatel. Konkrétně v Moravskoslezském kraji (MSK) podle údajů zveřejněných Ústavem zdravotnických informací a statistiky v ČR (ÚZIS) byl nárůst incidence CN oproti roku 2002 o 22,9 % vyšší. Nejvyšší incidence 10,84/10 000 obyvatel byla v okrese Ostrava, nejnižší v okrese Bruntál, kde incidence činila 2,97/10 000 obyvatel, průměr pro MSK byl v roce 2003 6,68/10 000 obyvatel. Pro UC platí opět, že nejvyšší incidence byla v Ostravě, kde představovala 22,16/10 000 obyvatel, nejméně pak v Novém Jičíně, kdy byla incidence UC 5,83/10 000 obyvatel. Průměrná incidence UC v MSK byla v roce 2003 12,58/10 000 obyvatel. Nárůst incidence UC byl v MSK o 14 % vyšší než v roce 2002. Celorepublikový průměr UC v roce 2003 činil 13,88/10 000 obyvatel. Podle informací ÚZIS byla také v MSK nejvyšší incidence CN i UC u pacientů ve věku mezi 20 - 64 roky (Kolektiv ÚZIS ČR v Ostravě, 2004). Další statistika zveřejněná ÚZIS za rok 2012 určila jako druhé nejčastější onemocnění (z gastroenterologických nemocí) UC, která se vyskytovala u 15 % dispenzarizovaných pacientů (aktivní dohled nad osobou, která má určitý rizikový faktor vhodný ke sledování ohroženého nebo trpícího člověka daným onemocněním). Celková incidence UC v tomto roce v ČR byla 21,9/10 000 obyvatel a obecně se dá říci, že od roku 2005 se rozšíření UC zvýšilo o 25 %. V letech 2005 - 2012 byla UC diagnostikována nejčastěji u pacientů ve věku 20 - 64 let. Třetí nejčastější onemocnění v roce 2012 byla CN, která tvořila 12 % evidovaných gastroenterologických onemocnění. Incidence CN v ČR v tomto roce byla 17,8/10 000 obyvatel a nárůst od roku 2005 činil o 51 %. V roce 2010 se celkový počet pacientů s CN mírně snížil, ale v roce 2011 opět došlo k nárůstu, stejně tak i v roce 2012. Vyšší vykazované počty některých onemocnění mohou být v posledních letech zčásti ovlivněny rozvinutější úrovní specializovaných diagnostických metod, novějším vybavením gastroenterologických ordinací s kvalitními přístroji a také větším zaměřením lékařů na některé méně známé diagnózy. Z hlediska věku byla v letech 2005 - 2012 nejvíce zastoupenou skupinou, stejně jako u UC, pacienti ve věku 20 - 64 let, přičemž se incidence kontinuálně zvyšovala (Typltová, 2012).

V této diplomové práci patřily mezi hodnocené nemoci Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida, ulcerózní rektosigmoiditida a celiakie. Vyšetření byly provedeny molekulárně genetickými metodami nebo imunologickými metodami v letech 2014 - 2017. V souboru bylo hodnoceno 2 446 pacientů, z toho bylo 959 mužů (39 %) a 1 487 žen (61 %).

Celkem bylo provedeno 10 324 testů. Tyto čísla jsou vyšší, než je celkový počet pacientů, protože u mnoha pacientů se daný typ testu v různých časových rozestupech opakoval. Dalším důvodem je také skutečnost, že někteří pacienti byli vyšetřováni na více než 1 typ onemocnění.

V rámci CN bylo zastoupení mužů 48 % a žen 52 %, což potvrzuje i světovou statistiku, kdy rozdíly v četnosti mezi muži a ženami nejsou příliš velké. U UC a ulcerózní rektosigmoiditidy bylo zastoupení mužů a žen podobné jako u CN, ale častější bylo u mužů - 51 % mužů a 49 % žen. Nejpočetnější věkovou skupinou v hodnoceném souboru byli pacienti ve věku 20 - 63 let. Nejméně zastoupenými skupinami byli pacienti ve věku 62 - 91 let a 2 - 5 let. U 13 pacientů byly provedeny testy na přítomnost mutací 3020insC, G908R a R702W (jedná se o mutace genu *NOD2/CARD15*), a u 2 pacientů na přítomnost mutace v genu *ATG16L1*. Mutace G908R se nevyskytovala u žádného ze 13 testovaných pacientů, mutace 3020insC se prokázala u 15 % pacientů s CN (heterozygoti) a mutace R702 byla detekována u 8 % pacientů s celiakií (heterozygoti).

Ve studii A.P. Cuthberta byly u 688 pacientů s CN a 604 pacientů s UC zjištěny podobné výsledky. Mutace 3020insC byla prokázána u 8,5 % pacientů (heterozygoti) s CN a u 3 % pacientů (heterozygoti) s UC. Další mutace G908R byla detekována u 5 % pacientů s CN a 3 % pacientů s UC (heterozygoti). Nejčastější mutací byla mutace R702W, která prokázala heterozygotní genotyp u 14 % pacientů s CN a 8 % pacientů s UC. Tyto výsledky ukazují, že mutace 3020insC, G908R a R702W jsou silně spojeny s CN, méně pak s UC (Cuthbert *et al.*, 2002). Světová situace výskytu ISZ se mezi státy výrazně liší. Výrazným faktorem, který tuto skutečnost ovlivňuje se rasa, kdy ISZ jsou častější u bělochů než Afroameričanů, Asijců, Hispánců nebo Indiánů. Nejvyšší výskyt je hlášen u Aškenázských židů. Incidence ISZ se nijak výrazně neliší u mužů a žen, ačkoliv CN je o něco málo častější u žen, naopak UC je nepatrně častěji hlášena u mužů (O'Brien, Downward, 2017). Nejvyšší prevalence a incidence ISZ je v Severní Americe, konkrétně Kanada je na prvním místě a jako druhá nejčastější země s ISZ je USA. Nicméně v posledním desetiletí se situace v těchto státech stabilizovala. Nízká úroveň výskytu ISZ platí pro státy Afriky, Latinské Ameriky a Asii. Ovšem v některých z těchto zemí díky rostoucí životní úrovni, roste také incidence a prevalence ISZ. V rámci Evropy je prevalence a incidence vyšší, ale liší se mezi zeměmi. Nejvyšší výskyt ISZ je hlášený obecně v severních státech Evropy - Skotsku, Finsku, Dánsku, Norsku, Švédsku, dále

pak ve Švýcarsku a Německu. Nejnižší incidence je v zemích východní Evropy, především v Maďarsku a Bosně a Hercegovině (Behzani *et al.*, 2015).

Prevalence celiakie je závislá na typizaci HLADQ2/DQ8 a množství lepku přítomného ve stravě. Pokud je jedinec či populace HLADQ2/DQ8 pozitivní, existuje vysoké riziko rozvoje celiakie (Gujral *et al.*, 2012). Nicméně přítomnost HLADQ2/DQ8 neznamená nutně diagnózu celiakie, ale zvyšuje riziko vzniku celiakie na 3 %, oproti obecné populaci, kde je riziko 1 %. Rodinní příslušníci (rodiče, sourozenci, děti) se stejným genotypem jako člen rodiny s celiakií mají riziko vzniku celiakie až 40 % (Celiac disease foundation, 2018). Přítomnost HLA-DQ2 s frekvencí vyšší než 20 % se objevuje v zemích západní Evropy, severní a západní Africe, Středním východě a Střední Asii, kdy celková frekvence klesá od západu na východ. Varianta HLA-DQ2 se téměř nevyskytuje v Japonsku. Alela HLA-DQ8 je rozšířena celosvětově, její frekvence vyšší než 20 % je v zemích Jižní a Střední Ameriky, Etiopii a západních zemích Evropy. Zvýšená prevalence výskytu celiakie je u žen, u kterých se objevuje až 3x častěji než u mužů. Stejně tak i v ČR je výskyt prevalence celiakie 2 - 3x vyšší u žen. V Evropě je celková prevalence v západních zemích téměř 1 %, v některých severních zemích může být i vyšší (Skandinávské státy, Irsko) (Gujral *et al.*, 2012).

V souboru pacientů hodnoceném v této diplomové práci bylo na celiakii vyšetřeno celkem 1 403 pacientů, přičemž 32 % tvořili muži a 68 % ženy. Pozitivní výsledky výskytu celiakie potvrzují světový trend, kdy ženy trpí celiakií 2 - 3x častěji než muži. Pouze u 288 pacientů se přistoupilo k testování HLADQ2/DQ8 genetické predispozice, která byla potvrzena pouze u 84 pacientů. Z těchto pacientů s HLADQ2/DQ8 predispozicí bylo 38 % mužů a 62 % žen, což opět potvrzuje vyšší výskyt u žen. Testování HLADQ2/DQ8 predispozice nebylo provedeno u všech pacientů. U některých pacientů byly výsledky imunologických testů natolik prokazatelné (pozitivní), že nebylo potřeba dalšího genetického testování.

7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se věnovala tématu problematiky idiopatických střevních zánětů - Crohnově nemoci a ulcerózní kolitidě, a problematice celiakie. V literárním přehledu jsem se zaměřila na fyziologickou stavbu gastrointestinálního traktu a dále poté na charakteristiku jednotlivých onemocnění, možné komplikace, genetiku a patogenezi.

V praktické části jsem analyzovala a statisticky hodnotila soubor 2 446 pacientů, kteří byli pomocí molekulárně-genetických a imunologických metod testováni na Crohnovu nemoc (non specificatus), ulcerózní kolitidu (non specificatus), ulcerózní (chronická) rektosigmoiditidu (zánět konečníku a esovité kličky tlustého střeva) a celiakii. Nejdůležitějšími sledovanými parametry, byl věk pacientů, incidence u obou pohlaví v rámci každého onemocnění a také sledování vybraných mutací u CN a UC, nebo genetické HLA-DQ2/DQ8 predispozice u celiakie. V hodnoceném souboru byly výsledky velmi podobné oficiálním statistikám. Pro CN platilo, že se nepatrně více vyskytuje u žen než u mužů, u UC tomu bylo však naopak. Také se potvrdilo, že nejpočetnější skupinou výskytu CN i UC byli pacienti ve věku 20 - 63 let. Taktéž u pacientů s CN a UC, u kterých se testovala přítomnost mutace 3020insC, G908R a R702W, se prokázala detekce těchto mutací u pacientů s CN, nikoliv s UC. I u pacientů vyšetřovaných pro celiakii byla při srovnání s jinými studiemi nalezena shoda. Potvrdilo se, že se celiakie vyskytuje 2 - 3x více u žen než u mužů, přičemž zde hraje významnou roli genetická predispozice pro HLA-DQ2/DQ8, která byla detekována u 29 % testovaných pacientů. U těchto pacientů s genetickou predispozicí se celiakie objevovala 2x častěji u žen než u mužů. Imunologické a genetické vyšetření mají při diagnostice ISZ (CN a UC) a celiakie velký význam. Především včasná diagnóza a vhodná léčba má velký vliv na další život pacienta - z hlediska fyzické i psychické stránky.

8. Použité zdroje

- Abdulkarim, A.S.; Murray, J.A. (2003): Review article: The diagnosis of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 17, 987-995.
- Adlerberth, I.; Wold, A.E. (2009): Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Paediatrica* 98, 229-238.
- Akobeng, A.K.; Ramanan, A.V.; Buchan, I. Heller, R.F. (2006): Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood* 91, 39-43.
- Allan, R. N.; et al. (1997): *Inflammatory Bowel Disease*. Churchill Livingstone 475-483.
- Antunes, L.C.; Han, J.; Ferreira, R.B.; et al. (2011): Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 1494 - 1503.
- Arentz-Hansen, H.; Fleckenstein, B.; Molberg, O.; et al. (2004): The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Medicine Journal* 1, e1.
- Bao, F.; Yu, L.; Babu, S.; Wang, T.; Hoffenberg, E.J.; Rewers, M.; Eisenbarth, G.S. (1999): One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated transglutaminase autoantibodies. *Journal of Autoimmunity* 13, 143-148.
- Beer, R.J. (1976): The relationship between *Trichuris suis* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. *Research in Veterinary Science* 20, 47-54.
- Berg, R. D. (1996): The indigenous gastrointestinal mikroflóra. *Trends in Microbiology* 4, 430-435.
- Bevins, C.L.; Salzman, N.H. (2011): Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9, 356-368.
- Bowcutt, R.; Forman, R.; Glymenaki, M.; Carding, S.R.; Else, K.J.; Cruickshank, S.M. (2014): Heterogeneity across the murine small and large intestine. *World Journal of Gastroenterology* 20(41), 15216-15232.
- Bullen, C.L.; Tearle, P.V.; Willis, A.T. (1976): Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in-vivo study. *Journal of Medical Microbiology* 9, 322 - 333.
- Burger-van Passen, N.; Loonen, L.M.; Witte-Bouma, J.; Korteland-van Male, A.M.; de Bruijn, A.C.; van der Sluis, M.; Lu, P.; Van Goudoever, J.B.; Wells, J.M.; Dekker, J.; Van Seuningen, I.; Renes, I.B. (2012): Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 β , Reg3 γ and angiogenin-4. *PLoS One* 7.
- Canami, R.B.; de Horatio, L.T.; Terrin, G.; et al. (2006): Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 42(1), 9-15.
- Caramalho, I.; Lopes-Carvalho, T.; Ostler, D.; Zelenay, S.; Haury, M.; Demengeot, J. (2003): Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 403-411.
- Catassi, C.; Fasano, A. (2010): Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *The American Journal of Medicine* 123, 691-693.

- Cebra, J.J. (1999): Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69, 1046-1051.
- Cooney, R.; Jewell, D. (2009): The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases* 27, 428-442.
- Coulombe, F.; Divangahi, M.; Veyrier, F.; de Léséleuc, L.; Gleason, J. L.; Yang, Y.; Kelliher, M. A.; Pandey, A. K.; Sasseti, C. M.; Reed, M. B.; Behr, M. A. (2009): Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *The Journal of Experimental Medicine* 206(8), 1709-1716.
- Croese, J.; O'Neil, J.; Masson, J.; Cooke, S.; Melrose, W.; Pritchard, D.; Speare, R. (2006): A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors, *Gut* 55, 136-137.
- Cuthbert, A.P.; Fisher, S.A.; et al. (2002): The Contribution of NOD2 Gene Mutations to the Risk and Site of Disease in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 122, 867-874.
- Červenková, R. (2009): *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. Galén, Praha, ISBN 978-80-7262-600-7.
- Čierna, I. (2015): *Crohnova choroba a ulcerózná kolitida u detí a adolescentov*. Grifart, Brno, ISBN 978-80-905337-9-0.
- Day, A.S.; Ledder, O.; Leach, S.T.; Lemberg, D.A. (2012): Crohn's and colitis in children and adolescents. *World Journal of Gastroenterology* 18(41), 5862-5869.
- De Dombal, F. T.; Burton, I.; Goligher, J. C. (1971): Recurrence of Crohn's disease after primary excisional surgery. *Gut* 12, 519-527.
- Dethlefsen, L.; Relman, D.A. (2011): Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(1), 4554-4561.
- Diaz, R.L.; Hoang, L.; Wang, J.; Vela, J.L.; Jenkins, S.; et al. (2004): Maternal adaptive immunity influences the intestinal microflora of suckling mice. *Journal of Nutrition* 134, 2359-2364.
- Dicke, W.K.; Weijers, H.A.; Van de Kamer, J.H. (1953): Coeliac disease II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatrica* 42, 34-42.
- Dítě, P. (2001): Nejčastější zánětlivá střevní onemocnění. *Interní medicína pro praxi* 3(10), 451-454, ISSN 1803-5256.
- Duerr, R.H.; Taylor, K.D.; Brant, S.R.; et al. (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.
- Ehrmann, J.; Konečný, M. (2011): Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. *Medicína pro praxi* 8(10), 435-437.
- El Aidy, S.; van Baarlen, P.; Derrien, M.; Lindenbergh-Kortleve, D.J.; Hooiveld, G.; Levenz, F.; Doré, J.; Dekker, J.; Samson, J.N.; Nieuwenhuis, E.E.; Kleerebezem, M. (2012): Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunology* 5, 567-579.

- Fallon, P.G.; Alcamí, A. (2006): Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics?. *Trends in Immunology* 10, 470-476.
- Fasano, A.; Araya, M.; Bhatnagar, S.; Cameron, D.; Catassi, C.; Dirks, M.; Mearin, M.L.; Ortigosa, L.; Phillips, A. (2008): Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition consensus report on celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 47, 214-219.
- Ferenčík, M.; Lokaj, J.; Dlabáč, V.; Stančíková, M.; Kačáni, L.; Rossman, P.; Šírová, M. (1994): Obranný a poškodující zápal. *Fórum imunologie* 6, 193-198.
- Frank, D.N.; Pace, N.R. (2008): Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology* 24, 4-10.
- Gallo, R.I.; Hooper, L.V. (2012): Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology* 12, 503-516.
- Glas, J.; Konrad, A.; Schmechel, S.; Dambacher, J.; Seiderer, J.; Schroff, F.; Wetzke, M.; Roeske, D.; Torok, H.P.; Tonenchi, L.; et al. (2008): The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *The American Journal of Gastroenterology* 103, 682-691.
- Gobbi, G. (2005): Coeliac disease, epilepsy and cerebral calcifications. *Brain & Development* 27, 189-200.
- Green, P.H. (2005): The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 128, S74-S78.
- Gujral, N.; Freeman, H.J. Thomson, A.B (2012): Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology* 18(42), 6036-6059.
- Hampe, J.; Franke, A.; Rosenstiel, P.; Till, A.; Teuber, M.; Huse, K.; Albrecht, M.; Mayr, G.; De La Vega, F.M.; Briggs, J.; et al. (2007): A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics* 39, 207-211.
- Hanzlová, J.; Hemza, J. (2006): *Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní II*. Masarykova univerzita, Brno, ISBN 80-210-3962-0.
- He, W.; Wang, M.L.; Jiang, H.Q.; Steppan, C.M.; Shin, M.E.; Thurnheer, M.C.; Cebra, J.J.; Lazar, M.A.; Wu, G.D. (2003): Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELMbeta/FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein. *Gastroenterology* 125, 1388-1397.
- Heyman, M.; Abed, J.; Lebreton, C.; Cerf-Bensussan, N. (2011): Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*.
- Hill, D.A.; Artis, D. (2010): Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual review of immunology* 28, 623-667.
- Hořejší, V.; Bartůňková, J.; Brdička, T.; Špišek, R. (2013): *Základy imunologie*. 5th. ed. Triton. Praha.
- Chn'ng, C.I.; Jones, M.K.; Kingham, J.G. (2007): Celiac disease and autoimmune thyroid disease. *Journal of Clinical Medicine Research* 5, 184-192.

- Choi, K.; Siegel, M.; Piper, J.L.; et al. (2005): Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chemistry & Biology* 12, 469-475.
- Jostins, L.; Ripke, S.; Weersma, R.K.; et al. (2012): Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124.
- Kennedy, N.; Walker, A.; Berry, S.; et al. (2014): PWE-082 the impact of Nod2 variants on ut microbiota in Crohn's disease and healthy controls. *Gut* 63(1), A159-A160.
- Khoo, U.Y.; Proctor, I.E.; Macpherson, A.J. (1997): CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *The Journal of Immunology* 158, 3626-3634.
- Klöck, C.; Jin, X.; Choi, K.; et al. (2010): Acylideneoxindoles: A new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
- Kohout, P. (2003): *Výživa u pacientů s idiopatickými střevními záněty*. Maxdorf, Praha, ISBN 80-7345-023-2.
- Kohout, P. (2006): Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína* 7(8), 324-326.
- Kolektiv autorů. (1992): *Lidské tělo: srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu*. Gemini. Bratislava, ISBN 80-85265-59-1.
- Koon, H.W.; Shih, D.Q.; Chen, J.; Bakirtzi, K.; Hing, T.C.; Law, I.; Ho, S.; Ichikawa, R.; Zhao, D.; Xu, H.; Gallo, R.; Dempsey, P.; Cheng, G.; Targan, S.R.; Pothoulakis, C. (2011): Cathelicidin signaling via the Toll-like receptor protects against colitis in mice. *Gastroenterology* 141, 1852-1863.
- Kuma, A.; Mizushima, N.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y. (2002): Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 18619-18625.
- Kupfer, S.S.; Jabri, B. (2012): Celiac disease pathophysiology. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 22(4).
- Levine, B.; Packer, M.; Codogno, P. (2015): Development of autophagy inducers in clinical medicine. *The Journal of Clinical Investigation* 125, 14-24.
- Lionetti, E.; Catassi, C. (2011): New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International Reviews of Immunology* 30, 219-231.
- Liu, S.; Cerione, R.A.; Clardy, J. (2002): Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 2743-2747.
- Losowsky, M.S. (2008): A history of coeliac disease. *Journal of Digestive Diseases* 26, 112-120.
- Ludvigsson, J.F.; Green, P.H. (2011): Clinical management of coeliac disease. *Journal of Internal Medicine* 269, 560-571.
- Lukáš, K. (1997): *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. Triton, Praha, ISBN 80-85875-31-4.
- Lukáš, K.; et al. (2001): *Idiopatické střevní záněty*. 2nd ed., Triton, Praha, 40-59.

- Lukáš, K.; Šatrová, J. (2004): *Dieta při ulcerózní kolitidě a Crohnově nemoci*. 1st ed., Triton, Praha, 9-28, ISBN 80-7254-473-X.
- Lukáš, M.; Starnovská, T. (1998): *Diety při zánětlivém onemocnění střev: recepty, rady lékaře*. Sdružení MAC, Praha, ISBN 80-86015-87-4.
- Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S. (1997): Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32 (suppl 222), 3-9.
- Manoury, B.; Gregory, W.F.; Maizels, R.M.; Watts, C. (2001): Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Current Biology* 11(6), 447-451.
- Martin, R.; Heilig, G.H.; Zoetendal, E.G.; Smidt, H.; Rodriguez, J.M. (2007): Diversity of the lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2638-2644.
- McGovern, D.; Kugathasan, S.; Cho, J.H. (2015): Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 149(5), 1163-1176.e2.
- McKerracher, L.; Higuchi, H. (2006): Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 23, 309-317.
- Mearin, M.L.; Biemond, I.; Pena, A.S.; et al. (1983): HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut* 24, 532-537.
- Mizushima, N.; Kuma, A.; Kobayashi, Y.; Yamamoto, A.; Matsubae, M.; Takao, T.; Natsume, T.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. (2003): Mouse Apg16L, a novel D-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* 116, 1679-1688.
- Mokry, M.; Middendorp, S.; Wiegerinck, C.L.; Witte, M.; Teunissen, H.; Meddens, C.A.; Cuppen, E.; Clevers, H.; Nieuwenhuis, E.E. (2014): Many inflammatory bowel disease risk Loci include regions that regulate gene expression in immune cells and the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 146, 1040-1047.
- Molberg, O.; McAdam, S.; Lundin, K.E.; et al. (2001): T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deaminated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *European Journal of Immunology* 31, 1317-1323.
- Moreau, M.C.; Ducluzeau, R.; Guy-Grand, D.; Muller, M.C. (1988): Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infection and Immunity* 21, 532-539.
- Morgan, X.C.; Tickle, T.L.; Sokol, H.; et al. (2012): Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* 13, R79.
- Mottet, C.; Uhlig, H.H.; Powrie, F. (2003): Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 170, 3939-3943.
- Muniz, L.R.; Knosp, C.; Yeretssian, G. (2012): Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in Immunology* 3, 310.

- Nanthakumar, N.N.; Dai, D.; Newburg, D.S.; Walker, W.A. (2003): The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. *The FASEB Journal* 17, 44-46.
- Nava, G.M.; Friedrichsen, H.J.; Stappenbeck, T.S. (2011): Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *The ISME Journal* 5, 627-638.
- Neovius, M.; Arkema, E.V.; Blomqvist, P.; et al. (2013): Patients with ulcerative colitis miss more days of work than the general population, even following colectomy. *Gastroenterology* 144, 536-543.
- Nys, K.; Agostinis, P.; Vermeire, S. (2013): Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease?. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10, 395-401.
- O'Neil, D.A.; Porter, E.M.; Elewaut, D.; Anderson, G.M.; Eskmann, L.; Ganz, T.; Kagnoff, M.F. (1999): Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *Journal of Immunology* 163, 6718-6724.
- Parzanese, I.; Qehajaj, D.; Patrino, F.; et al. (2017): Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 8(2), 27-38.
- Rashtak, S.; Murray, J.A. (2012): Review article: Celiac Disease, New Approaches to Therapy. *Alimentary pharmacology and therapeutics* 35(7), 768-781.
- Riutti, A. (2016): *Ilustrovaný atlas anatomie*. Sun, Říčany, ISBN 978-80-7371-132-0.
- Rubio-Tapia, A.; Hill, I.D.; Kelly, C.P.; Calderwood, A.H.; Murray, J.A. (2013): ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology* 108, 656-676.
- Ruysers, N.E.; De Winter, B.Y.; De Man, J.G.; et al. (2008): Worms and the treatment of inflammatory bowel disease: Are molecules the answer?. *Clinical and Developmental Immunology* 567514.
- Salem, M.; Ammitzboell, M.; Nys, K.; Seidelin, J.B.; Nielsen, O.H. (2015): ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy* 11(4), 585-594.
- Sardy, M.; Karpati, S.; Merkl, B.; Paulsson, M.; Smyth, N. (2002): Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 747-757.
- Sarin, R.; Wu, X.; Abraham, C. (2011): Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9560-9565.
- Sarlos, P.; Kovesdi, E.; Magyari, L.; et al. (2014): Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of current literature. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 5(3), 304-321.
- Shevach, E.M. (2000): Suppressor T cells: rebirth, function and homeostasis. *Current Biology* 10, R572-578.
- Shroff, K.E.; Meslin, K.; Cebra, J.J. (1995): Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infection and Immunity* 63, 3904-3914.

- Silano, M.; Agostoni, C.; Guandalini, S. (2010): Effect of the timing of gluten introduction on the development of celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* 16, 1939-1942.
- Smelt, M.J.; de Haan, B.J.; Bron, P.A.; van Swam, I.; Meijerink, M.; Wells, J.M.; Faas, M.M.; de Vos, P. (2013): Probiotics can generate FoxP3 T-cell responses in the small intestine and simultaneously inducing CD4 and CD8 T cell activation in the large intestine. *PLOS One* 8, e68952.
- Sollid, L.M.; Jabri, B. (2011): Celiac disease and transglutaminase 2: a model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Current Opinion in Immunology* 23, 732-738.
- Sollid, L.M.; Khosla, C. (2011): Novel therapies for coeliac disease. *Journal of Internal Medicine* 269, 604-613.
- Sommer, F.; Bäckhed, F. (2013): The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11, 227-238.
- Stack, W.; Mann, S.; Roy, A.; Heath, P.; Spowith, M.; Freeman, J.; Holmes, G. (1996): The effects of CDP571, an engineered human IgCD4 anti-TNFalpha antibody in Crohns disease. *Gut* 38(1), 107.
- Stark, P.L.; Lee, A. (1982): The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology* 15, 189-203.
- Stazi, A.V.; Trinti, B. (2010): Selenium status and over-expression of interleukin-15 in celiac disease and autoimmune thyroid diseases. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita* 46, 389-399.
- Steege, J.C.; Buurman, W.A.; Forget, P.P. (1997): The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine. *Clinical & Developmental Immunology* 5, 1121-1128.
- Stene, L.C.; Honeyman, M.C.; Hoffenberg, E.J.; et al. (2006): Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology* 3, e358.
- Summers, R.W.; Elliot, D.E.; Qadir, K.; Urban, J.F.; Thompson, R.; Weinstock, J.V. (2003): *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology* 98, 2034-2041.
- Summers, R.W.; Elliot, D.E.; Urban, J.F.; Thompson, R.; Weinstock, J.V. (2005): *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 54, 87-90.
- Suri-Payer, E.; Amat, A.Z.; Thornton, A.M.; Shevach, E.M. (1998): CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *The Journal of Immunology* 160, 1212-1218.
- Švíglerová, J.; Slavíková J. (2008): *Fyziologie gastrointestinálního traktu. Karolinum, Praha*, ISBN 978-80-246-1526-4.
- Taghipour, N.; Aghdaei, H.A.; Haghghi, A.; Mossafa, N.; Tabaei, S.J.S.; Rostami-Nejad, M. (2014): Potential treatment of inflammatory bowel disease: a review of helminths therapy. *Gastroenterology and hepatology From Bed to Bench* 7(1), 9-16.

- Traskalová-Hogenová, H. (1994): Imunita na sliznicích. Fórum Imunologie 1, 11-17.
- Troncone, R.; Jabri, B. (2011): Coeliac disease and gluten sensitivity. Journal of Internal Medicine 269, 582-590.
- Vader, L.W. Stepniak, D.T., Bunnik, E.M.; et al. (2003): Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. Gastroenterology 125, 1105-1113.
- Vaishnava, S.; Yamamoto, M.; Severson, K.M., Ruhn, K.A.; Yu, X.; Koren, O.; Ley, R.; Wakeland, E.K.; Hooper, L.V. (2011): The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. Science 334, 255-258.
- Vigué, J. (2015): *Atlas lidského těla*. Rebo International CZ, Čestlice, ISBN 978-80-255-0977-7.
- Volta, U.; Villanacci, V. (2011): Celiac disease: diagnostic criteria in progress. Cellular & Molecular Immunology 8, 96-102.
- Weinstock, J.V.; Elliot, D.E. (2013): Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. International journal for parasitology 43(0), 245-251.
- Weinstock, J.V.; Summers, R.; Elliott, D.E. (2004): Helminths and harmony. Gut 53(1), 7-9.
- Wright, E.K.; Kamm, M.A.; Teo, S.M.; Inouye, M.; Wagner, J.; Kirkwood, C.D. (2015): Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome on Crohn's disease: a systematic review. Inflammatory bowel diseases 21(6), 1219-1228.
- Ye, B.D.; McGovern, D.P.B. (2016): Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. Expert review of clinical immunology 12(10), 1091-1107.
- Zbořil, V.; et al. (2001): *Kortikosteroidy v léčbě nespecifických střevních zánětů*. 1st ed., Galén, Praha, 90, ISBN 80-7262-133-5.
- Zbořil, V.; Prokopová, L.; Pokorný, A.; Hertlová, M.; Dítě, P. (2001): Cyklosporin A v léčbě chronicky aktivních nespecifických zánětů střevních. Gastroenterologie 1, 5-10.
- Zbořil, V.; Šiškeová, J.; Kleinová, J.; et al. (1991): Zkušenosti s použitím plazmaferézy v terapii nespecifických zánětů střevních. Gastroenterologie 45(5), 265.
- Zoetendal, E.G.; Raes, J.; van den Bogert, B.; Arumugam, M.; Booijink, C.C.; Troost, F.J.; Bork, P.; Wels, M.; de Vos, W.M.; Kleerebezem, M. (2012): The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. The ISME Journal 6, 1415-1426.

Internetové zdroje:

UniProt: ATG16L1 - Autophagy-related protein 16-1 - Homo sapiens (Human) - ATG16L1 gene, protein [online] [cit. 2018-3-10] Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q676U5>.

MEDICAL TRIBUNE CZ: Autofagie a Crohnova choroba protein [online] [cit. 2018-3-10] Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/13867-autofagie-a-crohnova-choroba>.

EUC Laboratoře: Střevní záněty: Nové metody v laboratorní diagnostice [online] [cit. 2018-3-29] Dostupné z: <https://www.euclaboratore.cz/o-nas/archiv-clanku/strevni-zanety-nove-metody-v-laboratorni-diagnostice>.

Kolektiv Moravskoslezský krajský odbor ÚZIS ČR v Ostravě: Rychlé informace: Gastroenterologie - činnost oboru v Moravskoslezském kraji v roce 2003 [pdf] [online] [cit. 2018-4-17] Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/gastroenterologie-cinnost-oboru-moravskoslezskem-kraji-roce-2003>.

Typltová, J.: Aktuální informace: Činnost oboru gastroenterologie v ČR v roce 2012 [pdf] [online] [cit. 2018-4-17] Dostupné z: <http://uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-gastroenterologie-cr-roce-2012>.

O'Brien, S.; Downward, E.: Statistics: Inflammatory Bowel Disease [online] [cit. 2018-4-18] Dostupné z: <https://inflammatoryboweldisease.net/what-is-crohns-disease/statistics/>.

Behzadi, P.; Behzadi, E.; Ranjbar, R.: Immunology: Teh incidence and Prevalence of Crohn's Disease in Global Scale [pdf] [online] [cit. 2018-4-17] Dostupné z: <https://symbiosisonlinepublishing.com/immunology/immunology25.pdf>.

Celiac Disease FOUNDATION: Understanding Celiac Disease: Screening [online] [cit. 2018-4-18] Dostupné z: <https://celiac.org/ceciac-disease/understanding-ceciac-disease-2/diagnosing-ceciac-disease/screening/>.