

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**Sledování markerů oxidačního stresu u modelu chronického zánětu tlustého
střeva**

**The study of oxidative stress markers in animal model of chronic colitis in
large intestine**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové 2010

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.
Erika Hocková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při vypracování této práce.

ABSTRAKT

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida se řadí do idiopatických střevních zánětů.

NF – κ B představuje skupinu pěti různých proteinů – p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 a p52. NF – κ B je schopen nastartovat expresi různých prozánětlivých genů a ovlivnit tak proces mukosálního zánětu, také zprostředkovává různé specifické buněčné děje.

Bilirubin je endogenní látka, u které byly zjištěny antioxidační a protizánětlivé účinky, které by mohly ovlivnit proces zánětu a mít protektivní účinek.

Tato diplomová práce se zabývala vypracováním metodiky pro detekci nukleárního transkripčního faktor kappu B na parafinových řezech a sledováním jeho exprese ve stěně tlustého střeva normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn kmen) potkanů po indukci chronického zánětu pomocí imunohistochemických metod.

Ve studii bylo použito 8 potkanů kmene Gunn (G^+) a 8 potkanů kmene Wistar (K^+), kterým byl dlouhodobě podáván dextran sulfát (DSS). Sedm dnů po sobě byl do pitné vody přidáván DSS (koncentrace 2% w/v) s následným podáváním pouze pitné vody bez DSS po dobu 14 dnů. Popsaný třítydenní cyklus se 2x zopakoval (proběhly tedy 3 cykly). Jako kontroly byli opět použiti potkani kmene Gunn (n=6) a Wistar (n=6), kteří nebyly vystaveni vlivu DSS.

Výsledky imunohistochemické analýzy prokázaly detekci NF- κ B receptoru ve stěně tlustého střeva potkanů. Ve všech studovaných skupinách byla nalezena pouze slabá jaderná reakce NF- κ B. Tato reakce byla detekována zejména v oblasti střevní sliznice. Konkrétně v buňkách lamina propria mucosae a někde také přímo v epitelálních buňkách.

Jednoznačně nebyla prokázána souvislost mezi expresí NF – κ B a podáváním DSS (tedy indukcí poškození střeva) a ani mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými potkany. Závěrem lze konstatovat, že dextran sulfát nevyvolává významnou zánětlivou reakci ve stěně tlustého střeva u potkana a není pravděpodobně také významně ovlivňován hladinami bilirubinu u tohoto modelového stavu.

ABSTRACT

Crohn's disease and ulcerative colitis are both entities of inflammatory bowel disease (IBD).

The nuclear transcription factor kappaB (NFκB) family consists of five different members, which are namely p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 and p52. NFκB has ability to promote the expression of various proinflammatory genes, to influence the course of mucosal inflammation and to mediate different cell-type specific effects.

Bilirubin is an endogenous substance with anti-oxidative and anti-inflammatory effects, which influences the process of inflammation and has protective effect.

This diploma thesis was aimed at conduction of methods of NFκB detection on paraffine tissue slices and observation of NFκB expression in large intestine walls of normobilirubin and hyperbilirubin rats (Gunn's variety) after chronic imunohistochemically-induced inflammation.

Eight Gunn's variety rats (G⁺) and eight Wistar's variety rats (K⁺) were used in this study, all after long time administration of dextrane-sulfate (DSS). For seven following days, DSS (in concentration of 2%w/v) was added into drinkable water for these rats, followed by 14 days of clear drinkable water (without DSS) administered to rats. This three-weeks long cycle was repeated twice (3 cycles in total were completed). Six rats of both varieties (6 G⁺ and 6 K⁺) without DSS administration were used as a control group.

Findings of imunohistochemical analysis showed detection of NFκB receptor in walls of large intestine cells of rats. Only slight nuclear NFκB reaction was found in all studied groups. This reaction appeared mostly in intestinal mucosa, in lamina propria cells, sometimes directly in epithelial cells.

These was no direct relationship between NFκB and DSS administration explicitly proved and also no difference between normobilirubin and hyperbilirubin rats observed. The fact that DSS do not induce significant inflammation reaction in large intestine wall of rat and that is not significantly affected by bilirubin level can be stated as a conclusion.

Seznam zkratek

5-ASA	aminosalicylová kyselina
CN	Crohnova nemoc
cNOS	konstituční izoforma NO- syntázy
DAB	diaminobenzidin
DSS	dextran sulfát
FMLP	N-formyl-methionyl-leucylfenylalanin
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě
HO	hemoxygenáza
IBD	idiopatické střevní záněty
IgG	imunoglobulin třídy G
IgM	imunoglobulin třídy M
I κ B	inhibitor regulačního faktoru NF – κ B
IKK	kinázový komplex
IL	interleukin
IN	interferon
iNOS	indukovatelná forma enzymu NO- syntázy
ISZ	idiopatické střevní záněty
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NF – κ B	nukleární transkripční faktor kappa B
NO- syntáza	oxidu dusnatého
PBS	fyzilogický roztok
PG-PS	peptidoglykanový polysacharid
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
Th	pomocné T-lymfocyty
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
UC	ulcerózní kolitida
UDP	uridinfosfát

Obsah:

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Histologie tenkého a tlustého střeva.....	10
2.1.1. Tenké střevo – intestinum tenue.....	10
2.1.2. Tlusté střevo – intestinum crassum.....	11
2.2. Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida.....	12
2.2.1. Definice.....	12
2.2.2. Etiologie a patogeneze.....	14
2.2.3. Klinický obraz.....	19
2.2.4. Komplikace.....	20
2.2.5. Terapie.....	21
2.3. Oxidační stres.....	22
2.3.1. Volné radikály.....	22
2.3.2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku.....	23
2.4. Bilirubin.....	26
2.4.1. Vlastnosti.....	26
2.4.2. Metabolismus.....	28
2.4.3. Antioxidační účinek bilirubinu.....	29
2.4.4. Protizánětlivý účinek bilirubinu.....	30
2.5. Nukleární transkripční faktor kapa B - NF- κ B.....	30
2.5.1. Charakteristika a funkce NF – κ B.....	30
2.5.2. Aktivace NF – κ B.....	31
2.5.3. Specifické buněčné děje zprostředkované NF – κ B.....	32
2.5.4. Blokáda aktivace NF – κ B v terapii IBD.....	32
3. Cíl práce.....	34
4. Experimentální část.....	36
4.1. Materiál a jeho příprava.....	37
4.1.1. Zvířata design experimentu (experimentální model chronické kolitidy).....	37
4.1.2. Zpracování materiálu, imunohistochemie.....	37
4.2. Pracovní postup.....	39
4.2.1. ABC metodika – detekce exprese NF- κ B.....	39
5. Výsledky.....	40
6. Diskuze.....	46
7. Závěr.....	49
8. Literatura.....	51

1.Úvod

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida jsou záněty trávicí trubice vzniklé z neznámé příčiny, obě onemocnění mají několik společných rysů, ale liší se rozsahem postižení trávicí trubice a hloubkou postižení střevní sliznice.

CN i UC se řadí mezi civilizační choroby, které byly zcela rozpoznány až ve 2. polovině 20. století a v posledních letech těchto onemocnění přibývá, obě nemoci mají 2 vrcholy výskytu během života, první vrchol začátku je v době dospívání a nižším dospělém věku, druhý vrchol je mezi 50 – 80 roky. Studie ukazují na úlohu dědičnosti a důležitost faktorů zevního prostředí, které umožní fenotypickou manifestaci. Dalšími možnými příčinami vzniku obou nemocí mohou být faktory jako - změna diety, zvyšující se hygienické standardy, které jsou praktikovány od raného dětství, široké užívání antibiotik a chemoterapeutik, nesteroidní antirevmatika a stres. Jsou to onemocnění celoživotní, probíhající jako období klidového stavu – remise, kdy nejsou přítomny žádné známky zánětu a období opětovných vzplanutí zánětu – relapsů. Průběh onemocnění je individuální a závisí na rozsahu postižení u UC a lokalizaci postižení u CN. Můžou vést ke komplikacím, které musí být někdy řešeny chirurgicky (1).

I když zatím neumíme definitivně obě nemoci vyléčit, většina pacientů může vést plný a aktivní život. Léčba se soustředí na 2 oblasti – na léčbu aktivního onemocnění a na prevenci vzplanutí, pokud je nemoc v remisi.

Zvyšující se výskyt onemocnění, neznalost etiologie a neúplná znalost patogeneze jsou podnětem pro další výzkum, v současné době je zkoumáno mnoho látek a je velmi pravděpodobné, že přístup k léčbě obou nemocí se během krátké doby změní a přinese naději na definitivní vyléčení (3).

2. Teoretická část

2.1. Histologie tenkého a tlustého střeva

2.1.1. Tenké střevo – *intestinum tenue*

V tenkém střevě probíhá hlavní a poslední etapa enzymatického štěpení potravy, absorpce metabolitů a endokrinní sekrece. Navazuje na žaludek jako trubice o průměru kolem 3 – 4 cm a dlouhá 3 – 5 m. Má 3 úseky – **duodenum** – dvanáctník, **jejunum** – lačník a **ileum** – kyčelník.

Stěna tenkého střeva se skládá ze čtyř vrstev typických pro trávicí trubici.

Sliznice – tunica mucosa je bledě růžová, složena z **epitelu** - lamina epithelialis, **slizničního vaziva** – lamina propria mucosae a **slizniční svaloviny** - lamina muscularis mucosae.

Sliznice je krytá jednovrstevným cylindrickým epitelem s resorpčními vlastnostmi. Mezi těmito buňkami se nachází **pohárkové buňky**, které produkují povrchový ochranný hlen.

Sliznice se submucosou (podslizničním vazivem) vytváří příčné řasy – ***plicae circulares***, ty jsou vytvořeny v duodenu a jejunu a od poloviny tenkého střeva ubývají.

Na povrchu sliznice se nachází ***villi intestinales*** – střevní klky, které mají v duodenu tvar lístkovitý a v dalších úsecích střeva jsou spíše kuželovité. Jde o výběžky epitelu a vaziva sliznice (lamina propria mucosae), které směřují do lumen střeva. Povrch klku tvoří cylindrický epitel, na kterém se podílí více druhů buněk – ***enterocyty*** – jejich hlavní funkcí je vstřebávání látek z nitra tenkého střeva, ***pohárkové buňky*** - vtroušené mezi enterocyty, vylučují mucin, který vytváří na povrchu střevního epitelu ochranný film a zvlhčuje povrch. ***M-buňky*** (membránové) se nachází pod místem, kde je pod epitelem nahromaděná lymfatická tkáň, dovedou vytvořit kapsu, do které putují lymfocyty z lymfatické tkáně ve slizničním vazivu, m-buňky tímto způsobem zprostředkují styk lymfocytu s prostředím tenkého střeva, mimo to vycytávají z lumina střev makromolekulární látky antigenní povahy a předávají je lymfocytům, ty poté cestují do lymfoidních orgánů (uzlin) a nastartují v nich imunitní odpověď na cizorodé antigeny – jsou tedy funkčně zapojeny do ochranných mechanismů střevní sliznice.

Řasy sliznice a klky zvětšují plochu sliznice tenkého střeva.

Mezi klky jsou vytvořeny ve všech oddílech tenkého střeva – ***glandulae intestinales*** – Lieberkühnovy žlázy ve formě krypt, které vklesávají do lamina muscularis mucosae. V nich se nachází více druhů buněk. Nediferencované (kmenové) buňky, ze kterých se tvoří

enterocyty, pohárkové buňky krypt a klku, M-buňky a Panethovy buňky-těmto je přisuzovaná sekrece peptidáz a regulace střevní mikroflóry.

Slizniční vazivo je řídké a zasahuje do klku, obsahuje lymfatickou tkáň – **folliculi lymphatici solitarii** – uzlíčky roztroušené všude ve sliznici, **folliculi lymphatici aggregati** – shluky uzlíků, které tvoří bělavé pláty – **Peyerovy** – tyto se vyskytují jen v ileu, probíhá v nich dozrávání lymfocytů a začíná imunitní reakce navozená antigeny.

Lamina muscularis mucosae odděluje slizniční vazivo od podslizničního.

Podslizniční vazivo – tela submucosa je řídké s pleteněmi krevních a mízních cév a nervovými pleteněmi - plexus submucosus – Meissneri. Velké lymfatické folikuly zasahují do podslizničního vaziva.

Jsou zde umístěny i **glandulae duodenales** – Brunnerovy buňky - tuboaleveolární žlázy, které produkují alkalický hlen, ten chrání sliznici proti kyselým žaludečním šťávám a upravuje pH střevního obsahu.

Svalovina – tunica muscularis externa - se skládá z hladkého svalstva se 2 vrstvami – **stratum circulare** – vnitřní cirkulární vrstva a **stratum longitudinale** – vnější podélná. Mezi nimi se nachází nervové pleteně, vegetativní nervová ganglia, krevní a lymfatické cévy

Tunica serosa – peritoneální průsvitný povlak střeva, povrch je tvořen jednovrstevným plochým epitelem a pod ním je tenká vrstva subserózního vaziva (4,5).

2.1.2. Tlusté střevo – *intestinum crassum*

Tlusté střevo je poslední částí trávicí trubice, která přijímá z tenkého střeva kašovité až tekutý obsah – chymus, ze kterého byly v tenkém střevě vstřebány živiny. Z tohoto obsahu je postupně vstřebána voda a elektrolyty a obsah je formován ve stolici.

Tlusté střevo je úsek dlouhý 1,2 – 1,5 metru, široký od 4 cm do 7,5 cm. Je charakteristické větším průsvitem, našedlou tmavší barvou a charakterem sliznice.

Hlavní části tlustého střeva jsou **slepé střevo** – *intestinum caecum*, jehož součástí je **červovitý výběžek** – *apendix vermiformis*, **tračník** – *colon* – vzestupný, příčný, sestupný, esovitá klička a **rectum** – konečník, který vyústí navenek otvorem **anus** – řiť.

Stěna tlustého střeva se stejně jako tenké střevo skládá ze 4 vrstev, charakteristické pro trávicí trubici.

Sliznice - je bledá, žlutavá, bez klků, je kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem, má četné žlázy, jednoduché a hustě natěsnané Lieberkühnovy krypty, v nichž nejsou Panethovy buňky. Slizniční vazivo obsahuje lymfatické uzlíky.

Podslizniční vazivo – je řídké s cévami a nervovou pleteni, zasahují do něho shluky lymfocytů (uzlíků) ze sliznice.

Svalovina – má vnitřní cirkulární vrstvu a zevní longitudální – podélnou, která je tenká a mohutnější jen v taeniích, tyto se nachází na povrchu střeva jako tři bělavé podélné pruhy, tah taenie nakřčí střevo a vzniknou zevně vyklenutá místa – haustra a mezi nimi poloměsíčitě řasy – příčné řasy sliznice dovnitř střeva. (haustra jsou projevem funkce svaloviny).

Tunica serosa – je peritoneální povlak, stejný jako na tenkém střevu.

Posledním úsekem střeva je rectum – konečník, je dlouhý asi 12 – 16 cm a široký asi 4 cm, navenek ústí otvorem zvaným anus – řiť, v průběhu análního kanálu se postupně mění jednovrstevný cylindrický epitel na vícevrstevný až mnohvrstevný dlaždicový (4,5).

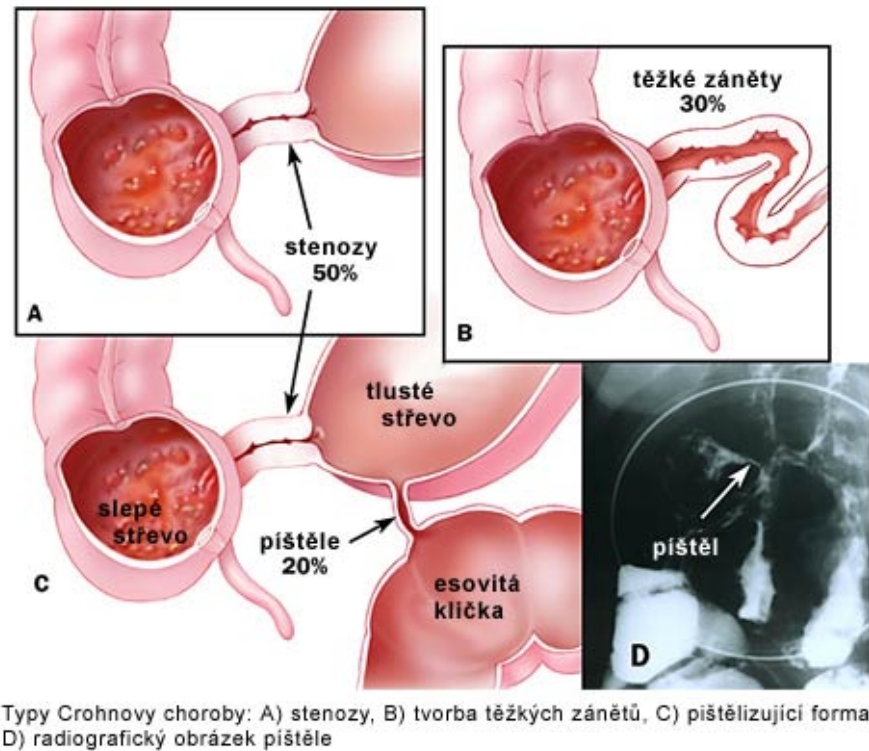
2.2. Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida

2.2.1. Definice

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida se řadí mezi tzv. idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel diseases – IBD) - tedy záněty vzniklé z neznámé příčiny. Předpokládá se, že tato onemocnění vznikají v důsledku poruchy komunikace mezi imunitním systémem a mikrobiálním obsahem střeva, svoji roli zde hrají dále geny a vnější prostředí.

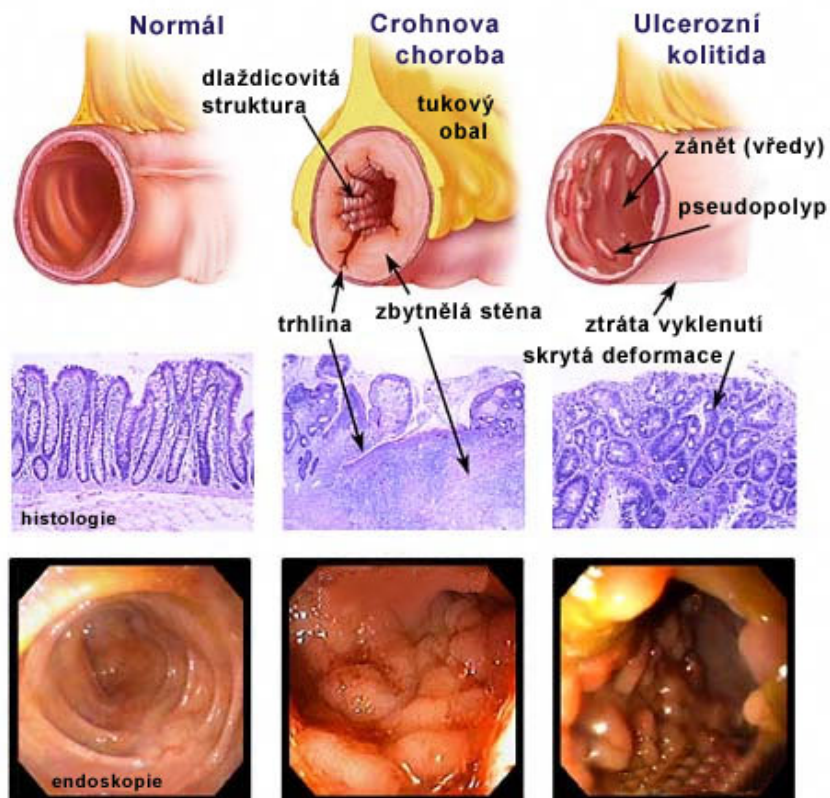
Crohnova nemoc – jde o chronické zánětlivé onemocnění trávicí trubice v typických případech s granulomatózní složkou, které postihuje jakoukoli její část, od jícnu až po konečník. Nejčastěji se vyskytuje ve spojení tenkého a tlustého střeva, v oblasti ileocekální. Může ale postihovat i jinou část tenkého střeva nebo jen tlusté střevo, hlavně oblast konečníku. Pro toto onemocnění je typické, že postihuje vždy jen určitou část tenkého nebo tlustého střeva (segmentálně), úseky mezi segmenty mohou být zcela zdravé. Ohraničený - segmentální zánět prostupuje celou tloušťkou stěny trávicí trubice a vytváří v ní **vředy** – **ulcerace**, **zúženiny** – **stenózy**, které mohou vést k neprůchodnosti střev a **píštěle** – **fistulace**,

spojky mezi střevem a dalšími orgány, nejčastěji mezi jednotlivými kličkami střevními nebo střevem a močovým měchýřem (1,6).



Obrázek 1: Viz popis výše (7).

Ulcerózní kolitida – je zánět tlustého střeva, to postihuje v různém rozsahu, kontinuálně – bez zdravých segmentů a vždy postihne konečník. Zánět vstupuje jen do povrchových vrstev stěny tlustého střeva, do sliznice a podslizniční části. Jen výjimečně proniká do hlubších vrstev. Průběh onemocnění je chronický, střídají se období aktivního zánětu s období klidu (6).



Obrázek 2: Popis zdravého střeva, postiženého CN a UC, histologie a endoskopie (7).

2.2.2. Etiologie a patogeneze

Etiologie

Příčina vzniku obou nemocí není známá. Předpokládá se, že UC i CN jsou heterogenní nemoci s multifaktoriální etiologií (3,8). Klinické studie a pokusy na zvířatech prokazují vliv vnějších faktorů a defektů v regulaci slizniční imunity, které vedou k zánětu u geneticky predisponovaných jedinců (9).

Z vrozené dispozice je to familiární agregace, častý výskyt u dvojčat, v některých etnických skupinách nebo současný zvýšený výskyt některých nemocí.

Z faktorů vnějšího prostředí se jedná především o vliv stravy - snížený přísun vlákniny, nedostatek tuků s vyšším obsahem nenasycených mastných kyselin, konzervované potraviny, antimikrobní látky, které mění bakteriální složení jak vnějšího tak vnitřního prostředí, stres – dlouhodobý stres dokáže pozměnit schopnost imunitního systému reagovat

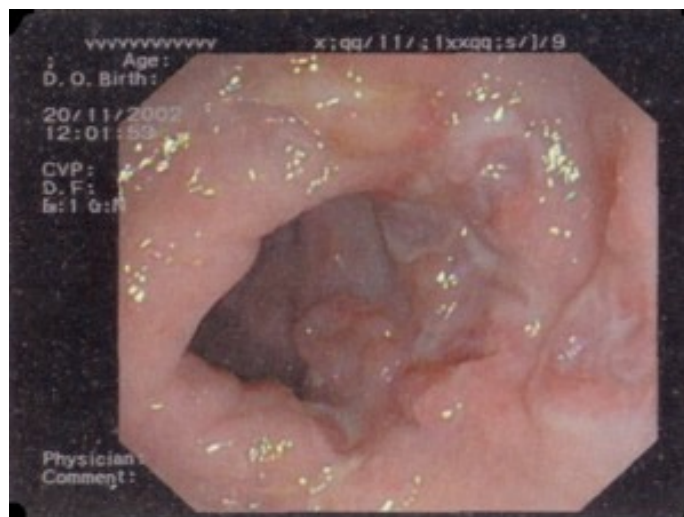
na běžné podněty, kouření zvyšuje riziko vzniku a zhoršuje průběh onemocnění a to pouze u CN, kdežto u UC studie ukazují, že aktivní kouření snižuje riziko vzniku UC až o 60 % (10).

Změny ve specifické humorální i buněčné odpovědi a imunopatologie (např. hypersenzitivita – atopie, místní tkáňová reaktivita, protilátková a autoprotilátková cytotoxicita zprostředkovaná buňkami) jsou nejpravděpodobnější příčinou vzniku těchto onemocnění (3,11).

Patologická anatomie a histologie

Crohnova nemoc

Makroskopicky je postižená část střeva ohraničená od okolní tkáně, pokud je postiženo více segmentů je střevo mezi nimi normální. Stěna střeva je ztlustělá, překrvená a rigidní. Ve sliznici se v ranných fázích tvoří drobné aftózní vřidky nacházející se nad hyperplastickými lymfatickými folikuly. S postupující nemocí se ve sliznici tvoří protáhlé vředy a hluboké štěrbinovité, které pronikají hluboko do stěny nebo ve formě píštělí do okolních orgánů, někdy může dojít k perforaci střeva nebo tvorbě abscesů. Kombinace ulcerací a méně postižených úseků sliznice vede ke změně jejího reliéfu, které připomíná dlažební kameny. Dochází k postupné fibrotizaci stěn a zúžení průsvitu střeva (12).



Obrázek 3:CN postižení tlustého střeva, edematózní sliznice, vředy (45).

Mikroskopicky jsou ve všech vrstvách stěny zánětlivé a fibrózní změny. Ve sliznici je edém, hyperémie a zánětlivá infiltrace. V celé stěně se nachází hyperplastické lymfatické folikuly nebo lymfoidní infiltráty. U 40 - 60 % pacientů jsou nalezeny granulomy hlavně v submukoze a subserózním vazivu a regionálních lymfatických uzlinách (12). Jsou přítomné hluboké vředy a dilatace krypt, úbytek pohárkových buněk a zvýšení počtu Panethových buněk (3).

Ulcerózní kolitida

V průběhu onemocnění se střídají akutní ataky – relapsy s ústupem zánětlivých projevů a klidovými obdobími (remisemi).

Makroskopicky je sliznice zpočátku překrvená, kyprá, křehká s mnoha krevními výrony – krvácivé stadium, později se ve sliznici nachází mnohočetné ploché vředy ze spodu kryté pablánami. Ulcerace postihuje hlavně sliznici, později může přecházet i do submukózy. V klidovém období je sliznice zarudlá, zrnitá, křehká – stadium zrnité. Ve stadiu úpravy se vzhled normalizuje, během hojení vředů se mohou na sliznici objevit pozánětlivé slizniční výčnělky – pseudopolypy – stadium polypů (12).



Obrázek 4: UC granulosity (46).

Mikroskopicky je v počátku charakteristická hyperémie a smíšená zánětlivá infiltrace lamina propria mucosae, zánětlivý infiltrát obsahuje lymfocyty, plazmatické buňky,

neutrofilní granulocyty někdy i eosinofilní a bazofily. Neutrofilní granulocyty pronikají do dilatovaných krypt a tvoří kryptové abscesy, v kryptách dochází k úbytku pohárkových buněk a snížení epitelových buněk. Při přechodu do klidového období dochází k úbytku neutrofilních granulocytů a vymizení kryptových abscesů, nově vznikající krypty jsou kratší a větvené, mezi jejich bází a lamina muscularis mucosae je zánětlivý infiltrát s plazmocytů. V klidovém období dochází k redukci zánětlivého infiltrátu (12).

Patogeneze

Patogeneze zánětu je probádána jen částečně, prozatím se opíráme o dvě hlavní teorie:

1. Autoimunitní reakce s určitým antigenem, který se nachází ve sliznici tlustého střeva.

2. Nepřímé poškození tkáně vyvolané autoimunitní reaktivitou, nikoliv přímou autoimunitní reakcí. Reakce není namířena primárně proti vlastním strukturám střevní tkáně, ale je vedlejším produktem odpovědi efektorové části imunitního systému (10).

Patogenezi lze rozdělit do pěti fází, které na sebe navazují.

1. INICIÁLNÍ FÁZE	2. ROZŠÍŘENÍ ZÁNĚTU	3. PORUCHA IMUNO-REGULACE	4. POŠKOZENÍ TKÁNĚ	5. KLINICKÉ SYMPTOMY
Genetika Infekce Toxiny	Střevní flóra a produkty jejich metabolismu Antigeny potravin	Th1 vs Th2 HLA ↑ IL-1/IL-1RA	O_2^- , NO INF- γ TNF- α	Průjem Bolest Teplota Krvácení

Tabulka 1: Formální rozdělení patogeneze zánětu (dle Sartora, 1995) (10).

Iniciální fáze

Je nejméně prozkoumaná. Za normálních podmínek jsou antigeny nabízeny imunokompetentním buňkám speciálními M - buňkami. Funkce a integrita sliznice jsou neporušené, toxiny, bakterie ani antigeny se jinou cestou do kontaktu s imunitním systémem nedostanou. V iniciální fázi dojde k porušení střevní obranné bariéry, pravděpodobně geneticky danou odchylkou. Spouštěcím faktorem může být infekční agens, mikrobiální toxiny nebo neinfekční příčiny (10).

Fáze rozvoje zánětu

V této fázi dochází k pronikání nespecifického antigenního materiálu z lumen střeva k imunokompetentním buňkám díky porušené obranné slizniční bariéře. Trvalý antigenní tlak, udržuje trvalou hyperaktivitu efektorové části imunitního slizničního systému. Na tomto procesu se podílí bakterie, endotoxiny a produkty bakteriálního metabolismu. Především lipopolysacharid FMLP (N- formyl – methionyl – leucylfenylalanin) a peptidoglykanový polysacharid PG-PS. Ty stimulují tvorbu a uvolnění cytokinů (IL, IN, TNF), eikosanoidů (tromboxanů, prostaglandinů, leukotrienů), volných kyslíkových radikálů a oxidu dusíku. Systémová resorpce produktů metabolismu bakterií nebo zánětlivých mediátorů může způsobit extraintestinální projevy ISZ (10).

Odchylná imunoregulační reakce

Je klíčovým mechanismem vzniku zánětu, jde především o:

1. geneticky podmíněnou abnormalitu imunokompetentních buněk, exprimovat určité antigeny nebo receptory na svém povrchu a schopnost regulovat tvorbu protilátek.
2. o genetické ovlivnění některých vlastností (např. schopnost nabízení antigenu imunokomp. buňkám) a cílových struktur (např. enterocytů).
3. o odchylnou činnost neuroendokrinního systému, který zprostředkovává přenos vlivů zevního prostředí na imunitní systém. Svědčí proto zvýšený počet receptorů pro substanci P – neurotransmitter na kolonocytech.
4. a o již zmíněný trvalý antigenní tlak z intracelulárního prostředí, způsobený porušením ochrany slizniční bariéry.

Imunoregulační účinek je ve tkáni zprostředkován cytokiny.

Porušená imunoregulace, která je geneticky podmíněná, uzavírá bludný kruh. Místo toho, aby byly zapojeny kompenzační a inhibiční mechanismy, které potlačí nepřiměřenou imunitní reakci, dochází k trvalé stimulaci efektorového imunitního systému (10).

Poškození tkáně

Výsledkem protražované silné zánětlivé reakce je těžké poškození tkáně. Zde se uplatňují volné kyslíkové radikály, oxidy dusíku, eikosanoidy a některé cytokiny (10).

Nejagresivnějšími faktory tkáňového poškození jsou volné radikály, které produkují aktivované makrofágy a neutrofilů stimulací zánětlivými mediátory (PG-PS) (10).

2.2.3. Klinický obraz

Crohnova nemoc

Projevy se liší podle toho jakou část trávicí trubice a v jaké míře ji zánět postihl.

Na spojení tenkého a tlustého střeva - převažujícími symptomy je triáda – průjem, bolesti břicha a úbytek hmotnosti. Bolesti jsou křečovité a dostavují se hlavně po jídle, stálá bolest může signalizovat už existující komplikaci. Průjmy jsou pravidlem a hubnutí je důsledkem nižšího příjmu potravy a zánětlivé aktivity choroby.

Na tlustém střevě – průjmy jsou krvavé, vyskytují se hnisavé projevy kolem konečníku a často i mimostřevní projevy – zánět kloubů, rohovky, kožní změny – např.erytém.

Na tenkém střevě – bolesti břicha, hubnutí a chudokrevnost, průjmy chybí.

V oblasti konečníku – hnisavé projevy u konečníku – opakované abscesy, píštěle, vředy v řitním kanálu (6).

Klasifikace CN podle anatomické lokalizace:

1. Ileitida-se projevuje kolikovitými bolestmi v břiše, krvácením, perforací, strikturami, píštělemi, tvorbou abscesů. Vyskytuje se ve 25 – 35 %.
2. Ileokolitida – projevuje se krvácením, perforacemi, tvorbou striktur s následnou obstrukcí, častou rekurencí po chirurgickém výkonu, výskyt 45%.
3. Kolitida – je provázena perianálním postižením a extraintestinálními manifestacemi. Výskyt 30%.
4. Anorektální onemocnění – bývá často sdruženo s kolitidou nebo ileokolitidou. Výskyt 30 – 40%.
5. Postižení apendixu – je časté 50% při ileokolitidě. Izolovaná CN apendixu je méně obvyklá.
6. Orální postižení – bývá zpravidla spojeno s ileokolitidou.
7. Gastroduodenální postižení není časté 0,5 – 4 %.
8. Miliární CN – je neobvyklá varianta nemoci, kdy na seróze tenkého střeva jsou mikroskopicky patrné miliární uzlíky (3,11).

Ulcerózní kolitida

Dominantním příznakem je průjem, který je obvykle spojen s příměsí krve ve stolici, vyprazdňování je časté s tenesmy, rektální bolestí a nucením na stolici, kumulované ranní defekace. Při těžším průběhu mohou mít nemocní více než 20 vodnatých stolic za den a

defekace mohou být i během noci. V některých případech může dojít při bolestivých spazmech v anorektální oblasti k funkční obstrukci a následné zácpě. Dále se vyskytují bolesti v břiše, teplota, anorexie, zvracení, úbytek hmotnosti, který je tím větší, čím rozsáhlejší je postižení tlustého střeva (3,11).

Klasifikace dle anatomické lokalizace

1. Pankolitida – postižen je celý tračník.
2. Subtoální forma – tračník je postižen od rekta po hepatální ohbí.
3. Levostranná forma – tračník je postižen od rekta po lineální ohbí.
4. Proktosigmoiditida – postižení rekta a sigmoidea.
5. Proktitida – je postiženo rektum (3,11).

2.2.4. Komplikace

Lokální střevní

Ulcerózní kolitida

Anorektální nálezy – hemoroidy, trhliny, výhřez anu, periproktální absces.

Krvácení z rekta – je typickou manifestací, není velké, ale je trvalé. **Volná perforace** - je komplikací toxického megakolonu. **Toxické megakolon** – je závažná komplikace, která postihuje jen 2 – 4 % pacientů, při těžkém zánětu tlustého střeva, způsobuje úplnou nebo segmentální dilataci tlustého střeva, což může vést ke střevní neprůchodnosti. **Zhoubná přeměna** – hlavně u pankolitidy s delším trváním. **Dysplastické léze** - tyto se vyvíjí po mnoho let (3,11).

Crohnova nemoc

Krvácení – méně časté než u UC. **Abscesy a píštěle** – postihují tlusté střevo, jsou časté a důsledkem extenze slizničních fisur a vředů do extraintestinálních tkání. Vedou k neohrazeným hnisavým zánětům v oblasti hráze a poškození funkce análních svěračů. **Obstrukce** – častá komplikace, zúžení lumen střeva způsobí střevní neprůchodnost, která se projevuje bolestmi břicha a zvracením. Často postihuje tenké střevo. **Perforace** – rozvíjí se postupně během silného zánětu, hluboký vřed pronikne stěnou, kolem něj se vytvoří vazivové blány, které ohraničí šířící se zánět, vznikne píštěl a absces, uložené mimo stěnu střeva.

Perianální změny – hemeroidy, anální figury, vředy, abscesy, píštěle. **Toxické megakolon** – se vyskytuje u CN jen málo. **Karcinom** – se vyskytuje u CN také málo (3,6,11).

Extraintestinální

Přesná příčina není doposud známá, předpokládá se, že je za ně zodpovědná imunitní reakce organismu (6).

Kůže – u CN s postižením tlustého střeva se objevuje nodózní erytém – bolestivé zduřenininy podkoží a kůže, nacházející se hlavně na bérkách. U UC – se objevuje pyoderma gangrenozum – drobný vředovitý defekt, který vznikne při drobném poranění kůže, následně se zvětšuje a prohlubuje. **Oči** – dochází k zánětům spojivky, rohovky nebo řasnatého tělíska. **Klouby** – nejčastěji jsou postiženy klouby hlezenní a kolenní. Kolitická - artritida jednostranné postižení velkých kloubů, hlavně dolních končetin. Polyartritida – postižení periferních kloubů. **Játra** – u pacientů s kolitidou vzniká chronický zánět žlučových cest, může vést až k transplantaci jater (3,6,11).

Metabolické komplikace

Jsou způsobené buď nežádoucími účinky léků (hlavně kortikoidů) nebo porušeným vstřebáváním živin (6).

Osteoporóza – k řídnutí kostí dochází dlouhodobou léčbou kortikoidy nebo porušeným vstřebáváním vitamínu D a vápníku. **Chudokrevnost** – je způsobená zvýšenými ztrátami krve a nižším vstřebáváním železa při nedostatku vitamínu B 12. **Žlučové kameny** – u některých pacientů po resekci střeva dochází k poruše vstřebávání žlučových kyselin, dostávají se do tlustého střeva, kde dojde k usnadnění vstřebávání žlučového barviva bilirubinu a následnému vzniku žlučových kamenů (3,6,11).

2.2.5. Terapie

Terapii lze rozdělit na medikamentózní a chirurgickou, podpůrnou a doplňkovou.

Jelikož není přesně známá etiologie, zaměřuje se medikamentózní léčba na inhibici řetězce řady zánětlivých mediátorů, které zánět přímo nevyvolávají, ale zesilují ho a udržují. Cílená léčba na vyvolávající činitele je prozatím otázkou budoucnosti (3).

Medikamentózní léčba zahrnuje aminosalicyláty – sulfasalazin a mesalazin (5 – ASA) jako udržovací léčba, kortikosteroidy – prednison a metylprednisolon jako aktivní léčba, topické kortikoidy – nejvíce se osvědčil budesonid, imunosupresiva, která potlačují bouřlivou reakci na antigenní stimulaci - azathioprin a 6 -merkaptopurin, metoterxát, cyklosporin A.

Biologická léčba – je určena pacientům, u kterých předchozí léčba kortikosteroidy a imunosupresivy selhala nebo neměla velkou odezvu, zahrnuje protilátky proti TNF - infliximab, adalimumab. Cílem medikamentózní léčby je zklidnit aktivní zánět, tak aby ho vystřídalo klidné období – remise.

Cílem podpůrné a doplňkové léčby je dodat tělu chybějící vitamíny a ionty, upravit výživu dle toho co je právě nejvíce třeba a snížit nežádoucí účinky léků a to hlavně kortikoidů. Zahrnuje enterální a parenterální výživu, substituční léčbu u pacientů léčených kortikoidy- vápník, hořčík, draslík, železo, vitamín B₁₂, protibakteriální léčiva - antibiotika, bakteriální léčiva – probiotika, protiprůjmové léky, dietu (3,6).

2.3. Oxidační stres

Za normálních podmínek je mezi produkcí volných radikálů a antioxidanty v organismu rovnováha, pokud jedna z těchto složek převáží, dochází k poruchám, které mohou vážně organismus ohrozit, při převaze volných radikálů, které bývají častější než antioxidantů, dochází k tzv. oxidačnímu stresu, ten vede k rozvoji mnoha chorob, k tzv. nemocem z volných radikálů (13).

2.3.1. Volné radikály

Volné radikály jsou prvky, sloučeniny nebo ionty s nepárovým elektronem, vznikající třemi možnými způsoby.

Homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, každá část pak získá jeden nepárový elektron, k této reakci je třeba dodat hodně energie – vysokou teplotou nebo UV záření, proto se s ním v biologickém systému nesetkáváme.

Redukcí, kdy dochází ke ztrátě elektronu nebo naopak *oxidací*, kdy dochází k přijetí elektronu. V biologickém systému tedy vznikají nejčastěji právě redukci nebo oxidací.

Radikály mohou být částice neutrální nebo záporně či kladně nabitě ionty.

Stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, proto se volné radikály snaží chybějící elektron doplnit, radikály jsou tedy vysoce nestabilní a reaktivní, volný radikál může chybějící elektron získat od jiného radikálu, častěji ho však vytrhne ze zdravé molekuly, z té se poté stane nový radikál, který může napadnout jinou sloučeninu a opět ji přeměnit na radikál, tímto se nastartuje řetězová reakce, která poškozuje molekuly, zastaví se až, když se potkají 2 radikály nebo se potká radikál s látkou, jejíž radikál je stabilní a je schopen delší dobu přetrvat (13).

Radikálové reakce jsou důležité pro udržení života na zemi, bez nich by nemohlo docházet k přenosu elektronů z živin na kyslík a nemohla by tak být získána potřebná energie.

2.3.2. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

V organismu vznikají reaktivní formy kyslíku – ROS a reaktivní formy dusíku – RNS, jsou to látky, které reagují s biologickými strukturami jako jsou - aminokyseliny, proteiny, nukleotidy, mastné kyseliny, lipidy, koenzymy. Zprostředkovávají přenos energie, jsou součástí imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace (14).

Reaktivní formy kyslíku

Reaktivních forem kyslíku – ROS je mnoho, nejdůležitějšími z nich jsou - hydroxylový radikál, superoxidový aniont, peroxid vodíku nebo singletový kyslík. Antioxidační enzymy a antioxidačně působící substráty jsou účinnou obranou proti nim (15).

Tabulka 2: Reaktivní formy kyslíku a dusíku (14).

Reaktivní formy kyslíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volné radikály
Superoxid, O_2^\bullet	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxylový radikál HO^\bullet	Kyselina chlorná $HOCl$
Peroxy ROO^\bullet	Ozon O_3
Alkoxy RO^\bullet	Singletový kyslík $1O_2$
Hydroxyperoxy HO_2^\bullet	
Reaktivní formy dusíku	
Volné radikály	Látky, které nejsou volné radikály
Oxid dusnatý NO^\bullet	Nitrosyl NO^+
Oxid dusičitý NO_2^\bullet	Nitroxid NO
	Kyselina dusitá HNO_2
	Oxid dusitý N_2O_3
	Oxid dusičitý N_2O_4
	Nitronium NO_2^+
	Peroxyinitrit $ONOO$
	Alkylperoxyinitrit $ROONO$

Tabulka 3: Antioxidační enzymy a jejich funkce (15).

Antioxidační enzymy	Funkce
Superoxiddizmutáza	Eliminace superoxidu jeho dizmutací na kyslík a peroxid vodíku
Glutathionperoxidáza	Eliminace peroxidu redukcí glutathionu
Glutathiontransferáza	Eliminace lipoperoxidů vazbou na glutathion
Kataláza	Eliminace peroxidu jeho dizmutací na kyslík a vodu
Hemoxygenáza	Produkce biliverdinu
Biliverdinreduktáza	Produkce bilirubinu

Tabulka 4: Antioxidační substráty (15).

Bilirubin
Kyselina askorbová (vitamín C)
Glutation
Kyselina lipoová
Kyselina močová
Karotenoidy (vitamín A)
Alfa tokoferol (vitamín E)
Ubichinol (koenzym Q10)
Albumin
Transferin
Laktoferin
Feritin
Haptoglobin
Hemopexin
Ceruloplazmin

Reaktivní formy kyslíku fungují i jako efektory obrany organismu před cizorodými mikroorganismy, působením enzymů NADPH – oxidázy a myeloperoxidázy dochází v neutrofilních leukocytech a makrofázích k produkci peroxidu vodíku, superoxidu a kyseliny chlorné, tyto mají schopnost zničit pohlcené mikroby. Důležitá role ROS za účasti NADPH – oxidázy je i v buněčné signalizaci. Při dysregulaci všech těchto procesů dochází k patologickým dějům, které způsobují nekontrolovatelnou proliferaci buněk a zánětlivé či degenerativní poruchy (15).

Při ISB vzniká velké množství ROS a to více způsoby. V histologii je u nemocných s UC zřetelná zánětlivá infiltrace neutrofilů v lamina propria a u nemocných s CN účast makrofágů a aktivovaných histocytů. Nadprodukce superoxidového aniontu a současná snížená antioxidační ochrana střeva způsobí oxidační poškození tkáně. K tomuto dále přispívá vysoký obsah železa v lumen a stěně střeva, které pochází hlavně z hemoglobinu a myoglobinu. Železo katalyzuje tvorbu vysoce reaktivních forem kyslíku ze superoxidu Fentonovou reakcí, tato reakce vedoucí k tvorbě ROS hraje důležitou roli u ISB, u kterých je průvodním znakem krvácení do GIT (16). Složky hlenu, který kryje laminární povrch střeva,

depolymeruje hydroxylový radikál nebo ferylové komplexy a startují lipoperoxidaci, modifikaci proteinů, sacharidů a DNA.

Reaktivní formy dusíku

V organismu dále vznikají i reaktivní formy dusíku a to oxid dusnatý a oxid dusičitý. Oxid dusnatý vzniká působením enzymu NO – syntázy z L-argininu, NO – syntáza se vyskytuje hlavně v neutrofilních leukocytech, makrofázích, endotelových buňkách, hepatocytech a hladké svalovině. Pokud dojde k vysoké tvorbě NO, zablokuje se syntéza DNA a funkce mitochondrií (10).

V makrofázích vzniká oxid dusnatý, který se přeměňuje na peroxynitrit, poškozující střevo. Při zánětu dochází díky stimulaci indukovatelné formy enzymu NO - syntázy (iNOS) ke zvýšené tvorbě radikálu NO. Zvýšená aktivita iNOS je zřejmě vyvolaná stimulovanými epitelovými buňkami a fagocytujícími leukocyty. Existuje i konstituční izoforma cNOS, její aktivita u nemocných s UC zůstává stejná jako normálně, kdežto u nemocných s CN byly aktivity obou enzymů výrazně zvýšeny. Rozdíly v aktivitě těchto enzymů můžou odrážet odlišnou patogenezi CN a UC (16,17).

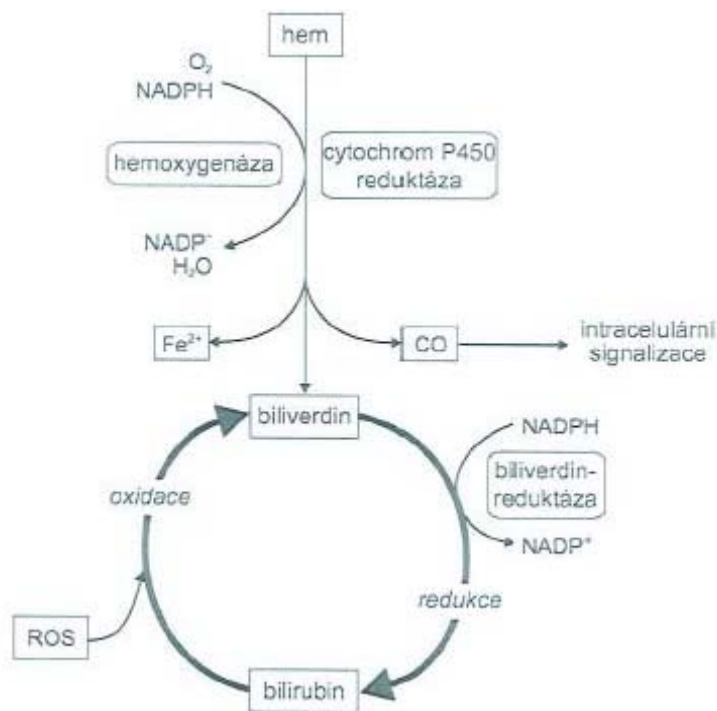
2.4. Bilirubin

2.4.1. Vlastnosti

Bilirubin, žlučový pigment, je hlavní organický produkt katabolismu hemu systémové cirkulace. Hem je červenohnědý cyklický tetrapyrolový porfyrin, který má v centru molekuly navázaný atom železa. Za účasti enzymu hemoxygenázy je degradován na biliverdin a poté enzymem biliverdinreduktázou na bilirubin IX alfa.

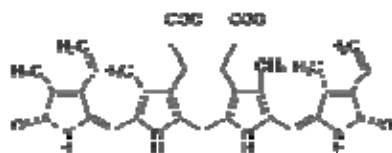
Hemoxygenáza existuje ve dvou izoformách, jako HO-1 a HO-2, HO-1 indukují látky, které vyvolávají oxidační stres jako peroxid vodíku nebo volné kyslíkové radikály, uplatňuje se tedy jako obrana proti oxidačnímu stresu.

Biliverdinreduktáza díky schopnosti autofosforylace a dvojímu pH – optimu zvyšuje svoji katalytickou aktivitu a tím produkci bilirubinu při oxidačním stresu, volné kyslíkové radikály totiž oxidují bilirubin na biliverdin a ten se může opět redukovat na bilirubin. Oba enzymy působí i jako transkripční faktory v buněčném jádře (15).



Obrázek 5: Katabolismu hemu, redukce biliverdinu a oxidace bilirubinu (15).

Nekonjugovaný bilirubin je nepolární a lineární tetrapyrolové struktury. Hydrofobní vlastnosti jsou dány intramolekulárními vodíkovými vazbami, které blokují polární skupiny a jejich expozici vodným rozpouštědlům a jsou příčinou rigidity molekuly. Díky tetrapyrolové struktuře se v plazmě bilirubin vyskytuje v několika izomerech, nejvíce jako isomer IX alfa v konfiguraci Z,Z a proto je nutná při jeho vyloučení z těla konjugace s kyselinou glukuronovou v játrech.

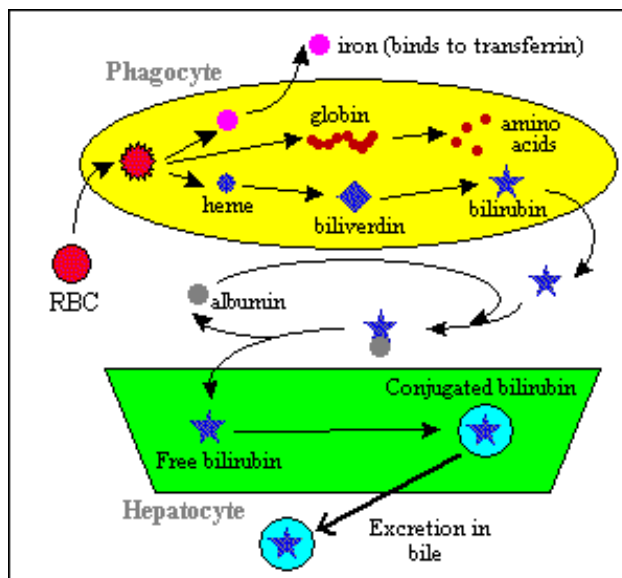


Obrázek 6: Bilirubin IX alfa v konfiguraci Z,Z (47).

Ostatní izomery (IX beta, gama, delta) se vyskytují jen ve stopových množstvích, nevytvářejí intramolekulární vodíkové můstky a díky tomu jsou ve vodě více rozpustné a nepotřebují narozdíl od IX alfa, konjugaci pro vyloučení žlučí (15).

2.4.2. Metabolismus

Bilirubin je degradován v mononukleárním fagocytárním systému, poté se dostává do systémové cirkulace a váže se relativně pevnou vazbou na albumin, transportní bílkovinu. (90%, zbytek se váže na apolipoprotein D v HDL – lipoproteinu). Tato vazba umožňuje transport bilirubinu ve vodném prostředí. Ze systémové cirkulace se dostává do jater disociací bilirubinu z albuminu a translokací přes cytoplazmatickou membránu hepatocytu, na jeho sinusoidálním pólu se nachází několik aktivních transportérů pro bilirubin. V hepatocytu se následně váže na specifické intracelulární proteiny, které umožňují transport bilirubinu jaterní buňkou. Jak již bylo řečeno, je bilirubin díky intramolekulárním můstkům, které spojují polární skupiny, těžce rozpustný ve vodě, proto musí být převeden na polárnější formu, aby mohl být transportován do žluče. Toho se dosáhne konjugací s kyselinou UDP - glukuronovou za katalýzy enzymem UDP – glukuronosyltransferazou, dojde k esterifikaci karboxylových skupin a uvolnění intramolekulárních můstků. Vzniklý konjugovaný bilirubin je aktivním transportním systémem vylučován do žluče a žlučovými cestami transportován do tenkého střeva a následně do tlustého střeva, kde je bakteriálním enzymem beta – glukoronidasou dekonjugován, odštěpí se zbytek kyseliny glukuronové a následně ho rozloží bakteriální reductasy na hydroderiváty bilirubinu nazývané urobilinoidy. Ty jsou poté vylučovány stolicí společně s nemetabolizovaným bilirubinem (15,18).



Obrázek 7: Metabolismus bilirubinu (48).

2.4.3. Antioxidační účinek bilirubinu

Produkce, metabolismus a vylučování bilirubinu jsou v organismu udržovány v rovnováze, při narušení této rovnováhy dochází k hromadění bilirubinu v séru a k tzv. hyperbilirubinemii.

Mírně zvýšená hladina bilirubinu v séru má antioxidační protektivní účinek, avšak při překročení určité hladiny dochází k rozvoji toxických účinků a to hlavně v nervovém systému.

Antioxidační účinek bilirubinu se projevuje především u nemocí, v jejichž patogenezi hraje roli oxidační stres. Protektivní účinky nekonjugovaného bilirubinu při mírně zvýšených hladinách byly popsány u onemocnění jako je aterosklerosa a u některých zánětlivých, autoimunitních, nádorových a neurodegenerativních chorob. Na druhou stranu se také ukazuje, že příliš nízké hladiny bilirubinu v krevním séru jsou asociovány s vyšším rizikem vzniku těchto onemocnění. Důvody těchto asociací nejsou v současnosti zcela jasné, podle teorie reverzní kauzality je pravděpodobné, že u onemocnění sdružených se s vysokým oxidačním stresem dochází ke zvýšené konzumci antioxidačně působícího bilirubinu. Není ale ani vyloučeno, že za nízké hladiny antioxidačně působícího bilirubinu u jedinců postižených těmito nemocemi mohou částečně genetické faktory (15).

Existuje několik teorií pro vysvětlení antioxidačního účinku bilirubinu. Je například dán strukturou bilirubinu, hlavně C10 metylenovou skupinou, tato slouží jako donor elektronů

reaktivním formám kyslíku. Dále je silným inhibitorem NADPH – oxidázy, enzymu, který katalyzuje vznik oxidantů ve fagocytárních i nefagocytárních buňkách, potlačuje tvorbu superoxidu, katalyzovanou NADPH – oxidázou. Antioxidační účinky byly popsány také na potkaním modelu nekonjugované hyperbilirubinémie (potkani kmene Gunn), u nich byly popsány nižší plazmatické hladiny lipoperoxidů a konjugovaných dienu (15).

2.4.4. Protizánětlivý účinek bilirubinu

Experimentální a klinické studie dokazují, že bilirubin má i protizánětlivé účinky. Jedním z mechanismů tohoto účinku je interference s komplementovým systémem a narušení interakce imunoglobulinů IgG a IgM s C1 složkou komplementu. Dále inhibuje komplementem zprostředkovanou hemolýzu a cytotoxicitu závislou na protilátkách. Také bylo prokázáno, že albumin, který se nachází v zánětlivém exsudátu, přenáší bilirubin přes cévní stěnu do míst poškozených volnými kyslíkovými radikály, které produkují fagocyty. Bilirubin je také schopen modulovat syntézu prostaglandinů. Na myším modelu bylo prokázáno, že intraperitoneální podávání biliverdinu zmírňuje střevní zánět vyvolaný dextran sulfátem.

Bilirubin také blokuje venulární adhezi leukocytů, transendotelovou migraci monocytů a aktivaci leukocytů. Žlučové pigmenty modulují expresi FC-receptorů na peritoneálních makrofázích, inhibují lymfocyty a granulocyty a ovlivňují produkci protilátek (15).

2.5. Nukleární transkripční faktor kappa B - NF-κB

2.5.1. Charakteristika a funkce NF – κB

Jak již bylo uvedeno výše, kromě genetických faktorů a faktorů prostředí hraje důležitou roli v patogenezi IBD také slizniční imunitní systém střeva. Ve zdravém střevě tento systém udržuje rovnováhu mezi pro a protizánětlivými mediátory a tím umožňuje obranu proti patogenům střevního lumen. Zároveň zabraňuje hyperreaktivitě imunitního systému proti velkému množství neškodných luminálních antigenů (např. potrava a nepatologické bakterie). U CN i UC je imunologická rovnováha vážně poškozena a posunuta na stranu prozánětlivou. Nukleární transkripční faktor kappa B (NF – κB) byl identifikován jako jeden z klíčových regulátorů tohoto imunologického procesu. Jeho aktivace je výrazně zvýšená u pacientů

s IBD. Svoji schopností nastartovat expresi různých prozánětlivých genů ovlivňuje proces slizničního zánětu. Kromě tohoto zprostředkovává také různé specifické buněčné děje (44).

NF – κ B představuje skupinu pěti různých proteinů – p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 a p52. Všechny proteiny mají stejnou strukturu se specifickou doménou situovanou na N-konci kolem třísté aminokyseliny, která umožňuje dimerizaci, vazbu na DNA a lokalizaci NF – κ B v jádře (19,20,21). Transkripce cílových genů jsou schopné uskutečnit jenom p-65, c-Rel a RelB. Transkripční potenciál p-50 a p-52 závisí na dimerizaci s p-65, c-Rel a RelB přes velké prekurzory zvané p-105 a p-100 (20,21). V nestimulovaných buňkách je většina dimerů NF – κ B inaktivovaná a situovaná v cytoplazmě spolu s malými inhibitory zvanými I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ . Tyto inhibitory jsou schopné deaktivovat vazebné místo zodpovědné za proces lokalizace NF – κ B do jádra (22).

2.5.2. Aktivace NF – κ B

K aktivaci NF – κ B vedou dvě intracelulární cesty – klasická a alternativní – přičemž obě vedou k uvolnění vazby NF – κ B na inhibitory a k přemístění NF – κ B do jádra (23,24,25). Klasická aktivace je iniciovaná širokým spektrem stimulů např. komponenty bakteriální buněčné stěny, prozánětlivými cytokiny, viry nebo látkami ničícími DNA (24). Tyto substance indukují intracelulární signální kaskádu, která vyústí do aktivace I κ B kinázového komplexu (IKK). Ten se skládá ze dvou podjednotek α a β a regulatorního proteinu NEMO (NF – κ B esenciální modulátor). Fosforylace I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ pomocí komplexu IKK vede k jejich proteozomální degradaci a přesunu NF – κ B do jádra (25,26,27,28). Alternativní aktivace je zaměřena na posttranslační proces proměny p-100 prekurzoru na zralý p-52. Protein NEMO není vůbec zapojen a hlavní roli hraje IKK α .(21,25). Aktivovaný a translokovaný NF – κ B v jádře interaguje s regulatorními jednotkami v promotorech a enhancerech, které zprostředkují indukci NF – κ B cílových genů (29), těchto čtyř skupin – zánětlivých a imunoregulačních genů, genů řídicích buněčný cyklus, antiapoptických genů a autoinhibičních regulačních genů NF – κ B (23).

2.5.3. Specifické buněčné děje zprostředkované NF – κB

Exprese a aktivace NF – κB je výrazně aktivována ve střevě postiženém IBD. Hlavně makrofágy a epiteliální buňky ze zaníceného střeva vykazují zvýšenou hladinu NF – κB p65 (30).

Množství aktivovaného NF – κB signifikantně koreluje se závažností střevního zánětu (30). Předpokládá se také, že fibroblasty z lamina propria hrají roli v prozánětlivé funkci NF – κB. Zvýšení exprese NF – κB v slizničních makrofázích je doprovázena zvýšenou kapacitou těchto buněk produkovat a sekretovat TNF – alfa, IL – 1, IL-6 (30). Toto zjištění odpovídá hlavní funkci NF – κB v monocytech, kterou je indukce a kontrola prozánětlivých cytokinů. Kromě TNF – alfa, IL – 1, IL-6, NF – κB také reguluje expresi IL – 12 a IL- 23 (31,32). Tyto cytokiny jsou přímo zodpovědné za typické tkaňové poškození sliznice u IBD. V buňkách lamina propria zodpovídají za stimulaci, aktivaci a diferenciaci imunokompetentních buněk, výsledkem je přetrvávání zánětu ve sliznici. Zejména pomocné lymfocyty Th -1 jsou silně aktivovány cytokinem IL – 12 s podporou IL-23 a TNF-alfa (33,34). TNF – alfa, který je indukován pomocí NF – κB je schopný zesilovat aktivaci NF – κB a tím zprostředkovat pozitivní feedback (35,36,37).

Role NF – κB v epiteliálních buňkách je kontroverzní. IL – 6 zvyšuje expresi intracelulární adhezivní molekuly, která hraje roli v shlukování neutrofilních granulocytů v zánětlivé tkáni (38). Z experimentálních modelů na myších lze ale předpokládat také protizánětlivou funkci NF – κB ve střevních epiteliálních buňkách (39,40).

2.5.4. Blokáda aktivace NF – κB v terapii IBD

Blokáda aktivace NF – κB může být v budoucnu jedna z terapeutických možností léčby IBD.

Některé z již používaných imunosupresivních léků jako jsou kortikosteroidy, sulfasalazin, methotrexát a protilátky proti TNF α působí z části také pomocí neselektivní inhibice NF – κB aktivity, např. kortikosteroidy indukují zvýšenou expresi IκBα (30, 44).

V posledních letech je snaha vyvinout selektivní inhibitory NF – κB. Pomocí myších modelů byla napadena přímo schopnost NF – κB vázat DNA, která vyústila ve zlepšení chronické kolitidy u myší a snížení produkce prozánětlivých cytokinů (41).

Další možnosti ovlivnění aktivace NF – κ B jsou cíleny na specifickou inhibici mechanismů translokujících NF – κ B do jádra, ovlivnění IKK komplexu nebo stabilizaci I κ B proteinu pomocí proteázomových inhibitorů a inhibitorů ubiquitilizace, bylo prokázáno, že proteolytická funkce proteázomů se liší u lidí s CN a UC a zdravých lidí. Poslední možností je přímé ovlivnění exprese NF – κ B pomocí specifických oligonukleotidů (19, 42, 44).

Protože bylo prokázáno, že blokáda NF – κ B aktivace v hepatocytech může vést ke spontánnímu rozvoji hepatocelulárního karcinomu, je nutno omezit inhibici NF – κ B na lokální použití v zanícené mukóze střeva k zabránění projevů systémových nežádoucích účinků (43).

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktor kappu B na parafinových řezech a sledovat jeho expresi ve stěně tlustého střeva normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn kmen) potkanů po indukci chronického zánětu pomocí imunohistochemických metod.

4. Experimentální část

4.1. Materiál a jeho příprava

4.1.1. Zvířata design experimentu (experimentální model chronické kolitidy)

Ve studii byly použity samice normobilirubinemických potkanů kmene Wistar a kmen tzv. Gunn potkanů, což je hyperbilirubinemický kmen s vrozeným defektem bilirubin UDP-glukuronosyltransferasy.

Ve studii bylo použito 8 potkanů kmene Gunn (G^+) a 8 potkanů kmene Wistar (K^+), kterým byl dlouhodobě podáván dextran sulfát (DSS). Sedm dnů po sobě byl do pitné vody přidáván DSS (koncentrace 2% w/v) s následným podáváním pouze pitné vody bez DSS po dobu 14 dnů. Popsaný třítydenní cyklus se 2x zopakoval (proběhly tedy 3 cykly). Jako kontroly byli opět použiti potkani kmene Gunn ($n=6$) a Wistar ($n=6$), kteří nebyly vystaveni vlivu DSS.

Před zahájením studie byli potkani přeléčeni antiparazitárním léčivem (Ivomec, aktivní látka ivermectin), jednorázovou dávkou 300 ug/kg/d p. o. (v pitné vodě) na den. Toto opatření bylo provedeno k eliminaci možného efektu parazitární infekce zažívacího traktu potkanů na rozvoj chronického zánětu střevní sliznice.

4.1.2. Zpracování materiálu, imunohistochemie

Pro histologické a imunohistochemické vyšetření jsme odebrali segment tlustého střeva 0.5-5 cm od řitního otvoru. Odebrané vzorky střeva byly fixovány 24 hodin v Bakerově fixační tekutině. Poté byly promyty ve fyziologickém roztoku a 3x během 24 hodin převedeny v lázních acetonu. Po dalším převedení v lázních benzenu byly vloženy na 2x2 hodiny do parafínu a poté zality do parafinových bločků. Dále byly nakrájeny 3 řezy z každého zvířete pro různá imunohistochemická barvení.

Pro detekci exprese NF- κ B byla použita metodika Avidin-Biotin (ABC) s detekcí pomocí diaminobenzidinu (DAB), který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

K detekci nukleární exprese NF- κ B ve stěně střeva byla použita pro světelnou mikroskopii polyklonální protilátka rabbit anti-rat NF- κ B ve zředění 1/300 (*Santa Cruz, USA*).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použit diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru NIS (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

4.2. Pracovní postup

4.2.1. ABC metodika – detekce exprese NF- κ B

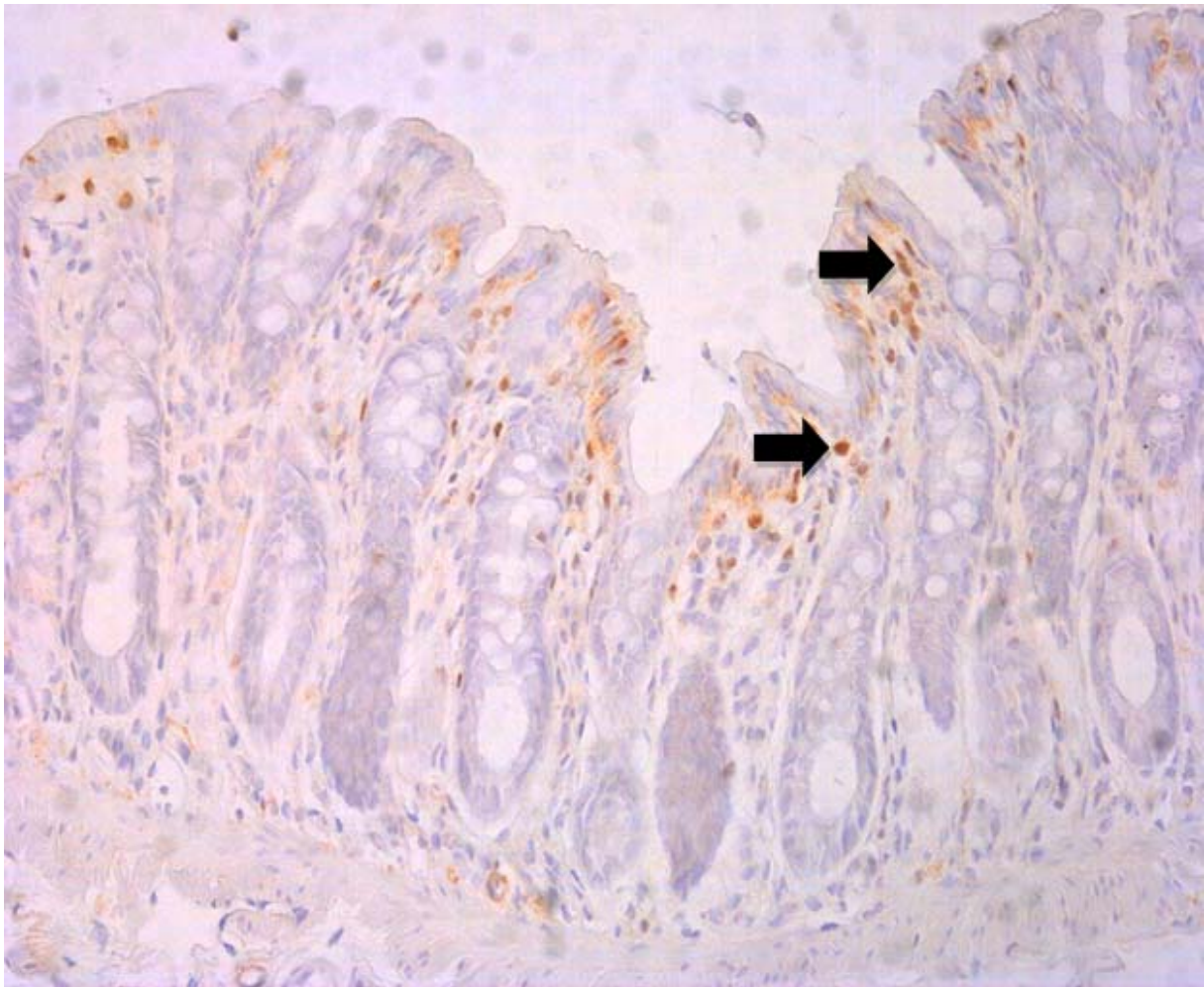
1. formaldehydové páry	2hod
2. odparafinování (xylen3x, aceton, EtOH _{96%} , EtOH _{70%} , destil.voda)	5min
3. digesce citrát pH 6	3x5min
4. PBS	5 minut
5. 10% horse serum v PBS (900 μ l PBS + 100 μ l sera)	30 minut
6. inkubace s anti-avidinem	15 minut
7. PBS	2x5 minut
8. inkubace s anti-biotinem	15 minut
9. PBS	oplach
10. <u>primární protilátka (ředí s v BSA)</u>	<u>přes noc</u>
11. PBS	2x5 minut
12. 10% horse serum v PBS (900 μ l PBS + 100 μ l sera)	15minut
13. sekundární protilátka (ředí se v BSA + 2% rat serum)	30minut
14. PBS	5 minut
15. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS)	15 minut
16. PBS	2x5 minut
17. ABC komplex elite	30 minut
(10 μl A + 10 μl B do 500 μl PBS nechat stát (30 minut))	
18. PBS	2x5 minut
19. DAB (10 μ l DAB na 500 μ l pufu)	sekund
20. Destilovaná voda	
21. Hematoxylin	5sekund
22. Modrání	1 minuta
23. aceton	oplach
24. aceton-xylen (10:1) (vždy dělat znova)→ aceton-xylen (1:10)	3 minuty
25. 3x xylen	2 minuty
26. Eukit	

5. Výsledky

U všech zvířat bylo možné pozorovat jisté změny v histologické struktuře tlustého střeva. Jednalo se hlavně o zkracování délky Lieberkühnových krypt, což je typický znak histopatologických změn u zánětu střeva. Tyto změny byly samozřejmě výraznější, pokud bylo zvířatům podáváno DSS. Naším úkolem však bylo soustředit se zejména na sledování exprese NF- κ B. Výsledky imunohistochemické analýzy prokázaly detekci NF- κ B receptoru ve stěně tlustého střeva potkanů ve všech skupinách zvířat.

Slabá jaderná reakce byla pozorována v buňkách epitelu a lamina propria mucosae. Výjimečně byla reakce prokázána také v jádrech buněk krypt. Analýza všech barvených preparátů však neprokázala žádný rozdíl v intenzitě a síle exprese mezi jednotlivými experimentálními skupinami viz. Obr 8-11.

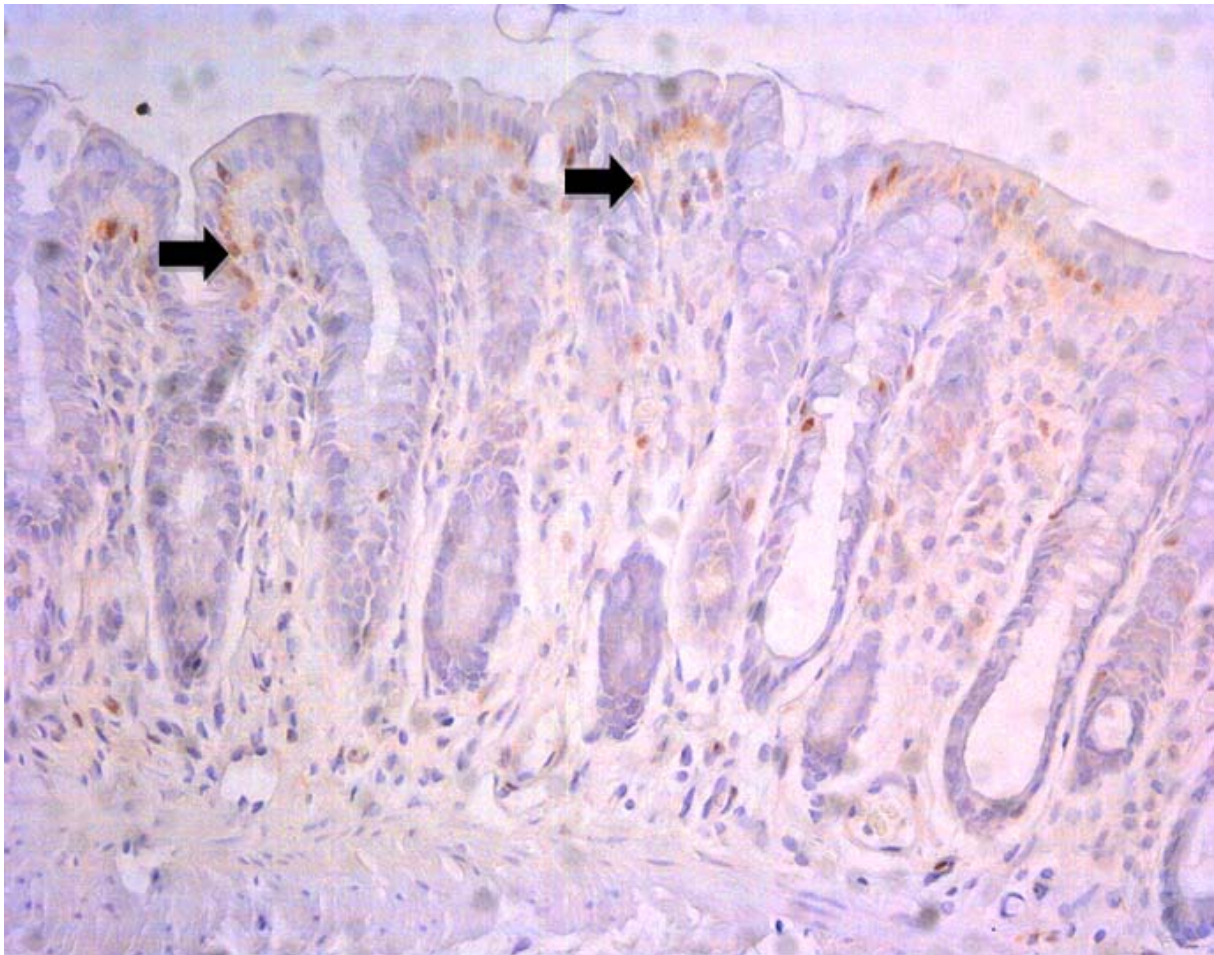
Obr. 8 : Reprezentativní obrázek exprese NF- κ B ve stěně tlustého střeva u kontrolního Wistar potkana bez DSS (K⁻ skupina). Šipky ukazují na jadernou expresi zejména v lamina propria mucosae. Zvětšení 100x.



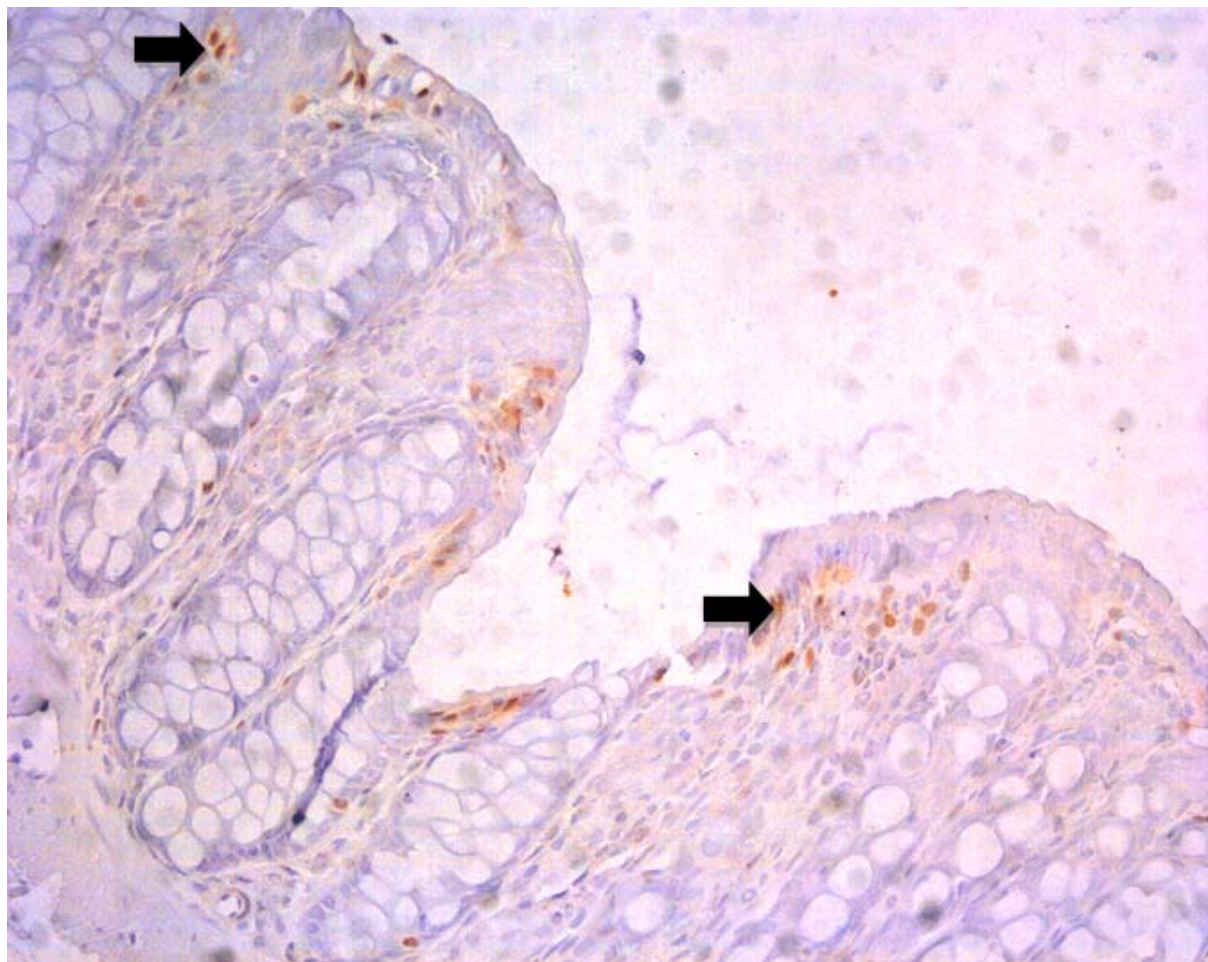
Obr. 9: Reprezentativní obrázek exprese NF- κ B ve stěně tlustého střeva u kontrolního Wistar potkana s DSS (K⁺ skupina). Reakce srovnatelná se zvířaty, kterým nebyl podáván DSS. Jaderná reakce je opět viditelná v zejména v buňkách lamina propria mucosae (šipky). Zvětšení 100x.



Obr. 10: Reprezentativní obrázek exprese NF- κ B ve stěně tlustého střeva Gunn potkana bez DSS (G⁻ skupina). I zde je viditelná pouze slabá reakce v buňkách lamina propria mucosae (šipky). Zvětšení 100x.



Obr. 11: Reprezentativní obrázek exprese NF- κ B ve stěně tlustého střeva Gunn potkana s DSS (G⁺ skupina). I zde je viditelná pouze slabá reakce v buňkách lamina propria mucoase a v epiteliálních buňkách (šipky). Zvětšení 100x.



6. Diskuze

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida patří do idiopatických střevních zánětů (Inflammatory Bowel Diseases, IBD) (50). Crohnova nemoc je chronický zánětlivý proces, který se může vyskytovat v jakékoliv části zažívacího traktu od jícnu až po anální oblast, ale nejčastěji se nachází v tenkém a tlustém střevě. Pro CN je příznačné, že zánětlivé změny jsou segmentální a postihují všechny vrstvy střevní stěny. Pro častou lokalizaci v terminálním úseku ilea (přibližně u 30% nemocných) byla dříve označována jako terminální ileitis a později jako regionální enteritis (54). Naproti tomu ulcerózní kolitida je chronický ulcerózní zánět nejasné etiologie, v jehož průběhu se střídají akutní ataky s ústupem zánětlivých projevů a remisemi. Zánět začíná v rektu a později se šíří na další části tlustého střeva, v některých případech postihuje celý tračník. Zánětlivé změny jsou omezeny pouze na sliznici, popřípadě submukózu. Klinicky a morfologicky je nutné vyloučit infekční kolitidu vyvolanou bakteriemi rodu *Shigella* a *Yersinia* (51).

Nukleární transkripční faktor kappa B (NF – κ B) byl identifikován jako jeden z klíčových regulátorů tohoto imunologického procesu. Jeho aktivace je výrazně zvýšená u pacientů s IBD. Svoji schopností nastartovat expresi různých prozánětlivých genů ovlivňuje proces slizničního zánětu. Kromě tohoto zprostředkovává také různé specifické buněčné děje (44). Expresie a aktivace NF – κ B je výrazně aktivována ve střevě postiženém IBD. Hlavně makrofágy a epiteliální buňky ze zaníceného střeva vykazují zvýšenou hladinu NF – κ B p65 (30). NF- κ B molekulou je regulována řada genů, jejichž produkty jsou pravděpodobně zapojeny i do jiných zánětlivých procesů jako např. procesu aterosklerózy. Adhezní molekuly jako VCAM-1, ICAM-1, a E-selektin a rovněž chemokiny, monocytový chemoatraktivní protein 1 (MCP-1), a interleukin (IL-8) pomáhají infiltraci arteriální intimy cirkulujícími mononukleárními leukocyty (49).

Ke studiu poškození střeva a tedy simulaci výše uvedených onemocnění je možné využít také experimentální zvířata (myši nebo potkany). K indukci zánětlivých změn je možno použít dextran sulfát (DSS) podávaný ve v pitné vodě. Takto lze indukovat a modelovat zánětlivou reakci v tlustém střevě, která má znaky obou výše uvedených onemocnění (52).

Bilirubin byl dlouho vnímán jen jako potenciálně toxická látka s nebezpečím rozvoje toxických účinků zejména v oblasti centrálního nervového systému. Data z poslední doby přesvědčivě ukazují, že mírný vzestup jeho hladin v séru má v důsledku silných antioxidačních a jeho dalších biologických vlastností pro organismus protektivní význam. Týká se to především nemocí, v jejichž patogenezi hraje velkou roli oxidační stres. Ochranné účinky nekonjugovaného bilirubinu při jeho mírně zvýšených hladinách byly skutečně popsány pro onemocnění, jako jsou ateroskleróza, některé nádorové choroby či zánětlivá,

autoimunitní nebo neurodegenerativní onemocnění. Na druhou stranu se také ukazuje, že příliš nízké koncentrace bilirubinu v krevním séru jsou asociovány s vyšším rizikem těchto chorob. Je pravděpodobné, že u onemocnění sdružených s vysokým oxidačním stresem dochází ke zvýšené konzumaci antioxidantně působícího bilirubinu (53).

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktoru kappa B na parafinových řezech a sledovat jeho expresi ve stěně tlustého střeva normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn kmen) potkanů po indukci chronického zánětu pomocí imunohistochemických metod.

Detekce NF- κ B u těchto zvířat je součástí rozsáhlé studie, kde se dále stanovují markery oxidačního stresu a zánětu po indukci poškození střeva podáváním DSS.

Ve všech studovaných skupinách byla nalezena pouze slabá jaderná reakce NF- κ B. Tato reakce byla detekována zejména v oblasti střevní sliznice. Konkrétně v buňkách lamina propria mucosae a někde také přímo v epiteliálních buňkách. Jednoznačně nebyla prokázána souvislost mezi expresí NF - κ B a podáváním DSS (tedy indukci poškození střeva) a ani mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými potkany. Některé předcházející studie prokázaly, že množství aktivovaného NF - κ B signifikantně koreluje se závažností střevního zánětu.(30) Předpokládá se také, že fibroblasty z lamina propria hrají roli v prozánětlivé funkci NF - κ B. Zvýšení exprese NF - κ B v slizničních makrofázích je doprovázena zvýšenou kapacitou těchto buněk produkovat a sekretovat TNF - alfa, IL - 1, IL-6 (30). Tyto výsledky jsme ovšem v této diplomové práci nepotvrdili. Tato skutečnost může být částečně vysvětlena tím, že indukce zánětu prostřednictvím DSS vyvolává spíše neinfekční zánět, tedy spíše chemicky indukovaný aseptický zánět s minimální zánětlivou reakcí. Toto může tedy v konečné fázi představovat hlavní rozdíl ve srovnání se zánětlivým onemocněním střeva u lidí.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodiku pro detekci nukleárního transkripčního faktor kappu B na parafinových řezech a sledovat jeho expresi ve stěně tlustého střeva normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn kmen) potkanů po indukci chronického zánětu pomocí imunohistochemických metod.

Ve všech studovaných skupinách byla nalezena pouze slabá jaderná reakce NF- κ B. Tato reakce byla detekována zejména v oblasti střevní sliznice. Konkrétně v buňkách lamina propria mucosae a někde také přímo v epiteliálních buňkách.

Jednoznačně nebyla prokázána souvislost mezi expresí NF - κ B a podáváním DSS (tedy indukci poškození střeva) a ani mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými potkany.

Závěrem lze tedy konstatovat, že dextran sulfát nevyvolává významnou zánětlivou reakci ve stěně tlustého střeva u potkana a není pravděpodobně také významně ovlivňován hladinami bilirubinu u tohoto modelového stavu.

8. Literatura

- 1) Internetový zdroj – Nespecifické střevní záněty, česká gastroenterologická společnost ČLS JEP, www.cgs-cls.cz, navštíveno 25. 4. 2010.
- 2) Internetový zdroj – interní medicína pro praxi - přehledové články, Crohnova nemoc – klasifikace,diagnostika,Libor Gabalec, www.internimedicina.cz, navštíveno 25.4.2010.
- 3) Lukáš K. – Idiopatické střevní záněty – minimum pro praxi – 1. vydání, Triton 2001, 84s:17s, 19-28s, 43-44s.
- 4) Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.- Základy histologie, 7. vydání, H&H, Jinočany, 1997, 501 s:287 – 294s.
- 5) Čihák R. – Anatomie 2, 2. vydání, Grada, 2002, 367s:82-103s.
- 6) Červenková R. – Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida, 1.vydání, Galén, 2009, 111s:,10-17s,21-28s.
- 7) Internetový zdroj - Občanské sdružení pacientů s IBD-www.crohn.cz, navštíveno 29. 4. 2010.
- 8) Internetový zdroj – Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně,doporučené postupy pro praktické lékaře, Crohnova choroba –Lukáš K., www.cls.cz, navštíveno 25. 4. 2010.
- 9) Internetový zdroj – interní medicína pro praxi - přehledové články, Ulcerózní kolitida – klasifikace, diagnostika, Gabalec L., www.internimedicina.cz, navštíveno 25.4.2010.
- 10) Lukáš M.– Idiopatické střevní záněty – nejistoty, současné znalosti a klinický přístup,1.vydání, Galén 1998 363s : 75 - 85s.
- 11) Lukáš K.– Idiopatické střevní záněty – diagnostika a léčba pro praxi, 1.vydání, Triton 1997, 175s: 17-18s,12-30s.
- 12) Stejskal, J. et al.: Speciální patologie II. díl, 1. vydání, Karolinum, Praha, 2006, 162 – 163 s.
- 13) Racek J. – Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, 1.vydání, Galén 2003, 89s:.,9s,19 s.
- 14) Štípek S. a kol. – Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci – 1.vydání, Grada Publishing 2000, 314s,21-22s.
- 15) Vítek L. – Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi , 1.vydání, Praha 2009, Grada Publishing, 123 s:XI s, 4-17s,81s,91-93 s.
- 16) Dagli U, Balk M, Yucel D - The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis.Inflam.Bowel.Dis.3, 1997, 260 - 264 s.

- 17) Kimura H, Kusugami K, Miura S – Increased nitric oxid production and inducible nitritic oxide synthase aktivity in colonic mucosa of patiens with active ulcerative colitis and crohns diseases. *Digest.Dis.Sci.* 42 1997 1047 – 1054 s.
- 18) Internetový zdroj – chemické listy, referáty, Vítek L., Sedláčková L., www.chemicke-listy.cz, navštíveno 25.4.2010.
- 19) Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725–34.
- 20) Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405–55.
- 21) Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1161–79.
- 22) Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 435–45.
- 23) Greten FR, Karin M. The IKK / NF-kappaB activation pathway – a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193–9.
- 24) Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749–59.
- 25) Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280–8.
- 26) Li XH, Fang X, Gaynor RB. Role of IKKgamma / nemo in assembly of the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2001; 276: 4494–500.
- 27) Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91: 243–52.
- 28) Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, Miething C, Goktuna SI, Neuenhahn M, Fierer J, Paxian S, Van Rooijen N, Xu Y, O’Cain T, Jaffee BB, Busch DH, Duyster J, Schmidt RM, Eckmann L, Karin M. NF-kappaB is a negative regulátor of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 2007; 130: 918–31.
- 29) Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141–79.
- 30) Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998–1004.

- 31) Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693–706.
- 32) Becker C, Wirtz S, Ma X, Blessing M, Galle PR, Neurath MF. Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT / enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2). *J Immunol* 2001; 167: 2608–18.
- 33) Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 307–12.
- 34) Holtmann MH, Neurath MF. Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med* 2004; 4: 439–44.
- 35) Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1 / Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567–73.
- 36) Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Chudáková T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13: 715–25.
- 37) Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997; 159: 6276–82.
- 38) Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol* 2003; 171: 3194–201.
- 39) Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007; 446:557–61.
- 40) Zaph C, Troy AE, Taylor BC, Berman-Booty LD, Guild KJ, Du Y, Yost EA, Gruber AD, May MJ, Greten FR, Eckmann L, Karin M, Artis D. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 2007; 446: 552–6.
- 41) Fichtner – Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strouber W, Kitani A. Treatment of murine Th1 and Th2 mediated inflammatory bowel disease with NF – kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 2005; 115 : 3057 – 71.
- 42) Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann SH, Schmidt-Ullrich R, Steinhoff U. Proteasome- mediated degradation of IkappaBalpha and

processing of p105 in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 3195–203.

43) Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2007; 11: 119–32.

44) Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF – kappa B in inflammatory bowel disease. *J Int Med* 2008; 263:591 – 596

45) Internetový zdroj – http://www.crohn.ic.cz/bin/crohn_tlustestrevo.jpg - www.crohn.ic.cz, navštíveno 30.4.2010.

46) Internetový zdroj - http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cf/UC_granularity.png/180px-UC_granularity.png - www.cs.wikipedia.org, navštíveno 30.4.2010.

47) Internetový zdroj - <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6a/Bilirubin.svg/556px-Bilirubin.svg.png> - www.simple.wikipedia.org, navštíveno 30.4.2010.

48) Internetový zdroj – <http://z.about.com/d/biology/1/0/L/3/bilirubin.gif> www.biology.about.com, navštíveno 30.4.2010.

49) Brasen J. H., Hakkinen T., Malle E., Beisiegel U. and Yla-Herttuala S. (2003). *Atherosclerosis* 166, 13-21.

50) Egan L. J. and Sandborn W. J. (1998). *Gastroenterology* 115, 1295-1296.

51) Ishihara S., Aziz M. M., Yuki T., Kazumori H. and Kinoshita Y. (2009). *J Gastroenterol* 44, 1097-1108.

52) Melgar S., Karlsson L., Rehnstrom E., Karlsson A., Utkovic H., Jansson L. and Michaelsson E. (2008). *Int Immunopharmacol* 8, 836-844.

53) Schwertner H. A. and Vitek L. (2008). *Atherosclerosis* 198, 1-11.

54) Sutherland A. D., Gearry R. B. and Frizelle F. A. (2008). *Dis Colon Rectum* 51, 1283-1291.