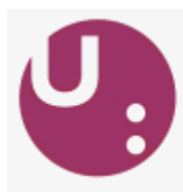


UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd



Příčiny rozvoje a diagnostika Crohnovy choroby

Kristýna Marečková

Bakalářská práce

Vedoucí: Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.

Pardubice, Česká republika

2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Marcely Slovákové, Ph.D. s využitím literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v použité literatuře na konci práce.

V Pardubicích

.....
Kristýna Marečková

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé bakalářské práce paní Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za věnovaný čas a pomoc, kterou mi ochotně poskytovala při jejím zpracovávání.

Obsah

1) Úvod	5
Zkratky	6
2) Klinický úvod.....	7
2.1. Historie	7
2.2. Klinické projevy onemocnění	8
2.3. Epidemiologie onemocnění.....	10
2.4. Histopatologie a imunopatologie onemocnění.....	10
3) Patogeneze Crohnovy choroby	13
3.1. Slizniční imunitní systém	14
3.2. Porucha imunitního dohledu ve střevním lumen.....	18
3.2.1. Receptory TLR 2,4	18
3.2.2. NOD2.....	19
3.2.3. STAT3	21
3.2.4. Galectin-3.....	21
3.2.5. IgA protilátky proti pivovarským kvasnicím a CD.....	23
4) Diagnostika onemocnění.....	25
4.1. Vstupní vyšetření.....	26
4.2. Zobrazovací techniky	27
4.3. Speciální imunologická vyšetření	29
5) Léčba	30
5.1. Medikamentózní léčba	31
5.1.1. <i>Hormonální léčba</i>	31
5.1.2. <i>Biologická léčba</i>	31
5.1.3. <i>Podpůrná a doplňková léčba</i>	32
5.2. Chirurgická léčba	32
6) Závěr.....	33
7) Použitá literatura.....	34

1) Úvod

Autoimunitní choroby jsou onemocněním charakterizovaná přítomností zánětu, jako důsledku autoreaktivity imunitního systému právě vůči vlastním strukturám. Příčinou jeho vzniku může být zhroucení imunitního systému na buněčné či humorální úrovni. V případě abnormální produkce protilátek (většina třídy IgG) je vlastní tkáň poškozována zejména cytotoxicky nebo ukládáním vzniklých imunokomplexů. Druhá možnost poškození tkáně zánětem je vyvolána nejčastěji linií buněk T, konkrétně Th1 a Tc lymfocytů.

Za autoimunitní onemocnění lze označit takovou chorobu, u níž je přítomen autoantigen a pokud je možno toto onemocnění vyvolat *in vitro* a *in vivo* na zvířatech. Klasifikace je bohužel obtížná, díky řadě neidentifikovaných autoantigenů.

Crohnova choroba se řadí mezi orgánově specifická onemocnění s lokalizací kdekoli v gastrointestinálním traktu (GIT), nejčastěji v oblasti ileocekální, tzn. přechodu tenkého střeva ve střevo tlusté. Spolu s ulcerózní kolitidou se řadí mezi idiopatické střevní záněty, s tím rozdílem, že v případě Crohnovy choroby nejsou diagnostikované protilátky cílené proti vlastním antigenům, ale jsou specifity anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) - konkrétně se jedná o pивní (pekařské) kvasnice.

Nejen záněty v GIT jsou spojeny s tímto onemocněním, ale u nemocných s touto chorobou se objevují například i artritidy, granulomatózní záněty s jinou lokalizací (cheilitida, erytema nodosum), uveitidy, polyneuropatie aj. (2,11).

Vzhledem ke vzrůstající incidenci tohoto onemocnění, a to především u mladých lidí a dětí, se zmíním ve své práci o správném fungování střevního imunitního systému, patogenezi GIT spojenou s Crohnovou chorobou a léčbu nutnou k odvrácení příznaků, jelikož se jedná o onemocnění charakteristické častými relapsy.

Použité zkratky

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
ANCA	Anti- neutrofilní protilátky
APC	Antigen prezentující buňky
ASCA	Protilátky proti pekařským, (pivovarským) kvasnicím
CD	Crohnova choroba
CRD	Sacharidy rozpoznávající doména galectinu-3
CRP	C- reaktivní protein
CT	Počítačová tomografie
DC	Dendritické buňky
DTH	Přecitlivělost oddáleného typu
EMT	Epiteliální- mezenchymální přechod
FAE	S folikuly asociovaný epitel
FW	Sedimentace erytrocytů
GALT	Se střevem spojená lymfatická tkáň
GIT	Gastrointestinální trakt
IBD	Zánětlivé střevní onemocnění
Ig	Imunoglobulin
MAP	Mykobacteria
MO	Mikroorganismus
MR	Magnetická rezonance
ND	N- terminální doména galectinu-3
PRR	Patogeny rozpoznávající receptor
SED	Subepitelové dómy
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy
TBC	Tuberkulóza
UC	Ulcerózní kolitida

2) Klinický úvod

Mezi idiopatické střevní záněty řadíme společně s ulcerózní kolitidou (UC) Crohnovu chorobu (CD), ta je charakterizovaná výraznou Th1 a Th17/23 odpovědí, týkající se exprese cytokinů IL -1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-23 a IL-17 (1,27). Naopak u UC převažuje Th2 buněčná odpověď spojená s produkcí cytokinů specifických pro tuto buněčnou linii, zejména IL-17 (1).

V obou případech se jedná o autoimunní orgánově specifická onemocnění, jejichž hlavním znakem je přítomnost autoprotilátek, různé specifity. Autoprotilátky přítomné v séru pacientů s CD jsou namířeny proti mannanům kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ale u osob postižených UC, jsou diagnostikovány protilátky cílené proti různým Ag cytoplazmy neutrofilů (2).

Českými lékaři byla tato onemocnění shrnuta do termínu idiopatické střevní záněty, ale dnes jsou v literatuře uváděny pod zkratkou IBD, která v angličtině znamená Inflammatory Bowel Diseases (3). Obě onemocnění mají společné rysy a taktéž mají charakteristický a obtížně předpověditelný průběh, ve kterém se střídají období zhoršení (relapsů) s fázemi relativního klidu (remisemi) (4, 5).

Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění gastrointestinálního traktu, která může postihnout kteroukoli část trávicí trubice, často diskontinuálně (6,7). Ale nejčastěji se vyskytuje v oblasti terminálního ilea, oblasti ileocekální (51,9%) a postižen může být i tračník (34,3%) a konečník (25,3%) (8). Ileocekální lokalizace CD je významná i z hlediska historie, poprvé byla popsána právě v přechodu tenkého střeva v tlusté. Zánět, který postihuje trávicí trubici je ohraničený a postihuje celou tloušťku stěny trávicí trubice, kde způsobuje vředy, zúženiny a píštěle (3).

Je to onemocnění neznámé etiologie a její příčiny dnes nejsou úplně známy. Jedná se nejspíše o nepřiměřenou odpověď organismu na mikrobiální střevní flóru u geneticky predisponovaných jedinců. Je prokázáno, že na rozvoj CD mohou mít vliv i jiné faktory. Kouření cigaret představuje až pětkrát zvýšené riziko vzniku onemocnění a může mít vliv i na to, že onemocnění bude probíhat bouřlivěji (9).

2.1. Historie

První popis Crohnovy choroby podal roku 1769 Giovanni Battista Morgagni, 1898 John Berg a také v roce 1904 polský chirurg Antonine Leśniowski (10). Roku 1913 popsal devět případů tohoto onemocnění Burril Bernard Crohn. A v roce 1932 spolu s Ginzburgem a

Oppenheimrem (4,8) publikovali svoji práci o regionální ileitidě. Dnešní název této choroby je výsledkem abecedního řazení jmen, kdy se jméno B. B. Crohna, amerického gastroenterologa objevilo na prvním místě jako autora (3,10).

2.2. Klinické projevy onemocnění

Klinické projevy tohoto onemocnění zahrnují především váhový úbytek, který může dosahovat 65-75% (5,6), což může znamenat pro tělo metabolický rozvrat charakteristický deficitem vitamínů a stopových prvků, hypokalcémií, sideropenií, hypofosfatémií (6) aj.. Objevují se také průjmy, které jsou poměrně časté většinou s příměsí krve nebo hlenu. Dále bolesti břicha a dehydratace (4). Pro Crohnovu chorobu jsou charakteristické zvýšené střevní ztráty, které mohou spolu s metabolickou nerovnováhou vést až k těžké malnutrici, anémii nebo osteoporóze. Jelikož dochází zejména ke ztrátě důležitých proteinů a živin.

Crohnova choroba může být provázena i extraintestinálními manifestacemi, které mohou odpovídat na aktivitu střevního onemocnění, ale mohou mu také předcházet a to i roky. Tyto manifestace jsou nalézány až u 25% nemocných a mohou to být například artritidy, uveitidy, perikarditidy, poškození očí (nodózní erytém) a ledvin (intersticiální nefritidy). Některé z nich mohou zesilovat či ubírat na síle v souvislosti se střevním zánětem (11).

Klinické projevy jsou velmi rozdílné a liší dle toho, kterou část trávicí trubice (GIT) postihují a do jaké míry.

Tabulka 1 Projevy CD, dle postižené části GIT. (Převzato z: (3))

Tenké a tlusté Střevo	Tlusté střevo	Tenké střevo	Konečník
Bolest břicha	Průjmy	Bolest břicha	Krvácení
Teploty	Krvácení	Hubnutí	Nucení na stolici
Průjmy	Mimostřevní projevy	Chudokrevnost	Hnisání

Jak již bylo zmíněno výše, Crohnova choroba je onemocnění charakteristické střídáním remisí a relapsů. Přičemž stanovit hranici remise u tohoto onemocnění není lehké, ale přesto důležité. Na základě dalších charakteristik může být vývoj tohoto onemocnění členěn na **progresivní**, kdy se aktivita onemocnění zhoršuje, a tím i jeho tíže. **Stacionární**- stabilizace nemoci je na mírném stupni aktivity a celkový stav jedince je vcelku dobrý. V poslední řadě

může být CD ve fázi *regrese*, kdy nemoc dosahuje stádia latence a klidu. Aktivita nemoci se stanovuje pomocí CDAI indexu (Crohn's Disease Activity Index), na základě vypočítaných hodnot. Přičemž remise onemocnění je hodnocena: (12)

- ≤ 150 ,
- 150-219 mírná aktivita,
- 220-450 střední progresse,
- ≥ 450 těžká forma onemocnění.

Tabulka 2 Hodnocení aktivity onemocnění (**Převzato z:** CDAI- Jeffrey S. Hyams, George D. Ferry, Francine S. Mandel)

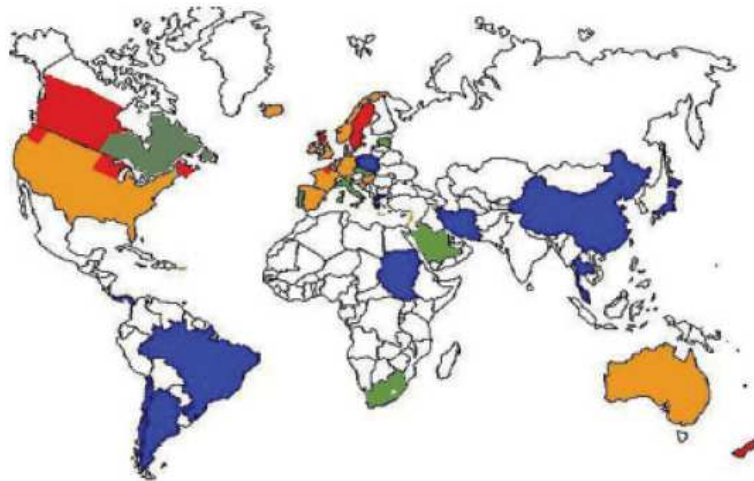
Všeobecný stav	
velice dobrý	0
mírně horší	1
špatný	2
velice špatný	3
hrozný	4
Bolesti břicha	
žádné.....	0
mírné.....	1
střední.....	2
těžké.....	3
Počet řídkých stolic	
žádné	0
1,2	1
3,4	2
5-7	3
8,9	4
více než 10/den	5
Rezistence v břiše	
žádná	0
pochybný, nejistý	1
hmatatelný	2
hmatatelný a citlivý	3

2.3. Epidemiologie onemocnění

Crohnova choroba je charakteristická tím, že postihuje mladé lidi ve věku nejčastěji od 15 do 30, 35 let (1,4), ale postižení bývají i lidé ve starším věku, po 50. roce života (13), (udává se mezi 50-80 rokem života), bývá postiženo okolo 6-15% obyvatel (14).

Zvýšený výskyt nemoci byl zmapován v Evropě, Skandinávii, severní Americe, Austrálii naopak nižší prevalence nemoci v Indii, tropické Africe a jižní Americe (Obrázek 1). Například ve Skandinávii je incidence onemocnění 5-7/100 000 obyvatel (14). Udává se, že idiopatické střevní záněty postihují až 0,5% populace v těchto oblastech včetně České republiky, kde se průměrný počet nemocných pohybuje okolo 20 000- 30 000 (14).

Dále byla objevena rasová souvislost s tímto zánětlivým onemocněním, které postihuje především bělošskou populaci, hlavně Aškenazim židy. U této etnické populace je výskyt IBD-1 genu 1,5-2x vyšší (4).



Obrázek 1 Globální mapa Crohnovy choroby ¹

2.4. Histopatologie a imunopatologie onemocnění

Střevní sliznice je velice důležitá, díky tomu, že brání vstupu mikroorganismů přes střevní stěnu a obsahuje buňky imunitního systému, které si předávají signály o antigenním složení lumen střeva (potravinové Ag, antigeny komensálních i patogenních MO). Více o imunitním systému ve sliznici viz kapitola 3.1.

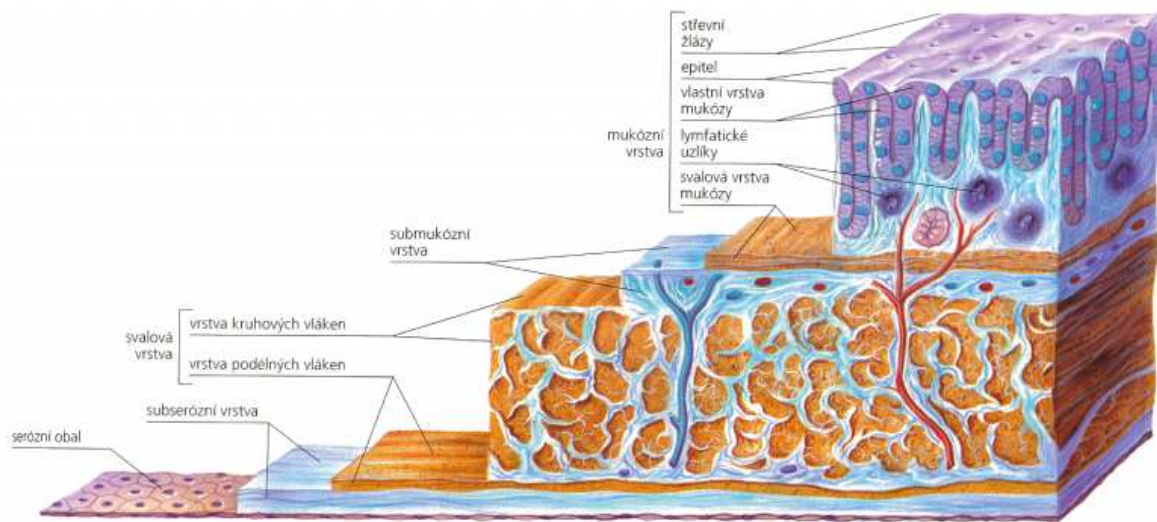
Střevní stěna se skládá z několika vrstev. Na povrchu **sliznice** (*lamina propria mucosae*) se nacházejí epitelové buňky enterocyty, mezi nimiž můžeme nacházet i četné buňky volné,

¹ Převzato z: Michael Economou, MD, PhD, and Georgios Pappas, MD; New Global Map of Crohn's Disease: Genetic, Environmental, and Socioeconomic Correlations; 2008; Červená barva odkazuje na incidenci onemocnění ročně nad 7/10⁵, oranžová výskyt 4-7/10⁵, zelená 1-4/10⁵ a modrá < 1/10⁵. Bezbarvá místa naznačují absenci údajů o výskytu CD.

kteří mají význam především v imunitních reakcích (například intraepitální lymfocyty), které jsou vyobrazeny modrými kolečkami v mukózní vrstvě (Obrázek 2). Pod sliznicí se nachází *lamina muscularis mucosae*, která se skládá z longitudinálního zevního a cirkulárního vnitřního svalstva.

Tunika submucosa obsahuje řídké vazivo, krevní a lymfatické cévy a nervy.

Tunika muscularis externa obsahující hladká svalová vlákna a nervy. Vrchní vrstvu střevní stěny tvoří *tunika seróza* (15).



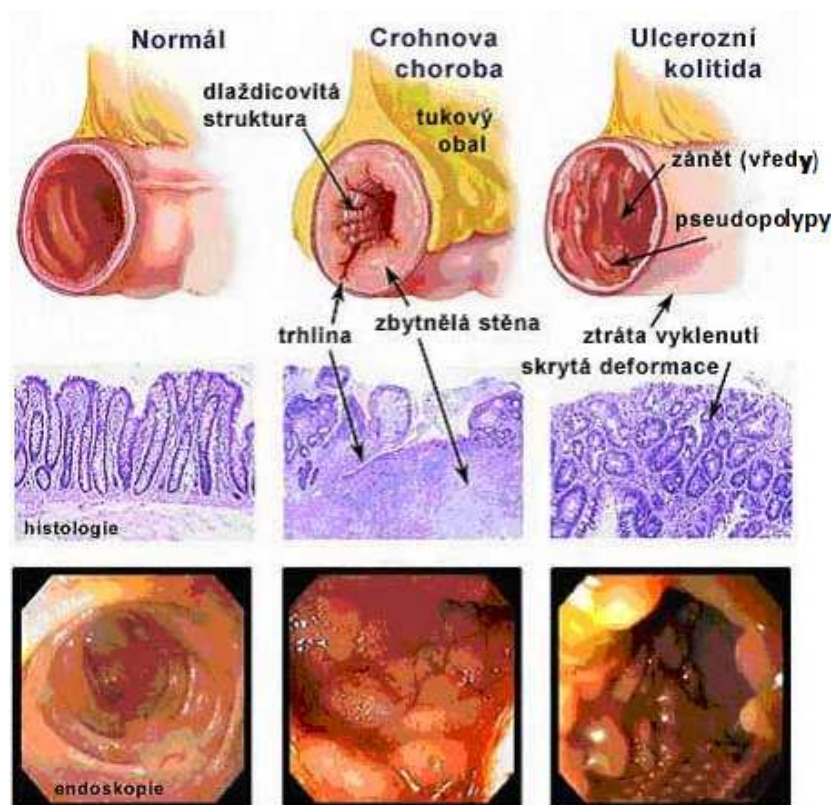
Obrázek 2 Průřez stěnou střevní sliznice ²

Makroskopický nález:

U Crohnovy choroby dochází k transmurálnímu zánětu (procházejícím celou stěnou), zjizvením a non-perforujícímu zánětu (3,10).

Makroskopicky se střevo postižené CD jeví jako dlaždice, (2,7) vzniklé snoubením úzkých penetrujících vředů. Tyto vředy perforují hlubší vrstvy střevní stěny v pozdějších fázích nemoci, což je spojeno se vznikem trhlin (figur), které oddělují zduřelou sliznici, tzn. typický vzhled dlaždice (Obrázek 3). Přítomné bývají i zúženiny, obstrukce a pštěle-trhliny pronikající do *lamina propria*, *muscularis mucosae* a do hlubších vrstev základové tkáně (16). Vyskytující se zejména v perianální oblasti GIT, mohou být non-epitelizované (2/3 případů) v důsledku epitel-mezenchymového přechodu (EMT).

² Staženo 15.11. 2011 z: <http://rakovinats.euweb.cz/stena.html>



Obrázek 3 Porovnání sliznice postižené zánětem při UC a při CD ³

Mikroskopický nález:

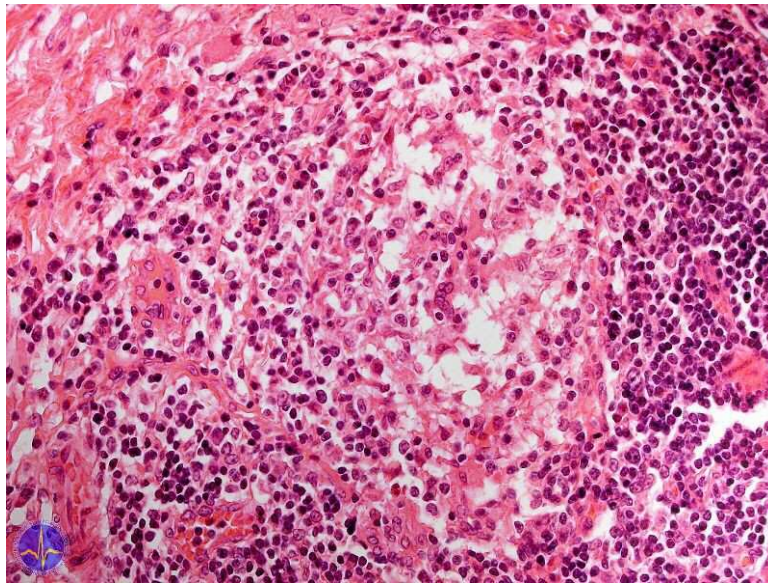
CD je charakteristická přítomností granulomů, což jsou abnormality nacházející se i u mnoha dalších onemocnění, které mají podobnou etiologii- selhání imunitního systému na úrovni nedostatečného odstranění exogenního materiálu ze stěvné stěny. Histiocyty tj. lokální makrofágy, jsou stimulovány k přeměně v obrovské mnohobuněčné buňky, které se shlukují v *lamina propria mucosae*, ale i v hlubších vrstvách stěvné stěny. Dle množství nakupených aktivovaných makrofágů lze tyto struktury rozlišit na makro- a mikro- granulomy (tj. = akumulace pouze několika histocytů).

Reakce, na níž je založená tvorba těchto patologických ložisek, je označována jako přecitlivělost oddáleného typu DTH (3). Princip leží na Th1 buňkách, které produkují IFN- γ k aktivaci makrofágů. Namířených k zneškodnění intracelulárních parazitů, v případě poruchy procesu vede k poškození tkáně (17).

Střed granulomu je vyplněn CD4+ pomocnými T- lymfocyty, okolo nich je zastoupení aktivovaných histocytů a vrchní korová část je seskupena z CD8+ supresorových T- lymfocytů (18). Tento granulom na rozdíl od tuberkulózního nemá kaseifikující střed, (19)

³ Staženo 15.11. 2011 z: <http://www.symbinatur.com/Ulcerozni-colitis-clanek-199.html>

ovšem tato (sýrová nekróza) nemusí být u tuberkulózy patrna vždy, u obou se ale vyskytují Langhansovy buňky.



Obrázek 4 Střevní granulom⁴

V klinické praxi slouží k analýze vzorky biopsie odebrané endoskopicky a chirurgicky. Resektáty střeva pacientů, nebo posmrtné vzorky střeva odhalí přítomnost granulomů ve většině případů, zatímco vzorky pro histologii odebrané endoskopicky pouze ve 20-30%. Negativní nález ale neznamená nepřítomnost tohoto onemocnění.

3) Patogeneze Crohnovy choroby

Crohnova choroba je onemocnění nejasného původu, na jehož vzniku se podílí celá řada faktorů. Vznik onemocnění nemá tedy přesný původ, ale je předpokládána přehnaná reakce imunitního systému na mikrobiální flóru u geneticky predisponovaných jedinců.

Gastrointestinální vrozený a adaptivní imunitní systém se neustále potýká se silnými podněty komenzální mikroflóry a složek potravin. Tyto lokální imunitní reakce vyžadují přísnou kontrolu, u zdravých jedinců je výsledkem indukce k toleranci. Postižení pacienti pravděpodobně trpí nesouhrou střevních imunitních buněk s mikroflórou intestinálního lumen. Kdy dochází ke zvýšenému přestupu bakterií do střevní stěny, přítomnost bakteriálních antigenů si vyžádá příslušné prozánětlivé reakce.

⁴ Staženo 15.11. 2011 z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/atlas/demo/16/ipage00010.htm>

Kromě výše uvedených etiologických faktorů bylo v souvislosti s tímto onemocněním prokázáno více spolučinitelů jako je pohlaví, věk, rasa, lokalizace onemocnění a také vnější vlivy prostředí.

Onemocnění CD postihuje zánětem sliznici střeva, v následujících kapitolách bude zmíněno správné fungování imunitního systému, jeho efektorových složek a poté změny při CD.

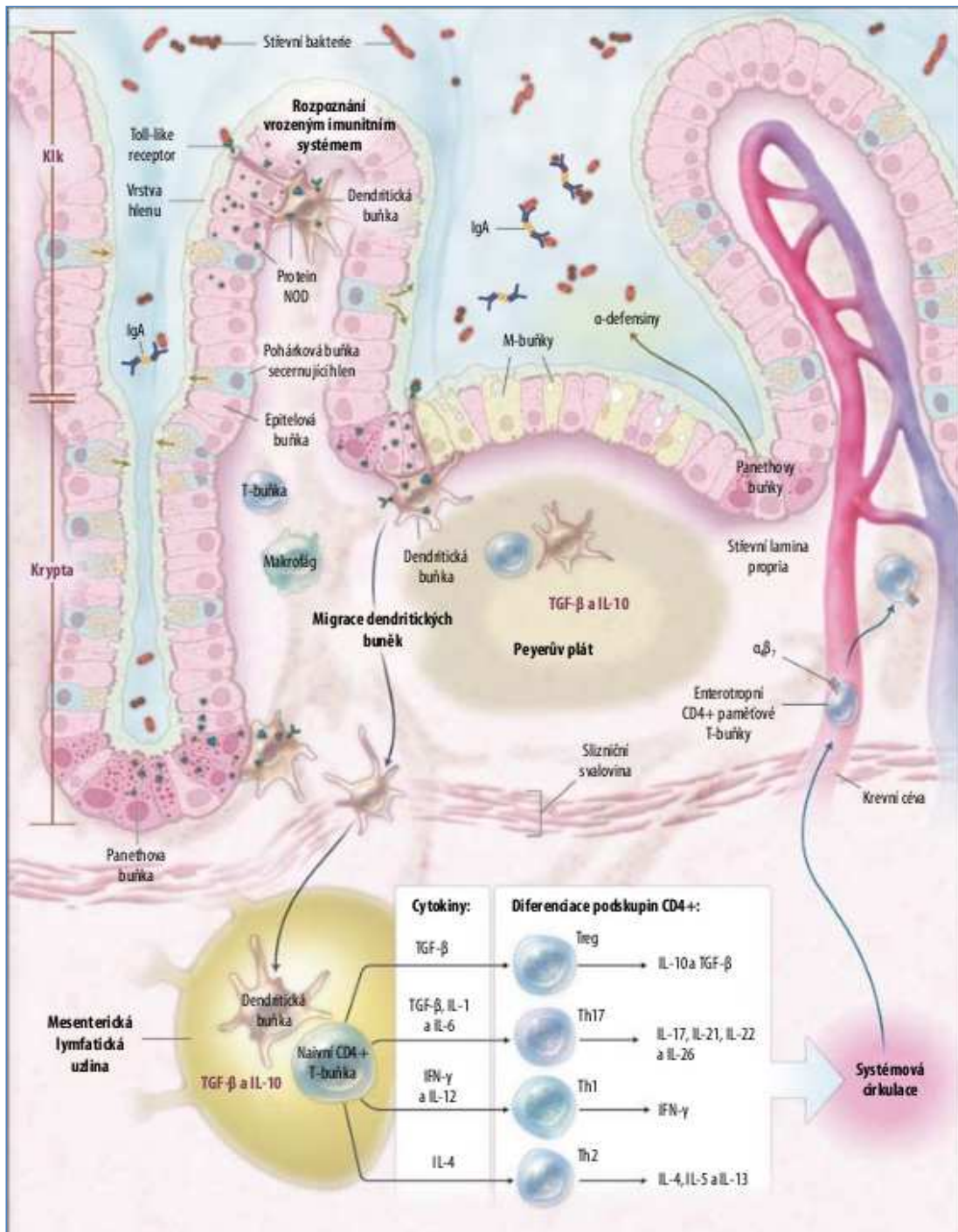
3.1. Slizniční imunitní systém

Střevní imunitní systém je největší a nejkomplexnější součástí imunitního systému. Jedná se o systém, který je v těle neustále vystavován, ve srovnání s jinými organizovanými součástmi IS, působení největšího množství antigenů v různé podobě. Může se jednat o invazivní patogenní MO, ale i o Ag potravinové a ty, které jsou součástí MO komenzálních, tzn. tělu prospěšných, a tedy neškodných. Slizniční imunitní systém byl vytvořen v reakci na silné podněty složky právě komenzální flóry. Úlohou tohoto vysoce organizovaného systému je zábrana průniku MO do *lamina propria* a udržování tolerance na antigeny z vnějšího prostředí, které pro organismus nepředstavují nebezpečí.

Slizniční IS se na tyto antigenní ataky přizpůsobil tím, že se zde vyvinuly specifické znaky odlišující se ve svých vlastnostech od jiných součástí IS. Je tomu tak například produkcí IgA, v menším rozsahu převažující Th2 buněčná odpověď, výrazné subsety APC- buněk a několik neobvyklých populací B a T lymfocytů. Přičemž jejich vzájemné interakce a migrace střevem je přísně kontrolována prostřednictvím exprese různých adhezních molekul.

Kromě vyvinutých mechanismů IS je velice důležitá anatomie střeva, celek označovaný jako GALT. Tzn. se střevem spojená lymfatická tkáň (Obrázek 6). Na povrchu tvořená epitelovými buňkami, které jsou vzájemně propojeny mezibuněčnými spoji, brání nadměrnému přestupu MO do střevní tkáně. Součástí antimikrobiální obrany jsou také specializované buňky např. Panethovy a pohárkové buňky, vyznačující se produkcí látek, jež epitel obnovují, anebo secernují peptidy usmrcující MO.

Pod epitelem se nachází mezenterické lymfatické uzliny (MLN), menší izolované folikuly a také tzv. Payerské pláty- celek označovaný jako *organizovaný* lymfatický systém, vedle *difúzního* zastoupeného množstvím rozptýlených lymfocytů aj. buněk v *lamina propria* sliznice střeva (1,2,17) (Obrázek 6).



Obrázek 5 Slizniční střevní imunitní systém (Převzato z: 1)⁵

Struktura epitelu nad Payerskými pláty je jiná ve srovnání s oblastí střeva tam, kde se Payerské pláty nevyskytují. Tzn. epitel je tedy tvořen 1 vrstvou cylindrických buněk (tj. s folikuly asociovaný epitel FAE) a difúzně bezprostředně pod epitelem se nacházejí tzv. subepitelové dómy. FAE je charakteristický svými M-buňkami, které mají funkci sem

⁵ Převzato z: 1; Jako ochrana před lumenálními bakteriemi slouží především pohárkové buňky produkující hlen, Panethovy buňky svojí výrobou IgA, dále je zajištěna sekrece antimikrobiálních látek (α-defenzinů). Monitorace Ag složení prostřednictvím PRR náleží nejen APC buňkám, ale i buňkám epitelovým (nesoucí TLR, NOD2).

dopravovat Ag z lumen střeva - jelikož na rozdíl od klasických mízních uzlin nemají aferentní cévu, která by byla schopna přivádět Ag prostřednictvím krve (1,2,17).

M buňky nemohou exprimovat MHC molekuly na svém povrchu tzn., nemají funkci APC-buněk, proto tedy samotný a neporušený Ag předkládají profesionálním APC-buňkám, jako jsou například dendritické buňky (DC) (Obrázek 6).

Cesta Ag z lumen do střeva prostřednictvím M-buněk není jediná, Ag mohou prostupovat i volně přes sliznici, kde jsou buď opět zachyceny APC-buňkami, nebo jsou unášeny krevním řečištěm a dopraveny do periferní lymfatické tkáně (Obrázek 6).

DC jsou jedny z hlavních APC buněk, jsou přítomny v cirkulaci ale především také ve tkáních na rozhraní s okolním prostředím. DC v lamina propria tlustého a tenkého střeva mají efektorovou funkci, což lze nazvat i jako mapování antigenního prostředí střevního lumen vkládáním a prodlužováním svých výběžků skrz epitelové buňky do lumen. Existují 2 možnosti jejich další existence. Pokud není v organismu přítomen žádný infekční agens způsobující zánět, nejsou DC aktivovány, ale podílí se na udržení tolerance prezentací antigenů tělu vlastních v kontextu s MHC na povrchu, například se může jednat o Ag komenzálních buněk, části odumřelých buněk nebo o molekuly rozpuštěné v mezibuněčné hmotě. Takto pohlcené částice (Ag) DC zpracuje při cestě do lymfatických uzlin, toto zpracování a předkládání Ag provádí DC nezralé.

Další možností je přítomnost zánětu a tedy zachycení PAMPs DC, po kterém následuje aktivace, jíž dosáhne DC stádia zralosti, tak ztratí svoje fagocytární schopnosti a bude sloužit nadále pouze jako aktivátor T lymfocytární odpovědi, důležité součásti specifického střevního imunitního systému (1,24). Cesta DC buněk do míst indukce specifické imunitní odpovědi (Payerské pláty a lymfatické folikuly) je regulována pomocí interakce se slizniční adresinovou adhezivní molekulou (Mad CAM-1) (1,2).

K rozpoznávání PAMPs struktur DC buňkám, ale nejen jim, slouží PRR= patogen rozpoznávající receptory, mezi hlavní z nich patří především TLR a NOD2.

Savčí TLR jsou bílkovinné PRR receptory na povrchu cytoplasmatických membrán a zahrnují prozatím 11 známých jednotlivých typů transmembránových receptorů identifikujících PAMPs (2).

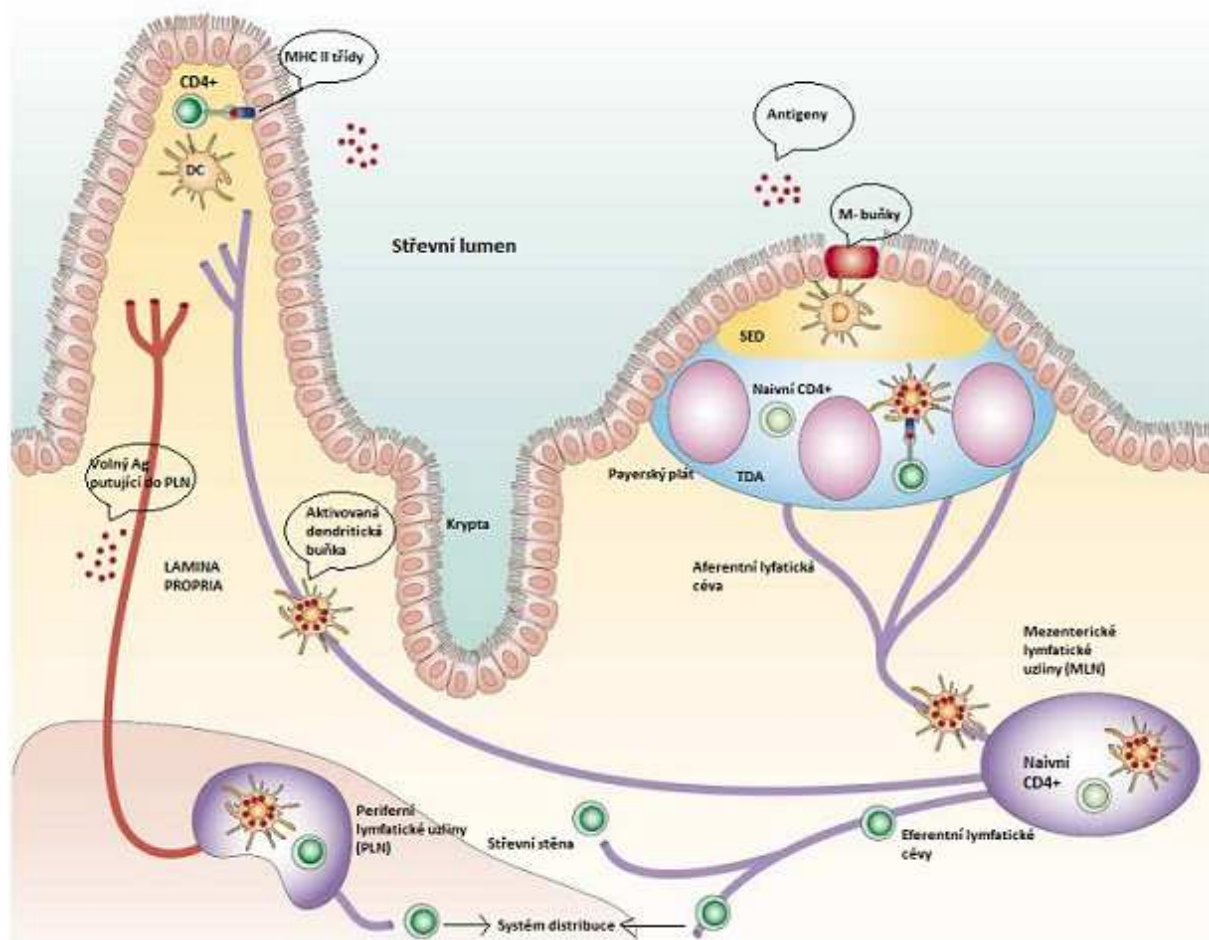
NOD2 je také proteinový receptor uložený intracelulárně, konkrétně v cytoplasmě (9,16). Je přítomný na myeloidních buňkách IS, ale nejen na buňkách IS. Vyskytuje se také na střevních epitelových buňkách, které se pak označují jako neprofesionální APC buňky.

Funkčně se podílí na aktivaci transkripce v případě rozpoznání nebezpečného vzoru. Tzn., aktivace jaderného faktoru Nf-KB, který způsobuje citlivost na bakteriální polysacharidy

(9,28,29). Aktivací Nf-KB je spuštěna kaskáda dějů, jejichž výsledkem je tvorba př. TNF, IL-1 β a antimikrobiálních peptidů.

Gen pro NOD2 se vyskytuje na chromozomu 16, je známý také jako (IBD1, CARD15).

Prezentací Ag naivním T- CD4+ buňkám v sekundárních lymfatických folikulech, CD 4+ lymfocyty jsou sem transportovány krevním řečištěm, je jejich modulace do příslušných podskupin (Th1, Th2, Th17 a Treg) na základě cytokinového prostředí a fenotypu APC-buněk. Následně je rozhodnuto o dalším dění: zda bude vůči danému Ag navozena tolerance či B-lymfocyty v příslušném folikulu projdou izotypovým přepnutím a dojde k produkci Ab (resp. Ab třídy IgA) (1,17). Transcytózou se IgA dostávají na povrch epitelových buněk, kde zamezují adhezii MO na povrch epitelu (20) nebo se uvolňují s tzv. sekreční komponentou, kde má za úlohu neutralizaci Ag (2).



Obrázek 6 Příjem a rozpoznávání antigenů ve střevě⁶

⁶ Převzato z: 17; MLN, mezenterické lymfatické uzliny; SED, subepitelové dómy; TDA, na thymu závislá oblast; PLN, periferní lymfatická uzlina. Payerské pláty i MLN se podílí na indukcii imunity a tolerance. Payerské pláty klky lamina propria jsou prostoupeny sítí aferentních lymfatických cév a ústí do MLN.

3.2. Porucha imunitního dohledu ve střevním lumen

Imunitní dohled (tzv. monitorování) nad střevním lumen mají na starosti antigen prezentující buňky (APC). Ve střevě jsou to hlavně dendritické buňky (DC), epitelové buňky (enterocyty), histiocyty a makrofágy. Všechny tyto APC buňky nesou na svém buněčném povrchu TLR a NOD receptory, označované v souboru jako PRR receptory. Tzv. patogen rozpoznávající receptory (1,2,21).

Tyto struktury rozpoznávají nebezpečné vzory pro organismus označované jako PAMP. Pod tímto názvem si můžeme představit lipopolysacharidový enterotoxin (G^- bakterií), peptidoglykany typické pro G^+ bakterie, nukleové kyseliny a některé další cukerné komponenty buněčné stěny mikroorganismů. TLR mohou být stimulovány i ligandy tělu vlastními, to představují fosfolipidy normálně se nacházející na vnitřní vrstvě membrány. K takovéto stimulaci může docházet pod vlivem stresu nebo nekróz.

Jak jsem zmínila, TLR jsou receptory vázající ligandy nacházející se na povrchu patogenů, a protože patofyziologie CD je způsobena nadměrnou reakcí imunitního systému střeva na mikroflóru, dochází také k nadměrné expresi těchto receptorů ve střevní sliznici, což bylo také podpořeno různými studiemi střevních biopsií pacientů. Zvýšená exprese těchto receptorů zavádí na otázku, zda je tento patologický proces způsobený nadměrným výskytem mikrobů ve střevě nebo přímou poruchou cytokinového mikroprostředí či jiné činnosti IS.

3.2.1. Receptory TLR 2,4

Jelikož existuje několik typů TLR byla zkoumána jejich role při IBD. Jak se ukázalo, nejdůležitější v patogenezi CD je TLR-2, reagující hlavně s peptidoglykanem, součástí buněčné stěny G^+ bakterií a TLR-4 reagující s lipopolysacharidovým endotoxinem (LPS) G^- bakterií a kyselinou teichoovou (21). LPS, pokud je přítomen v těle, je opsonizován lipopolysacharid vázajícím proteinem (LPB), takto vzniklý komplex je rozpoznán CD14 na povrchu makrofágů. Vznikající LPS-LPB-CD14 finálně aktivuje TLR-4 (22). TLR-3 receptory rozpoznávají především dvouřetězcovou RNA, kdy jsou spuštěny IS reakce proti virovým patogenům. Exprese tohoto receptoru se však u CD neprokázala jako stěžejní.

TLR-2 a TLR-4 exprese se může vyvíjet mnoha způsoby. Rozpad epiteliální bariéry a masivní kontakt s bakteriálními antigeny na zanícené sliznici by mohl být odpovědný za zvýšenou expresi TLR. Dále mohou stát za zvýšenou produkcí bakteriální produkty, odumřelé, nekrotické buňky a cytokiny T-lymfocytů ($IFN-\gamma$ a TNF). Zvýšená TNF reakce na TLR-2

ligandy souvisí s vyšší TLR-2 expresí, ta může být oproti zdravé tkáni až 9x vyšší, TLR-4 exprese potom až 5x.

Dendritické buňky, jakožto nosiči TLR a NOD receptorů, se mohou výrazně podílet na patogenezi CD, k čemuž poskytly porozumění mnohé zvířecí pokusy.

Lamina propria *tenkého střeva* je obsazena DC produkujícími CX3CR1, což je receptor pro fraktalkin, transmembránový protein a chemokin T-lymfocyty, monocytů zvyšující adhezivitu leukocytů. CX3CR1+CD11b+ DC mají schopnost rozšiřovat svoje dendritické výběžky v CX3CR1 způsobem závislým na prozkoumání střevního lumen.

Dále se ve sliznici *tenkého střeva* nacházejí dendritické buňky CD103+, které svojí produkcí kyseliny retinové zvyšují hladinu chemokinového receptoru CCR9 a intergrinu $\alpha 4\beta 7$ indukujících CD4 a CD8 T buňky k lepšímu cílenému navádění do tkáně tenkého střeva a zároveň umožňují konverzi T-lymfocytů na T regulační. Pokud jsou v jejich přítomnosti cytokiny TGF- β , IL-6 a IL-23 dochází ke vzniku Th17 efektorových buněk, které se hromadí v lamina propria pacientů s IBD. Existuje několik genů souvisejících buď i ně úplně specificky se signalizací zprostředkované Th17-buňkami a IL-23. Polymorfní varianty genů vykazují vztah, jak ke Crohnově chorobě, tak i k ulcerózní kolitidě (1).

DC *tlustého střeva* o fenotypu CD4-CD8- pohlcují a zpracovávají antigeny a indukují T buňky k proliferaci (23,24).

Objev konkrétních DC spojených s aktivací luminálních Ag může pomoci navrhnout vhodnou terapeutickou léčbu pro pacienty s IBD.

DC tedy svými funkcemi zasahují do reakcí závislých na T-buňkách, a to tak že mohou spouštět škodlivé reakce na endogenní mikroflóru, která je základem pro IBD.

3.2.2. NOD2

NOD je protein obsažený v epitelových buňkách tzv. neprofesionální APC buňky, dendritických buňkách, mononukleárních fagocytech, makrofázích= (monocytech) (1,9). Není tedy přítomen v lymfocytech, což svědčí o specifických poruchách myeloidních buněk, které mají rozhodující funkci v rozvoji Crohnovy nemoci (16).

U 30-35 % pacientů bělošské populace (1,10,25) s CD se totiž vyskytuje mutace v genu kódujícím tento protein, může to být posunová či substituční genová přestavba. Jedná se celkem o tři mutace, Tzv. jednonukleotidové polymorfismy (SNP). SNP jsou společné tím, že souvisejí se zvýšenou citlivostí ke CD. Byl popsán i počet méně často vyskytujících se variant pro CD ale nevýznamných (26).

R702W= (substituce arginin/ tryptofan na pozici 702; SNP8), G908R= (substituce glycin/ arginin na pozici 908; SNP12) a 1007fs= (frameshift mutace; SNP13) (26,27,28), přičemž 2 se týkají substituční přestavby a jedna mutace je posunová. Každá z nich způsobuje záměny aminokyselin v NOD2, způsobující narušenou odpověď na nebezpečné vzory v lumen střeva. Mohou ovlivňovat i přežívání intracelulárních parazitů (tj. adhezní invazivní *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*) ve fagocytujících buňkách (MAP) (27), nebo může docházet ke snížené sekreci defenzinů a s tím je spojená i zvýšená přilnavost a invaze MO do slizničních epitelových buněk (25).

Možný důkaz o zapojení NOD2 do patofyziologie CD, konkrétně deregulovaná aktivace Nf-KB, je účinná léčba sulfasalazinem a glukokortikoidy- známé Nf-KB inhibitory (29).

CD je multifaktoriální onemocnění, jak bylo zmíněno výše, a jedna z možných příčin vzniku může být souhra faktorů genetické informace hostitele (př. NOD2 polymorfismy) spolu s jedním či více faktory životního prostředí jako spouštěčů- v našem případě tedy *Mycobacterium* (30).

Diskuzi o možném infekčním původu CD rozvířili v roce 1989 Chiodini et al., kteří kultivovali *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) u tří pacientů s Crohnovou chorobou (25). Tento zdroj infekce je velice diskutovaný, obzvláště díky rozšířeným MAP infekcím ve stádech dojníc v Evropě, Severní Americe a Austrálii, vylučování MAP v mléce infikovanými kravami, a odolnosti intracelulárních MAP k používaným technikám př. pasterizaci.

Dalším důvodem pro podezření MAP jako původce CD je jistá podobnost chronického střevního onemocnění Johne (u zvířat) a tuberkulózy (TBC). Byla provedena studie sérodiagnostických hodnot bílkovin ze séra pacientů s CD, kontrolní skupiny dobrovolných dárců (H-MAP) a zvířat (B-MAP).

Ze čtrnácti šest bílkovin H-MAP: (ModD, PepA, transaldolase, EchA9, MAP2120c a MAP2950c), reagovalo v séru CD pacientů, přičemž ModD a PepA by mohly sloužit jako klíčové proteiny diagnostiky infekce MAP (30).

Dnešní studie využívají polymerázové řetězcové reakce (PCR) k detekci DNA *Mycobacterií*, ta byla ve zvýšené koncentraci detekována na resektátech od postižených CD (66,7 %) oproti UC (2 %) a 5 % v kontrolní skupině (25).

I když analýzy prováděné ve spojení MAP a CD potvrdily sdružení tohoto MO s onemocněním, přesto zůstává neznámé, zda je MAP patogenní pro určitou skupinu citlivých osob, nebo zda se jedná o vadný imunitní systém hostitele, který je tolerantní k přežívání MAP uvnitř buněk.

Stavba buněčné stěny MAP je odlišná od ostatních G+ nebo G- bakterií. A liší se zejména v muramyl dipeptidu MDP, podjednotka peptidoglykanu buněčné stěny (27,31). U většiny bakterií je tento MDP N- acetylovaný, ale MAP muramyl dipeptid převádějí na N- glykolylyl MDP pomocí hydroxylázy N- acetyl muramové kyseliny (NamH)- tedy hydroxylace UDP-N- acetylmuramové kyseliny na UDP-N- glycolylmuramovou kyselinu (31). Jedná se o enzym přítomný pouze u některých aerobních aktinomycet se zvýšenou imunogenní aktivitou (Freund). Právě N- glykolylyl MDP NOD2 rozpozná přednostně, dojde k silné aktivaci IS a pravděpodobně následné kaskádě patogenních procesů spojených s CD (31).

3.2.3. STAT3




Po rozpoznání nebezpečného vzoru pomocí receptoru PPR (NOD, nebo TLR) dochází po pohlcení MO a následně k prezenci Ag na povrchu APC. Ty putují do Peyerových plátů či lymfatických folikulů, kde se setkávají s naivními lymfocyty, jimž prezentují tento Ag. Během procesu kdy si buňky předávají informace o Ag složení lumen je sekretován IL-23 APC buňkou, který následně aktivuje STAT3 v naivní buňce (1).

STAT3 delece může hrát kritickou roli ve vrozené imunitě, respektive v jejich falešných aktivacích. Dochází ke zvýšené expresi TNF- γ , IFN- γ a také k vyšší NADPH oxidázové činnosti. Stat3 je transkripční prostředník pro mnohé cytokiny a je nezbytný pro normální embryonální vývoj (16). STAT3 genový deficit může tedy velice významně ovlivnit vznik a průběh CD, tím že má vliv na abnormální vývoj myeloidních bb jejich proliferaci a diferenciaci a řídí také citlivost na mikrobiální Ag (16).

3.2.4. Galectin-3

Galectin-3 je členem skupiny β -galaktosidy vázající lektin jako jeden ze 14-ti známých členů. Obsahuje oblast 130 aminokyselin, která je odpovědná za vazbu sacharidů tzv. sacharidy rozpoznávací doména (CRD) (32). Kromě této C- vazebné domény obsahuje ještě na prolin a glycin-bohatou N terminální doménu (ND), jehož prostřednictvím dokáže tvořit oligomery (33).

Galectiny jsou produkovány různými typy tkání př. epitelové buňky, fibroblasty, keranocyty, dendritické buňky, osteoklasty, monocyto-makrofágový systém (Obrázek 7). Přítomen je intra- i extracelulárně a má různé funkce, které jsou zajímavé i z hlediska patogeneze CD. Je možné, že se v několika příštích letech stane markerem aktivních forem IBD.

	T cell activation	T cell apoptosis	Cytokine production	Cell adhesion and migration	Regulatory T cells
 Galectin-1	-	+ Extracellularly	- IL-2 (T cells) - TNF α (T cells) - IFN γ (T cells) + IL-5 (T cells) + IL-10 (T cells) + TGF β (T cells)	- Adhesion and transendothelial migration of T cells	+
 Galectin-3	-	+ Extracellularly - Intracellularly	- IL-5 (Eosinophils and T cells) - IL-12 (DCs) + IL-1 (Monocytes) + IL-2 (T cells) + IL-8 (Neutrophils)	+ Adhesion to ECM + Chemoattraction of macrophages	?
 Galectin-9	?	+ Extracellularly	- IFN γ (Th1 cells) + IL-12 (DCs)	+ Chemoattraction of eosinophils - CD44-mediated T cell adhesion	?

Obrázek 7 Role Galectinu-1,3,9 při rozvoji a řešení zánětlivé odpovědi (Převzato z: 34)

Vázáním a zesíťováním glykokonjugátů na povrchu buněk, mohou modulovat procesy jako je sekrece cytokinů, buněčná adheze, migrace a apoptóza. Galectin-3 komunikuje s receptorem bcl-2, známý jako inhibitor apoptózy (32). Ve studiích bylo však prokázáno rozlišné působení exogenně aplikovaného a endogenního galectinu z hlediska apoptózy. Přičemž endogenní galectin vykazoval anti-apoptotické vlastnosti na rozdíl od exogalectinu (34).

Jedním ze znaků doprovázejících CD je šíření zánětu skrz *muscularis mucosa* a *muscularis propria*, odlišnost oproti UC. Jedná se o mechanismus vedoucí k formování fistul, pištělí a striktur. Jelikož jde o porušení celistvosti tkáně, je důležitá přítomnost opravného faktoru, a to zejména tzv. fibroblastů.

Galectin-3 byl prokázán jako silný aktivátor kolonických fibroblastů *lamina propria*. TNF je známý, že hraje důležitou roli při modulaci pištělí, (8) inkubacemi střevní biopsie galectinu-3 s TNF vedla k jeho snížené expresi- jeden z možných důvodů pozitivních výsledků anti-TNF léčby pištělí a striktur. Právě v nich byla prokázána nízká exprese galectinu-3 u pacientů s CD ve srovnání se vzorky od kontrol a pacientů s UC, tzn. sníženou funkci reparace postižené tkáně u CD (32).

Fibroblasty se neúčastní pouze opravných procesů, ale střevo mohou poškozovat vylučováním matrixových metaloproteináz (MMP), které se podílejí na extracelulární degradaci matrix, zejména MMP3 a MMP9.

Zkoumáním myofibroblastů z pištělí od pacientů s CD byla zjištěna jejich abnormální distribuce a uspořádání ve srovnání s kontrolami. Rozdíly byly patrné nejvíce v jejich zvýšené schopnosti proliferovat, uvolňovat TGF- β , TNF- α a sníženou schopností proliferace. Pištěle u

pacientů s CD jsou až ze 2/3 non-epitelizované. Což znamená, že tenká vrstva fibroblastů tvoří pomocí těsných spojení (=gap- junctions) bazální membránu, jako základní strukturu. To znamená, že se epitelové bb mohou přeměnit v mezenchymální, proces zmiňovaný jako EMT epiteliální-mezenchymální přechod. Epitelové bb nahrazené mezenchymálním fenotypem se vyznačují sníženou buněčnou adhezí a vyšší mobilitou- lepší migrace k opravě defektů sliznice (35).

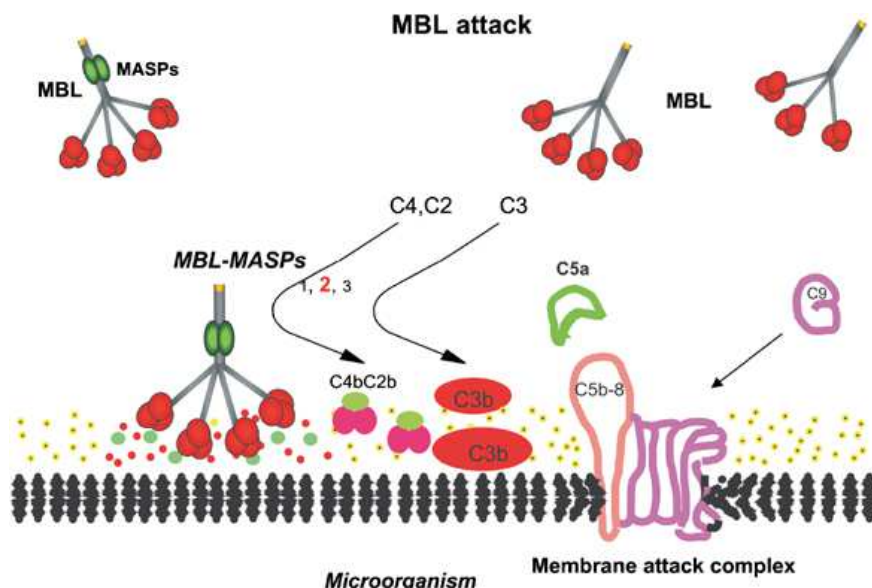
3.2.5. IgA protilátky proti pivovarským kvasnicím a CD

Jak již bylo zmíněno výše, CD je autoimunitní onemocnění, tzn. je spojené s produkcí autoprotilátek. Tyto Ab však na rozdíl od UC nejsou namířeny proti vlastním strukturám, ale proti antigenům nacházejícím se na pivovarských (pekařských) kvasnicích, konkrétně *Saccharomyces cerevisiae*. Protilátky jsou označeny zkratkou ASCA- (třídy IgG, IgA) a slouží jako pomocný diagnostický marker CD spolu s Ab ANCA, respektive jejich vzájemný poměr.

Třídy zmíněných protilátek však zřejmě nemají stejný původ. Imunoglobuliny= protilátky jsou produktem plasmatických buněk, vývojová stádia B- lymfocytů. Většina plasmatických buněk je v zažívacím traktu určena pro produkci IgA, navíc je její výroba závislá na přítomnosti MO (v našem případě *Saccharomyces cerevisiae*) a specifickém cytokinovém mikroprostředí. Tak úplně tomu není u IgG, pokud je u CD detekována třída těchto Ab, s největší pravděpodobností byl jejich vznik iniciován plasmatickými buňkami v lymfatických uzlinách mimo Payerské pláty, kde se podmínky prostředí a cytokinového složení liší od střevní sliznice. Cytokinová síť ve střevě, zejména IL- 10/ TNF- α rovnováha hraje velkou roli ve schopnosti eliminace patogenů. Byly objeveny genetické polymorfismy v genech pro IL- 10 a TNF- α spojené s jejich vzájemnou různou produkcí. Nosičství mutované alely pro TNF- α souvisí buď se zvýšenou nebo sníženou produkcí TNF- α , což má vliv na rozdílnou výrobu Ab proti vlastním a cizím Ag. V případě výskytu ASCA u pacientů s CD se jedná o polymorfismus způsobující sníženou výrobu TNF- α . Protože se jedná o prozánětlivý cytokin následně dojde ke zhoršené schopnosti efektivně eliminovat mikroorganismy, které vstupují do slizničního epitelu. Zvýšeným prostupem patogenů pod sliznici střeva dochází k absorpci těchto exogenních Ag na dendritické buňky lamina propria, které se následně stěhují do lymfatických uzlin střeva k indukci specifických imunních reakcí a produkci IgA, přičemž část z nich se stěhuje do uzlin vzdálených cytokinovému profilu střeva a dochází k produkci Ab třídy IgG (36).

IgA je obsažen v cirkulaci (c-IgA), ale zejména na sliznicích (s-IgA) tzn. i ve střevě, kde se nachází na povrchu epitelových bb. Jeho hlavní úlohou je zábrana adheze MO na povrch sliznice a to tak, že svými sacharidovými konci vyvazuje lektiny (adheziny) patogenů, čímž zabraňuje jejich nasedání na povrch sliznice.

K aktivaci komplementu (C) potřebného k usmrcení MO klasickou cestou je potřebný vznik komplexu Ag-Ab (20). Právě v aktivaci komplementu se od sebe liší c-IgA a s-IgA → komplement takto neaktivuje, ale naopak spouští tuto kaskádovitou aktivaci komplementu lektinovou cestou přes manosa-binding-lektin (MBL). Tj. reaktant akutní fáze a strukturně podobný složce C, konkrétně C1 (Obrázek 8), jeho navázáním je pak spuštěna reakce IS vedoucí k opsonizaci, lýze nebo fagocytóze MO přímo bez účasti protilátek (37). MBL je bílkovina, která váže selektivně sacharidy, (př. repetice manózových zbytků na kvasinkách, G⁻ bakteriích, N-acetylglukosamin), exprimované na povrchu MO nebo se váže přímo na povrch imunoglobulinů (Ig). Ig jsou vysoce glykosylované molekuly. Mimo vazebné místo pro Ag má IgA na těžkém řetězci několik dalších cukerných řetězců tj. N-glykany, O-glykany. Tyto cukerné řetězce Ig mohou mít pozměněnou strukturu a hrát tak roli v autoimunitních onemocněních jako jsou v případě CD nespecifické střevní záněty. Důležitá je zde právě zmíněná pozměněná cukerná struktura, která má podíl na aktivaci komplementu lektinovou cestou, s čímž souvisí vznik zánětlivé reakce, tedy i patogeneze CD (20, 37).

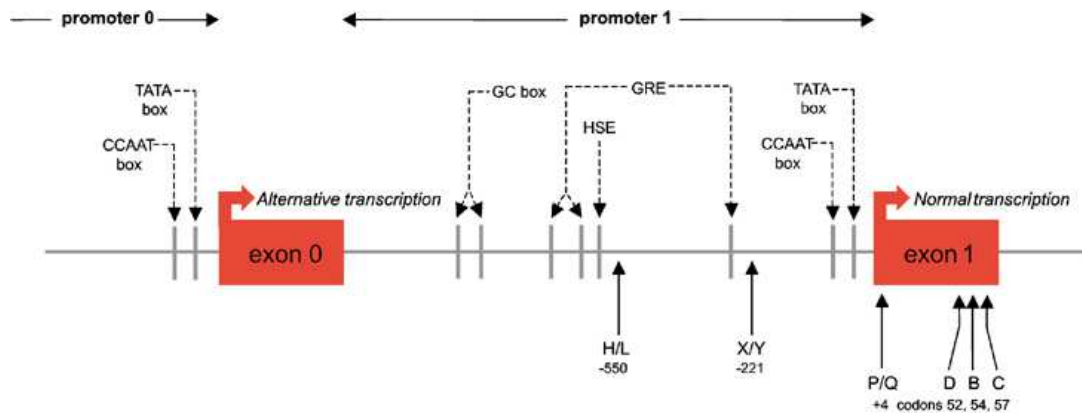


Obrázek 8 Manóza vázající lektin (MBL) způsobující komplementový atak MO⁷

Koncentrace MBL se značně liší mezi jednotlivci, přičemž je ovlivněna mutacemi. Lidský gen pro MBL se nachází na chromozomu 10q 11,2-21 (Obrázek 9) a skládá se ze 4 exonů

⁷ Převzato z: 37; MBL v komplexu s MASPs váže cukry na povrchu MO a společně tak zprostředkovávají komplementový atak. MASPs představuje serinové proteázy.

(37). K bodovým mutacím dochází v exonu 1, konkrétně v kodonu 52(D), 54 (B) a 57 (C), výsledkem jsou záměny aminokyselin mající za následek sníženou funkci MBL spojenou se zvýšenou citlivostí na některé infekční choroby, což zvyšuje riziko vzniku autoimunitního onemocnění (20,37,38). Tato zjištění mohou mít zásadní význam při rozvoji CD.



Obrázek 9 MBL2 polymorfismy; (převzato z: 37)

4) Diagnostika onemocnění

Diagnostika Crohnovi choroby je velice důležitá ke stanovení aktivity onemocnění a k určení správného léčebného postupu, medikamentózního nebo chirurgického.

Mnohdy se u pacientů vyskytují příznaky typické pro CD- anémie, vysoká hladina CRP, trombocytóza, úbytek váhy -atd., ale samotná choroba může propuknout až po delší době, někdy i po letech. Proto je nutná dlouhodobá monitorace pacienta k včasnému zachycení onemocnění a zahájení účinné léčby. Někdy nemusí být z příznaků, které se u pacienta vyskytují, čitelné že se jedná právě o CD.

Pokud se pacient dostaví k lékaři na vyšetření, pravděpodobně projde řadou testů, které se mohou být rozčleněny do tří skupin: (5,39)

Tabulka 3 Seznam vyšetření pacientů s CD.

Vstupní vyšetření
Krevní obraz
CRP- (C reaktivní protein)
Železo, stopové prvky a minerály
Zobrazovací techniky
Ultrasonografie
Magnetická rezonance
Počítačová tomografie CT
Endoskopická vyšetření
<ul style="list-style-type: none">• Kapslová endoskopie• Koloskopie• Enteroskopie
Speciální imunologická vyšetření
Vyšetření autoprotilátek (ANCA, ASCA)
Stanovení cytokinů
Chemotaxe

4.1. Vstupní vyšetření

Diagnostika onemocnění se opírá také o histologické vyšetření, viz výše.

Pacientovi je po dostavení k lékaři odebrána příslušným zdravotníkem krev, která prochází řadou rozborů a testů. V hematologické laboratoři je stanoven krevní obraz, v biochemické laboratoři CRP, minerály aj.

Hladina CRP velice dobře koreluje se zánětlivými procesy v těle, (40) a to zejména proto, že játra velice rychle reagují na prozánětlivé cytokiny kolující v krvi např. interleukin 1 a 6, interferon γ , TNF α aj. Produkce těchto nízkomolekulárních látek bb imunitního systému vede k jejich zachycení v játrech a následnou odezvou, tedy vznikem CRP.

Je to tedy do jisté míry marker zánětu, který lze stanovovat pro doplnění diagnózy, může dosahovat hodnot z normálních 0-7,0 mg (41) až na >45 mg (40).

V krevním obrazu se můžeme setkat u CD s anemií, trombocytózou a zvýšenou sedimentací erytrocytů (FW) 58-82/hod, (5) která je užívána hlavně pro diagnostiku zánětů a nádorů. Neprozradí sice původ zánětu, ale je vodítkem pro jeho mapování (41).

4.2. Zobrazovací techniky

4.2.1. Ultrasonografie

Je celkem příjemná a bezbolestná vyšetřovací technika, která slouží k monitoraci vnitřních orgánů. Monitoring orgánů je prováděn pomocí ultrazvuku, který prochází orgány a odráží se od nich na základě změny hustoty tkáně. Na monitoru vzniká pak výsledný obraz v podobě světlých a tmavých skvrn jako míra odrazu, kterou dále lékař hodnotí. V dnešní době je to metoda první volby, používaná zvláště u mladých pacientů, protože příliš nezatěžuje organismus a nevyužívá ionizujícího záření (13).

Jak jsem zmínila, není to metoda nějak bolestivá, ale bohužel může být v některých případech nevyhovující. Například u obezních osob, kdy musí ultrazvuková vlna čelit průchodu tukovou tkání (3).

Klasickou ultrasonografií lze hodnotit morfologii střeva: reliéf sliznice, Kerkringovy řasy, šíři průsvitu střeva, změny v okolí střeva nebo tloušťku střevní stěny (13,42). Aktivitu onemocnění lze tedy hodnotit dle morfologických kritérií, ale také dle vaskularizace mezenteria a střevní stěny k čemuž slouží blood-pool kontrastní látka (13).

Pro hodnocení dynamiky perfuze střevní stěny při stanovení aktivity Crohnovy choroby se využívá kombinace ultrasonografie a blood-pool kontrastní látky. Tato sloučenina se nijak nemetabolizuje a nepřestupuje stěnou cévy (13).

Po aplikaci do střevní žíly se sleduje rychlost sycení střevní stěny touto látkou, z čehož lze usoudit míru poškození a tak aktivitu nemoci pacientů s CD.

4.2.2. Magnetická rezonance

Je zobrazovací metoda, která snímá jednotlivé orgány pacienta, umístěného do jakéhosi tunelu (3). V tomto kovovém tunelu je vloženo vnější silné homogenní magnetické pole. Skener MR pracuje s vlastním magnetickým polem atomů buněk a snímá je jako radiové vlny do výsledného obrazu.

MR má tu výhodu, že se dá aplikovat na těhotných ženách i malých dětech díky tomu, že nevyužívá ionizujícího záření podobně jako ultrasonografie (13). Je zde pouze jedno riziko, a to u pacientů s kovovými náhradami, kteří by toto vyšetření neměli podstoupit, v případě podepisují písemný souhlas.

Podobně jako ultrasonografie, která hodnotí morfologii střeva a vaskularizaci střevní stěny, je MR založená na podobném principu.

Klasická MR využívá hodnocení změn střeva a to zejména pokud CD zasáhla zánětem konečník či řitní kanál a způsobila komplikace v podobě abscesů či píštělí (3).

MR lze kombinovat s blood-pool kontrastní látkou a sledovat maximální nasycení střevní stěny (13). Tento typ MR je mnohem účinnější ve spolupráci s ultrasonografií, tyto metody se velice dobře doplňují a lze pomocí nich určit aktivitu onemocnění tzn. remisi či relaps až v 93%.

4.2.3. Počítačová tomografie= CT

Jedná se kombinaci rentgenového vyšetření s počítačem, který zpracovává získané informace a utváří výsledný obraz. Při vyšetření trávicí trubice a břišních orgánů je CT kombinováno s kontrastní látkou, kterou musí pacient před vyšetřením vypít.

Výsledný obraz je mnohem kvalitnější než u klasického rentgenového snímku a tím je velice usnadněna rychlost a přesnost vyšetření, poskytuje až o 46% více informací než klasický rentgenový snímek.

4.2.4. Endoskopie

- a) Kapslová endoskopie spočívá v požití kapsle, vlastního endoskopického aparátu= endoskopu o rozměrech 11x26 mm (43). Obal je tvořen z plastového obalu, který je rezistentní vůči kyselému pH žaludku. Vlastní kapsle potom obsahuje snímací aparát, který vytváří při průchodu trávicím traktem 2 snímky za 1s (3). Samotná kapsle je funkční po dobu trvání baterií, které jsou z netoxického materiálu, a to činí zhruba 8-12 hodin.
- b) Kolonoskopie neboli koloskopie je vyšetření u pacientů méně oblíbené, lékař zavádí endoskop konečníkem, až do sledované části střeva což může být i střevo tenké. 2 dny před vyšetřením se musí dodržovat tekutá strava a 1 den před vlastním nástupem k lékaři vypít projímadlo k vyčištění lumen střeva (3). Ačkoli jde o metodiku méně oblíbenou, je stále velmi důležitá a suverénní v zobrazení a posouzení patologických změn a umožňuje současně provádět biopsii a některé terapeutické zákroky.
- c) Enteroskopie je moderní metoda vyšetření tenkého střeva, které je možno vyšetřit v celém jeho rozsahu na rozdíl od ileoskopie, která nám umožňuje náhled pouze cca 10-ti cm. Dvoubalonová enteroskopie navíc umožňuje odběr histologie k upřesnění diagnózy a dokonce i terapeutický zákrok (3).

4.3. Speciální imunologická vyšetření

4.3.1. Vyšetření autoprotilátek ASCA, ANCA

V obou případech se jedná o autoprotilátky, ASCA jsou protilátky namířené proti běžným a navíc prospěšným pekařským kvasinkám (*Saccharomyces cerevisiae*) (3,5). (Viz. Kapitola patogeneze). Vyskytují se zejména u pacientů s CD (60%). ANCA jsou stanovovány jako perinukleární antineutrofilní cytoplazmatické Ab, vyskytující se zejména u pacientů s ulcerózní kolitidou (60-70,80%) (5,40). Stanovení se provádí dle dohody nepřímou imunofluorescencí, která poskytuje 2 vzory barvení. C-ANCA s granulárním cytoplazmatickým barvením rozeznávajícím proteinázy-3 a P-ANCA tedy perinukleární vzor reagující na myeloperoxidázu. Právě P-ANCA se vyskytuje u IBD, ale v atypické formě, antigen zde není myeloperoxidáza a barvení je také odlišné. Jadernou periferii lemují nehomogenní široký okraj (40).

Jako vhodnější ukazatel hodnocení testu u pacientů s CD je použití poměru ANCA negativní / ASCA pozitivní. ASCA jsou protilátky proti pekařským a pivovarským kvasnicím, a to třídy IgG a IgA prokazatelné u pacientů s CD až v 60-70% (40). Jsou to Ab, jejichž hlavní antigen byl označen jako manotetrosa= (oligomanan), poměr vzniku IgG a IgA protilátek se může v jistých případech lišit.

Interpretace výsledků ASCA je složitá a není vhodná pro široký screening CD v populaci (5). Jsou to tedy autoprotilátky, které bývají oproti fyziologickým Ab obsaženy v těle ve vyšších koncentracích s vyšší afinitou k antigenu. Typově se jedná o skupinu IgG imunoglobulinů oproti IgM v těle běžně se vyskytující (2,44). K vyšetření se využívá nepřímá fluorescence a cílový antigen, proti kterému byla protilátka namířena, bývá doplněn ELISOU či Westernblot analýzou, díky antigenní nespecifitě nepřímé fluorescenční metody.

Princip nepřímé fluorescence spočívá ve vzniku komplexu Ag-Ab, kdy Ag je obsažen na příslušném histologickém řezu střeva, k němuž se přidá vyšetřované sérum obsahující Ab. Ke vzniklému komplexu je po inkubaci přidána sekundární značená Ab (fluorescein) s afinitou k Ab primární, navázané v komplexu při první inkubaci (5).

4.3.2. Fagocytóza a oxidační metabolismus

Lidský imunitní systém disponuje řadou buněk, které mají úlohu odstraňovat cizorodý materiál, poškozené buňky tělu vlastní a tím ho tak chránit. Těchto přirozených zabíječů je těle několik druhů, tuto schopnost mají neutrofilů, dendritické buňky, monocytů/makrofágů a

eozinofily (2,5). Při pochlčení mikroorganismu dochází k aktivaci enzymové kaskády, která daný MO usmrtí. Dochází k respiračnímu kyslíkovému vzplanutí, které má baktericidní účinek.

Při chybné funkci těchto buněk v lidském těle může docházet k různým poruchám, proto ačkoli toto vyšetření není řazeno mezi základní, je v mnohých případech velice přínosné.

Tímto vyšetřením se tedy hodnotí schopnost polymorfonukleárů a buněk monocytomakrofágového systému pohltnit a následně zneškodnit definované množství mikrobů nebo substrátu v podobě mikrosférických hydrofilních partikulí (MSHP) (5,45). Pokud se jedná o složení pohlcovaného materiálu: z mikrobů se nejčastěji používají *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, stafylokoky, mikropartikelky jsou potom z latexu a dobře smáčivé.

Oxidační metabolismus/vzplanutí je z hlediska indikace Crohnovy choroby metoda s větší výpovědí a významem. Je založená na schopnosti fagocytárních buněk, respektive jejich oxidačního metabolismu, redukovat bezbarvé tetrazoliové soli na barevné formazany (45).

4.3.3. Chemotaxe, cytokiny

Chemotaxe je schopnost řady druhů buněk produkovat tzv. cytokiny, prostřednictvím kterých si buňky předávají informace o místě vzniku zánětu. K tomu, aby zpětná reakce byla úplná je zapotřebí ještě přítomnost příslušných receptorů pro tyto chemotaxiny, adhezivní molekuly a příslušný kontraktilní aparát (2,5).

Pro vyšetření cytokinů je nutné zaprvé buňky izolovat a to tak že se zředěná odebraná periferní krev vede přes Ficoll- Hypaque gradient, oddělená střední vrstva lymfocytů se nechá kultivovat a příslušné hladiny cytokinů (TNF- α , IL-1, MCP-1) jsou detekovány pomocí metody ELISA (46).

Jak jsem již zmínila, jsou to látky důležité k iniciaci náboru buněk do místa zánětu, samotnou chemotaxi lze vyšetřovat in vivo (Rebuckovo kožní okénko) a in vitro Boydenova komůrka).

5) Léčba

Léčbu můžeme rozdělit na chirurgickou a non-chirurgickou=konzervativní, (8) která zahrnuje kromě medikamentů různého druhu i podávání doplňkové výživy a některé endoskopické zákroky.

Jelikož je Crohnova choroba chronické onemocnění charakterizované častým střídáním remisí a relapsů, není vyléčitelná ani medikamentózně, ani chirurgicky.

CD léčba bývá zahájena pokud možno vždy medikamentózně, tzn. nechirurgickým způsobem. Snaha lékařů spočívá v tom, že většinou předepíše co nejvyšší dávky léků k dosažení remise, období klidu, a po jeho nastolení přichází na řadu udržovací terapie.

5.1. Medikamentózní léčba

Volbou číslo 1 jsou **aminosalicyláty**, které ve 30. letech 19. století vytvořila švédská lékařka Nana Schwartzová, za tento výtvar byla roku 1974 nominována na Nobelovu cenu. Tento lék se úspěšně začal užívat pro léčbu IBD v roce 1948 (8).

Aminosalicyláty snižují tvorbu prostaglandinů, leukotrienů, IL-1 α , IL-1 β , a funkci granulocytů, redukuje syntézu imunoglobulinů a upravují metabolismus epitelových buněk střeva. Sulfasalazin, působí antibakteriálně (AB) a protizánětlivě (AI), díky tomu, že obsahuje 2 účinné složky sulfapyridin (AB) a 5-aminosalicylovou kyselinu (mesalazin). Bohužel tento lék vykazoval příliš nežádoucích účinků, což bylo předmětem zkoumání studenta Azada Khana (3). Ten přišel v 70. letech na to, že vlastní účinná látka hojící poškozenou tkáň je mesalazin, a tak nemusí být podávána spolu s sulfapyridinem. Proto jsou dnes užívány léky obsahující pouze mesalazin, díky tomu že nemá vedlejší účinky- olsalazin, mesalazin a besalazin.

5.1.1. Hormonální léčba

Týká se podávání synteticky vyrobených léčiv, u kterých se využívá jejich protizánětlivých vlastností a inhibice produkce prozánětlivých cytokinů aj. Lze sem zařadit prednisolon a methylprednisolon, jsou to medikamenty velice účinné, ale každé plus má své mínus. Mají nežádoucí účinky na metabolismus kostní tkáně, metabolismus cukrů a po jejich vysazení nastane často relaps. Toto je jen výčet těch nejvýznamnějších vedlejších účinků, bohužel jich je více (3,8).

Medikamenty volby číslo tři jsou **imunopresiva**, díky tomu že mají velké množství nežádoucích účinků. Jejich zrod přišel po druhé světové válce, kdy byla objevena molekula azathioprinu.

Lze sem zařadit medikamenty azathioprin a 6-merkaptopurin; cyklosporin A; metotrexát- u toho léku musí být pacienti opatrní při početí dítěte, pokud tento lék užívají, protože je to silný teratogen, způsobující vývojové vady a defekty plodu.

5.1.2. Biologická léčba

Je určena především pacientům, u kterých předešlá terapie selhala nebo měla nízkou odezvu. Jedná se o proteiny připravené metodami genetického inženýrství, jde o látky čistě biologické

povahy. Může se jednat i o aplikaci látek vyrobených z lidské krve (3). Infliximab je monoklonální protilátka založená na principu navázání se na solubilní a membránové TNF- α tím, dojde k neutralizaci. Skládá se ze 75% lidské komponenty a zbývající část, tedy 25%, je myší (47). Patří mezi chimérické monoklonální protilátky a je namířena k indukci apoptózy aktivovaných T-lymfocytům a aktivaci komplementu. Dále může být k léčbě použita tzv. humanizovaná CDP 571 monoklonální protilátka, která je z 95% lidská a variabilní komponenta je doplněna myší pouze z 5%. Indukuje inaktivaci TNF bez apoptózy. Léčba pomocí těchto léků může indukovat tvorbu protilátek, protože obsahuje antigenní náboj, a to hlavně v podobě myší sekvence.

Adalimumab, na rozdíl od Infliximabu, je čistě lidská protilátka se srovnatelnými účinky (47).

5.1.3. Podpůrná a doplňková léčba

Zahrnuje enterální výživu, parenterální výživu, substituční léčbu, protibakteriální léčbu a bakteriální léčbu.

5.2. Chirurgická léčba

I přesto, že je léčba Crohnovy choroby převážně medikamentózní, 55-90% pacientů s tímto onemocněním nakonec podstoupí chirurgický zákrok, (3, 44) během života (48).

Chirurgické řešení je bráno v úvahu až v poslední řadě, kdy selhala konzervativní léčba, a lékaři nejsou schopni dosáhnout remise po čas 2-3 měsíců.

V některých případech může pro pacienta znamenat chirurgický zákrok jak psychickou, tak i fyzickou úlevu. Místo resekce postižených částí střeva se dnes nabízí šetrné strikturoplastiky, které jsou indikovány při mnohočetných fibrotických strikturách a u pacientů s obstrukčními příznaky (7). U perianálních pištělí dochází k tomu, že se operatér snaží spojit pištěle do jedné a zajistit tak trvalou drenáž.

6) Závěr

Náplní mojí bakalářské práce bylo seznámit čtenáře s Crohnovou chorobou, jejími příznaky a příčinami toto střevní zánětlivé onemocnění způsobující.

Během vypracování svojí bakalářské práce jsem sice příčinu způsobující toto autoimunitní střevní onemocnění neobjevila, ale pokusila jsem se o vypracování stručného přehledu možných činitelů či faktorů spolupůsobících v patogenezi CD.

Jelikož se jedná o autoimunitní onemocnění se stoupající incidencí především u mladých lidí a bohužel i dětí myslím, že je třeba zamyslet se nad dosavadním životním stylem i nad tím, jak se jeho provozování odráží na zdraví nás všech.

7) Použitá literatura

- 1) Abraham, MD, Judy H. Cho, MD- Zánětlivá střevní onemocnění- Medicína po promoci: 11; 2010; s. 6-14
- 2) Václav Hořejší, Jiřina Bartůňková; Základy imunologie; nakladatelství TRITON; 2009; 316 stran
- 3) Renata Červenková; Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida; nakladatelství GALÉN; 2009; 112 stran
- 4) Jan Lata, Jan Bureš, Tomáš Vaňásek a kolektiv; Gastroenterologie; nakladatelství GALÉN; 2010; 251 stran
- 5) V. Hrabovský, A. Mendlová, T. Posolda a kolektiv- Role protilátek anti-Saccharomyces cerevisiae: Čes a Slov Gastroent a Hepatol; 64(3); 2010; s. 7-12
- 6) Hrabovský V., Zadák Z., Bláha V. a kolektiv; Metabolismus lipidů u Crohnovy choroby; Klin. Biochem. Metab.; 14(35); 2006; s. 228-231
- 7) Krška Z., Šváb J., Lukáš M., Pešková M.; Idiopatické střevní záněty- profil chirurgicky řešených nemocných I. Morbus Crohn; Miniinvazivna chirurgia a endoskopia I; 2005
- 8) Michal Konečný; Konzervativní léčba Crohnovy choroby; Klin Farmakol Farm; 18; 2004; s. 144-145
- 9) Daniel J. B. Marks, Farooq Z. Rahman, Gavin W. Sewell et al; Crohn's Disease: an Immune Deficiency State- Clinic Rev Allerg Immunol; 38; 2010; s. 20-31
- 10) PhDr. Radko Obereignerů, Ph.D., MUDr. Katarina Kollarova; Psychologické aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí; Psychiatr. prax; 9(1); 2008; s. 33– 37
- 11) Kimberly Ephgrave, MD; Extra-Intestinal Manifestations of Crohn's Disease; Surgical Clinic of North America; 87; 2007; s. 673-680
- 12) William R. Best, MD; Predicting the Crohn's Disease Activity Index From the Harvey-Bradshaw Index; Inflamm Bowel Dis; 12; 2006; s. 304-310
- 13) Hynek Mírka, Jiří Ferda, Jana Koželuhová, Kristýna Ohlídálová; Hodnocení dynamiky perfuze střevní stěny při stanovení aktivity CD - Ces Radiol; 63(1); 2009; s. 42-47
- 14) M. Lukáš; Zvláštnosti diagnostiky a terapie idiopatických střevních zánětů ve vyšším věku; ČES GER REV; 5(2); 2007;s. 68-71
- 15) L. Carlos Junqueira, José Carneiro, Robert O Kelley; Základy histologie; vydavatel H+H; 2002; 502 stran

- 16) Thomas Welte, Samuel S. M. Zhang, Tian Wang, Zhiyuan Zhang et al; STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity-; 100; 2003; s. 1879-1884
- 17) Allan McI.Mowat; Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens;; Immunology; 3; 2003; s. 331-343
- 18) Motoji Oki, Haruo Ohtani, Yoshitaka Kinouchi; Accumulation of CCR5 T cells around RANTES granulomas in Crohn's disease: a pivotal site of Th1-shifted immune response?; Laboratory Investigation; 85; 2005; s. 137-145
- 19) S. Brychtová, A. Hlobilková; Histopatologický atlas; nakladatelství GRADA; 2008; 112 stran
- 20) K. Matoušovic, J. Mestecky, M. Tomana a kolektiv; Imunoglobulin A a choroby ledvin; Vnitř Lék; 52(3); 2006; s. 256-262
- 21) M. Pierik, G. De Hertogh, S. Vermeire; Epithelioid granulomas, pattern recognition receptors, and phenotypes of Crohn's disease; Inflammatory bowel disease; *Gut*; 54; 2005; s. 223-227
- 22) Lenka Frolová, Pavel Drastich, Pavel Rossmann; Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis; 2007
- 23) E. Majorova, A. Arató, B. Szebeni, G. Veres, A. Dezsőfi, K. Rusai, Á. Vannay, M. Mraz, Increased expression of Toll-like receptor TLR2 and TLR 4; 2007; s. 1365-2249
- 24) Jan Hendrik Niess; Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease: - *World J Gastroenterol*; 14; 2008; s. 5138-5148
- 25) R Balfour Sartor; Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease?; *Gut*; 54; 2005; s. 896- 898
- 26) L. J. Walker, M. C. Aldhous, H. E. Drummond et al; Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations; *Clinical and Experimental Immunology*; 153; 2004; s. 490-496
- 27) Dylan M Glubb, Richard B Gearry, Murray L Barclay et al; NOD2 and ATG16L1 polymorphisms affect monocyte responses in Crohn's disease; *World Journal of Gastroenterology*; 17(23); 2011; s. 2829-2837
- 28) Yasunori Ogura, Denise K. Bonen, Naohiro Inohara; A frameshiftmutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease; *NATURE*; 411; 2001; s. 603-606

- 29) Jean-Pierre Hugot, Mathias Chamaillard, Habib Zouali et al; Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease; *Letters to nature*; 411; 2001; s. 599-603
- 30) A-Rum Shin, Hwa-Jung Kim, Sang Nae Cho et al; Identification of seroreactive proteins in the culture filtrate antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* human isolates to sera from Crohn's disease patients; *FEMS Immunol Med Microbiol*; 58; 2010; s. 128-137
- 31) François Coulombe, Maziar Divangahi, Frédéric Veyrier; Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide; *J Exp Med.*; 206; 2009; s. 1709-1716
- 32) Stefan Muller, PhD, Thomas Schaffer, MSc, Beatrice Flogerzi; Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in inflamed intestinal epithelium in IBD; *Inflamm Bowel Dis*; 12; 2006; s. 588-597
- 33) Alison C. MacKinnon, Sarah L. Farnworth, Philip S. Hodgkinson; Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3; *The Journal of Immunology*; 180; 2008; s. 2650 -2658
- 34) G. A. Rabinovich, F.-T. Liu, M. Hirashima et al; An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer; *Scandinavian Journal of Immunology*; 66; 2007; s. 143–158
- 35) Philip J. Tozer, MBBS, Kevin Whelan, PhD, Robin K.S. Phillips, MS; Etiology of Perianal Crohn's Disease: Role of Genetic, Microbiological, and Immunological Factors; *Inflamm Bowel Dis*; 15; 2009; s. 1591–1598
- 36) Patricia Castro-Santos; Lourdes Mozo; Carmen Gutiérrez; Ana Suárez; TNFA genotype influences development of IgA-ASCA antibodies in Crohn's disease patients with CARD15 wild type; *Clinical Immunology*; 121; 2006; s. 305-313
- 37) P Garred, F Larsen, J Seyfarth, et al; Mannose-binding lectin and its genetic variants; *Genes and Immunity*; 7; 2006; s. 85–94
- 38) Frank Seibold MD; Angelica B.W. Boldt PhD, MSc; Beatrice Seibold-Schmid et al; Association of deficiency for mannan-binding lectin with anti-mannan antibodies in Crohn's disease: A family study; *Inflammatory bowel diseases*; 13; 2007; s. 1077–1082
- 39) MUDr. Jan Malý; Diagnostika a následná péče o děti s nespecifickými střevními záněty; *Pediatric pro praxi*; 2004
- 40) Xavier Bossuyt; Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease; *Clinical Chemistry*; 2; 2006; s. 171–181

- 41) <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/c-reaktivni-protein.html>
- 42) D. Bartušek, M. Vavříková, V. Válek, J. Hustý; Využití ultrazvuku v diagnostice onemocnění střev; Čes a Slov Gastroent a Hepatol; 64(4); 2010; s. 18-24
- 43) Mudr. Tomáš Douša, Ph.D.; Kapslová endoskopie: endoskopie; 19; 2010; s. 117-120
- 44) J. Bartůňková, M. Paulík a kolektiv; Vyšetřovací metody v imunologii; nakladatelství GRADA; 2011; 168 stran
- 45) <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-imunologicka-diagnostika-413551>
- 46) Olof Grip, MD, PhD; Sabina Janciauskiene, PhD; Stefan Lindgren, MD, PhD; Circulating Monocytes and Plasma Inflammatory Biomarkers in Active Crohn's Disease -; Inflamm Bowel Dis; 10; 2004; s. 193–200
- 47) Vladimír Zbořil; Influximab v klinické léčebné praxi; Klin Farmakol Farm; 19; 2005; s. 67-71
- 48) Vrzgula A., Pribula V., Radoňak J., Zakuciová M.; Laparoskopia v chirurgickom riešení Crohnovej choroby; Miniinvazívna chirurgia a endoskopia; 2010; s. 17-21