



Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Zánět a periferní metabolismus glukokortikoidů

Pavel Leden

Praha 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: II. Interní klinika 3.lékařské fakulty University
Karlovy a Fakultní nemocnice Královské
Vinohrady

Autor: MUDr. Pavel Leden

Školitel: doc. MUDr. Milan Kment, CSc.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Podkladem k této disertační práci jsou především tři publikace, na jejichž vzniku jsem se podílel spolu s ostatními autory. První a třetí publikace byly částečně podpořeny z grantu GAUK 77/2006/C, jehož jsem byl hlavním a jediným řešitelem.

1. Glucocorticoid availability in colonic inflammation of rat.

Ergang P, Leden P, Bryndová J, Zbáňková S, Miksík I, Kment M, Pácha J.

Dig Dis Sci. 2008 Aug;53:2160-7

Na této práci jsem se podílel: indukcí experimentální kolitidy (včetně modulace glukokortikoidního metabolismu), přípravou a zpracováním zkoumaného tkáňového materiálu, izolací RNA, reverzní transkripce, přípravou a vlastním prováděním RT PCR, přípravou homogenátů k měření aktivity enzymů.

2. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis.

Zbáňková S, Bryndová J, Leden P, Kment M, Svec A, Pácha J.

J Gastroenterol Hepatol. 2007 Jul;22:1019-23

Na této práci jsem se podílel: přípravou a zpracováním zkoumaného tkáňového materiálu při DSS kolitidě, izolací RNA, přípravou a vlastním prováděním RT PCR u experimentální kolitidy, kompletací a zpracováním klinických dat od pacientů s ulcerózní kolitidou.

3. Local metabolism of glucocorticoids and its role in rat adjuvant arthritis.

Ergang P, Leden P, Vagnerová K, Klusonová P, Miksík I, Jurcovicová J, Kment M, Pácha J. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

Na této práci jsem se podílel: zavedením modelu experimentální adjuvantní artritidy na pracovišti, indukcí kolitidy (včetně modulace glukokortikoidního metabolismu a vlastní implantace osmotických pump), monitorováním a patologickým vyhodnocováním průběhu pokusu, přípravou a zpracováním zkoumaného tkáňového materiálu a izolací RNA. Dále návrhem a přípravou pokusu s biologickou léčbou artritidy podáváním antagonistů prozánětlivých cytokinů.

OBSAH

SOUHRN	3
SUMMARY	4
1. ÚVOD.....	5
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	6
3. MATERIÁLY A METODY	7
3.1. 11HSD a experimentální TNBS kolitida	7
3.2. 11HSD a ulcerosní kolitida.....	8
3.3. 11HSD a experimentální DSS kolitida	8
3.4. 11HSD a adjuvantní artritida.....	9
4. VÝSLEDKY	9
4.1. 11HSD a experimentální TNBS kolitida	9
4.2. Ulcerosní kolitida a 11HSD.....	10
4.3. 11HSD a experimentální DSS kolitida	10
4.4. 11HSD a adjuvantní artritida.....	10
5. DISKUZE.....	11
5.1. 11HSD a experimentální model TNBS kolitidy	11
5.2. 11HSD a ulcerosní kolitida.....	13
5.3. 11HSD a DSS kolitida.....	14
5.4. 11HSD a adjuvantní artritida.....	14
6. ZÁVĚRY.....	16
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	17

SOUHRN

Glukokortikoidy hrají významnou roli v regulaci zánětlivého procesu a pro svůj imunosupresivní účinek jsou užívány v terapii celé řady zánětlivých onemocnění. Biologická aktivita glukokortikoidů nezávisí pouze na plazmatické koncentraci hormonu, hustotě jejich receptorů a responzibilitě cílových buněk, ale také na lokálním metabolismu glukokortikoidů. Klíčovým enzymem tohoto metabolismu je dehydrogenáza 11 β -hydroxysteroidů (11HSD). Jsou známy dvě izoformy tohoto enzymu. Isoforma 11HSD1 pracuje převážně jako reduktáza a zvyšuje lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů. Isoforma 11HSD2 pracuje pouze jako dehydrogenáza a lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů tedy snižuje. Bylo publikováno několik prací o funkci periferního metabolismu glukokortikoidů v průběhu zánětlivého procesu. Většina prací byla provedena *in vitro*. Cílem této práce bylo: (1) prozkoumat změny periferního metabolismu glukokortikoidů na modelu kolitidy u potkana vyvolané aplikací trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS). (2) Prozkoumat změny periferního metabolismu glukokortikoidů v humánních vzorcích střeva postiženého ulcerosní kolitidou (3) prozkoumat změny periferního metabolismu glukokortikoidů u potkana s kolitidou indukovanou dextranulfátem (DSS) (4) prozkoumat změny v periferním metabolismu glukokortikoidů v průběhu adjuvantní artritidy u potkana. Na řešení cíle jedna byli použiti potkani kmene Wistar, u kterých byla indukována kolitida aplikací TNBS. K řešení úkolu 2 byly získány lidské vzorky střevní tkáně postižené ulcerosní kolitidou. Úkol 3 byl řešen pomocí potkanů kmene Wistar u kterých byla indukována kolitida pomocí orální aplikace DSS. Úkol 4 byl řešen pomocí potkanů kmene Lewis, u kterých byla indukována adjuvantní artritida pomocí kompletního Freundova adjuvans (cFA). Ke studiu byly použity enzymové a molekulárně biologické metody, včetně jednokrokové RT PCR v reálném čase.

(1) V průběhu experimentální TNBS kolitidy byly nalezeny změny periferního metabolismu glukokortikoidů ve smyslu vzestupu reduktázové aktivity 11HSD a poklesu aktivity oxidázové. Zároveň dochází k vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Podávání neselektivního inhibitoru karbenoxolonu vedlo k poklesu oxidázové aktivity a nemělo žádný vliv na expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL1- β , ani na míru infiltrace střevní tkáně buňkami imunitního systému.

(2) Bylo zjištěno, že průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA a k vzestupu exprese TNF- α a IL1- β v zánětlivě postižené střevní tkáni. Za tento vzestup je pravděpodobně spoluodpovědný stimulační účinek prozánětlivých cytokinů, vliv infiltrovaných buněk imunitního systému a zvýšená systémová hladina kortizolu na podkladě hyperaktivace HPA osy.

(3) V průběhu DSS kolitidy dochází v zánětlivě postižené střevní tkáni k vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a poklesu 11HSD2 mRNA. V souladu s tím, dochází k vzestupu reduktázové aktivity 11HSD a poklesu aktivity oxidázové. Nalezené změny tedy plně korelují s nálezy u vzorků ulcerosní kolitidy.

(4) V průběhu adjuvantní artritidy dochází k vzestupu hladin mRNA a reduktázové aktivity 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto změny jsou pozorovány jak v synoviální tkáni, tak ve spádových lymfatických uzlinách. Podávání karbenoxolonu zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a OPN mRNA.

SUMMARY

Glucocorticoids play an important role in regulation of inflammation and their immunosuppressive effect is widely used for treatment of inflammatory diseases. The biological activity of glucocorticoids depends not only on their plasma concentrations, the number of receptors and the responsiveness of the target cells but also on the local metabolism of glucocorticoids that is predominated by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD). Two isoforms of 11HSD are known. The isoform 11HSD1 operates in vivo predominantly as a reductase that increases the local concentrations of glucocorticoids by reduction of their 11-oxo derivatives. The isoform 11HSD2 is a pure dehydrogenase that inactivates biologically active glucocorticoids to their inactive 11-oxo derivatives.

The published data concerning peripheral metabolism of glucocorticoids during inflammation were obtained mostly in in-vitro studies. The aim of the thesis therefore was: (1) to study peripheral metabolism of glucocorticoids during trinitrobenzensulfonic acid (TNBS) induced colitis in rat. (2) to study peripheral metabolism of glucocorticoids in biopsies from human ulcerative colitis (3) to examine peripheral metabolism of glucocorticoids during dextran sodium sulphate (DSS) induced colitis in rat and (4) to study peripheral metabolism of glucocorticoids during adjuvant arthritis in rat. Enzymatic and molecular biology methods were used to study the specific goals.

(1) TNBS induced colitis resulted in significant changes of peripheral metabolism of glucocorticoids. 11-reductase activity was strongly up-regulated and 11-oxidase activity down-regulated in inflamed tissue. Concomitantly the expression of 11HSD1 mRNA was up-regulated and 11HSD2 mRNA down-regulated. Treatment with nonselective inhibitor carbenoxolone decreased 11-oxidase activity in the inflamed tissue by almost 50% without any influence on neither expression of proinflammatory cytokines TNF- α , IL1- β nor the infiltration of colon by immune cells.

(2)Ulcerative colitis up-regulated the expression of colonic 11HSD1 mRNA and down-regulated 11HSD2 mRNA. The mRNA expression of pro-inflammatory cytokines was significantly increased in biopsy specimens from patients with ulcerative colitis compared to control biopsies. This effect was probably influenced by proinflammatory cytokines, increased activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and increased infiltration of colon by immune cells.

(3) DSS colitis significantly up-regulated expression of 11HSD1 and down-regulated expression 11HSD2. In accordance with these changes we found increased 11-reductase activity and decreased 11-oxidase activity compared with control group. These findings fully reflected findings in ulcerative colitis.

(4) Adjuvant arthritis increased synovial 11HSD1 mRNA and 11-reductase activity and in lymph nodes. Administration of carbenoxolone resulted in exacerbation of edema and significantly increased mRNA expression of inflammatory markers TNF- α , COX-2 and OPN, with no change in plasma levels of corticosterone.

1. ÚVOD

Glukokortikoidy hrají významnou roli v regulaci zánětlivého procesu a pro svůj imunosupresivní účinek jsou užívány v terapii celé řady zánětlivých onemocnění. Představují jeden z klíčových modulačních mechanismů v regulaci zánětlivého procesu a imunitní reakce, neboť představují efektorový prvek osy hypotalamus, hypofýza, nadledviny, která je prostředníkem mezi centrálním nervovým systémem a součástími vrozeného a získaného imunitního systému. Regulační účinek glukokortikoidů v zánětlivém procesu je velmi komplexní. Je všeobecně známo, že porucha funkce osy hypotalamus, hypofýza, nadledviny jak ve smyslu hypoaktivity, tak ve smyslu hyperaktivity má za následek závažné změny v zánětlivé odpovědi a imunitní reakci. Neadekvátní hyperaktivace této osy jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti zánětlivého procesu (bolest, emoční trauma, kalorická restrikce), má za následek neadekvátní reakci imunitního systému ve smyslu imunoprese a vyšší náchylnost k infekcím¹. Naopak, neadekvátně nízká aktivita této osy významným způsobem zhoršuje průběh zánětlivého procesu. Je například známo, že pacienti s Addisonovo chorobou vyžadují v průběhu těžkých zánětlivých onemocnění substituci glukokortikoidních hormonů, mimo jiné jako prevenci cytokinové toxické reakce². V terapeuticky užívaných dávkách mají glukokortikoidy výrazný protizánětlivý účinek. Naproti tomu hladiny endogenních glukokortikoidů mají účinky spíše imunomodulační, než čistě imunosupresivní.

Biologická aktivita glukokortikoidů nezávisí pouze na plazmatické koncentraci hormonu, hustotě jejich receptorů a responzibilitě cílových buněk, ale také na lokálním metabolismu glukokortikoidů. Klíčovým enzymem tohoto metabolismu je dehydrogenáza 11 β -hydroxysteroidů (11HSD).

11HSD a její oxidační účinek na kortisol a kortikosteron byl poprvé popsán v 50. letech minulého století v hepatocytech, avšak v této době byla tomuto enzymu přisuzována pouze role při odbourávání glukokortikoidů. V následujících letech byl tento enzym popsán také v dalších tkáních, například v placentě, ledvinách, plicích a varlatech. Na konci 60. let byla popsána reduktázová aktivita enzymu v játrech. Na počátku 70. let bylo objeveno, že ke konverzi kortisolu na kortizon dochází ve značné míře také v ledvinách. V 80. letech minulého století byla purifikována 11HSD z krysích hepatocytů a byla popsána její oxoreduktázová funkce. Na konci 80. let dvě skupiny nezávisle na sobě určily fyziologickou roli 11HSD. V roce 1989 byla vyizolována a podrobně popsána forma 11HSD1. Již v této době se začaly objevovat teorie o existenci druhé izofomy tohoto enzymu. 11HSD2 byla poprvé naklonována a podrobně popsána v roce 1994. V následujícím období byla podrobně zkoumána tkáňová distribuce obou forem 11HSD. V posledních letech se pak pozornost zaměřila na výzkum tkáňově specifických funkcí 11HSD a její patofyziologický význam u některých onemocnění.

Izofoma 11HSD1 pracuje převážně jako reduktáza a zvyšuje lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů (kortizol) z jejich neaktivních 11-oxo derivátů (kortizon). Izofoma 11HSD2 pracuje pouze jako dehydrogenáza, a snižuje tedy lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů jejich přeměnou na neaktivní 11-oxo deriváty. Bylo publikováno několik prací o funkci periferního metabolismu glukokortikoidů v průběhu zánětlivého procesu. Většina prací byla provedena in vitro.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo přispět k bližšímu porozumění významu periferního metabolismu glukokortikoidů v průběhu zánětlivých procesů in vivo. Byly řešeny následující čtyři otázky:

1. Dochází v průběhu experimentální kolitidy indukované aplikací trinitrobenzensulfonové kyseliny ke změnám v expresi a aktivitě izoforem 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy ve střevní tkáni a vede aplikace látek ovlivňujících glukokortikoidní metabolismus ke zvýraznění nebo útlumu těchto změn?

TNBS indukovaná kolitida je zvířecí model, který je běžně užíván jako simulace Crohnovy nemoci. Jedním z klíčových prozánětlivých faktorů, které se podílejí na regulaci zánětlivého procesu, jsou prozánětlivé cytokiny a enzym inducibilní NO syntasa, jejíž jednou z mnoha funkcí je aktivace klíčového prozánětlivého transkripčního faktoru NF- κ B. Jeho aktivace ve spolupráci s cytokiny a prostaglandiny má za následek zvýšenou produkci proteinu mucinu střevní tkáni. Bylo prokázáno, že kortikosteroidy potlačují zánět v různých tkáních včetně střeva, ovlivněním syntézy cytokinů a prostaglandinů. Dále je známo, že in vitro cytokiny TNF- α a IL-1 β zvyšují syntézu 11HSD1 a snižují syntézu 11HSD2. Chtěli jsme proto ověřit, zda k těmto změnám dochází také in vivo na tkáňové úrovni. Dále jsme chtěli zjistit, zda lokální metabolismus glukokortikoidů může v průběhu zánětlivého střevního procesu ovlivňovat expresi vybraných genů. K ověření této hypotézy, byl experimentálním zvířatům v průběhu kolitidy lokálně aplikován neselektivní inhibitor 11HSD karbenoxolon, antagonista glukokortikoidních receptorů mifepriston a terapeuticky užívaný syntetický glukokortikoid budesonid.

2. Mění se exprese 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy ve střevní tkáni postižené zánětlivým procesem v průběhu ulcerosní kolitidy?

Výsledky našich prací i prací jiných autorů na experimentálním modelu zánětlivých střevních onemocnění ukázaly změny v expresi a aktivitě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy. Chtěli jsme ověřit, zda k obdobným změnám v lidské střevní tkáni dochází i v průběhu idiopatického střevního zánětu. Zkoumali jsme proto expresi 11HSD a zánětlivých cytokinů ve vzorcích střevní tkáně získaných od pacientů s ulcerosní kolitidou a porovnávali je se vzorky střevní tkáně od pacientů, u kterých byl zánětlivý střevní proces histologicky vyloučen.

3. Dochází v průběhu kolitidy vyvolané aplikací dextransulfátu ke změnám v expresi a aktivitě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy a korelují tyto změny s nálezem u humánních vzorků střevní tkáně s ulcerosní kolitidou?

Zánětlivý střevní proces vyvolaný podáváním dextransulfátu je obecně využíván jako experimentální model napodobující ulcerosní kolitidu. Sledovali jsme proto, zda in vivo dochází ke změnám v expresi a aktivitě 11HSD a expresi vybraných prozánětlivých cytokinů a výsledky porovnávali s humánními vzorky střevní tkáně s ulcerosní kolitidou.

4. Jakým způsobem se mění exprese a aktivita 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenasy v průběhu adjuvantní artritidy v zánětlivě poškozené synovii a buňkách imunitního systému a je možné modulovat tyto změny látkami ovlivňujícími metabolismus glukokortikoidů?

Glukokortikoidy jsou užívány v terapii zánětlivých kloubních onemocnění a jejich účinek je v kloubní tkáni pravděpodobně modulován 11HSD. Expresí 11HSD byla in vitro prokázána v synoviocytech. Navíc některé studie ukazují, že prozánětlivé cytokiny jsou velice účinným spouštěčem 11HSD v různých tkáních, včetně synoviocytů. K objasnění vzájemné interakce mezi zánětlivým procesem, 11HSD a prozánětlivými cytokiny jsme při adjuvantní artritidě podávali neselektivní inhibitor 11HSD karbenoxolon a inhibitor glukokortikoidních receptorů mifepriston. Za účelem objasnění účinku TNF- α , IL-1 β na expresi a aktivitu 11HSD1 in vivo jsme modulovali artritický proces specifickými antagonisty těchto cytokinů. Následně jsme zkoumali účinky těchto jednotlivých látek na změny aktivity a exprese 11HSD v buňkách synoviální tkáně a buňkách spádových lymfatických uzlin.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. 11HSD a experimentální TNBS kolitida

K pokusům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar vážící 250 až 300 gramů. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin, skupiny experimentální a skupiny kontrolní. Experimentální kolitida byla indukována pomocí enterální aplikace 2,4,6 trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) metodou opublikovanou dříve³. K experimentu byla použita jednorázová dávka TNBS v množství 30 mg, u některých experimentů byla dávka TNBS redukována na 8mg nebo 16 mg, aby indukované zánětlivé změny byly mírnějšího stupně. Kontrolní skupině zvířat byl aplikován fyziologický roztok. Experimentální skupina zvířat byla 24 hodin po aplikaci TNBS náhodně rozdělena na čtyři podskupiny. Každé podskupině zvířat byly v následujících 5 dnech rektálně aplikovány látky, které různým způsobem modulují glukokortikoidní metabolismus. První podskupině, která sloužila jako kontrolní, byl rektálně aplikován roztok 0,9% NaCl. Druhé skupině byl aplikován neselektivní inhibitor 11 β HSD karbenoxolon. Třetí skupině zvířat byla podávána kombinace karbenoxolonu a antagonisty glukokortikoidních receptorů mifepristonu (RU-486). Čtvrté skupině byl aplikován syntetický glukokortikoid budesonid. Aplikace jednotlivých dávek všem podskupinám probíhala v intervalu 24 hodin. Sedmý den experimentu byla zvířata usmrcena dekapitací. Ihned po dekapitaci bylo odebráno tlusté střevo k analýze. Část tkáně střeva byla odebrána k histologické analýze, část určená pro kvantitativní analýzu mRNA byla šokově zmrazena v tekutém dusíku a zbytek střevní tkáně byl zpracován k izolaci intraepiteliálních lymfocytů. Intraepiteliální lymfocyty byly izolovány mírně upravenou metodou dle Lyscoma a Bruetona⁴.

V čerstvých tkáňových řezech byla měřena oxidázová a reduktázová aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy pomocí dříve opublikované metody⁵, kdy byly tkáňové řezy inkubovány v přítomnosti kortikosteronu nebo 11-dehydrokortikosteronu. Po inkubaci byly vyextrahovány steroidy a ty pak následně zanalyzovány pomocí HPLC.

Další alikvot získané střevní tkáně byl použit k měření genové exprese pomocí jednokrokové RT PCR v reálném čase. Nejdříve byla vyzolována celková RNA pomocí preparátu RNA Blue (Top-Bio, Praha, ČR), následovala reverzní transkripce pomocí Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptázy (M-MLV). V získané cDNA byly následně kvantitativně analyzovány geny pro 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , IL1- β , COX-2 a MUC-2. K vlastní analýze byl použit přístroj LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo), nebo přístroj Abi-Prism 7000 Sequence Detection System instrument od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Následně byla vypočtena hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen. Jako standard

byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně.

K posouzení míry zánětlivé infiltrace zkoumaných vzorků byla stanovena aktivita enzymu myeloperoxidázy. Aktivita myeloperoxidázy byla stanovena jako index infiltrace tkáně neutrofilními leukocyty pomocí dříve publikované metody ⁶.

3.2. 11HSD a ulcerosní kolitida

Do studie bylo zařazeno celkem 26 pacientů, kteří podstoupili rutinní endoskopické vyšetření tlustého střeva (koloskopii). Protokol studie byl schválen etickou komisí 3. LF UK a všichni pacienti zařazení do studie měli podepsán informovaný souhlas. Čtrnáct pacientů bylo zařazeno do skupiny s kolitidou a 12 pacientů bylo zařazeno do skupiny kontrolní. Do skupiny s kolitidou byli zařazení pacienti s diagnostikovanou ulcerosní kolitidou se středně těžkým až těžkým průběhem dle Mayo skóre ⁷. Do kontrolní skupiny byli zařazení pacienti, u kterých bylo zánětlivé střevní onemocnění vyloučeno. Bioptické vzorky byly odebrány do 2 ml roztoku RNA-later a uskladněny při teplotě 4°C.

Izolace RNA z humánních vzorků byla provedena pomocí produktu Gene elute mammalian Total RNA kit dle návodu k výrobku. Vlastní kvantifikace byla provedena pomocí přístroje LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) za použití firemního kitu Fast Start DNA Master Sybr Green I. Jako referenční gen byl pro všechny zkoumané geny zvolen β -aktin. Pro jednotlivé geny byla následně pomocí kalibračních křivek vypočítána hladina mRNA. Kalibrační křivky byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen a jako standardní cDNA byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně. Výsledky byly vypočítány jako poměr zkoumaných genů/ β -aktin. Sekvence jednotlivých primerů, koncentrace MgCl₂ a vlastní program amplifikace byli stanoveny na základě optimalizace.

3.3. 11HSD a experimentální DSS kolitida

K pokusům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar vážící 200 až 250 gramů a to jak pro skupinu experimentální, tak pro skupinu kontrolní. K indukci kolitidy byl použit dříve popsáný model indukce zánětlivých změn aplikací sodné soli dextransulfátu (DSS) ⁸. Indukce střevního zánětu touto látkou je pravděpodobně způsobena na podkladě aktivace makrofágů a dalších imunitních buněk vyvolané porušením bariérové funkce střevních epiteliálních buněk. DSS byl podáván ve třech cyklech trvajících 5 dnů s pauzou 20 dnů mezi cykly. Po skončení třetího cyklu byla zvířata usmrcena a bylo odebráno tlusté střevo. Odebrané střevo bylo podélně rozstříženo a důkladně promyto ve fyziologickém roztoku. Část tkáně pak byla okamžitě použita ke stanovení enzymatické aktivity 11HSD a zbytek střeva byl použit ke stanovení hladin mRNA a aktivity enzymu myeloperoxidázy.

Aktivita 11HSD byla měřena obdobným způsobem podrobně popsáným v kapitole 3.1. Nejdříve byly vzorky inkubovány s [³H]kortikosteronem, nebo [³H]11-dehydrokortikosteronem. Následně byly vyextrahovány steroidy, které byly následně analyzovány pomocí HPLC.

RNA ze zvířecích vzorků byla vyzolována metodou dle Chomczynského ⁹ a následně byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA za pomoci M-MLV reverzní transkriptázy. Kvantifikace exprese jednotlivých genů byla provedena přístrojem LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) za použití firemního kitu Fast Start DNA Master Sybr Green I. Jako „house-keeping“ gen byl pro všechny zkoumané geny zvolen β -aktin. Následně byla pomocí kalibračních křivek vypočítána hladina mRNA.

Aktivita enzymu myeloperoxidázy byla stanovena ve zmrazených vzorcích střevní tkáně metodou podrobně popsanou v kapitole 3.1.

3.4. 11HSD a adjuvantní artritida

K experimentům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Lewis ve stáří 7-9 týdnů a to jak ve skupině experimentální, tak ve skupině kontrolní. Adjuvantní artritida byla indukována pomocí dříve popsané metody¹⁰ za pomoci suspenze tepelně usmrcených bakterií *Mycobacterium butyricum* rozpuštěných v inkompletním Freundovo adjuvans. Experiment proběhl ve dvou nezávislých částech. V první části byly porovnávány změny mezi skupinou artritickou a skupinou kontrolní. Ve druhé části experimentu byla artritická skupina 8. den po aplikaci Freundova adjuvans rozdělena do 5 podskupin a každé podskupině byla v následujících sedmi dnech aplikována látka modulující zánět, nebo metabolismus glukokortikoidů. První skupině byl aplikován inhibitor receptoru pro TNF- α etanercept, druhé skupině byl aplikován antagonist receptoru pro IL-1 β anakinra, třetí skupině byl aplikován neselektivní inhibitor 11HSD karbenoxolon, čtvrté skupině byl aplikován antagonist glukokortikoidních receptorů mifepriston. Poslední páté skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok. Zvířata byla usmrcena 16. (v prvním experimentu) nebo 18. (v druhém experimentu) den po indukcii artritidy. Ze zvířat byly odebrány kolenní klouby (z nichž byly následně vyizolovány synoviocyty), dále byly odebrány inguinální, lumbální a kaudální lymfatické uzliny. Ke sledování rozvoje artritidy byla denně měřena hmotnost zvířat a edém postižených končetin.

K izolaci RNA ze synoviocytů a lymfatických uzlin byl použit Genelute mammalian total RNA kit. Vzorky RNA byly následně transkribovány do cDNA pomocí M-MLV reverzní transkriptázy.

Kvantitativní real time PCR byla provedena pomocí přístroje Abi-Prism 7,000 Sequence Detection System instrument od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Užity byly firemně vyráběné proby pro jednotlivé geny a jako referenční gen byl použit GAPDH. Hladina mRNA byla vypočítána pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý zkoumaný transkript.

Aktivita 11HSD byla měřena výše popsanou metodou za pomoci inkubace s radioaktivně značeným substrátem, následnou extrakcí steroidů a analýzou pomocí HPLC.

4. VÝSLEDKY

4.1. 11HSD a experimentální TNBS kolitida

Enterální aplikace směsi trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) a etanolu vyvolala zánětlivé změny v celém postiženém úseku tlustého střeva. Rozsah a míra zánětlivých změn byla úměrná aplikované dávce. Při indukcii kolitidy dávkou 8 mg TNBS převládaly u všech zvířat zánětlivé změny odpovídající středně těžké zánětlivé reakci.

Indukce TNBS kolitidy signifikantním způsobem ovlivnila aktivitu 11HSD v čerstvě zmrazených tkáňových řezech z tlustého střeva. Oxidázová aktivita byla snížena ve vzorcích zvířat kterým byla aplikována TNBS a toto snížení aktivity korelovalo s podanou dávkou TNBS. Reduktázová aktivita byla naopak výrazně zvýšena ve vzorcích s TNBS a toto zvýšení také korelovalo s podanou dávkou. Vzhledem k tomu, že u všech tří sledovaných skupin byla absolutní hodnota oxidázové aktivity vyšší než aktivity reduktázové, byla celková aktivita 11HSD ve prospěch oxidace.

Při experimentu, kdy byla indukována kolitida dávkou 30 mg TNBS a následně byly na zánětlivé poškozenou střevní sliznici topicky aplikovány jednotlivé látky různým způsobem ovlivňující glukokortikoidní metabolismus, došlo k signifikantním změnám v aktivitě 11HSD. Při topické aplikaci neselektivního inhibitoru 11HSD karbenoxolonu (CBX) došlo k poklesu oxidázové aktivity o téměř 50 %. Velmi podobný účinek na

oxidázovou aktivitu 11HSD jako aplikace CBX mělo topické podávání budesonidu. Topická aplikace CBX společně s antagonistou glukokortikoidních receptorů mifepristonem (RU-486), vedlo k oslabení efektu samotného CBX.

Topická aplikace CBX vedla také k několikanásobnému zvýšení hladin 11HSD1 mRNA. Aplikace RU-486 společně s CBX vedla k inhibici tohoto vzestupu. Signifikantní vzestup 11HSD1 mRNA byl pozorován také po topickém podávání budesonidu. V případě 11HSD2 mRNA podávání CBX vedlo k významnému snížení exprese 11HSD2 mRNA, zatímco aplikace CBX v kombinaci s mifepristonem, ani podávání budesonidu nevedlo k signifikantním změnám ve srovnání s kontrolní skupinou.

Pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase byly měřeny také hladiny mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , COX-2 a MUC-2. Podávání CBX významně neovlivňuje hladiny mRNA genů pro TNF- α , IL-1 β , COX-2, avšak dochází k významnému vzestupu hladiny mRNA MUC2 a to jak při aplikaci CBX samotného, tak při jeho současném podávání s RU-486. Lokální podávání budesonidu má za následek snížení hladin mRNA pro TNF- α , IL-1 β a COX-2. Signifikantní vliv na hladinu MUC-2 mRNA lokální podávání budesonidu nemá. Podávání RU-486 vedlo k významnému zvýšení hladin mRNA TNF- α a IL-1 β a nemělo žádný prokazatelný vliv na hladiny mRNA COX-2, MUC-2.

K posouzení míry zánětlivé infiltrace zkoumaných vzorků byla stanovena aktivita enzymu myeloperoxidázy. U vzorků ze zvířat s TNBS došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity myeloperoxidázy oproti vzorkům kontrolní skupiny. Zatímco topické podávání CBX nemělo za následek významnou změnu aktivity MPO, aplikace CBX + RU486 vedlo k signifikantnímu vzestupu aktivity oproti skupině TNBS. Lokální podávání budesonidu vedlo k poklesu aktivity MPO ve srovnání s TNBS skupinou. Při měření hladin mRNA 11HSD1 ve vyizolovaných intraepiteliálních lymfocytech tlustého střeva byl zjištěn významný nárůst hladiny 11HSD1 mRNA ve skupině s TNBS oproti skupině kontrolní.

4.2. Ulcerosní kolitida a 11HSD

V biopsických vzorcích tlustého střeva získaných od pacientů s ulcerosní kolitidou (UC) a pacientů kontrolní skupiny měřena hladina mRNA obou izoform 11HSD. Bylo zjištěno, že ve vzorcích od pacientů s UC je významně vyšší hladina mRNA 11HSD1 a významně nižší hladina 11HSD2 mRNA. Dále byly nalezeny významně vyšší hladiny mRNA TNF- α a IL-1 β ve vzorcích od pacientů s UC ve srovnání s kontrolní skupinou.

4.3. 11HSD a experimentální DSS kolitida

Ve vzorcích tlustého střeva získaných od experimentálních zvířat skupiny s DSS kolitidou a kontrolní skupiny byla stanovena jak oxidázová, tak reduktázová aktivita 11HSD. Medián 11-oxidázové aktivity byl významně nižší ve vzorcích s DSS kolitidou oproti vzorkům kontrolní skupiny. Naproti tomu, 11-reduktázová aktivita byla ve srovnání s kontrolní skupinou významně zvýšena ve vzorcích skupiny s DSS kolitidou.

Kromě aktivity 11HSD byla ve zkoumaných vzorcích také stanovena hladina mRNA pro obě izoformy. Bylo zjištěno, že ve vzorcích ze skupiny zvířat s DSS kolitidou dochází, ve srovnání s kontrolní skupinou významnému vzestupu mRNA 11HSD1 a poklesu mRNA 11HSD2.

4.4. 11HSD a adjuvantní artritida

Ve skupině zvířat, u kterých byla indukována adjuvantní artritida došlo k významnému otoku kloubů zadních končetin oproti skupině kontrolní.

Ke změnám ve velikosti hlezenních kloubů, docházelo i ve skupinách zvířat, kterým byly

podávány látky o kterých je známo, že ovlivňují zánětlivý proces. Podávání karbenoxolonu, stejně jako mifepristonu vedlo k významnému zvětšení otoku hlezenních kloubů ve srovnání jak se skupinou kontrolní, tak se skupinou s adjuvantní artritidou. Naproti tomu podávání etanerceptu i anakinry vedlo k významnému snížení otoků hlezenních kloubů ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou.

Měřením aktivity 11HSD v synoviocytech vyzolovaných z kolenních kloubů bylo zjištěno, že adjuvantní artritida významně zvyšuje reduktázovou aktivitu 11HSD ve srovnání s kontrolní skupinou.

Pomocí RT PCR v reálném čase byl zjištěn významný nárůst hladin mRNA HSD1 ve skupině s adjuvantní artritidou při porovnání s kontrolní skupinou. Ani v jedné skupině nebyla detekována mRNA 11HSD2.

Aplikace etanerceptu a anakinry vedla k významnému poklesu hladin mRNA 11HSD1 v porovnání se skupinou s artritidou.

Ve spádových lymfatických uzlinách zánětlivě postižených kloubů byly nalezeny obě izoformy 11HSD. Ve skupině s adjuvantní artritidou byl zjištěn významný vzestup hladiny mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou. V případě mRNA 11HSD2 nebyl rozdíl mezi skupinou s adjuvantní artritidou a skupinou kontrolní statisticky významný.

Ve stromální části spádových lymfatických uzlinách nebyl zjištěn prakticky žádný rozdíl ani v oxidázové, ani v reduktázové aktivitě 11HSD mezi skupinou s artritidou a skupinou kontrolní. V mobilní části spádových lymfatických uzlin byla zjištěna signifikantně vyšší reduktázová aktivita ve skupině s artritidou oproti skupině kontrolní a žádný rozdíl v aktivitě reduktázové.

V synoviocytech a spádových lymfatických uzlinách byl v průběhu adjuvantní artritidy zjištěn významný pokles exprese GR mRNA.

Dále bylo zjištěno, že v izolovaných synoviocytech v průběhu adjuvantní artritidy dochází k signifikantnímu vzestupu mRNA TNF- α , IL1- β , COX-2, OPN a S100A4.

Podávání karbenoxolonu mělo za následek významný vzestup mRNA TNF- α , COX-2 a OPN. Naproti tomu podávání mifepristonu vedlo k signifikantnímu zvýšení pouze mRNA COX-2 a OPN.

Ve spádových lymfatických uzlinách podávání karbenoxolonu vedlo k významnému zvýšení hladiny mRNA OPN a nemělo žádný efekt na mRNA ostatních sledovaných genů.

5. DISKUZE

5.1. 11HSD a experimentální model TNBS kolitidy

Experimentální kolitida indukovaná lokální aplikací trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) je dobře popsaný zvířecí model zánětu, který je využíván především pro podobnost zánětlivých změn se změnami nalazanými při Crohnově nemoci³. Je všeobecně známo, že regulace zánětlivého procesu je komplexní a průběh tohoto procesu je dán kombinací prozánětlivých a protizánětlivých faktorů. Mezi nejdůležitější prozánětlivé faktory patří prozánětlivé cytokiny a systém enzymu inducibilní NO syntázy (iNOS), jejíž jednou z důležitých fyziologických funkcí je aktivace klíčového prozánětlivého transkripčního faktoru NF- κ B¹¹. Je všeobecně známo, že glukokortikoidy mají schopnost potlačovat zánětlivý proces v celé řadě tkání, včetně tlustého střeva a to právě prostřednictvím změn v transkripci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů, prostaglandinů a také interferencí se systémem transkripčního faktoru NF- κ B. Jak již bylo uvedeno, enzym 11HSD má schopnost měnit lokální koncentrace glukokortikoidů na tkáňové a buněčné úrovni. Několik autorů pak prokázalo, že in vitro prozánětlivé cytokiny

TNF- α a IL-1 β syntézu a aktivitu 11HSD1 zvyšují a 11HSD2 snižují¹²⁻¹⁴, čímž dochází ke změnám koncentrace glukokortikoidů v zánětlivé tkáni. Tento mechanismus by mohl představovat důležitý mechanismus negativní zpětné vazby v regulaci zánětlivého procesu. Na podkladě znalosti o snížené expresi 11HSD2 v průběhu zánětlivého procesu¹⁵, jsme vytvořili hypotézu, že lokální metabolismus glukokortikoidů může ovlivňovat expresi genů regulujících zánětlivý proces. K ověření této hypotézy, jsme použili zmiňovaný TNBS model kolitidy, kdy skupině experimentálních zvířat byl topicky aplikován neselektivní inhibitor 11HSD CBX a následně byla sledována míra infiltrace střevní tkáně leukocytárními buňkami prostřednictvím měření enzymu myeloperoxidázy, oxidázová i reduktázová aktivita 11HSD a exprese 11HSD1 mRNA, 11HSD2 mRNA, exprese prozánětlivých markerů TNF- α mRNA, IL-1 β mRNA, COX-2 a nejvýznamnějšího střevního mucinu MUC-2 mRNA. Bylo prokázáno, že izoforma 11HSD2 je ve střevní tkáni exprimována pouze enterocyty, zatímco izoforma 11HSD1 je exprimována také buňkami lamina propria a buňkami imunitního systému^{16,17}. Lze se tedy říci, že zatímco inhibice izoformy 11HSD1 vede ke snížené tvorbě biologicky aktivních glukokortikoidů z jejich neaktivních metabolitů a tím vlastně snižuje glukokortikoidní signál, inhibicí izoformy 11HSD2 v průběhu zánětlivého procesu dochází k usnadnění přístupu biologicky aktivních glukokortikoidů k jejich receptorům ve vybraných buňkách zánětlivě postižené tkáně. Výsledky našich měření ukázaly, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k poklesu oxidázové aktivity a vzestupu reduktázové aktivity. Tyto změny korelují se stupněm zánětlivého procesu. Podávání neselektivního inhibitoru 11HSD CBX do oblasti zánětlivě postiženého tlustého střeva má za následek významné snížení dehydrogenázové aktivity v tkáni střeva a pokles této aktivity je doprovázen zvýšenou expresí 11HSD1 mRNA a sníženou expresí 11HSD2 mRNA. Snížený metabolismus kortikosteronu v zánětlivé tkáni však pravděpodobně není přímým následkem efektu CBX, ale s největší pravděpodobností následkem zvýšené lokální aktivity 11HSD1 a snížené aktivity 11HSD2. Na základě těchto našich poznatků, můžeme konstatovat, že podávání CBX mění lokální koncentraci kortikosteronu na podkladě zvýšené exprese 11HSD1 a snížené exprese 11HSD2. Nález snížené exprese 11HSD2 po podání CBX je mírně překvapivý, nemůže být totiž dostatečně vysvětlen jako následek autoregulace tohoto enzymu cestou substrátu a produktu, neboť existují důkazy, že glukokortikoidy expresi 11HSD2 mRNA zvyšují¹⁸. Je tedy pravděpodobné, že na regulaci se podílí vliv dalších faktorů. Jako nejjednodušší vysvětlení se zdá, podíl derivátů kyseliny arachidonové na regulaci exprese 11HSD2 mRNA ve střevní tkáni. In vitro bylo totiž prokázáno, že produkce prostaglandinů na tkáňové úrovni může snižovat aktivitu 11HSD2¹⁹. Podávání budesonidu vedlo k významnému vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a k nesignifikantnímu poklesu 11HSD2 mRNA. Nález zvýšené 11HSD1 mRNA je v souladu s našimi předpoklady, jelikož ve studiích in vitro bylo prokázáno, že podávání glukokortikoidů vede u některých typů buněk ke zvýšení exprese 11HSD1²⁰.

Je všeobecně známo, že glukokortikoidy jsou prostřednictvím glukokortikoidních receptorů schopné snižovat aktivitu zánětlivého procesu prostřednictvím snižování produkce prozánětlivých cytokinů²¹ a prostřednictvím inhibice enzymů zánětlivé kaskády fosfolipasy A2 a cyklooxygenasy 2²². Zajímalo nás proto, k jakým změnám v průběhu experimentu dojde v expresi genů TNF- α , IL1- β , COX-2, MUC2. Prokázalo se, že v průběhu zánětlivého procesu dochází k vzestupu exprese těchto genů. Lokální podávání budesonidu vedlo k signifikantnímu poklesu exprese TNF- α mRNA, IL1- β mRNA, COX-2 mRNA, což bylo plně v souladu s předpoklady a dříve opublikovanou prací²³. V rozporu s našimi předpoklady však byl efekt podávání CBX. Předpokládali jsme, že vzhledem ke skutečnosti, že podávání CBX ovlivňuje lokální

koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů, mělo by dojít ke změnám v expresi podobně jako při podávání budesonidu. Ve skutečnosti však žádné signifikantní změny v expresi TNF- α mRNA, IL1- β mRNA, COX-2 mRNA zaznamenány nebyly. Pro tento rozpor nemáme zcela jasné vysvětlení. S největší pravděpodobností se lokální metabolismus glukokortikoidů v průběhu experimentální kolitidy nepodílí významným způsobem na expresi těchto prozánětlivých cytokinů. Tato skutečnost napovídají i výsledky lokální aplikace RU-486, které ukazují, že systémová hladina kortikosteronu hraje pravděpodobně důležitější roli v regulaci exprese některých cytokinů než lokální hladiny kortikosteronu. Této teorii nasvědčuje i výsledek měření aktivity enzymu myeloperoxidasy. Zatímco při lokálním podávání budesonidu došlo k signifikantnímu poklesu aktivity, podávání CBX nemělo na aktivitu MPO žádný vliv. Pokud uvážíme skutečnost, že glukokortikoidy snižují aktivitu MPO²³ a snižují přísun granulocytů do tlustého střeva postiženého TNBS kolitidou²⁴, je zřejmé že lokální metabolismus glukokortikoidů a s ním spojené lokální změny v koncentraci kortikosteronu nemají schopnost modulovat migraci a aktivaci granulocytů.

V rozporu s předpoklady byly také výsledky měření exprese genu MUC-2. Jelikož je známo, že exprese tohoto genu se mění v závislosti na aktivitě zánětlivého střevního onemocnění a že in vitro podávání glukokortikoidů či prozánětlivých cytokinů vede ke změnám v expresi tohoto genu, předpokládali jsme změny v jeho expresi v souvislosti se změnami v lokální koncentraci glukokortikoidů. Překvapivě však, ani podávání CBX, ani podávání budesonidu nevedlo k poklesu exprese MUC-2 mRNA.

Je tedy možné konstatovat, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k vzestupu exprese 11HSD1 a tento vzestup je závislý na tíži zánětlivého procesu. Změny v expresi obou izoforem 11HSD mají za následek sníženou schopnost zánětlivé tkáně oxidovat biologicky aktivní glukokortikoidy na jejich neaktivní 11-oxo deriváty. Vzhledem k tomu, že exprese 11HSD1 byla prokázána ve střevní lamina propria i spádových lymfatických tkáních²⁵ a že v průběhu TNBS kolitidy dochází k masivní infiltraci střevní stěny imunitními buňkami které také exprimují 11HSD1¹⁶, lze předpokládat, že vzestup reduktázové aktivity 11HSD a vzestup hladin exprese 11HSD1 mRNA může být následkem kombinace infiltrace zánětlivě postižené střevní tkáně těmito buňkami a také stimulace 11HSD1 prozánětlivými cytokiny. Naše výsledky jsou ve shodě s dřívějšími pracemi které ukázaly, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k vzestupu exprese prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β ²⁶ a že tyto cytokiny in vitro stimulují expresi 11HSD1^{12,13,27}. Je tedy zřejmé, že prozánětlivé cytokiny se účastní regulace glukokortikoidního účinku v zánětlivě postižené střevní tkáni. Účinek CBX a jeho inhibice přidáním RU-486 ukazuje na autoregulační mechanismus hladin kortikosteronu na expresi 11HSD1. Na druhou stranu, z výsledků naší práce je zřejmé, že periferní metabolismus glukokortikoidů se nepodílí na regulaci glukokortikoidního signálu v průběhu plně rozvinutého zánětlivého procesu. Toto zjištění je v rozporu s dříve publikovanými in vitro experimenty^{22,27}.

5.2. 11HSD a ulcerosní kolitida

Glukokortikoidy jsou dlouhou dobu užívány v terapii idiopatických střevních zánětů pro svůj protizánětlivý účinek. Jak již bylo zmíněno, tento protizánětlivý účinek je dán interferencí komplexu glukokortikoid/glukokortikoidní receptor s produkcí prozánětlivých cytokinů a se systémem transkripčního faktoru NF- κ B. Úloha periferního metabolismu glukokortikoidů v regulaci střevního zánětlivého procesu byla zkoumána doposud pouze in vitro a na zvířecích experimentálních modelech, nikoliv však ve vzorcích tkáně od pacientů s nespecifickým střevním zánětem. Je všeobecně známo, že

v průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů²⁸ a také enzymu fosfolipasy A2²⁹. Naše měření ukázala, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází k významnému zvýšení exprese 11HSD1 mRNA a poklesu 11HSD2 mRNA. Vzhledem k předpokladu, že in vivo se 11HSD1 chová převážně jako reduktáza, lze předpokládat, že ve střevní tkáni v průběhu ulcerosní kolitidy dochází k vzestupu lokální koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů. V souladu s předpoklady bylo zjištěno, že v průběhu ulcerosní kolitidy stoupá exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF- α střevní tkáni. Na základě naší práce není možné jednoznačně stanovit, které faktory se podílejí na změnách exprese 11HSD mRNA. Jistě je nutno vzít v úvahu stimulační účinek prozánětlivých cytokinů, vliv infiltrovaných buněk imunitního systému které mají schopnost exprese 11HSD a zvýšené hladiny aktivních glukokortikoidů. Bylo prokázáno, že v průběhu idiopatických střevních zánětů dochází ke zvýšení aktivity osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny³⁰. Tato zvýšená aktivita se jistě může podílet na stimulaci 11HSD1. Zde se však nabízí otázka, jakým mechanismem dochází ke snížení exprese 11HSD2 mRNA, když bylo in vitro prokázáno, že glukokortikoidy expresi 11HSD2 zvyšují. Vysvětlení může pravděpodobně spočívat ve skutečnosti, že 11HSD2 je ve střevní tkáni exprimována pouze v epiteliálních buňkách²⁵. V průběhu ulcerosní kolitidy dochází k poškození funkcí střevního epitelu a je také snížena jeho imunoreaktivita³¹. V souhrnu lze konstatovat, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Nakolik se na regulaci glukokortikoidního signálu v průběhu ulcerosní kolitidy podílí systémová hladina biologicky aktivních glukokortikoidů a na kolik jejich periferní metabolismus nejsme schopni v tuto chvíli říci.

5.3. 11HSD a DSS kolitida

Podávání dextranulfátu vedlo k rozvoji kolitidy, při které byly histologicky pozorovány změny, které se charakteristicky nacházejí v chronickém stadiu ulcerosní kolitidy. Obdobně jako v případě vzorků získaných od pacientů s ulcerosní kolitidou, byl ve střevní tkáni s DSS kolitidou pozorován vzestup exprese 11HSD1 mRNA a pokles 11HSD2 mRNA. Rozdíly byly velmi podobné jako v případě ulcerosní kolitidy. Měřením aktivity 11HSD bylo zjištěno, že v průběhu DSS kolitidy dochází k vzestupu reduktázové aktivity a poklesu oxidázové aktivity. Nalezené změny v aktivitě tedy plně korelují se změnami v expresi. Tato skutečnost potvrzuje naši hypotézu, že v průběhu zánětlivého střevního procesu dochází k vzestupu nejenom exprese 11HSD mRNA, ale také vlastní aktivity enzymu. Je tedy možné konstatovat, že v průběhu DSS kolitidy dochází ke stejným změnám v expresi 11HSD jako v případě ulcerosní kolitidy a tento model je pravděpodobně vhodný ke studiu periferního metabolismu glukokortikoidů. Nakolik jsou změny v expresi a aktivitě 11HSD podmíněny zánětlivými cytokiny a lokální produkcí biologicky aktivních glukokortikoidů a nakolik jsou důsledkem systémových hladin, není možné přesně stanovit.

DSS kolitida je spojena se zvýšenou expresí střevní 11 β HSD1 a sníženou expresí střevní 11 β HSD2, což pravděpodobně podporuje protizánětlivý účinek glukokortikoidů.

5.4. 11HSD a adjuvantní artritida

Bylo prokázáno, že podávání glukokortikoidů v průběhu revmatoidní i zánětlivé artritidy vede k významnému snížení rychlosti destrukce destrukce a přestavby postižených kloubů a zpomaluje progresi onemocnění³². Vzhledem k tomu, že enzym 11HSD je klíčovým prvkem regulujícím tkáňovou koncentraci biologicky aktivních

glukokortikoidů, byl tento enzym zkoumán i v kostní a kloubní tkáni. Studie na tuto problematiku prokázaly přítomnost obou izoform 11HSD v lidských osteoblastech a synoviálních buňkách^{33,34}. Expres a aktivita 11HSD2 byla v citovaných pracích velmi nízká prakticky až na hranici detekovatelnosti a jejich původ pocházel nejspíše z kloubních makrofágů. Při našich měřeních na modelu adjuvantní artritidy jsme však prokázali expresi pouze izoformy 11HSD1 a izoformu 11HSD2 se nám nepodařilo v synoviocytech prokázat. Příčina této skutečnosti není úplně zřejmá. V první řadě se nabízí vysvětlení mezidruhovou živočišnou variabilitou. Zatímco výše uvedené práce prokázaly expresi 11HSD2 v lidských buňkách, naše měření byla provedena na potkanech kmene Lewis. Měření hladin mRNA 11HSD1 ukázalo více signifikantní vzestup ve skupině s adjuvantní artritidou ve srovnání se skupinou kontrolní. Vzestup exprese mRNA 11HSD1 koreloval se zjištěným nárůstem reduktázové aktivity enzymu. Toto navýšení je plně v souladu s předchozími experimenty, i s publikacemi jiných autorů^{35,36}.

Všeobecně se předpokládá, že průběh artritického procesu je řízen celou řadou prozánětlivých a protizánětlivých faktorů. Převaha prozánětlivých faktorů vede k proliferaci synoviocytů, tvorbě zánětlivé granulomatózní tkáně z kloubní synovie a aktivací osteoklastů, což má za následek patologickou přestavbu kostní a kloubní tkáně. Za nejvýznamnější prozánětlivé faktory v průběhu artritického procesu jsou považovány TNF- α , IL-1 β ³⁷, jejichž exprese v průběhu zánětlivého procesu stoupá. V souladu s touto skutečností jsou i naše měření, kdy ve skupině s artritidou došlo k významnému vzestupu hladin mRNA jak TNF- α , IL-1 β v synoviální tkáni ve srovnání s kontrolní skupinou. In vitro bylo opakovaně prokázáno, že prozánětlivé cytokiny jsou mocným induktorem 11HSD1 v různých tkáních, včetně synoviocytů^{12,13,27}. Zároveň bylo prokázáno, že inhibice TNF- α nebo IL-1 β významným způsobem snižuje míru zánětlivé reakce jak u revmatoidní artritidy^{38,39}, tak u celé řady experimentálních modelů artritidy^{40,41}. Zajímalo nás, zda vzestup TNF- α nebo IL-1 β zvyšuje expresi 11HSD in vivo, a zda jejich množství koreluje s expresí 11HSD1. K získání odpovědi jsme experimentálním zvířatům s adjuvantní artritidou podávali antagonistu IL-1 β anakinru, nebo TNF- α etanercept. V minulosti bylo prokázáno, že obě látky u potkanů s indukovanou juvenilní artritidou snižují patologickou angiogenezi, otoky a ovlivňují tepelnou mechanickou hyperalgezií^{42,43}. Naše měření ukázala, že obě látky nejenže zlepšují klinický obraz a otok postižených kloubů, ale také snižují expresi 11HSD1. Dalo by se předpokládat, že terapie pomocí blokátorů prozánětlivých cytokinů ovlivňuje periferní metabolismus glukokortikoidů nejen na úrovni buněk synoviální membrány, ale také ovlivněním migrace buněk imunitního systému do oblasti zánětlivě postiženého kloubu. Je všeobecně známo, že přenos glukokortikoidního signálu je zprostředkován pomocí glukokortikoidních receptorů. Naše měření ukázala, že v průběhu adjuvantní artritidy dochází k významnému snížení exprese genu pro glukokortikoidní receptor. Toto zjištění je v souladu s nálezem v celé řadě tkání v průběhu zánětlivého procesu⁴⁴. Na základě výše uvedených skutečností, jsme se snažili najít odpověď na otázku, zda změny v aktivitě a expresi 11HSD nějakým způsobem modulují průběh zánětlivého procesu v průběhu adjuvantní artritidy. V minulosti bylo prokázáno, že podávání neselektivního inhibitoru CBX má za následek pokles aktivity i exprese 11HSD1, že biologicky aktivní glukokortikoidy snižují expresi mRNA genů pro TNF- α a COX-2⁴⁵ a že prozánětlivé cytokiny zvyšují expresi mRNA OPN⁴⁶. Snažili jsme se tedy najít odpověď na otázku, zda v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke změnám v expresi prozánětlivých cytokinů a markerů kloubního zánětu u zvířat kterým byl podáván CBX ve srovnání s artritickou skupinou bez aplikace CBX. Naše měření ukázala, že podávání CBX signifikantně zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a

OPN mRNA. Vzhledem k této skutečnosti a také faktu, že podávání CBX vedlo ke zhoršení makroskopických projevů zánětu je pravděpodobné, že za tyto změny jsou odpovědné změny v aktivitě 11HSD1 na úrovni synoviálních kloubů a že se tedy nejedná o změnu glukokortikoidní aktivity na úrovni celého organismu. Vzhledem ke skutečnosti, že CBX je nespecifickým inhibítoem se nabízí otázka, zda za výše popsané změny není odpovědný jiný mechanismus než lokální aktivita 11HSD.

V našem experimentu bylo zjištěno, že podávání CBX žádným způsobem nemění expresi ani TNF- α , ani COX-2, ani mRNA S100A4 v lymfatických uzlinách, ačkoliv byla přítomna aktivita 11HSD1. Tento nálezu je odlišný od nálezu v synoviální tkáni. Nález zvýšené aktivity 11HSD1 a absence jakéhokoliv efektu podávání karbenoxolonu a mifepristonu zřejmě svědčí o rezistenci buněk lymfatických uzlin ke glukokortikoidům, nebo o farmakodynamických rozdílech mezi synoviální tkání a tkání lymfatických uzlin.

Na rozdíl od TNF- α mRNA a COX-2 mRNA exprese OPN mRNA byla signifikantně zvýšena v lymfatických uzlinách artritických potkanů léčených CBX. Vysvětlení tohoto rozdílného chování OPN mRNA v porovnání s TNF- α mRNA a COX-2 mRNA není zcela zřejmé, nabízí se však vysvětlení v odlišné regulaci genů pro jednotlivé proteiny. Zdá se tedy, že ačkoliv v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a aktivitě jak synoviocytech, tak ve spádových lymfatických uzlinách, zřejmě pouze v synoviální tkáni je enzym dostatečně aktivní k tomu aby reguloval zánětlivý proces.

6. ZÁVĚRY

Odpověď na otázku 1: V průběhu experimentální TNBS kolitidy dochází ke změnám periferním metabolismu glukokortikoidů ve smyslu vzestupu reduktázové aktivity 11HSD a poklesu aktivity oxidázové. Zároveň dochází k vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Podávání neselektivního inhibitoru karbenoxolonu vedlo k poklesu oxidázové aktivity téměř o 50% a nemělo žádný vliv na expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL1- β , ani na míru infiltrace střevní tkáně buňkami imunitního systému. Předpoklad, že se periferní metabolismus glukokortikoidů podílí na regulaci glukokortikoidního protizánětlivého účinku se však nepotvrdil a tento nálezu je v rozporu s dříve provedenými in vitro studii.

Odpověď na otázku 2: V průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Ulcerosní kolitida je také spojena se vzestupem exprese TNF- α a IL1- β v zánětlivě postižené střevní tkáni. Za tento vzestup je pravděpodobně spoluodpovědný stimulační účinek prozánětlivých cytokinů, vliv infiltrovaných buněk imunitního systému a zvýšená systémová hladina kortizolu na podkladě hyperaktivace HPA osy.

Odpověď na otázku 3: V průběhu DSS kolitidy dochází ve střevní tkáni k vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a poklesu 11HSD2 mRNA. V souladu s tím, dochází k vzestupu reduktázové aktivity 11HSD a poklesu aktivity oxidázové. Nalezené změny tedy plně koreluje s nálezu u vzorků ulcerosní kolitidy.

Odpověď na otázku 4: V průběhu adjuvantní artritidy dochází k signifikantnímu vzestupu hladin mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou a tento vzestup exprese koreluje s nárůstem reduktázové aktivity enzymu. Tyto změny jsou pozorovány jak v synoviální tkáni, tak ve spádových lymfatických uzlinách. Podávání inhibitoru

karbenoxolonu významně zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a OPN mRNA, avšak neovlivňuje plazmatické hladiny kortikosteronu. Zdá se tedy, že ačkoliv v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a aktivitě jak synoviocytech, tak ve spádových lymfatických uzlinách, zřejmě pouze v synoviální tkáni je enzym je dostatečně aktivní k tomu aby reguloval zánětlivý proces a nemá pravděpodobně vliv na úrovni organismu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet* 2003;362:1828-38.
2. Kapcala LP, Chautard T, Eskay RL. The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:419-37.
3. Morris G, Beck P, Herridge M, Depew W, Szewczuk M, Wallace J. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
4. Lyscom N, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 1982;45:775-83.
5. Pacha J, Miksik I. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *J Endocrinol* 1996;148:561-6.
6. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-9.
7. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625-9.
8. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
9. Mazancova K, Kopecky M, Miksik I, Pacha J. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the heart of normotensive and hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:273-7.
10. Calvino B, Maillet S, Pradelles P, Besson JM, Couraud JY. Variation of substance P-like immunoreactivity in plasma and cerebrospinal fluid in the course of arthritis induced by Freund adjuvant in rats, a model for the study of chronic pain. *C R Acad Sci III* 1991;312:427-32.
11. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-60.
12. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* 1997;186:189-98.

13. Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, et al. Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology* 2001;142:1982-9.
14. Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ, Frey BM. TNF-alpha enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Lett* 2001;507:351-6.
15. Bryndova J, Zbankova S, Kment M, Pacha J. Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:549-53.
16. Zhang TY, Ding X, Daynes RA. The Expression of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I by Lymphocytes Provides a Novel Means for Intracrine Regulation of Glucocorticoid Activities. *J Immunol* 2005;174:879-89.
17. Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, et al. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol* 2001;167:30-5.
18. Pacha J, Miksik I, Lisa V, Pohlova I. Hormonal regulation of intestinal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Life Sci* 1997;61:2391-6.
19. Hardy DB, Pereria LE, Yang K. Prostaglandins and leukotriene B4 are potent inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biol Reprod* 1999;61:40-5.
20. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 2004;25:831-66.
21. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:189-222.
22. Goppelt-Struebe M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1389-95.
23. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, et al. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1122-8.
24. Palmén MJ, Dieleman LA, Soesatyó M, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Effects of local budesonide treatment on the cell-mediated immune response in acute and relapsing colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1998;43:2518-25.
25. Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM. Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon. *Endocrinology* 1994;135:2533-41.
26. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, et al. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G187-95.
27. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in

- osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16:1037-44.
28. McCabe RP, Secrist H, Botney M, Egan M, Peters MG. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;66:52-8.
 29. Minami T, Tojo H, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Okamoto M. Increased group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1994;35:1593-8.
 30. Anton PA, Shanahan F. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"? *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:723-34.
 31. Takahashi KI, Fukushima K, Sasano H, et al. Type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1999;44:2516-22.
 32. Makrygiannakis D, af Klint E, Catrina SB, et al. Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1463-72.
 33. Cooper MS, Walker EA, Bland R, Fraser WD, Hewison M, Stewart PM. Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone* 2000;27:375-81.
 34. Hardy R, Rabbitt EH, Filer A, et al. Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1204-10.
 35. Zbankova S, Bryndova J, Leden P, Kment M, Svec A, Pacha J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1019-23.
 36. Vagnerova K, Kverka M, Klusonova P, et al. Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut. *J Endocrinol* 2006;191:497-503.
 37. Brennan FM, Field M, Chu CQ, Feldmann M, Maini RN. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1991;30 Suppl 1:76-80.
 38. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552-63.
 39. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998;41:2196-204.
 40. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9784-8.
 41. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 1996;39:797-809.

42. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004;50:277-90.
43. Boettger MK, Hensellek S, Richter F, et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008;58:2368-78.
44. Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, et al. Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea pig lungs using methylprednisolone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L998-L1006.
45. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. In: *Annu Rev Immunol*; 2002:125-63.
46. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:333-45.

1. publikace které jsou podkladem disertace:

a) s IF

Žbáňková S, Bryndová J, Leden P, Kment M, Švec A, Pácha J.
11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis.

Journal of Gastroenterology and Hepatology 2007;22(7):1019-23
(IF 2,41)

Ergang P, Leden P, Bryndová J, Zbáňková S, Mikšík I, Kment M, Pácha J.
Glucocorticoid Availability in Colonic Inflammation of Rat.

Digestive Diseases and Sciences 2010;53(8):2160-7
(IF 2,06)

Ergang P, Leden P, Vagnerová K, Klusonová P, Mikšík I, Jurcovicová J, Kment M, Pácha J.

Local metabolism of glucocorticoids and its role in rat adjuvant arthritis.

Molecular and Cellular Endocrinology 2010;323(2):155-60
(IF 4,11)

b) bez IF

Leden P

Periferní metabolismus glukokortikoidů: klinické aspekty.

Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie 2007;61(3):139-149

2. publikace bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

Balik M, Rulisek J, Leden P., Zakharchenko M, Otahal M, Bartakova H, Korinek
Concomitant use of beta-1 adrenoreceptor blocker and norepinephrine in patients with septic shock.

Wiener klinische Wochenschrift, In press
(IF 0,74)

Balik M, Zakharchenko M, Leden P, Otahal M, Hruby J, Rusinova K, Polak F, Stach Z, Vavrova J, Jabor A

Bioenergetic gain of citrate anticoagulated continuous hemodiafiltration a comparison between two citrate modalities and unfractionated heparin.

Journal of Critical Care, In press
(IF 2,07)

b) bez IF

Závada J, Valenta J, Kopecký O, Stach Z, Leden P.

Black mamba dendroaspis polylepis bite: a case report.

Prague Med Rep. 2011;112(4):298-304