

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Ondřej Fabián

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

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

Praha, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN
Motol

Autor: MUDr. Ondřej Fabián

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

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

OBSAH

1 Souhrn	5
2 Abstract	7
3 Úvod.....	9
4 Cíle práce	11
5 Materiál a metodika	13
6 Výsledky studií a diskuze.....	15
6.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby.....	15
6.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy	16
6.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekcí	18
6.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními	20
7 Závěry.....	21
7.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby.....	21
7.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy ...	22
7.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekcí	22
7.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními	23
8 Použitá literatura	24

9 Seznam publikací doktoranda	28
9.1 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech s IF	28
9.2 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech bez IF ..	28
9.3 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech s IF	29
9.4 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech bez IF ...	29

1. SOUHRN

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

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

V další fázi výzkumu jsme se snažili hledat jiné, přesnější metody hodnocení histopatologické aktivity zánětu, které by mohly sloužit jako prediktor komplikací. Zaměřili jsme se na imunohistochemický průkaz tkáňového kalprotektinu (CPT). Jakožto produkt neutrofilů je v případě aktivního zánětu v trávicím traktu uvolňován do sliznice a následně do lumen střeva. Dle naší hypotézy by jeho přímý průkaz ve tkáni mohl zpřesnit hodnocení aktivního zánětu u dětí s IBD. Provedli jsme na toto téma dvě

studie, jednu na souboru dětských pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) a druhou na souboru dětí s CD, které podstoupily ileocékální (IC) resekci a my stanovovali tkáňový CPT v resekčních okrajích IC resekátů. V první jmenované studii jsme zjistili, tkáňový CPT sice dobře koreloval s mikroskopickou aktivitou zánětu stanovenou standardními histopatologickými skóre, špatně však koreloval s endoskopickou aktivitou zánětu, hladinami fekálního CPT a klinickou aktivitou onemocnění a neměl, podobně jako samotné histopatologické vyšetření, prediktivní schopnost stran rozvoje komplikací. Oproti tomu, hladiny fekálního CPT i střední klinická aktivita zánětu (definovaná jako Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index > 40) predikovaly nutnost zahájení systémové kortikoterapie a terapie 5-aminosalicylovou kyselinou. Ani ve druhé studii na toto téma jsme nepotvrdili, že by zpřesnění hodnocení aktivity zánětu v resekčních okrajích IC resekátů predikovalo rozvoj komplikací, v tomto případě endoskopické rekurence po 6 měsících od operace. Jako prediktor se však ukázala být přítomnost akutní a chronické peritonitidy v resekčních okrajích a dále i vyšší hladiny CRP a nízký sérový albumin v době diagnózy a vysoký fekální CPT v době kontroly.

Třetí oblast našeho výzkumu se pak zaměřila na možnosti zlepšení diagnostiky dětských IBD. Cílili jsme se na imunohistochemický průkaz CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí s CD, UC i neklasifikovanou IBD (IBDU). Jelikož dosavadní poznatky o imunopatogenezi IBD naznačovaly, že by děti s UC mohly mít vyšší hodnoty CD30+ lymfocytů v séru i střevní sliznici, rozhodli jsme se tuto detekci využít jako potencionální marker diferenciacie v UC. Naše práce prokázala signifikantní rozdíl v počtech CD30+ lymfocytů ve sliznici téměř všech etáží střeva, s maximem v rektu. Děti s UC vykazovaly výrazně vyšší hodnoty CD30+ buněk a podařilo se nám nalézt i

hodnotu cut-off, schopnou rozlišit mezi CD od UC s téměř 90% senzitivitou a specificitou. Výsledek dává i naději do budoucna v podobě případné cílené anti-CD30 terapie. Soustředili jsme se i na detekci CD30+ lymfocytů u dětí s IBDU. Nalezený signifikantní rozdíl mezi UC a IBDU pacienti by mohl v budoucnu selektovat IBDU pacienti s možnou diferenciací v UC.

2. ABSTRACT

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

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

In the next part of our research, we searched for other, more precise methods of assessment of histopathological disease activity that could serve as predictors of complications. We focused at immunohistochemical assessment

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

The third domain of our research focused at improvement of diagnostics of pediatric IBD. We aimed at immunohistochemical assessment of CD30+ lymphocytes in intestinal mucosa in children with CD, UC and IBD unclassified (IBDU). Since the current knowledge about IBD immunopathogenesis indicate that children with UC could have higher levels

of CD30+ lymphocytes in serum and intestinal mucosa, we decided to use this detection as a possible marker of UC differentiation. Our work showed a significant difference in numbers of mucosal CD30+ lymphocytes in almost all bowel segments, with maximal difference in rectum. Children with UC showed significantly higher counts of mucosal CD30+ lymphocytes compared to children with CD. We also found a cut-off that was able to differentiate UC from CD with almost 90 % sensitivity a specificity. These results are promising also for a future targeted anti-CD30 therapy. Apart from that, we focused at detection of CD30+ lymphocytes in children with IBDU. A significant difference between UC and IBDU we found could shed a light on biology of IBDU and select IBDU patients with possible future differentiation towards UC.

3. ÚVOD

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) představují skupinu chronických systémových onemocnění, která postihují převážně zažívací trakt (GIT), a spadají do nich Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). V případě, kdy není možné IBD blíže zařadit, se používá výraz neklasifikovaná IBD (IBDU). Nejčastěji postiženou skupinou jsou mladí dospělí. U dětí se IBD nejčastěji manifestují ve druhé dekádě života a incidence v České republice dosahuje necelých 10/100 000 obyvatel za rok, z čehož 5/100 000 tvoří CD a 4/100 000 UC (*Schwarz J. a Sýkora J., 2013*). Příčina IBD zůstává stále neobjasněna. Etiopatogeneticky jde nejspíše o narušenou interakci mezi imunitní bariérou střevní sliznice a střevní mikroflórou u geneticky vnímavého jedince (*Day AS. et al., 2012*). Klinická prezentace CD je charakterizována

zejména triádou chronických bolestí břicha, nekrvavého průjmu a úbytku na váze. Pro UC je pak typický krvavý průjem. Diagnostika IBD je multidisciplinárním procesem vycházejícím z anamnézy, fyzikálního vyšetření pacienta, výsledků laboratorních vyšetření, endoskopického nálezu, obrazu na zobrazovacích vyšetřeních, mikroskopie a někdy i genetického vyšetření. V případě dětských IBD se diagnostický proces opírá o tzv. revidovaná Portská kritéria z roku 2014 (*Levine A. et al., 2014*). Histopatologický obraz IBD odpovídá chronické enterokolitidě s narušenou architektonikou sliznice a v případě aktivity onemocnění i s přítomností kryptitidy a kryptových abscesů. CD se pak od UC odlišuje zejména kolísáním zánětu a mikroskopickým nálezem epiteloidních granulomů (*Langner C. et al., 2014*). U pacientů na léčbě je pak důležitý i adekvátní klinický, endoskopický a mikroskopický monitoring aktuální aktivity zánětu. Pro tento účel slouží řada skórovacích systémů. Z klinických je to zejména Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) (*Hyams JS. et al., 1991*) a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) (*Turner D. et al., 2007*), z endoskopických Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) (*Navaneethan U. et al., 2012*) a Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) (*Daperno M. et al., 2004*). Histopatologických indexů existuje celá řada, většina z nich však byla vytvořena pro pacienty s UC, jen minimum pro CD a žádný primárně pro IBDU. Žádný z nich navíc nebyl primárně etablován pro dětskou populaci (*Bryant RV. et al., 2014*). Mezi nejpoužívanější patří Geboes score (*Geboes K. et al., 2000*) a Nancy Histological Index (*Marchal-Bressenot A. et al., 2017*) pro UC a Global Histologic Activity Score (*D'Haens GR. et al., 1998*) pro CD. U pacientů s CD po ileocékální (IC) resekci se pak využívá Rutgeertsovo skóre pro hodnocení endoskopické rekurence po 6 měsících od zákroku (*Rutgeerts P. et al., 1990*).

4. CÍLE PRÁCE

Histopatologie sice hraje zásadní úlohu v diagnostice dětských IBD, její přínos v rámci kontrolních endoskopií u pacientů na léčbě je však sporný, zejména u dětí. V naší první práci (Fabián O, Hradský O, Potužníková K a spol. Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2017; 213: 353-358) jsme si proto stanovili cíle:

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

V další práci (Fabián O, Hradský O, Lerchová T a spol. Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019; 215: 152689) jsme se zaměřili na specializovanější metody hodnocení mikroskopické aktivity zánětu u dětí s IBD. Jako vhodný neinvazivní biomarker monitoringu aktivity zánětu slouží fekální kalprotektin (FCPT). Ten však může být v řadě případů falešně negativní i falešně pozitivní. Proto jsme se zaměřili na jeho detekci přímo ve tkáni metodou imunohistochemie. Cílem práce bylo:

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

Dále jsme se soustředili na prediktory relapsu onemocnění po 6 měsících u dětí s Crohnovou chorobou po IC resekci (Zárubová K, Fabián O, Hradský O a spol. Predictive value of tissue calprotectin for disease recurrence after ileocaecal resection in paediatric Crohn's disease. *Odesláno k submisi*). Zvlášť důkladně jsme cílili na mikroskopické prediktory, a především pak na imunohistochemický průkaz TCPT v resekčních okrajích IC resekátů. Cíle studie byly následující:

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

- Posoudit vliv laboratorních nálezů a mikroskopického obrazu v době operace na následný terapeutický management.

Poslední práce (Fabián O, Hradský O, Dršková T a spol. Immunohistochemical Assessment of CD30+ Lymphocytes in the Intestinal Mucosa Facilitates Diagnosis of Pediatric Ulcerative Colitis. Dig Dis Sci 2018; 63: 1811-1818) si kladla za cíl zpřesnění mikroskopické diagnostiky dětských IBD. Jelikož je zánět u UC zprostředkován převážně cestou Th2 lymfocytů a některé subpopulace Th2 lymfocytů na svém povrchu exprimují antigen CD30, předpokládali jsme, že by tito pacienti mohli mít vyšší počty CD30+ lymfocytů ve sliznici GIT. Proto jsme chtěli:

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

5. MATERIÁL A METODIKA

Soubory pacientů

Všechny studie byly prováděny retrospektivně na souborech dětských pacientů, kterým byla diagnostikována IBD ve Fakultní nemocnici v Motole mezi lety 2009 až 2018. Do studií jsme zařazovali pouze pacienty s nově

diagnostikovanou a neléčenou IBD. U všech pacientů byl zpětně zrevidován klinický, endoskopický i mikroskopický nález a diagnóza potvrzena aktuálními diagnostickými doporučeními (revidovaná Portská kritéria z roku 2014). Mikroskopická, endoskopická a klinická aktivita zánětu byla objektivizována užitím příslušných skórovacích systémů. Z histopatologických skóre byly použity GHAS pro CD, Geboes score a Nancy Histological Index pro UC a námi nově etablované univerzální skóre pro pacienty s IBDU. Hodnoceno bylo ve většině případů 6 standardně zvolených etáží střeva (terminální ileum, cékum, colon ascendens, colon transversum, colon descendens a rektum). Endoskopický obraz byl hodnocen užitím SES-CD a UCEIS. Klinická aktivita zánětu byla stanovena prostřednictvím PUCAI a PCDAI. Do studie zahrnující pacienty po IC resekci jsme zařadili všechny děti s CD, které podstoupily ve Fakultní nemocnici v Motole IC resekci s primární anastomózou a zároveň u nich byla 6 měsíců po resekci (dříve v případě známek klinického relapsu) provedena endoskopická kontrola s odběrem bioptických vzorků.

Zpracování bioptického materiálu

Endoskopicky odebrané vzorky i materiál z chirurgických resekcí byly fixovány v 10% pufovaném formolu. Drobné endoskopické vzorky byly zpracovány v celém rozsahu, v případě IC resekatů byl proveden reprezentativní odběr vzorků z více míst včetně resekcí okrajů. Vzorky byly následně zalaty do parafinových bločků a zhotoveny byly řezy o tloušťce 1 mikrometr, které byly následně barveny hematoxylinem a eozinem.

Imunohistochemické vyšetření

Podstata imunohistochemického vyšetření spočívá ve vazbě specifické primární protilátky na zkoumaný antigen a její následná enzymatická vizualizace sekundární protilátkou s navázaným biotin-avidinovým komplexem. V našich studiích jsme imunohistochemicky detekovali přítomnost antigenů CD30 (klon Ber-H2, Cell Marque, ředění 1:50) a kalprotektinu (klon MAC387, Invitrogen, ředění 1:1000).

6 VÝSLEDKY STUDIÍ A DISKUZE

6.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby

Do studie bylo zahrnuto 63 pacientů s CD. Ti byli sledováni po dobu minimálně jednoho roku, zda nerozvinou některou z následujících komplikací: strikturu neprostupnou pro endoskop nebo s prestenotickou dilatací, intraabdominálního absces nebo píštěl, fistulující perianální onemocnění nebo nutnost zahájení anti-TNF terapie.

Devatenáct pacientů ze souboru rozvinulo komplikace (15 nutnost nasazení anti-TNF terapie, 3 intraabdominální absces, 1 strikturu). Mezi skupinami pacientů s a bez komplikací nebyl nalezen signifikantní rozdíl v GHAS ($p = 0,136$) ani PCDAI ($p = 0,934$). Byl však prokázán rozdíl v SES-CD ($p = 0,046$). SES-CD > 15 bodů se navíc ukázalo být nezávislým prediktorem rozvoje komplikací (HR = 3,20; $p = 0,04$). Dále jsme prokázali jen slabou korelaci mezi GHAS a SES-CD ($r = 0,48$; $p = 0,0001$) a žádnou korelaci mezi GHAS a PCDAI ($r = 0,15$; $p = 0,24$).

Diskuze

Histopatologických skórovacích systémů pro IBD je značné množství, většina z nich je však vytvořena pro UC, minimum z nich je validovaných a žádné není vytvořené primárně pro dětské pacienty či pacienty s IBDU. Korelace příslušných skóre s endoskopickým nálezem není ideální, zejména u pacientů s CD z důvodu kolísavého charakteru zánětu (*Geboes K. et al., 2005*). Endoskopie, která dokáže přehlédnout celý lumenální povrch střeva, v tomto podává validnější informaci. Prognostický význam mikroskopie je u pacientů s IBD také sporný a u dětí nebyla prediktivní schopnost histopatologických skórovacích systémů v době naší studie ještě zkoumána (*Riley SA. et al., 1991; Wright R. a Truelove SR., 1966; Baars JE. et al., 2012*). V naší studii se GHAS, v souladu s předpoklady, neukázal být prediktorem komplikací u dětí s CD. Oproti tomu, SES-CD > 15 bodů se ukázalo být nezávislým prediktorem rozvoje komplikací.

6.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy

Do studie vstoupilo 49 pacientů s UC, u kterých byl následně proveden imunohistochemický průkaz TCPT ve tkáňových řezech a kvantifikován počet CPT+ buněk na 1 zorné pole mikroskopu s velkým zvětšením (HPF). Pacienti byli následně sledováni po dobu minimálně jednoho roku, v jehož průběhu jsme pátrali po přítomnosti konkrétních komplikací, které jsme rozdělili do tří podskupin podle své závažnosti (příčemž skupina A byla považována za nejzávažnější). Do skupiny A byl zařazen rozvoj Akutní závažné kolitidy (definované jako PUCAI > 65), nutnost kolektomie a nutnost zahájení anti-

TNF terapie; do skupiny B nutnost zahájení systémové kortikoterapie (CS) a do skupiny C nutnost zahájení systémové terapie 5-aminosalicylovou kyselinou (5ASA).

Hladiny TCPT ani hodnoty UCEIS, Geboesova skóre či Nancy Histological Index nepredikovaly žádnou z daných komplikací. Nicméně, hladiny FCPT a střední klinická aktivita zánětu (definována jako PUCAI > 40) se ukázaly být nezávislým prediktorem cílů B (HR 0,422 při $p = 0,04$ pro FCPT a HR 2,98 při $p = 0,048$ pro PUCAI) a C (HR 2,517 při $p = 0,026$ pro FCPT a HR 0,98 při $p = 0,048$ pro PUCAI). Dále byla nalezena dobrá korelace mezi mediány hodnot TCPT a obou histopatologických skóre ($k = 0,65$ pro Geboesovo score a $k = 0,62$ pro Nancy Histological Index při $p < 0,001$) (obr. 6). Slabou korelaci jsme pak prokázali mezi TCPT a UCEIS ($k = 0,38$; $p = 0,02$), mezi TCPT a FCPT ($k = 0,44$; $p = 0,01$) a mezi TCPT a PUCAI ($k = 0,42$; $p = 0,01$). FCPT pak slabě koreloval s histopatologickými skóre ($k = 0,39$ při $p = 0,025$ pro Geboesovo score a $k = 0,38$ při $p = 0,03$ pro Nancy Histological Index) a UCEIS ($k = 0,36$; $p = 0,039$) a nekoreloval s PUCAI ($k = 0,63$; $p = 0,06$).

Diskuze

FCPT je dobrý neinvazivní marker aktivity střevního zánětu, není však etiologicky specifický, nelze na jeho základě určitě přesnou lokalitu aktivity zánětu a v řadě případů může být falešně pozitivní či negativní (Kolho KL. et al., 2012; Poullis A. et al., 2004; Degraeuwe PL. et al., 2015). Jeho přímá detekce ve tkáni by tak mohla zpřesnit hodnocení aktivity zánětu a tím i přispět k odhadu dalšího průběhu onemocnění. Jelikož jsme v naší studii našli dobrou korelaci mezi TCPT a histopatologickými skóre aktivity zánětu, TCPT tak nejspíše skutečně validně odráží aktuální tíži mikroskopické

aktivity onemocnění. Nicméně, TCPT ani histopatologická skóre nepredikovaly žádnou z námi definovaných komplikací. Doložili jsme však schopnost FCPT predikovat v době diagnózy nutnost zahájení systémové CS a 5ASA terapie, což je v souladu s předchozí studií Theede K. a spol. (*Theede K. et al., 2016*), dokládající schopnost FCPT predikovat relaps u pacientů v klinické remisi. Obdobnou prediktivní hodnotu v naší práci měla i střední klinická aktivita onemocnění (PUCAI > 40).

6.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekcí

U 48 dětí s CD po IC resekcí byla nejprve dohledána základní klinická a chirurgická data (jiné provedené chirurgické zákroky kromě IC resekcí; rozsah resekcí; typ terapie; přítomnost penetrujícího postižení; hladiny FCPT a základní laboratorní data), a dále byl zpětně zrevidován histopatologický materiál z resekcčních okrajů IC resektátů, kde bylo pátráno po přítomnosti následujících mikroskopických proměnných (intenzita chronického zánětu; intenzita aktivního zánětu; intenzita eozinofilní zánětlivé celulizace; porucha architektiky sliznice; epiteloidní granulomy; bazální plazmocytóza; pylorická metaplázie; fibrotizace; lymfocytární lymfangiitida; transmurální lymfatické agregáty; submukózní plexitida; myenterická plexitida; hyperplázie myenterického plexu; obliterativní vaskulopatie; akutní fibrinózně-hnisavá peritonitida; chronická adhezivní peritonitida). Na bioptický materiál z proximálního i distálního resekcčního okraje byl následně proveden imunohistochemický průkaz TCPT a byly kvantifikovány pozitivní buňky na 1 HPF. V další fázi byla zhodnocena mikroskopická a endoskopická aktivita

zánětu z kontrolní endoskopie po 6 měsících užitím GHAS a Rutgeertsova skóre a bylo pátráno po známkách endoskopické rekurence v dolním i horním GIT.

Dvacet pět pacientů mělo v době kontroly známky endoskopické rekurence v místě anastomózy. Z ostatních pacientů pak 1 vykazoval známky rekurence v tlustém střevě a 4 v horním GIT. Nebyla nalezena žádná souvislost mezi počtem CPT+ buněk v distálním resekcčním okraji a rozvojem rekurence. Z dalších histopatologických znaků byla s rozvojem rekurence asociována přítomnost akutní a chronické peritonitidy (OR = 4,15; p = 0,048). Z ostatních testovaných proměnných byly s rozvojem rekurence asociovány nízká sérová hladina albuminu v době diagnózy i v době endoskopické kontroly po 6 měsících, avšak pouze po adjustaci na podskupinu pacientů na biologické terapii (OR = 0,851; p = 0,039 v době diagnózy, OR = 0,759; p = 0,011 v době kontroly), a dále vyšší hodnoty CRP v době endoskopické kontroly (OR = 2,21; p < 0,001).

Diskuze

Prediktory endoskopické rekurence po IC resekcii jsou u dospělých pacientů známy a jsou jimi především kouření, předcházející intestinální resekcce, přítomnost penetrujícího onemocnění, přítomnost perianálního onemocnění a nutnost extenzivní resekcce (*de Cruz P. et al., 2015; Buisson A. et al, 2012*). Z histopatologických znaků pak mezi doložené prediktory patří přítomnost aktivního zánětu a myenterické a submukózní plexitidy v resekcčních okrajích (*Misteli H. et al., 2015; Lemmens B. et al., 2017; Bressenot A. a Peyrin-Biroulet L., 2015*). Studie na dětské populaci jsou limitované. Dle našich výsledků nelze imunohistochemii doporučit jako vhodný prediktor pooperační rekurence. Oproti předchozím studiím na

dospělých pacientech jsme neprokázali ani prediktivní hodnotu myenterické či submukózní plexitydy. Potencionálním novým histopatologickým prediktorem by ale mohla být přítomnost akutní i chronické peritonitidy v resekcčních okrajích. FCPT je standardně používán jako neinvazivní biomarker pooperační rekurence (*Hukkinen M. et al., 2016; Kamath AF. et al., 2017*). Naše výsledky dřívější nálezy nepodporuje, v naší studii se však jako nezávislý prediktor rekurence ukázala být hladina CRP v době endoskopické kontroly. Lze tak předpokládat, že na rekurenci může mít vliv i přítomnost systémového zánětu, přičemž hladiny FCPT mohou být po vynětí postižené části střeva normalizované. Dále naše práce potvrzuje výsledky předchozí práce od Zárubové K. a spol. (*Zárubová K. et al., 2017*), dokládající prediktivní hodnotu nízké hladiny albuminu u dětí léčených pouze monoterapií azathioprinem. Naše práce tento závěr potvrzuje i u pacientů na biologické terapii. V rozvoji pooperační rekurence tak nejspíše bude hrát roli i nutriční status pacienta.

6.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními

Do studie vstoupilo 33 pacientů s CD, 30 s UC a 11 s IBDU. U všech pacientů byl proveden imunohistochemický průkaz antigenu CD30 na biotické vzorky střevní sliznice. CD30+ lymfocyty pak byly počítány na 1 HPF. Ve všech segmentech střeva s výjimkou céka a colon ascendens se nám podařilo najít statisticky signifikantní rozdíl v mediánech, průměrných hodnotách i maximálních hodnotách CD30+ lymfocytů mezi CD a UC pacienty. Nejvyšší rozdíl byl nalezen v oblasti rekta ($p < 0,001$). Na základě

analýzy plochy pod křivkou jsme pro rektální lokalizaci následně našli hodnotu cut-off 2,5 pozitivních buněk, které bylo schopné rozlišit CD a UC s 83% senzitivitou a 90% specificitou. Tento rozdíl byl nezávislý na endoskopické i mikroskopické aktivitě zánětu ($p < 0,0001$). Nalezená hodnota cut-off byla následně použita pro analýzu skupiny pacientů s IBDU. Nebyl nalezen rozdíl mezi pacienty s CD a IBDU ($p = 0,8$), avšak byl prokázán rozdíl mezi IBDU a UC ($p = 0,007$).

Diskuze

Výsledky naší práce korespondují s prací Flores C. a spol. (Flores C. et al., 2015), dokládající vyšší hladiny CD30+ lymfocytů v nejpostiženější části střeva u dospělých pacientů, a také s prací od Giacomelli R. a spol. (Giacomelli R. et al., 1998), dokládající vyšší hodnoty CD30 u pacientů s UC v séru. Rozdíly byly nezávislé na intenzitě zánětu, a tudíž námi nalezená hodnota cut-off by mohla být použitelná i pro pacienty s jen mírným zánětem v rektu. Výsledky naší práce dále naznačují, že pacienti s UC by mohli v budoucnu profitovat z cílené anti-CD30 terapie, která je v současné době zvažována u pacientů s některými typy lymfomů (Schirrmann T. et al., 2014; Fabbri A. et al., 2017). U pacientů s IBDU, zejména těch refrakterních k dosavadní terapii, by vyšší hladiny CD30+ mohly představovat znak budoucí diferenciaci v UC. Otázkou pak zůstává i samotná biologická povaha IBDU. Námi nalezený signifikantní rozdíl mezi IBDU a UC v počtech CD30+ lymfocytů by tak mohl znamenat, že IBDU má biologicky blíže k CD. Nicméně, současná léčebná strategie u IBDU pacientů je mnohem bližší UC nežli CD (Turner D. et al., 2012). Nabízí se tak otázka, zda by pacienti s

IBDU nemohli profitovat ze změny terapie. Tato hypotéza je však založená na velmi malém počtu dětí v IBDU skupině a musí být ověřena dalšími studiemi.

7 ZÁVĚRY

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

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

7.2. Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy

- Byla nalezena dobrá korelace hladiny TCPT s histopatologickými skóre aktivity zánětu u dětí s UC; nicméně hladina TCPT se neukázala být vhodným prediktorem komplikovaného průběhu onemocnění.

- Hladiny FCPT v době diagnózy a střední klinická aktivita zánětu stanovená pomocí skórovacího systému PUCAI se ukázaly být nezávislými prediktory nutnosti zahájení CS a 5ASA terapie.

7.3. Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci

- Hladiny CPT+ buněk v resekčních okrajích IC resekátů nejsou prediktorem endoskopické rekurence onemocnění po 6 měsících u dětí s CD.
- Nízký sérový albumin a vysoké CRP v době operace a vysoký FCPT v době endoskopické kontroly po 6 měsících predikovaly rozvoj endoskopické rekurence.

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

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

8. POUŽITÁ LITERATURA

Baars JE, Nuij VJ, Oldenburg B et al. Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(9): 1634-1640.

Bressenot A, Peyrin-Biroulet L. Histologic features predicting postoperative Crohn's disease recurrence. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21(2): 468-475.

Bryant RV, Winer S, Travis SP et al. Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is 'complete' remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohns Colitis* 2014; 8(12): 1582-1597.

Buisson A, Chevaux JB, Allen PB et al. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35(6): 625-633.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Levine A, Koletzko S, Turner D et al.** ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58(6): 795-806.
- Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C et al.** Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* 2017; 66(1): 43-49.
- Misteli H, Koh CE, Wang LM et al.** Myenteric plexitis at the proximal resection margin is a predictive marker for surgical recurrence of ileocaecal Crohn's disease. *Colorectal Dis* 2015; 17(4): 304-310.
- Navaneethan U, Kochhar G, Phull H et al.** Severe disease on endoscopy and steroid use increase the risk for bowel perforation during colonoscopy in inflammatory bowel disease patients. *J Crohns Colitis* 2012; 6(4): 470-475.
- Poullis A, Foster R, Shetty A et al.** Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2): 279-284.
- Riley SA, Mani V, Goodman MJ et al.** Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32(2): 174-178.
- Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G et al.** Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990; 99(4): 956-963.
- Schirrmann T, Steinwand M, Wezler X et al.** CD30 as a therapeutic target for lymphoma. *BioDrugs* 2014; 28(2): 181-209.
- Schwarz J, Sýkora J.** Incidence idiopatických střevních zánětů u dětí a dospívajících v Plzeňském kraji v letech 2001–2011. Prospektivní studie. *Ces-slov Pediatr* 2013; 68(3): 149-156.
- Theede K, Holck S, Ibsen P et al.** Fecal Calprotectin Predicts Relapse and Histological Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22(5): 1042-1048.
- Turner D, Otley AR, Mack D et al.** Development and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI): a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 423-432.

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

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

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

9 SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

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

9.1.1 Fabián O, Hradský O, Potužníková K, Kalfusová A, Krsková L, Hornofová L, Zámečník J, Bronský J. Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2017; 213(4): 353-358.
IF 1.8

9.1.2 Fabián O, Hradský O, Dršková T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J. Immunohistochemical Assessment of CD30+ Lymphocytes in the Intestinal Mucosa Facilitates Diagnosis of Pediatric Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2018; 63(7): 1811-1818.
IF 2.9

9.1.3 Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J. Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019; 215(12): 152689.
IF 1.8

9.1.4 Zárubová K, Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Dotlačil V, Poš L, Škába R, Bronský J. Predictive value of tissue calprotectin for disease recurrence after ileocaecal resection in paediatric Crohn's disease.

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

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

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

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

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

IF 1.8

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

IF 1.8

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

IF 2

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

IF 1.2

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

IF 19

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

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

- 9.4.2 Fabián O, Štěchovský C.** Histopatologická diagnostika myokarditid. *Cesk Patol* 2019; 55(4): 218-223.
- 9.4.3 Fabián O, Štěchovský C.** Nejnovější poznatky v mikroskopické diagnostice kardiomyopatií. *Cesk Patol* 2019; 55(4): 224-230.
- 9.4.4 Fabián O.** Aktuální nomenklatura a histopatologická kritéria pro hodnocení nezánnětlivých degenerativních onemocnění aorty. *Cesk Patol* 2020; 56(1): 26–31.
- 9.4.5 Matějková A, Fabián O.** Diferenciální diagnostika tumorózních lézí srdce. *Cesk Patol* 2020; 56(1): 18–25.
- 9.4.6 Havová M, Antonová P, Gebauer R, Fabián O, Chaloupecký V, Vlk L, Hornofová L, Rohn V.** Obstrukce výtokového traktu pravé komory. *Interv Akut Kardiol* 2019; 18(3, Suppl. A): 15–17.
- 9.4.7 Fabián O, Havová M, Gebauer R, Poruban R, Materna O, Špatenka J, Burkert J, Chaloupecký V, Rohn V, Mikuš F, Obešlová E, Janoušek J.** Microscopical assessment of explanted allograft heart valves: a limited contribution of histopathology to the pathogenic mechanism of the graft failure in long-term explants.
Článek recentně přijat do recenzovaného periodika Cor et Vasa.
- 9.4.8 Fabián O, Trojánek M, Richterová L, Stejskal F, Dundrová K, Rožnětinská M, Zámečník J.** Případ amébové kolitidy s

endoskopickými i histopatologickými rysy Crohnovy choroby. *Cesk Patol* 2020; 56(2): 95–98.

9.4.9 Douda L, Keil R, Lochmannová J, Drábek J, Fabián O, Hornofová L, Honsová E, Jirsa M. Svízelná diagnostika primární sklerozující cholangitidy u pacienta s rekurentními epizodami akutní bakteriální cholangitidy. *Gastroent Hepatol* 2015; 69(4): 368-377.