

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Vliv bilirubinu na progresi nespecifických střevních zánětů

Bilirubin influence on the progression of inflammatory bowel disease

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2014

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Anna Patková

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

„Děkuji panu doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, za čas, který mi věnoval, a cenné rady, které mi poskytl. Dále bych ráda poděkovala i ostatním zaměstnancům Katedry biologických a lékařských věd, kteří byli ochotni poradit a pomoci, ačkoliv měli své vlastní práce nad hlavu. Můj velký dík patří také všem, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali, především potom mým rodičům, kteří pro mě dokázali vytvořit takové zázemí, že jsem se na své studium mohla plně soustředit.“

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vliv bilirubinu na progresi nespecifických střevních zánětů

Diplomová práce

Anna Patková

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Cíl práce: Nespecifické střevní záněty, mezi které řadíme především Crohnovu nemoc a ulcerózní kolitidu, jsou chronické záněty střev, na jejichž patogenezi se pravděpodobně podílí genetická predispozice a faktory vnějšího prostředí. Předpokládá se, že tkáňové poškození je do jisté míry způsobeno také oxidačním stresem. Jak hemoxygenáza-I, tak bilirubin jsou silnými antioxidanty a poskytují protizánětlivý účinek. Cílem této diplomové práce bylo popsat změny exprese HO-I v tlustém střevě normobilirubinemických a hyperbilirubinemických potkanů po indukci akutní či chronické experimentální kolitidy.

Metody: Pro tuto práci byli použiti potkani kmene Gunn s vrozeným defektem UDP-glukuronyltransferázy, který je příčinou vzniku hyperbilirubinemie. Kontrolní skupinu tvořili heterozygotní sourozenci těchto potkanů, u nichž jsou hladiny sérového bilirubinu v normě. Všem zvířatům byl podáván dextran sulfát sodný za účelem vyvolání experimentální kolitidy. Potkani byli rozděleni do dvou skupin, z nichž každá obsahovala hyperbilirubinemické i normobilirubinemické jedince. U jedné skupiny zvířat byl vyvolán akutní zánět, u druhé skupiny byl indukován zánět chronický (DSS byl zvířatům podáván v cyklech). Exprese HO-I byla detekována pomocí imunohistochemických metod.

Výsledky: Imunohistochemická analýza prokázala detekci HO-I v tlustém střevě potkanů. Exprese HO-I byla detekována především v *tunica mucosa* u všech testovaných skupin zvířat. Výrazná exprese byla patrná zejména v epitelu, a to hlavně na povrchu lumenální strany střeva.

Závěr: Podávání dextran sulfátu sodného nevedlo u studovaných zvířat ke změnám exprese HO-1. Tyto změny nebyly pozorovány ani při srovnávání akutního a chronického modelu kolitidy. Různé hladiny sérového bilirubinu rovněž neměly na expresi HO-1 vliv.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Bilirubin influence on the progression of inflammatory bowel disease

Diploma thesis

Anna Patková

Supervisor: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Background: Inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic inflammatory disorders of the gut caused by an interaction of genetic and environmental factors. It is thought that tissue damage is also partly caused by an oxidative stress. Heme oxygenase-1 and bilirubin are strong antioxidants and both of them provide an anti-inflammatory effect in various tissues. The aim of this diploma thesis was to detect changes of expression of HO-I in the large intestine of normobilirubinemic and hyperbilirubinemic rats after the induction of acute or chronic experimental colitis.

Methods: We used Gunn rats with hereditary defect of UDP-glucuronyltransferase, which causes hyperbilirubinemia. The control group of animals was made up of heterozygous littermates of the Gunn rats, which have normal serum bilirubin levels. All animals were treated by dextran sulfate sodium in order to induce an experimental colitis. Rats were divided into two groups. Each of them contained hyperbilirubinemic and normobilirubinemic animals. The acute colitis was induced in the first group and the chronic colitis was induced in the second one (DSS was administered in cycles). The expression of HO-I was detected by immunohistochemical methods.

Results: Immunohistochemical analysis showed expression of HO-I in the large intestine of rats. Expression of HO-I was detected mainly in *tunica mucosa* in all studied groups of animals. The strong expression was found mostly in epithelial cells, especially on the surface of luminal side of the intestine.

Conclusion: Administration of DSS did not result in any changes in expression of HO-I in studied animal groups. These changes were not observed even in comparison of acute and chronic model of colitis. Different levels of serum bilirubin did not affect the expression of HO-I as well.

.

Seznam použitých zkratek

ABC	avidin-biotin complex – avidin-biotinový komplex
AIEC	adherentně invazivní Escherichia coli
BR	bilirubin
CD	Crohn's disease – Crohnova nemoc
DSS	dextran sulfát sodný
GF animals	germ free animals – bezmikrobní zvířata
HLA	human leukocyte antigens – lidské leukocytární antigeny
HO	hemoxygenáza
IBD	inflammatory bowel disease – idiopatické střevní záněty
ICAM-I	intercellular adhesion molecule-I – intercelulární adhezivní molekula-I
IgA	imunoglobulin třídy A
IL-2	interleukin-2
INF- γ	interferon- γ
Nrf2	nukleární faktor 2
PBS	phosphate buffered saline – fosfátový pufr
SPF animals	specific pathogen free animals – zvířata prostá specifického patogenu
Th lymfocyt	T helper lymfocyt – pomocný T lymfocyt
TNBS	trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF- α	tumor necrosis factor α – faktor nádorové nekrózy α
UC	ulcerative colitis – ulcerózní kolitida
VCAM-I	vascular cell adhesion molecule-I – vaskulární buněčná adhezivní molekula-I

Obsah

1 ÚVOD.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Anatomie a histologie tlustého střeva.....	12
2.2 Idiopatické střevní záněty	15
2.2.1 Etiologie a patogeneze	17
2.2.2 Klinický obraz.....	20
2.2.2.1 Crohnova nemoc	20
2.2.2.2 Ulcerózní kolitida	21
2.2.3 Komplikace	22
2.2.4 Průběh	23
2.2.5 Léčba.....	25
2.2.6 Patologická anatomie a histologie	27
2.2.6.1 Makroskopický nález.....	27
2.2.6.2 Mikroskopický nález.....	28
2.3 Experimentální modely kolitidy	30
2.3.1 Kolitida indukovaná dextran sulfátem sodným	30
2.3.1.1 Histologie kolitidy indukované dextran sulfátem sodným	32
2.3.2 Další modely indukované kolitidy	34
2.3.2.1 Oxazolonom indukovaná kolitida	34
2.3.2.2 Kolitida indukovaná trinitrobenzensulfonovou kyselinou.....	34
2.3.2.3 Kolitida indukovaná kyselinou octovou	34
2.3.2.4 Kolitida indukovaná indometacinem	35
2.3.2.5 Kolitida vyvolaná bakteriální infekcí	35
2.4 Bilirubin	36
2.4.1 Úvod.....	36
2.4.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	36
2.4.3 Metabolismus.....	38
2.4.4 Familiární hyperbilirubinemie	40
2.4.4.1 Gilbertův syndrom	41
2.4.5 Protektivní účinky bilirubinu	42
2.4.6 Protektivní účinky hemoxygenázy-I.....	43

2.4.6.1 Hemoxygenáza-I a zánět.....	45
2.4.6.2 Předpokládané mechanismy protizánětlivého působení HO-I.....	46
3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE.....	47
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu	48
4.1.1 Potkani kmene Gunn.....	49
4.2 Imunohistochemie.....	50
4.2.1 Avidin-biotin-peroxidázová metoda	50
4.2.2 Detekce hemoxygenázy	51
4.2.2.1 Detekční systémy	51
4.2.2.2 Použité protilátky	52
4.2.2.3 Pracovní postup.....	52
5 VÝSLEDKY	54
5.1 Histologická analýza.....	54
5.2 Imunohistochemická analýza exprese HO-I.....	59
6 DISKUSE.....	64
7 ZÁVĚR.....	67
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

1 ÚVOD

Mezi nespecifické střevní záněty řadíme Crohnovu nemoc a ulcerózní kolitidu. Ačkoliv mají obě onemocnění mnoho společného a někdy je dokonce obtížné je od sebe jednoznačně odlišit, hlavní rozdíl mezi nimi spočívá především v místě a hloubce postižení trávicí trubice. Incidence idiopatických střevních zánětů neustále stoupá a věk, ve kterém obě nemoci propukají, se naopak rok od roku snižuje. Nemocných tedy stále přibývá a nikdo vlastně nedokáže říci proč. Přestože současná vyspělá věda přináší mnoho způsobů, jakými lze symptomy těchto onemocnění mírnit a dostat je do tzv. klidové fáze, jedná se prozatím o nemoci nevyléčitelné. Důvodem je pravděpodobně fakt, že doposud neznáme jejich přesné příčiny vzniku. Na manifestaci obou nemocí má patrně vliv genetická predispozice podpořená určitými spouštěcími faktory (nedostatek spánku, stres, nezdravé stravování, alkohol). Jasný a všeobecně uznávaný mechanismus vzniku nespecifických střevních zánětů však prozatím neexistuje. Z tohoto důvodu se jedná o poměrně atraktivní téma, které je v současnosti předmětem nejedné studie.

Jednou z mnoha prací zabývajících se idiopatickými střevními záněty je i studie prof. MUDr. Libora Vítka, Ph.D., na níž se podílela Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Petra Nachtigala, Ph.D. Pan profesor Vítek se ve svých výzkumných projektech zaměřuje především na bilirubin a jeho protektivní účinky na lidský organismus. Cílem této studie bylo zjistit, zda jsou lidé s Gilbertovým syndromem (tj. s mírně zvýšenými hladinami sérového bilirubinu) lépe chráněni před idiopatickými střevními záněty. Vědecká skupina Katedry biologických a lékařských věd měla za úkol odhalit mechanismus, kterým k protekci dochází. V této diplomové práci jsme se zaměřili na jeden z mnoha sledovaných markerů, které by ochranný mechanismus mohly pomoci objasnit. Zvolili jsme hemoxygenázu I, jelikož se jedná o enzym, jenž je pro tvorbu bilirubinu nezbytný, a sledovali jsme změny její exprese v tlustém střevě normobilirubinemických a hyperbilirubinemických potkanů po indukci akutního a chronického zánětu. Pro experiment jsme použili potkany kmene Gunn s vrozeným defektem UDP-glukuronyltransferázy. Za účelem vyvolání střevního zánětu byl zvířatům podáván dextran sulfát sodný. K vyhodnocení celého experimentu jsme zvolili imunohistochemické metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anatomie a histologie tlustého střeva

Hlavní funkcí tlustého střeva je přebírání zbytků potravy ze střeva tenkého a jejich následná přeměna na stolici. Tento děj probíhá pomocí absorpce vody a práce střevní mikroflóry [1]. Tvorba stolice je mimo jiné spojena s produkcí hlenu, který zvlhčuje sliznici a tvoří jakýsi obal pro bakterie a jiné pevné částice. Ty jsou díky němu ze střeva lépe odstraněny [2, 3]. Hlen dále chrání sliznici střeva před vlivem hnilobných a kvasných produktů, které se zde tvoří působením střevních mikroorganismů, a zabraňuje tak jejich vstřebávání do krevního oběhu [4].

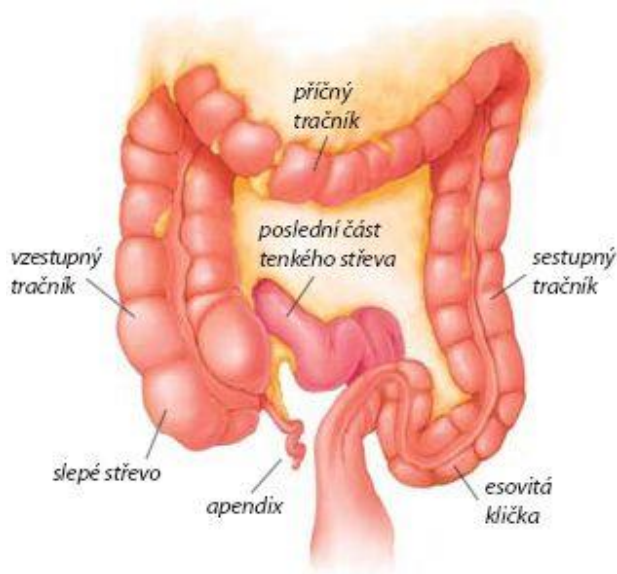
Tlusté střevo (*intestinum crassum*) tvoří poslední část trávicího systému. Jeho délka činí asi 1,5 m, šířka se pohybuje okolo 6-8 cm a objem odpovídá zhruba 2000 cm³. Uvedené údaje samozřejmě závisí na aktuální náplni střeva.

Na tlustém střevě rozeznáváme několik částí. Jedná se o slepé střevo neboli *caecum*, jehož součástí je červovitý výběžek – *appendix vermiformis*. Po něm následuje tračník neboli *colon*, který se dále dělí na vzestupný (*ascendens*), příčný (*transversum*) a sestupný (*descendens*). Na sestupný tračník navazuje esovitá klička (*colon sigmoideum*). Posledním úsekem tlustého střeva je konečník neboli *rectum* (viz obr. č. 1) [1].

Obrázek č. 1: Anatomická stavba tlustého střeva [2014-02-24].

<<http://strevni-nepruchodnost.webnode.cz/anatomie-a-fyziologie/>>.

Nejširší částí tlustého střeva je střevo slepé, které je umístěno v pravé jámě kyčelní. Z jeho dolního konce vybíhá červovitý výběžek a směrem nahoru vyústí v vzestupný tračník. Ten se táhne podél pravé strany břišní dutiny. Příčný tračník jde směrem zprava doleva pod játry a žaludkem. Levou stranu dutiny břišní lemuje tračník sestupný. Na něj navazuje esovitá klička, která končí ve středu malé pánve a na kterou je dále napojen konečník. Ten vyúsťuje ven z těla řitním otvorem [5].



Stěnu tlustého střeva stejně tak jako celého trávicího traktu tvoří čtyři základní vrstvy. Jedná se o sliznici (*tunica mucosa*), podslizniční vazivo (*tunica submucosa*), zevní svalovou vrstvu (*tunica muscularis externa*) a serózu (*tunica serosa*) (viz obr. č. 2) [6].

Povrch sliznice tlustého střeva je tvořen jednovrstevným cylindrickým epitelem [3]. Enterocyty, které tento epitel tvoří, obsahují krátké mikrovilky, jež jsou zodpovědné za absorpční funkci střeva [2]. Přitom zde úplně postrádáme klky, které jsou typické pro střevo tenké. Díky této skutečnosti je sliznice tlustého střeva hladká [3]. Kromě již zmiňovaného epitelu se sliznice skládá také z *lamina propria mucosae* a *lamina muscularis mucosae*. *Lamina propria mucosae* je tvořena vazivovou tkání, ve které jsou obsaženy krevní a lymfatické cévy a svalové buňky [6, 7]. Mimoto v ní nacházíme tzv. Lieberkühnovy krypty. Jedná se o dlouhé hluboké útvary, které jsou

taktéž vystlané jednovrstevným cylindrickým epitelem [3]. Tyto krypty obsahují velký počet pohárkových buněk¹, absorpčních elementů a malý počet enteroendokrinních elementů [2]. V *lamina propria mucosae* se dále vyskytuje lymfatická tkáň, která sahá až do submukózy [2, 3]. *Lamina muscularis mucosae* odděluje sliznici od submukózy a skládá se z hladkých svalových buněk [6]. Tyto buňky jsou orientovány do dvou rozdílných vrstev – vnitřní a vnější. Ve vnitřní vrstvě, která se nachází blíže lumen, jsou hladké svalové buňky uspořádány cirkulárně, ve vnější vrstvě je orientace jednotlivých buněk podélná (longitudinální). Díky jejich přítomnosti se sliznice může samostatně pohybovat, čímž je dosaženo jejího lepšího kontaktu s potravou [7].

Podslizniční vazivo je stejně tak jako *lamina propria mucosae* tvořeno vazivem s krevními a lymfatickými cévami. Kromě cév zde najdeme také nervový plexus (*plexus submucosus Meissneri*), který se skládá z vegetativních a sensitivních nervových vláken.

Jak již sám název napovídá, je zevní svalová vrstva tvořena hladkými svalovými buňkami. Tyto buňky jsou podobně jako v *lamina muscularis mucosae* rozděleny do dvou vrstev – vnitřní cirkulární a vnější longitudinální [6, 7]. V tlustém střevě je (na rozdíl od tenkého střeva) svalovina ve vnější podélné vrstvě spojována ve tři silné pásy, které nazýváme *taeniae coli* [2]. Mezi dvěma svalovými vrstvami lze opět nalézt krevní a lymfatické cévy a další nervový plexus (*plexus myentericus Auerbrachi*), který je zodpovědný za kontrakce této vnější svalové vrstvy.

Rovněž seróza je tvořena vazivovou tkání, ve které nacházíme velké množství krevních a lymfatických cév. Mimo ně je zde také přítomna tuková tkáň [6, 7]. Ta uvnitř peritonea vytváří drobné výběžky, nazývané *appendices epiploicae* [2]. Celá seróza je pokrytá jednovrstevným plochým epitelem – mezotelem [6, 7].

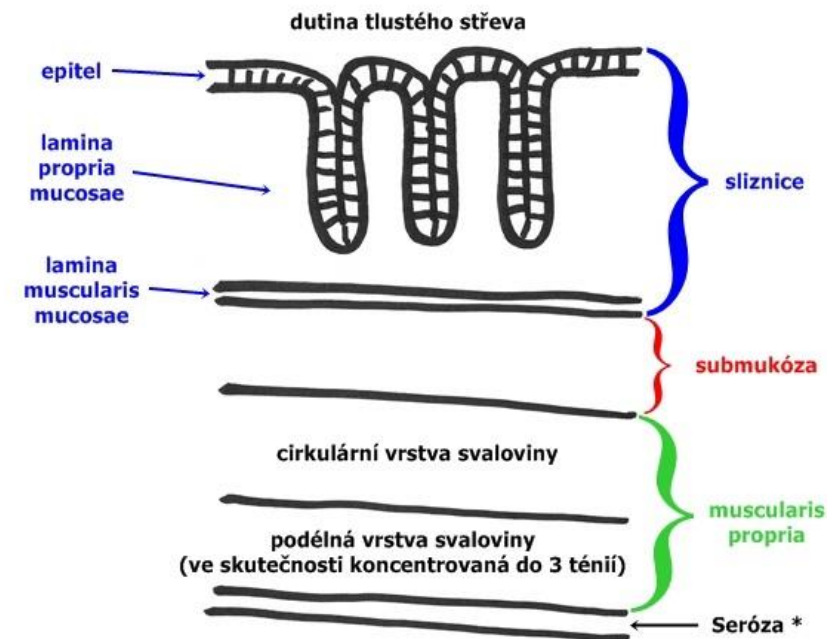
Svou histologií se poněkud liší *appendix* a *rectum*. *Appendix* obsahuje méně Lieberkühnových krypt, které jsou navíc o něco kratší, a nenacházíme v něm žádné *taeniae coli*. *Rectum* se odlišuje stavbou sliznice, která není hladká, nýbrž tvořená podélnými záhyby – *columnae rectales*. Také u epitelu dochází ke změně [3]. „Asi dva centimetry nad análním otvorem přechází jednovrstevný cylindrický epitel v epitel vícevrstevný dlaždicový“ [3].

¹ Pohárkové buňky se nacházejí mezi jednotlivými enterocyty a produkují hlen [8].

Obrázek č. 2: Histologická stavba tlustého střeva [2014-02-24].

<<http://www.travici-potize.cz/index.php/tluste-strevo-informace.html>>.

Stěna tlustého střeva je směrem od střevní dutiny tvořena sliznicí, submukózou, zevní svalovou vrstvou a na vnější části střevní stěny směrem do peritonea nacházíme serózu. Povrch sliznice pokrývá jednovrstevný cylindrický epitel, který vystýlá také Lieberkühnovy krypty. Pod epitelem je umístěna lamina propria mucosae, na kterou navazuje lamina muscularis mucosae [9].



* pouze u intraperitoneálních úseků

© MUDr. Jiří Štefánek
www.travici-potize.cz

2.2 Idiopatické střevní záněty

Idiopatické střevní záněty neboli IBD (inflammatory bowel disease) jsou záněty střev, u kterých prozatím neznáme jasnou příčinu vzniku [10]. Mezi tato onemocnění patří Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida a tzv. neurčitá kolitida [11].

Crohnova nemoc se běžně vyskytuje v tenkém i v tlustém střevě. Zánět zpravidla prochází celou střevní stěnou (postihuje ji transmurálně) a má granulomatózní² povahu, která ovšem nemusí být vždy plně prokazatelná. Zánět se navíc může projevit i ve vyšších segmentech trávicí trubice. Takové případy jsou však vzácné.

Jak již ze samotného názvu plyne, ulcerózní kolitida je v podstatě ulcerózní nebo hemoragicko-katarální³ zánět konečníku, který se odtud rozšiřuje do vyšších segmentů tlustého střeva. Přitom ve všech těchto segmentech postihuje, na rozdíl od zánětu u Crohnovy nemoci, pouze povrchové vrstvy střeva [12].

Ne vždy je však možné tyto dvě nemoci jednoznačně odlišit. Existuje velké procento pacientů, u kterých nelze jejich onemocnění přesně diagnostikovat, jelikož se u nich objevují příznaky obou nemocí zároveň. Takové onemocnění je pak označováno jako neurčitá kolitida (indeterminate colitis) [11, 12].

Charakteristických znaků, které od sebe vzájemně odlišují Crohnovu nemoc a ulcerózní kolitidu, existuje ještě více. Kromě rozdílných histologických nálezů bývají odlišné i projevy jednotlivých onemocnění a skupiny lidí, které tyto dvě nemoci postihují. Podrobněji viz následující tabulka.

Tabulka č. 1: Rozdíly mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou [2013-12-02].

<<http://www.strevni-zanety.cz/rozdily-mezi-mc-a-uc>>.

Crohnova nemoc	Ulcerózní kolitida
může postihnout celý trávicí systém od úst až po konečník	zasahuje vždy konečník a různě rozsáhlý úsek tlustého střeva
zasazené úseky střeva se střídají se zdravými	postihuje střevo vcelku, bez zdravých úseků
hlavním příznakem jsou průjemy, které jsou většinou bez příměsí	hlavním příznakem je průjem s příměsí krve
zánět postihuje celou střevní stěnu	zánět zasahuje pouze střevní sliznici
často je spojena se vznikem píštělí	píštěle se vytvářejí jen vzácně
nejčastěji postihuje pacienty ve věku 18 až 35 let	nejčastěji postihuje pacienty ve věku 30 až 40 let
výskyt u obou pohlaví je stejný	vyskytuje se 1,5krát častěji u žen

² Granulomatózní zánět je charakteristický tvorbou tzv. granulacní tkáně. Tato tkáň se skládá především z velkého množství makrofágů, fibroblastů a kapilár. Často vyplňuje rány, je měkká, křehká a náchylná k poškození. V konečné fázi granulomatózního zánětu vzniká bílá vazivová jizva [13].

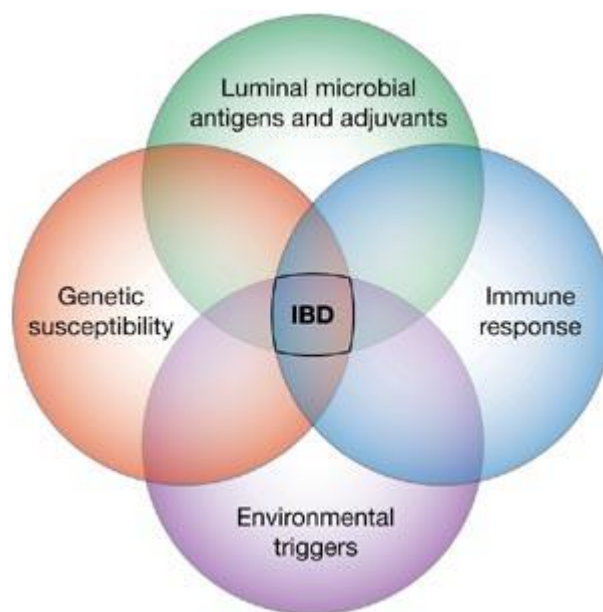
³ Pro katarální zánět je typická tvorba hleny a častá nekróza povrchového epitelu, která má později za následek tvorbu vředů [14]. Vzhledem k tomu, že se ke kataru připojuje také hemoragie, nalézáme ve sliznici kromě přítomného hlenu rovněž krev.

2.2.1 Etiologie a patogeneze

Jak již bylo několikrát zmiňováno, příčina vzniku nespecifických střevních zánětů není prozatím zcela známá. Ať už je ale jakákoliv, vše napovídá tomu, že za poškození střevní tkáně je zodpovědná především imunitní reakce ve střevě. I zde však rozlišujeme dvě teorie vzniku. V první řadě se může jednat o nepřiměřenou imunitní odpověď na antigen, který je běžnou součástí sliznice střeva. V takovém případě hovoříme o autoimunitní reakci v pravém slova smyslu. Další alternativou je potom imunitní odpověď na nadměrnou antigenní stimulaci. I zde se však předpokládá abnormální reaktivita imunokompetentních buněk ve střevní sliznici [15, 16]. Tato imunopatologická reakce se rozvíjí pravděpodobně pouze u jedinců, kteří k ní mají určité genetické predispozice. K vlastní exacerbaci onemocnění je ovšem patrně zapotřebí určitého “spouštěče“, který celou reakci odstartuje. Za ten jsou v současnosti považovány faktory zevního prostředí (*viz obr. č. 3*) [17]. Mezi tyto faktory řadíme infekční agens, bakteriální toxiny, užívání nesteroidních antiflogistik a širokospektrých antibiotik či konzervační a antioxidační látky v potravě [16]. Zatímco v případě Crohnovy nemoci patří mezi tyto faktory také kouření, u ulcerózní kolitidy byl prokázán jeho protektivní účinek [17].

Obrázek č. 3: Etiologie IBD [18].

Nespecifické střevní záněty jsou nadměrnou imunitní odpovědí, která se objeví u geneticky predisponovaných jedinců jakožto výsledek komplexní interakce mezi faktory prostředí, mikrobiálními faktory a střevním imunitním systémem [19].



Celou formální patogenezi nespecifických střevních zánětů můžeme rozdělit do pěti fází. Jedná se o iniciální fázi, fázi rozšíření zánětu, poruchu imunoregulace, poškození tkáně a nakonec i fázi přítomnosti klinických symptomů (rozdělení podle *Sartora*) [20].

Co se iniciální fáze týče, jedná se o fázi, o níž toho víme vůbec nejméně. Předpokládá se, že nejprve dochází k porušení ochranné střevní bariéry. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně již zmiňovaná geneticky daná odchylka imunoregulace podpořená faktory vnějšího prostředí [21]. Tato bariéra je tvořena zevní a vnitřní vrstvou. Zevní vrstvu tvoří hlen obsahující molekuly IgA⁴, vnitřní vrstva se skládá z epitelových buněk a těsných spojení mezi nimi (*viz obr. č. 4*) [22].

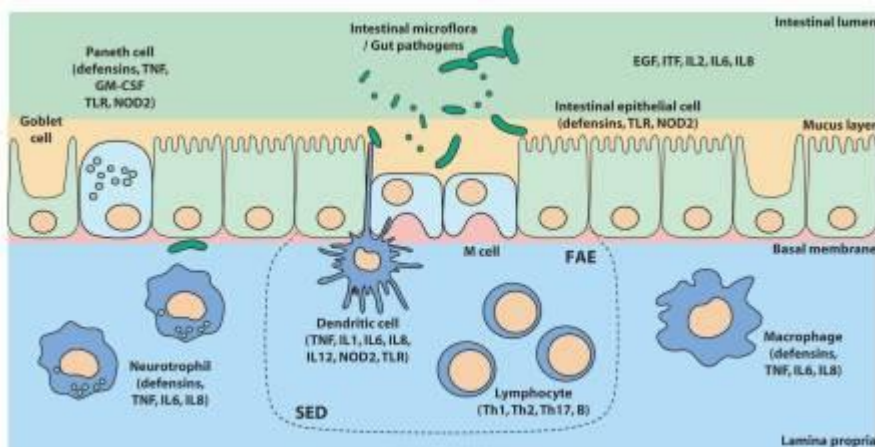
Za normálních okolností, je-li slizniční bariéra neporušená, jsou antigeny předkládány tzv. M-buňkami ostatním imunokompetentním buňkám. Toxiny, bakterie ani antigeny se tedy k těmto buňkám žádnou jinou cestou dostat nemohou. U idiopatických střevních zánětů, kdy je slizniční bariéra porušená, prochází antigeny

⁴ IgA je imunoglobulin neboli protilátka třídy A. Jedná se o molekulu vylučovanou na povrch sliznice, jejíž hlavní funkcí je ochrana proti mikroorganismům. K té dochází především pomocí opsonizace (váže se na Fc receptory fagocytů). Tento imunoglobulin neaktivuje komplement [23].

paracelulárně i transcelulárně do vnitřního prostředí, kde stimulují imunitní systém. Takto vzniklá stimulace již není ničím regulována – mluvíme o tzv. fázi rozvoje zánětu. Vytvoří-li se ve střevní stěně vředy, umožní průchod bakteriím a produktům jejich metabolismu do systémové cirkulace, a podpoří tak rozvoj mimostřevních projevů zánětu [21, 22].

Obrázek č. 4: Ochranná slizniční střevní bariéra [24].

Ochranná bariéra je tvořena vrstvou hlenu secernovanou pohárkovými buňkami a buněčnou bariérou tvořenou epiteliálními buňkami. Vedle epiteliálních buněk nacházíme také epiteliální imunitní buňky, mezi které řadíme Panethovy buňky (vyskytují se pouze v tenkém střevě, na obrázku znázorněná vlevo) a již zmiňované M buňky (na obrázku uprostřed). Zánětlivá reakce zahrnuje aktivaci slizničního imunitního systému – mononukleárních buněk, lymfocytů a dendritických buněk, které se nacházejí v subepiteliálním prostoru. Zánět je zprostředkován pomocí cytokinů - TNF a IL, uvolňovaných prostřednictvím těchto imunitních buněk [24].



Odchylná imunoregulační reakce slizniční imunity je pro vznik a rozvoj zánětu klíčová. Jedná se především o genetickou odchylku buněk imunitního systému schopných exprimovat antigeny a receptory na svém povrchu, a tedy ovlivňovat tvorbu protilátek. Odlišná činnost neuroendokrinního systému, který má za úkol přenášet vlivy zevního prostředí na imunitní systém, je další složkou, jež k celkové odchylce imunoregulace přispívá. V neposlední řadě sem patří také již zmiňovaný antigenní tlak, který se vytváří v důsledku porušené slizniční bariéry [25].

Výsledkem antigenní stimulace je tvorba Th1 lymfocytů, IL-2 a INF- γ prostřednictvím imunitních buněk. Tyto látky mají svůj podíl na imunitní reakci, která vede k poškození tkáně. INF- γ je navíc zodpovědný za tvorbu antigenů HLA II. třídy na epitelových buňkách, jež jsou díky tomu schopny nabízet antigeny dalším buňkám imunitního systému. Th2 lymfocyty rozvíjejí spíše hypersenzitivní alergickou reakci. Během rozvoje zánětu uvolňují imunitní buňky další cytokiny. Jedná se především o IL-1, TNF- α a INF- γ , které posléze zvyšují expresi adhezních molekul na povrchu endotelových buněk. To umožňuje adhezi neutrofilů, monocytů a lymfocytů a jejich následný průnik do intersticiálního prostoru. Neutrofilové ve tkáních uvolňují eikosanoidy a faktor aktivující destičky, které k výslednému poškození tkáně přispívají. Společně s aktivovanými makrofágy navíc produkují volné kyslíkové radikály, jež jsou považovány za nejagresivnější faktory tkáňového poškození vůbec [26]. Zajímavé je, že podle některých studií je Crohnova nemoc zprostředkována především aktivací Th1 lymfocytů, zatímco pro ulcerózní kolitidu je typická Th2 imunitní odpověď [27].

Jednotlivé klinické symptomy charakteristické pro poslední fázi patogeneze popisuje následující kapitola.

2.2.2 Klinický obraz

2.2.2.1 Crohnova nemoc

Projevy Crohnovy nemoci většinou velmi závisí na lokalizaci zánětu v konkrétní části trávicí trubice a na míře poškození střeva.

Nejčastěji zánět nacházíme na spojení tenkého a tlustého střeva. Zde jsou pro jeho projevy typické bolesti břicha, průjemy a hubnutí [28]. Pacienti hubnou hned z několika důvodů. Kromě toho, že dochází k neustálým ztrátám živin kvůli pravidelným průjmům, objevuje se také problém s malabsorpcí způsobený zánětlivými změnami ve střevní stěně. V neposlední řadě se pacienti jednoduše “bojí najíst“, protože právě jídlo jim přináší výše zmiňované bolesti a průjem [29]. Charakteristická pro bolesti břicha je křečovitá povaha a bezprostřední spojitost s jídlem (dostávají se zpravidla 30-60 minut po jídle, někdy i dříve).

Ačkoliv krev ve stolici bývá typická spíše pro ulcerózní kolitidu, může se u Crohnovy nemoci rovněž objevit. Jedná se často o případy, kdy je zánětem postiženo

pouze tlusté střevo. I zde se setkáváme s průjmy a bolestmi břicha. Mimo ně jsou pro tento typ postižení charakteristické také mimostřevní projevy zánětu.

Jestliže se zánět nachází pouze v tenkém střevě, zpravidla mezi jeho projevy postrádáme průjem. Pacienti nicméně stejně neprospívají a k hubnutí, k němuž tu dochází kvůli malabsorpci, se v těchto případech často přidává také chudokrevnost, která se objevuje v důsledku okultního krvácení. Nesetkáváme se zde ani s mimostřevními projevy zánětu, o to častěji však hrozí neprůchodnost tenkého střeva [28]. V případě neprůchodnosti se jedná o komplikaci vzniklou na podkladě stenóz⁵ [30]. Dojde-li k této komplikaci, objeví se navíc vzednutí břicha a zástava plynů a stolice [31].

Objeví-li se zánět v oblasti konečníku a řitního kanálu, je pro něj typické naléhavé nucení na stolicí. Ta je v tomto případě však málo objemná [29]. Velmi charakteristický je pro tuto oblast také výskyt abscesů a píštělí⁶ [28].

2.2.2.2 Ulcerózní kolitida

Všichni pacienti s ulcerózní kolitidou trpí na rozdíl od Crohnovy nemoci velmi podobnými obtížemi. Mění se pouze intenzita těchto potíží v závislosti na intenzitě vlastního zánětu, jeho rozsahu a v neposlední řadě také na funkční poruše střev. Mezi typické příznaky patří bolestivé nucení na stolicí, krvácení z konečníku a průjmy [32].

Podle anatomické lokalizace dělíme zjednodušeně ulcerózní kolitidu na pankolitidu, levostrannou formu kolitidy a tzv. proktitidu [33].

V případě proktitidy bývá postižen pouze konečník. Typickým znakem je ostrý přechod zánětlivé sliznice ve sliznici zdravou. Stolice bývá zpravidla formovaná, někdy dokonce dochází k zácpě. Pacienty trápí zejména tenesmy. Jedná se o časté bolestivé nucení na stolicí, po kterém však nepřichází úleva ve formě vyprázdnění. Pacienti ze sebe v těchto případech dostávají jenom krev a hlen [32]. U proktitidy krev stolicí pouze obaluje [34].

Rozdíl mezi levostrannou kolitidou a pankolitidou spočívá v tom, že levostranná kolitida již nepostihuje příčný tračník. Naproti tomu pankolitida zasahuje kromě

⁵ Jedná se o zúžení střevního lumen. K němu dochází prostřednictvím tvorby jizev, které se vytváří během procesu hojení střevní stěny [30].

⁶ „Píštěl je komunikace ze střeva na kůži, do jiné části trávicí trubice nebo dokonce sousedních orgánů (močového měchýře, pochvy). Absces je ohraničené hnisavé ložisko, které se ovšem může provalit obsahem do okolí“ [30].

příčného tračníku někdy i celé tlusté střevo. V obou případech trpí pacienti průjmy doprovázenými křečovitými bolestmi břicha, tenesmy a krvácením z konečníku [32]. Zde už je krev přímo součástí stolice [34]. Kromě krve se ve stolici vyskytuje také hlen [32]. V obou případech je poměrně častá horečka. U těžké formy se může objevit i zvracení, ačkoliv důvod k němu není zcela objasněn. Podobně jako u Crohnovy nemoci i zde nemocní ubývají na váze [34]. Mezi komplikace typické pro těžší formu ulcerózní kolitidy patří toxické megakolon⁷ a proděravění střeva – perforace [32].

2.2.3 Komplikace

Většina intestinálních komplikací byla zmiňována výše. Jedná se především o stenózy, perforace, perianální abscesy a píštěle a toxické megakolon. Zde se k nim již nebudeme vracet. Zbývá snad jen doplnit riziko masivního krvácení, které je však poměrně vzácné. Další komplikací, o níž doposud nebyla řeč, je rakovina tlustého střeva. Hrozí především u pacientů s ulcerózní kolitidou, kteří tímto onemocněním trpí déle než deset let [36].

Extraintestinální projevy zánětu postihují především kůži, oči, klouby a někdy také játra.

Mezi kožní komplikace řadíme tzv. *erythema nodosum*. Tento erytém je typický hlavně pro Crohnovu nemoc tlustého střeva. Jedná se o zduřeniny v kůži a podkoží vyskytující se především na bérkách. Jeho růžová barva se postupně mění jako modřina až do úplného vymizení [37]. Erytém je horký a citlivý. Nedochozí u něj k ulceracím ani jizvení a jeho výsev nekoreluje s rozsahem a trváním onemocnění [38]. Naproti tomu *pyoderma gangrenosum* je vředovitý defekt, který postihuje především pacienty s ulcerózní kolitidou. Většinou se vytváří v místech malého poranění a postupem času se zvětšuje [37]. S aktivitou onemocnění je jeho výskyt úzce spojen – objevuje se při těžké formě zánětu, nejčastěji na dolních končetinách [38].

Co se očí týká, často u pacientů pozorujeme záněty rohovky nebo spojivky. Méně časté jsou záněty duhovky a řasnatého tělesa. Následky očních zánětů zpravidla nebývají trvalé [37]. Jejich aktivita koreluje s aktivitou střevního onemocnění [39].

⁷ Jedná se o rozšíření střeva, které vzniká na podkladě ochrnutí svaloviny střevní stěny. K tomu dochází při nadměrném poškození střevní sliznice. Je-li sliznice poškozena, bývá rovněž narušena ochranná střevní bariéra. To má za následek vstřebávání střevního obsahu, který je pro okolní tkáň toxický. Právě megakolon může vést mimo jiné k již zmiňované perforaci, kdy je obsah střeva uvolněn do dutiny břišní [35].

Nejčastěji postižené bývají klouby. Tzv. enteropatická artritida postihuje především kolenní a hlezenní kloub. Jedná se v podstatě o akutní zánět synoviální výstelky, během něhož se v kloubu utváří výpotek. Kloub je bolestivý a zarudlý [37]. Toto postižení kloubů je nejčastější v době aktivního vzplanutí onemocnění [40]. Jakmile tento stav odezní, kloub se bez trvalých následků zhojí. Naproti tomu sarkoilitida není na aktivitě střevního zánětu závislá a postihuje křížokyčelní kloub.

Malé procento pacientů, většinou muži, mívá postižena také játra. V tomto případě hovoříme o chronickém zánětu žlučových cest, který může vyústit až v transplantaci jater [37]. Hrozí zde totiž rozvoj jaterní cirhózy. Mezi typické příznaky patří hubnutí, bolest v pravém podžebří, horečka, zimnice a žloutenka [41].

Posledním typem komplikací jsou ty, které vznikají v důsledku špatného vstřebávání živin nebo jako nežádoucí účinek některých léků. Jedná se o tzv. metabolické komplikace. Patří sem osteoporóza vznikající v důsledku léčby kortikosteroidy. Podpořená může být rovněž špatným vstřebáváním vápníku a vitamínu D. Krevní ztráty a nedostatečné vstřebávání železa vedou k anémii. Ta se často vyskytuje také po resekci terminálního ilea, kdy je porušeno vstřebávání vitamínu B12. Další metabolickou komplikací bývají kožní změny. Příčinou je zpravidla špatné vstřebávání selenu a zinku. V neposlední řadě patří mezi tyto komplikace také žlučové a ledvinové kameny. V obou případech dochází k jejich tvorbě v důsledku resekce tenkého střeva. Žlučové kameny se vytváří kvůli velkému množství žlučových kyselin, které se dostanou do tlustého střeva, jelikož se v tenkém střevě nemohly vstřebat. Díky žlučovým kyselinám se v tlustém střevě lépe vstřebává bilirubin, který se později ukládá ve žlučníku. V případě ledvinových kamenů zvyšuje porušené vstřebávání žlučových kyselin koncentraci oxalátů v moči a ty následně vytvářejí kameny v ledvinách [42].

2.2.4 Průběh

Idiopatické střevní záněty jsou nemoci nevyлéčitelné. Současná medicína je však dokáže dostat do tzv. klidové fáze neboli remise, během níž jsou pacienti schopni žít kvalitní život bez větších omezení. Tato období klidu jsou však u velké většiny pacientů v průběhu jejich života střídána tzv. relapsy, během kterých dochází k opětovnému vzplanutí nemoci [43].

Podle toho, jak často se relapsy objevují, můžeme průběh nemoci rozdělit na remitující a intermitující. U remitujícího průběhu se relapsy vyskytují vícekrát do roka. V případě intermitujícího průběhu představuje naopak období mezi jednotlivými vzplanutími dobu delší než jeden rok [44]. Existují také nemocní, u kterých se ataka objeví jen jednou za život. V takovém případě ale nemůžeme s určitostí říci, že byla prvotní diagnóza stanovena správně. Menší část pacientů má naopak potíže neustále a klidová období i přes veškerou dostupnou léčbu prakticky nezná [45]. V takovém případě mluvíme o tzv. chronickém průběhu nemoci (ataka trvá déle než jeden rok). Jestliže nemoc prudce vzplane a velmi rychle progreduje, jedná se o průběh perakutní [44].

Na základě toho, kde se zánět při relapsu opětovně objeví, rozeznáváme tři základní pojmy. Jedná se o reaktivaci, recidivu a rekurenci. K reaktivaci dochází, vytvoří-li se zánět v již postiženém úseku střeva (často po ukončení léčby). Dojde-li ke vzplanutí v úseku dosud nepostiženém, hovoříme o tzv. recidivě. Termín rekurence se používá v případě vzniku zánětu po předchozím chirurgickém odstranění všech postižených částí střeva [46].

Průběh onemocnění se dá na jeho začátku předpovídat jen velmi obtížně. Na základě dlouholetých zkušeností lze však obecně říci, že pro stanovení prognózy pacienta jsou důležité první tři roky soužití s nemocí. Pakliže se nemoc několikrát do roka vrací, ačkoliv pacient již užívá dostupné léky, je pravděpodobné, že se tak bude chovat i v budoucnu. Někteří pacienti jsou proto i přes vyspělou medicínskou vědu ve svém životě velmi omezení. Pokud však jedinec vydrží po tuto “zkušební“ dobu s vhodnou udržovací léčbou bez větších potíží, je i jeho prognóza do budoucna dobrá.

Co přesně relapsy způsobuje, nejsme prozatím schopni s určitostí říci. Velký vliv je ale přikládán nadměrnému stresu, o něco menší potom virovým respiračním infekcím a užívání širokospektrých antibiotik [47].

2.2.5 Léčba

Vzhledem k tomu, že dosud neznáme jasné příčiny vzniku IBD, zaměřuje se léčba především na inhibici zánětlivých mediátorů, které zánět udržují a zesilují [48]. Léčbu můžeme obecně rozdělit na chirurgickou a konzervativní – do té řadíme léčbu medikamentózní a podávání výživy, popřípadě také některé endoskopické zákroky [49].

Základem medikamentózní léčby jsou aminosalicyláty. Patří sem starší sulfasalazin s větším počtem nežádoucích účinků a novější mesalazin neboli 5-aminosalicylová kyselina (na rozdíl od sulfasalazinu postrádá přidružený sulfonamid). Tyto látky mají protizánětlivé účinky a jsou upravené do enterosolventní formy. Podle různých technologických úprav působí v různých částech střeva. Aminosalicyláty jsou užívány především k udržení remise, popř. v léčbě lehké a středně těžké formy idiopatických střevních zánětů [50, 51]. Další důležitou skupinou léčiv jsou kortikosteroidy. Tyto léky hrají velkou roli při léčbě akutního vzplanutí nemoci, na udržení remise však prakticky nemají vliv. Jejich nevýhodou je velké množství nežádoucích účinků [52]. Z této lékové skupiny se používá především prednison a methylprednisolon. Mluvíme-li o steroidech, nesmíme opomenout ty topické. V lékařské praxi se používá budesonid, který díky technologickému zpracování působí na rozhraní tenkého a tlustého střeva. Na okolní tkáň ani celkový metabolismus by neměl mít vliv, jelikož se ze střeva vstřebává do krve, odkud je odváděn do jater, kde je téměř všechn metabolizován. Zatímco na těžkou formu střevního zánětu prakticky nepůsobí, u středně těžkých a lehkých forem onemocnění jsou s ním velmi dobré zkušenosti [53]. Předposlední skupinou léčiv spadajících do medikamentózní léčby jsou imunosupresiva. Do této skupiny řadíme azathioprin, 6-merkaptopurin, metotrexát a cyklosporin A. Imunosupresiva slouží především k udržení remise. Na zvládnutí akutního onemocnění ovšem nestačí, jelikož nástup jejich účinku trvá několik měsíců [54].

Velkým objevem několika posledních let je tzv. biologická léčba. Je indikovaná u pacientů, u kterých léčba výše zmiňovanými léčivými prostředky selhala. Jedná se o látky, které svým účinkem blokují působení TNF- α . Ten je uvolňován především aktivovanými lymfocyty a makrofágy za účelem co nejrychlejšího potlačení infekce (v případě IBD jde o přehnanou reakci imunitního systému). Mezi biologické léky indikované k léčbě IBD patří v současné době infliximab a adalimumab. V případě

influximabu hovoříme o tzv. chimérické monoklonální protilátce. To znamená, že jedna její čtvrtina pochází z myši. Dalším jejím charakteristickým znakem je aplikace prostřednictvím infuze. Adalimumab je naproti tomu protilátka kompletně lidská a pacienti si ji aplikují sami pomocí subkutánních injekcí [55].

Mezi tzv. doplňkovou léčbu můžeme zařadit umělou výživu, substituční terapii a stejně tak sem patří také antibiotika a probiotika [56]. Umělou výživu dělíme na enterální a parenterální. Obsahuje všechny nezbytné živiny, jako jsou aminokyseliny, glycidy, tuky, vitaminy, ionty a stopové prvky, a pomáhá tak zlepšit kondici podvyživených nemocných [57]. První volbou je vždy výživa enterální. Parenterální výživa přichází na řadu až ve chvíli, kdy je průběh choroby natolik těžký, že je třeba nechat střevo odpočívat od motility, sekrece a antigenní stimulace [58]. V rámci substituční terapie je během léčby kortikoidy často nezbytné doplňovat vápník, hořčík a draslík. Velká většina pacientů potřebuje dodávat také železo, které se vytrácí v důsledku okultního krvácení. Vzhledem k tomu, že má železo sklony přecitlivělý trávicí trakt dráždit, je často nezbytné podávat ho prostřednictvím infuzí. Formou subkutánních injekcí zase podáváme vitamin B12 u pacientů po resekci terminálního ilea [59]. Co se antibiotik týče, používají se proto, že mohou nespecifickým účinkem redukovat množství antigenů. Kromě toho také snižují počet mikroorganismů, které k vývoji zánětlivého procesu přispívají. V neposlední řadě některá z nich působí dalšími (např. imunosupresivními) účinky. Takovou látkou je např. metronidazol [60]. Mimo něj se v léčbě IBD používá také cotrimoxazol, klaritromycin, rifaximin a ciprofloxacin. Některá širokospektrá antibiotika však mohou rozvoj střevního zánětu spíše podpořit. Jedná se např. o penicilin a amoxicilin [61]. Zbývající skupinou doplňkové léčby jsou probiotika, která podle posledních studií přispívají k oddálení nástupu aktivního onemocnění. Klinicky potvrzená byla účinnost těchto kmenů: *Escherichia Coli kmen Nissle*, *Lactobacillus acidophilus* a *Sacharomyces boulardii* [62].

Navzdory veškeré dostupné léčbě poměrně velké procento pacientů stále po několika desítkách let soužití se svojí nemocí končí na operačním sále. Uvádí se, že po dvaceti letech života s ulcerózní kolitidou musí operaci podstoupit zhruba 15-20% pacientů. V případě Crohnovy nemoci bývají tato čísla o něco horší – po třicetiletém průběhu onemocnění operace nemine asi 90% pacientů [63, 64].

2.2.6 Patologická anatomie a histologie

2.2.6.1 Makroskopický nález

U Crohnovy nemoci je makroskopický nález charakterizován ostrým ohraničením zanícené části střeva od okolní zdravé tkáně. Stěna střeva je ztlustělá a překrvená [65]. Typickým znakem jsou úzké štěrbinovité vředy – tzv. fisury a další vředovité defekty, které často zasahují hluboko do střevní stěny, popř. až do okolních orgánů kvůli vznikajícím píštělím a peritoneálním adhezím. V horším případě může dojít k perforaci střeva [65, 66]. Vlivem fibrotizace tkáně začíná být sliznice zhrublá a lumen střeva se postupně zužuje [65]. Povrch sliznice získává vzhled, který připomíná dlažební kameny – objevuje se tzv. políčkování (*viz obr. č. 5*). V submukóze, svalovině a subserózním vazivu nacházíme fibrózní ložiska [66].

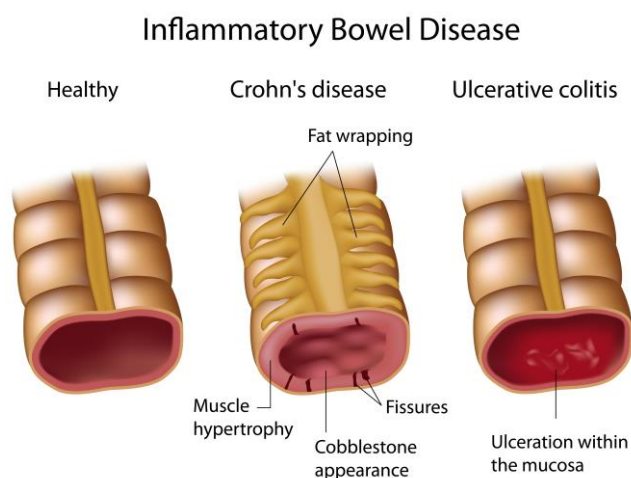
V případě ulcerózní kolitidy se taktéž objevuje překrvení sliznice. Zde je navíc ještě výraznější než u Crohnovy nemoci. Jelikož je překrvená sliznice velmi křehká, dochází často až k jejímu prokrvácení. Na sliznici potom nacházíme malé eroze i hlubší ulcerace [67]. Tyto vředy však málokdy zasahují hlouběji pod sliznici (*viz obr. č. 5*). Ze zbývajících sliznic se obvykle vytvářejí pseudopolypy⁸ [68].

⁸ Pseudopolypy jsou tvořeny sliznicí, která na okrajích vředů vyčnívá nad okolní povrch. Tyto útvary jsou charakteristické jak pro zanícenou, tak pro regenerující sliznici [69].

Obrázek č. 5: Makroskopický nález [2013-12-03].

<<http://info.dhcla.com/blog/bid/337785/What-s-the-Difference-Between-Ulcerative-Colitis-Crohn-s-Disease>>.

U Crohnovy nemoci (uprostřed) můžeme vidět hypertrofickou střevní stěnu s políčkováním na jejím povrchu. Na obrázku jsou rovněž znázorněny fisury zasahující hluboko do stěny střeva. Tloušťka střevní stěny u ulcerózní kolitidy (napravo) zůstává naproti tomu nezměněná a vředové defekty jsou pouze povrchové.



2.2.6.2 Mikroskopický nález

U Crohnovy nemoci pozorujeme v celé střevní stěně překrvení, otok a přítomnost zánětlivého infiltrátu. Ve všech vrstvách stěny střeva jsou rovněž přítomny hyperplastické lymfatické folikuly⁹ [65]. Kromě toho se utváří vazivo – dochází k tzv. fibroprodukcii, která je patrná až v oblasti serózy [71]. Později se kvůli tomuto jevu rozšiřuje submukóza [65]. Uvnitř hlubokých vředů proliferuje nespecifická granulační tkáň a hromadí se fibrózní exsudát. Kromě vředů můžeme vidět dilataci krypt, úbytek pohárkových buněk a v tenkém střevě také nárůst Panethových buněk. Dalším typickým znakem bývají epiteloidní granulomy (viz obr. č. 6). Jedná se o uzlíkovité formace histiocytů¹⁰, někdy i více nebo mnoho jaderných. K nekróze, která je často patrná u tzv. kaseózních granulomů (vznikají v průběhu tuberkulózního procesu), zde nedochází [71]. Hovoříme tedy o tzv. nekaseifikujících granulomech,

⁹ Jedná se o lymfatické uzlíky tvořené lymfocyty a dendritickými buňkami [70].

¹⁰ Histiocyt je druh makrofágu, který se nachází ve vazivu [72].

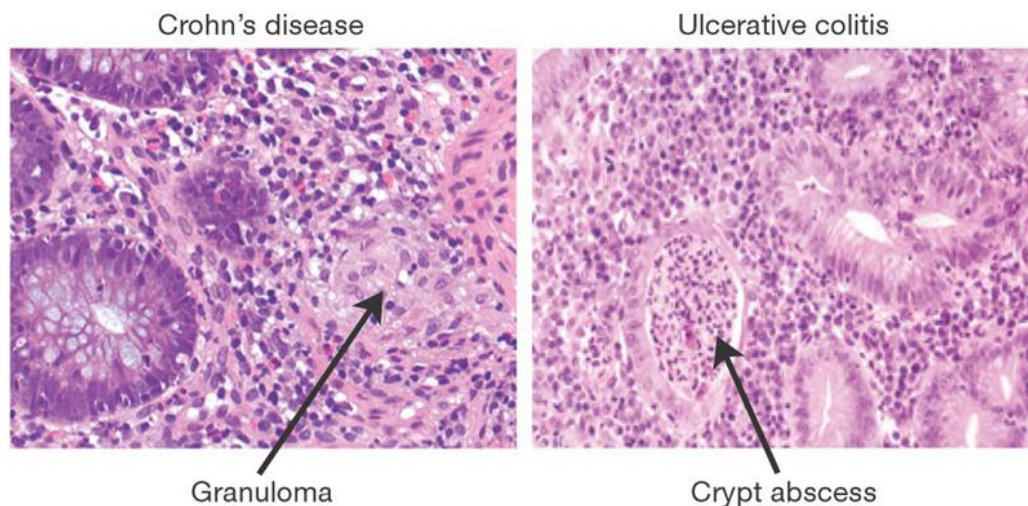
kteřé nacházíme především v submukóze a subserózním vazivu. Trvá-li onemocnění delší dobu, mohou se ve sliznici vytvářet prekancerózní léze [65].

V případě ulcerózní kolitidy pozorujeme ve fázi aktivního zánětu především překrvení a zánětlivou infiltraci sliznice [68]. Zánětlivý infiltrát se zpravidla skládá z lymfocytů, plazmatických buněk a neutrofilních granulocytů [73]. Během infiltrace pronikají neutrofilní granulocyty do krypt, kde vytváří tzv. kryptové abscesy (viz obr. č. 6) [68]. Jsou-li krypty takto poškozeny, dochází v nich k postupnému ubývání pohárkových buněk a někdy také k oploštění buněk epitelových [73]. Na stěvné sliznici se během této fáze formují ploché vředy. V době, kdy zánět ustupuje, počet neutrofilů postupně klesá a spolu s nimi i množství kryptových abscesů. Regenerující se krypty nedosahují až k *muscularis mucosae*, jsou nepravidelně uspořádané a větví se. Ve fázi remise již zánětlivý infiltrát není přítomen [68]. Postupem času dochází k reepitelizaci jednotlivých vředů jednovrstevným epitelem [73]. Stále se však objevuje výrazné zkrácení krypt a ztráta jejich souběžného uspořádání [68]. Sliznice i nadále zůstává hyperemická a granulovaná [73].

Obrázek č. 6: Mikroskopický nález [2013-12-04].

<http://www.nature.com/nature/journal/v448/n7152/fig_tab/nature06005_F1.html>.

Nalevo můžeme vidět epitelooidní granulom u Crohnovy nemoci. Napravo je zachycen kryptový absces ve střevě postiženém ulcerózní kolitidou.



2.3 Experimentální modely kolitidy

Během posledních dvou desetiletí bylo vytvořeno několik zvířecích modelů kolitidy. Tyto modely vznikaly především proto, aby odhalily patofyziologické aspekty lidských nespecifických střevních zánětů. Ačkoliv žádný z modelů nereprodukuje lidské onemocnění zcela přesně, některé patologické děje na nich můžeme velmi dobře studovat. Jedná se především o patofyziologické aspekty zánětu v různých fázích jeho vývoje, díky kterým můžeme identifikovat některé imunologické procesy [74]. Zvířecí modely, které by měly lidské IBD co nejvěrněji vystihnout, můžeme rozdělit na spontánně vzniklé, indukované a geneticky modifikované [75].

V případě indukovaných modelů může být zánět vyvolán v podstatě dvěma způsoby – buďto jsou do potravy zvířat přidávány určité chemické látky, nebo je zánět navozen pomocí bakteriální infekce [76]. Chemicky indukované modely IBD jsou v praxi vůbec nejpoužívanější. Hlavním důvodem je snadné vyvolání zánětlivé odpovědi a dobrá kontrola nástupu, doby trvání i závažnosti zánětu [75]. Ačkoliv většina již uskutečněných studií byla prováděna především na myších, chemicky indukovaná kolitida byla testována také na jiných druzích zvířat – od nižších organismů, jako je Dánio pruhované¹¹ nebo *Drosophila*¹², až po vyšší živočichy, konkrétně krysy a prasata. Volba zvířete i indukční metody vždy závisí na cílech stanovených konkrétní studií [76].

2.3.1 Kolitida indukovaná dextran sulfátem sodným

Velmi častou metodou sloužící k vytvoření zánětu a vředů ve střevech zvířat je podávání dextran sulfátu sodného (DSS). Ten však ve skutečnosti sám o sobě zánět nevyvolává. Jeho účinek spočívá v porušení střevního epitelu, jehož výsledkem je vystavení *lamina propria* a submukózního kompartmentu antigenům a střevním bakteriím [74]. Zvýšená permeabilita a následná infiltrace imunitních buněk zvyšuje

¹¹ Dánio pruhované (lat. *Danio rerio*) je sladkovodní kaprovitá ryba pocházející z východní Indie. Tato ryba je využívána jako modelový organismus v oblasti genetiky a molekulární biologie [77].

¹² *Drosophila melanogaster* neboli octomilka obecná je dvoukřídle hmyz, který je taktéž často užívaný k výzkumům v oblasti genetiky a vývojové biologie [78].

pravděpodobně produkci prozánětlivých cytokinů jak z epiteliálních, tak z imunitních buněk. Po vysazení DSS zůstávají hladiny těchto mediátorů poměrně vysoké. Klesnou až kolem čtrnáctého dne po vysazení, což poukazuje na fakt, že zánět indukovaný DSS přetrvává poměrně dlouho [79].

Účinnost DSS závisí na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří dávkování, doba podávání a výrobce (šarže) DSS, typ myšního kmenu, pohlaví (samci jsou náchylnější) a mikrobiální prostředí zvířat (GF – bezmikrobní zvířata, SPF – zvířata prostá specifického patogenu). Kromě toho DSS podávané myším ukazuje obrovskou variabilitu v závažnosti vzniklého onemocnění. Není-li zvířatům podáváno v opakujících se cyklech, pak u nich zcela postrádáme chronické změny pozorované u lidí. Nicméně tento typ indukované kolitidy je běžně užívanou metodou především pro jeho jednoduchost podávání (pitná voda) a snadné dávkování (pro dosažení určitého stupně zánětu) [74].

Na základě koncentrace, délky a frekvence podávání DSS můžeme u myši vytvořit dva typy kolitidy – akutní nebo chronickou. Akutní kolitida je obvykle indukována pomocí kontinuálního podávání 2-5% DSS po krátkou dobu (4-9 dní). Chronická kolitida je zpravidla vyvolána kontinuálním podáváním nízkých koncentrací DSS v tzv. cyklech. Např. se DSS zvířatům podává ve čtyřech cyklech, z nichž každý trvá sedm dní a je vždy vystřídán desetidenním podáváním čisté vody.

Klinická manifestace DSS indukované kolitidy v její akutní fázi může zahrnovat úbytek na váze, průjem, okultní krvácení, piloerecti, anémii a popřípadě také smrt. Klinické projevy v chronické fázi kolitidy obvykle neodpovídají závažnosti probíhajícího zánětu nebo histologickým změnám v tlustém střevě [75].

Pro histologické změny je charakteristické především rozsáhlé poškození krypt s relativně pomalou regenerací oproti jiným modelům, které k indukci kolitidy používají odlišné chemické látky. Histopatologická analýza dále ukazuje poškození epiteliálních buněk, infiltraci granulocytů a dalších imunitních buněk a otok tkáně, často spojený s těžkou ulcerací. Právě kvůli masivnímu otoku a následné ulceraci používá řada vědců tento model k interpretaci lidského chronického střevního zánětu. V podstatě se však stále jedná o chemické poškození tkáně, a zůstává tedy otázkou, do jaké míry chronický zánět skutečně interpretuje.

Patologické hodnocení se provádí především v distálním segmentu střeva, který bývá nejvíce postižen. Histopatologické hodnocení je založeno na třech základních parametrech: závažnost zánětu (žádný, lehký, přiměřený, těžký), rozšíření zánětu

(žádné, mukóza, mukóza a submukóza, transmurální) a poškození krypt (žádné, jedna třetina poškozená, dvě třetiny poškozené, ztráta krypt se zachovaným epitelem, ztráta krypt i epitelu) [74].

2.3.1.1 Histologie kolitidy indukované dextran sulfátem sodným

V roce 1993 vyšla studie za účelem popsat klinické a histopatologické znaky kolitidy vyvolané dextran sulfátem sodným. *Harry et al* se snažili zachytit nejčasnější histopatologické změny, na jejichž základě popsali celkem čtyři stupně vývoje kolitidy.

Stupeň 1 je charakterizován především zkracováním krypt přibližně o jednu třetinu jejich původní délky. Díky tomuto jevu krypty nenasedají přímo na *muscularis mucosae*, jako je tomu za normálních okolností ve zdravé tkáni tlustého střeva. Často v nich dochází k dilataci a ztenčování zbývajícího epitelu. Méně často může k tomuto jevu docházet také v kryptách, které si zachovaly původní délku. V místech, kde dochází ke ztrátám krypt, má *lamina propria* jakýsi hyalinní¹³ vzhled. Ke všem změnám dochází bez přítomnosti jakékoliv známky zánětlivé infiltrace (*viz obr. č. 7*).

V případě 2. stupně vývoje kolitidy se z krypt vytrácejí již dvě třetiny původní délky a jejich epitel se nadále ztenčuje. Znamky zánětu stále nejsou patrné. Původní *lamina propria* se díky nadále se zmenšujícím kryptám stává velmi výraznou (*viz obr. č. 8*)

U 3. stupně již krypty úplně chybí, jejich povrchový epitel však zůstává zachován. V *lamina propria* a *tunica submucosa* se objevuje mírný zánětlivý infiltrát, nezasahuje však epiteliální buňky (*viz obr. č. 9*). Tento infiltrát se skládá z neutrofilů, lymfocytů a plasmatických buněk.

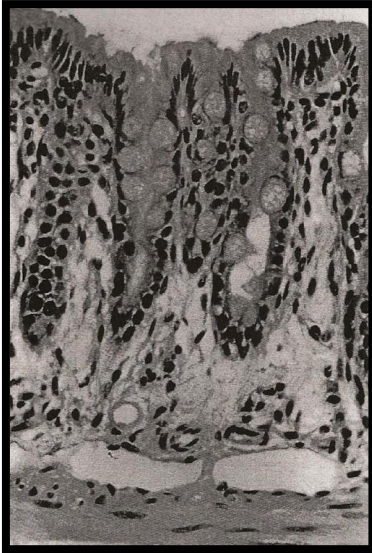
Pro 4. stupeň je typická hyperplazie¹⁴ epitelu v místě původních dolních dvou třetin krypt, ztráta produkce hlenu a zvýšená mitotická aktivita. Jedná se o znaky, které jsou charakteristické pro regenerující epitel. Zánětlivý infiltrát je zde o něco výraznější. Kromě submukózy postihuje také mukózu a později se rozšiřuje do svalové vrstvy (*viz obr. č. 10*) [80].

¹³ Hyalin se vytváří během procesu hyalinizace, kdy se vazivová tkáň přeměňuje na bezstrukturní eosinofilní hmotu [52].

¹⁴ Jedná se o zvětšení tkáně, které vzniká v důsledku zmnožení buněk [53].

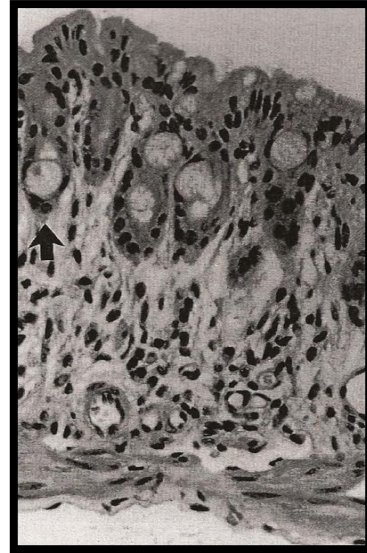
Obrázek č. 7: Stupeň 1 [80].

Krypty jsou zkrácené přibližně o jednu třetinu. Lamina propria začíná být výrazná. Znamky zánětu nejsou patrné [80].



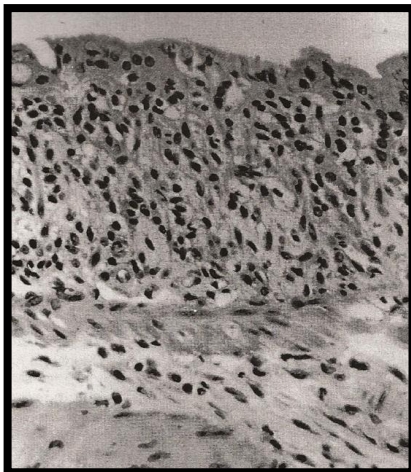
Obrázek č. 8: Stupeň 2 [80].

Krypty jsou zkrácené již o dvě třetiny. Lamina propria je ještě výraznější a epitel se ztenčuje. Zánět stále není přítomen [80].



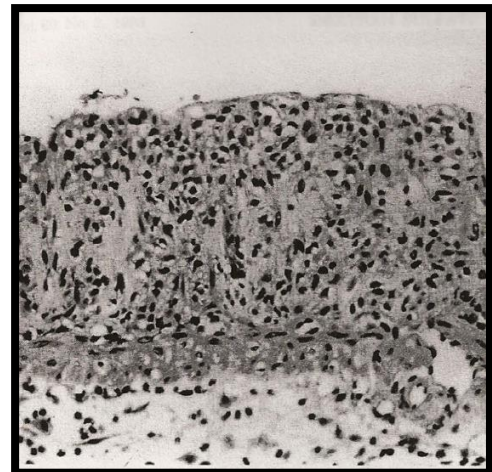
Obrázek č. 9: Stupeň 3 [80].

Zde krypty už úplně chybí. Epitel ještě zůstává zachován. Objevují se první známky zánětlivé infiltrace [80].



Obrázek č. 10: Stupeň 4 [80].

Na obrázku můžeme vidět časný čtvrtý stupeň, pro který je charakteristický mírný až středně těžký zánět [80].



2.3.2 Další modely indukované kolitidy

2.3.2.1 Oxazonem indukovaná kolitida

Tento typ kolitidy není, na rozdíl od předchozího modelu, indukován pomocí perorálního podávání látky. Oxazon se zvířatům podává intrarektálně, rozpuštěný v etanolovém vehikulu. To vyvolává akutní kolitidu charakterizovanou Th2 typem imunitní odpovědi. Vše je doprovázeno ztrátou váhy, průjmem, tvorbou vředů a ztrátou epitelálních buněk v tlustém střevě [76]. Vředy se pod mikroskopem jeví jako relativně povrchové a celá kolitida je omezená pouze na distální část tlustého střeva [74]. Právě kvůli těmto charakteristikám odpovídá tento zvířecí model především lidské ulcerózní kolitidě [76].

2.3.2.2 Kolitida indukovaná trinitrobenzensulfonovou kyselinou

Trinitrobenzensulfonová kyselina se stejně tak jako oxazon podává intrarektálně, rozpuštěná v etanolu. Etanol je v obou případech zodpovědný za narušení epitelální vrstvy a následné vystavení bazální *lamina propria* bakteriím. Tento typ indukované kolitidy má mnoho společných znaků s lidskou Crohnovou nemocí. Mezi tyto znaky patří těžký transmurální zánět spojený s průjmy, ztrátou váhy a indukcí Th1 zprostředkované imunitní odpovědi. Oproti oxazonem indukované kolitidě postihuje tato kolitida větší úsek tlustého střeva, čímž zase připomíná pankolitidu [76].

2.3.2.3 Kolitida indukovaná kyselinou octovou

Intrarektální podávání 3-5% kyseliny octové indukuje akutní kolitidu v distální části tlustého střeva. Počáteční postižení zahrnuje nekrózu střevního epitelu, která může a nemusí zasahovat do *lamina propria*, submukózy, nebo dokonce do externích svalových vrstev. Zánětlivá odpověď je především nespecifickou imunitní reakcí vznikající v důsledku narušení epitelální bariéry organickou kyselinou. Tato imunitní reakce však prvních 24 hodin po podání kyseliny vůbec neprobíhá [74]. Výhody metody spočívají především v její nízké ceně a jednoduchosti podávání [76].

2.3.2.4 Kolitida indukovaná indometacinem

Zatímco kyselina octová vyvolává akutní zánět pouze v oblasti tračníku, indometacin má schopnost navodit akutní ileitidu. Krysám je tato látka podávána subkutánně, což vede k vytvoření akutní zánětlivé odpovědi. Tato odpověď je charakterizována četnými hlubokými ulceracemi především v distálním jejunu a proximálním ileu. Maximální intenzity dosahuje zánět během 24 hodin a odeznívá v průběhu týdne. Jsou-li aplikovány dvě injekce za den, dochází k indukci chronického zánětu, který přetrvává alespoň dva týdny. Střevní bakterie i jejich produkty zde významně přispívají k exacerbaci a udržení chronické fáze indometacinem vyvolaného zánětu [74].

2.3.2.5 Kolitida vyvolaná bakteriální infekcí

Mezi patogeny používané k indukci experimentálního zánětu střev patří *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin* a *Escherichia coli*.

Počáteční zánět způsobený kolonizací *S. typhimurium* má podobný histopatologický obraz jako lidská ulcerózní kolitida. Dochází zde ke ztrátě epiteliálních krypt, četným erozím a infiltraci neutrofilů. Vše obvykle do týdne vyústí v systémovou infekci. To je také důvod, proč je tento model pro výzkum pozdějších stádií zánětu nevhodný.

Adherentně invazivní Escherichia coli (AIEC) byla původně izolována z ilea pacientů s Crohnovou nemocí. Tento patogen je schopný vyvolat zánět jak v tenkém, tak v tlustém střevě, kde působí mírné epiteliální poškození. Toto poškození můžeme přirovnat k obrazu epitelu po působení nízkých dávek DSS. Efektivní kolonizace AIEC není zpravidla umožněna díky řadě probiotických bakterií, které jsou ve zdravých střevech běžně přítomny. Potlačením intestinální mikroflóry pomocí antibiotik však lze kolonizace docílit [76].

2.4 Bilirubin

2.4.1. Úvod

Bilirubin je hlavním žlučovým barvivem, které vzniká jako konečný produkt katabolismu červeného krevního barviva hemu [83]. K tomu dochází v játrech, kde se bilirubin vytváří ze zaniklých červených krvinek při rozkladu hemoglobinu [84]. Chemicky se jedná o tetrapyrrolovou sloučeninu, která je charakteristická svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Jelikož jde o nepolární látku, je bilirubin v krvi navázán na albumin. Jen méně než 0,01% bilirubinu najdeme v krevním řečišti v nevázané formě. Tato forma je zodpovědná za biologické účinky látky. Dojde-li k její akumulaci, vytváří se hyperbilirubinemie, která se později projeví žloutenkou. Při vyšších sérových koncentracích volného bilirubinu dochází k rozvoji toxických účinků, které jsou nebezpečné především pro centrální nervový systém [83]. Z těchto důvodů byl bilirubin dlouho považován za látku nebezpečnou. Studie posledních let však ukazují, že mírně zvýšené hladiny bilirubinu mají naopak protektivní účinek. Tento účinek je podmíněn především jeho antioxidačními vlastnostmi [83, 84].

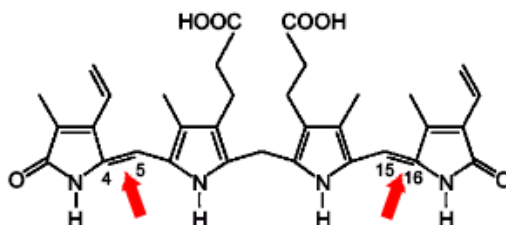
2.4.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Jak již bylo zmiňováno výše, bilirubin je tetrapyrrolová nepolární sloučenina. V nekonjugované formě se jedná o lineární strukturu, která je označována jako IX α (4Z, 15Z). Toto pojmenování vyjadřuje skutečnost, že se bilirubin vytváří z izomeru IX protoporfyrinu rozštěpením jeho α -methinového můstku a že jeho stereochemické uspořádání uhlíků v poloze 4 a 15 je v konfiguraci Z (*viz obr. č. 11*). V této podobě se bilirubin přirozeně vyskytuje v lidském těle [85, 86].

Obrázek č. 11: 4Z, 15Z-bilirubin IX α [2013-12-20].

<<http://www.anaesthetist.com/icu/specpl/neonate/Findex.htm#index.htm>>.

Na obrázku je znázorněna lineární tetrapyrrolová struktura, ve které se bilirubin přirozeně vyskytuje v těle člověka [85, 86].

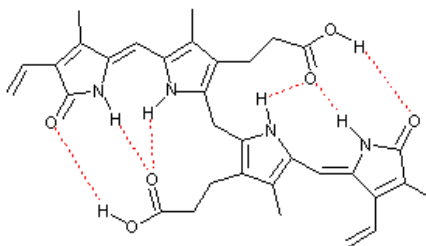


Karboxylová skupina kyseliny propionové postranních řetězců a C = O a NH skupiny postranních pyrrolových kruhů mají tendenci vytvářet vodíkové můstky vždy s protilehlou polovinou molekuly (viz obr. č. 12). Díky těmto intramolekulovým vazbám nemohou být polární skupiny vystaveny vodnímu prostředí, a bilirubin se tudíž chová jako hydrofobní látka [86].

Obrázek č. 12: Konformace 4Z, 15Z-bilirubinu IX α [2013-12-20].

<http://cpr.molsci.ucla.edu/cpr/cpr_info/rsc_preview.asp?a_id=700060&r_id=res4&e=e>.

Rovinné zobrazení trojrozměrného uspořádání molekuly bilirubinu s vodíkovými můstky [86].



Ostatní známé izomery bilirubinu (IX β , IX γ , IX δ) se od sebe navzájem odlišují místem rozštěpení porfyrinového kruhu (každý izomer se štěpí v jiném methinovém můstku). Ve žluči je najdeme pouze ve stopových množstvích. Jedná se o izomery, které nevytvářejí vodíkové můstky. Z toho důvodu jsou ve vodě rozpustné a nevyžadují k transportu vodním prostředím konjugaci [85, 86].

2.4.3 Metabolismus

Zhruba 80% bilirubinu vzniká odbouráváním hemu v játrech, který se do systémové cirkulace uvolňuje po degradaci červených krvinek. Zbývajících 20% je tvořeno přeměnou bílkovin, ve kterých je hem obsažen. Jedná se např. o myoglobin, cytochromy či některé enzymy [85].

„Hem je červenohnědý cyklický tetrapyrolový porfyrin s centrálně navázaným atomem železa“ [85]. Tento porfyrin je v endoplazmatickém retikulu buněk monocytomakrofágového systému napadán mikrosomálním enzymem hemoxygenázou [85, 87]. Dochází tak k oxidaci dvojmocného železa na trojmocné, které v této formě koluje v těle [87]. Tento enzym dále katalyzuje oxidativní štěpení α -methinového můstku. Jeho uhlík zoxiduje na oxid uhelnatý, který je eliminován plícemi [85, 87]. Hemoxygenáza tedy v podstatě roztrhne porfyrin, z něhož se vytvoří lineární tetrapyrrol. Nově vzniklou látku nazýváme biliverdin (*viz obr. č. 13*). Biliverdin je zelené barvivo, které v malém množství nacházíme ve žluči [87]. Jeho většina se dále přeměňuje na bilirubin pomocí biliverdinreduktázy, která hydrogenuje methinový můstek na methylenový (*viz obr. č. 13*) [85, 87].

Nově vzniklý bilirubin je transportován do jater prostřednictvím systémové cirkulace, kde je navázán na bílkovinu albumin. Nepolární bilirubin je albuminem solubilizován, čímž je zprostředkován jeho transport krevní plazmou [85].

V játrech dochází k disociaci vazby mezi bilirubinem a albuminem. Uvolněný bilirubin prochází přes membránu do cytosolu pomocí specifického přenašeče. Zde se navazuje na transportní proteiny Y a Z, kterými je přenášen do endoplazmatického retikula, kde dochází ke konjugaci s UDP-glukuronátem. Dva glukuronátové zbytky se zde konjugují se dvěma zbytky kyseliny propionové, které jsou součástí bilirubinu. Tuto reakci katalyzuje enzym UDP-glukuronyltransferáza za vzniku bis-glukosiduronátu bilirubinu (neboli diglukuronidu podle staršího názvosloví) (*viz obr. č. 13*). V malém množství se vytváří také monoglukosiduronát. Konjugovaný bilirubin se díky uvolnění vodíkových vazeb stává velmi polárním, a tedy rozpustným ve vodném prostředí [87].

Díky nově získané polaritě může být diglukuronid transportován žlučí. Touto cestou putuje do tenkého střeva a z tenkého střeva do střeva tlustého [85]. Zde jsou pomocí bakteriálního enzymu β -glukuronidázy odštěpeny zbytky kyseliny glukuronové. Poté následuje hydrogenace prostřednictvím bakteriálních reduktáz, během níž se

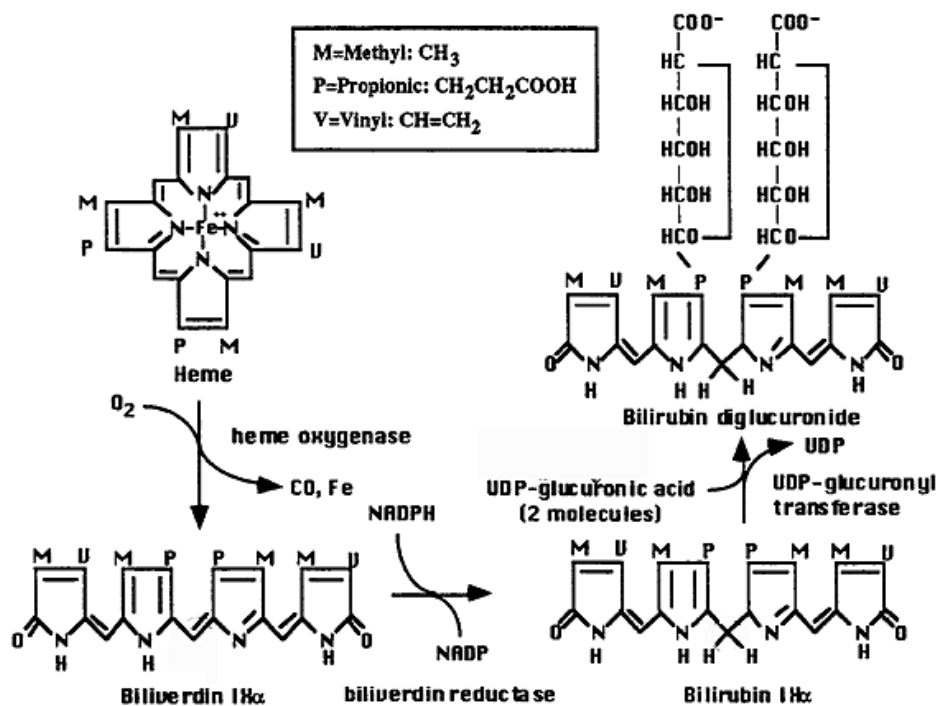
vytvářejí hydroderiváty, které se obecně nazývají urobilinoidy. Urobilinoidy jsou z těla vylučovány stolicí [85, 88].

Za určitých podmínek se část urobilinoidů společně s nekonjugovaným bilirubinem zpětně vstřebává v tlustém střevě a portální krví se navrácí zpátky do jater. V játrech dochází k jejich opětovnému vyloučení do žluče nebo do systémové cirkulace. Hovoříme o tzv. enterohepatální cirkulaci [85].

Obrázek č. 13: Metabolismus bilirubinu [2013-12-21].

<http://www.nbs.csudh.edu/chemistry/faculty/nsturm/CHE452/13_Heme%20Metabolism.htm>.

Na obrázku můžeme vidět chemicky znázorněnou metabolickou dráhu bilirubinu od jeho vzniku z hemu až po tvorbu polárních konjugátů. Vlevo nahoře je vyobrazena tetrapyrrolová struktura hemu, který se působením hemoxygenázy mění na biliverdin. Vedlejšími produkty reakce jsou oxid uhelnatý a trojmocné železo. Prostřednictvím biliverdinreduktázy (na obrázku dole) je biliverdin redukován na bilirubin, který je v játrech posléze přeměněn na bis-glukosiduronáty prostřednictvím UDP-glukuronyltransferázy (viz pravý horní roh).



2.4.4 Familiární hyperbilirubinemie

Mezi familiární hyperbilirubinemie řadíme hyperbilirubinemie konjugované a nekonjugované. Jak již ze samotného názvu plyne, konjugované hyperbilirubinemie jsou ty, u kterých nacházíme zvýšené hladiny konjugovaného bilirubinu. V případě nekonjugovaných hyperbilirubinemií dochází ke zvýšení bilirubinu nekonjugovaného.

Mezi konjugované hyperbilirubinemie patří Dubinův-Johnsonův syndrom a syndrom Rotorův. Příčinou Dubinova-Johnsonova syndromu je defektní vylučování bilirubinglukosiduronátových konjugátů z hepatocytů [89]. Projevuje se intermitentní žloutenkou a charakteristická jsou pro něj tmavě pigmentovaná játra. Rotorův syndrom je v podstatě obdobou téhož, v játrech se však neobjevuje tmavý pigment [90]. Ani u jednoho onemocnění není nutná léčba, jelikož hodnota hyperbilirubinemie nedosahuje orgánové toxicity, a jejich prognóza je tedy příznivá [91].

Nekonjugované hyperbilirubinemie můžeme rozdělit na hyperbilirubinemie vrozené a získané [85]. Příčinou vrozených hyperbilirubinemií je porušená glukuronidace v játrech způsobená deficitem UDP-glukuronyltransferázy. Řadíme mezi ně tzv. Gilbertův syndrom a Crigler-Najjarův syndrom I. a II. typu [85, 89]. Zatímco Crigler-Najjarův syndrom je poměrně vzácným, avšak velmi závažným onemocněním, v případě Gilbertova syndromu hovoříme o tzv. benigní hyperbilirubinemii, která je pouze mírná [85]. Rozdíl mezi I. a II. typem Crigler-Najjarova syndromu spočívá v tom, že deficit UDP-glukuronyltransferázy je u II. typu pouze částečný, zatímco u I. typu postrádáme tento enzym úplně. Z toho tedy plyne, že II. typ tohoto onemocnění má daleko lepší prognózu a pacienti se, na rozdíl od I. typu, dožívají běžného věku. Rozdíl mezi těmito dvěma syndromy můžeme mimo jiné pozorovat také ve způsobu léčby. Zatímco jsou u II. typu Crigler-Najjarova syndromu dobré zkušenosti s induktorem konjugace fenobarbitalem, u I. typu je prakticky neúčinný. Místo něj je současnou nejúčinnější léčbou fototerapie. Jejím prostřednictvím dochází k fotoizomerizaci bilirubinu, který se tak stává ve vodě rozpustnějším. Poslední alternativou v léčbě Crigler-Najjarova syndromu I. typu zůstává transplantace jater, kterou je však nezbytné provádět v mladém věku pacienta [92].

Získanou formou nekonjugované hyperbilirubinemie je např. novorozenecká žloutenka [85]. Zhruba 5% narozených dětí trpí tímto onemocněním, jelikož je produkce bilirubinu u novorozenců až trojnásobně vyšší než u dospělých jedinců. Jsou-

li hladiny bilirubinu nebezpečně vysoké, hrozí jeho přestup přes hematoencefalickou bariéru a následné neuronální poškození – tzv. kernicterus. Základní léčbou novorozenecké žloutenky je fototerapie [93].

2.4.4.1 Gilbertův syndrom

Jak již bylo nastíněno výše, příčinou Gilbertova syndromu je mutace genu pro UDP-glukuronyltransferázu, která je nezbytná pro glukuronidaci. Díky této mutaci je aktivita enzymu snížena. Vzhledem k tomu, že se jedná o nejmírnější formu familiární nekonjugované hyperbilirubinemie, nedochází zde k poškození jater ani zjevné hemolýze, a syndrom tedy nevyžaduje žádnou léčbu. To je také důvod, proč ho současná odborná veřejnost nepovažuje za onemocnění. K některým onemocněním mají však lidé s tímto syndromem větší předpoklady. Jedná se např. o pigmentovou cholelithiázu. Mechanismus vzniku tohoto typu žlučových kamenů spočívá pravděpodobně v tom, že díky nedostatečné glukuronidaci vznikají v játrech ve větším množství monokonjugáty bilirubinu, které jsou následně odváděny do žluče. Tyto monokonjugáty jsou náchylnější k hydrolyze, prostřednictvím které vzniká nekonjugovaný bilirubin. Ten vytváří s vápenatými ionty nerozpustné soli, jež jsou podstatou žlučových pigmentových kamenů. Kromě žlučových kamenů hrozí jedincům s Gilbertovým syndromem také vznik nežádoucích účinků léků, které se stejně jako bilirubin metabolizují přes UDP-glukuronyltransferázu. Všechna tato negativa, která s sebou Gilbertův syndrom nese, jsou na druhou stranu vyvážena antioxidačními účinky bilirubinu, jež jsou v současnosti předmětem nejednoho zkoumání.

Ačkoliv pro prevalenci Gilbertova syndromu v České Republice data chybí, podle zahraničních studií můžeme předpokládat, že se pohybuje kolem 5-10%. Častěji se tento syndrom vyskytuje u mužů. Důvodem jsou hormonální vlivy na konjugaci bilirubinu v játrech žen, díky kterým jsou ženské sérové hladiny bilirubinu nižší.

Hladiny bilirubinu v séru kolísají také během dne. Ráno jsou vůbec nejvyšší a v průběhu dne dochází k jejich snižování. Větší rozdíly mezi ranními a odpoledními hodnotami nalézáme právě u lidí s Gilbertovým syndromem. Dalšími faktory, které sérové hladiny bilirubinu ovlivňují, jsou hladovění, nadužívání alkoholu, dieta, fyzická aktivita, další přidružená onemocnění a menstruační cyklus. Hladina izolované

nekonjugované hyperbilirubinemie se obvykle pohybuje mezi 17-70 $\mu\text{mol/l}$, výjimečně se může vyšplhat až na 100 $\mu\text{mol/l}$ [94].

Co se klinických projevů týče, jedná se většinou o asymptomatické onemocnění, které je často diagnostikováno pouhou náhodou. Někdy se může objevit únava, bolest v pravém podžebří nebo dyspepsie [94, 95]. Problémy se často zhoršují s fyzickou nebo psychickou zátěží, přidruženou nemocí nebo operací [95]. Poslední dobou však vyvstává otázka, do jaké míry se skutečně jedná o projevy onemocnění a do jaké míry jsou tyto příznaky psychosomatického původu [94]. Objektivním nálezem je v současnosti pouze subikterus sklér [95].

K ověření diagnózy se dříve používaly dva jednoduché testy – test hladověním a test s fenobarbitalem. V případě hladovění dochází ke zvýšení hladin sérového bilirubinu o více jak 100%, u fenobarbitalového testu se tyto hodnoty v důsledku enzymové indukce naopak snižují [94, 95]. Vzhledem k tomu, že jsou oba testy jen velmi málo specifické, bylo od jejich používání postupem času upuštěno [94].

2.4.5 Protektivní účinky bilirubinu

Jak již bylo několikrát zmiňováno, má bilirubin prokázaný antioxidační účinek. Tento účinek hraje velkou roli především u nemocí, na jejichž vzniku se významně podílí oxidační stres. Mezi takováto onemocnění řadíme např. aterosklerózu, některé nádorové choroby a zánětlivá, autoimunitní nebo neurodegenerativní onemocnění. Zároveň, jsou-li sérové hladiny bilirubinu nízké, zvyšuje se nebezpečí vzniku těchto nemocí [83]. Antioxidační účinek bilirubinu je dán především jeho chemickou strukturou. Největší význam má pravděpodobně C10 methylenová skupina, která poskytuje elektrony reaktivním formám kyslíku. Dalším vysvětlením tohoto účinku může být také fakt, že bilirubin inhibuje NADPH-oxidázu, která je důležitým zdrojem oxidantů v buňkách [96]. S antioxidačním účinkem úzce souvisí účinek antiaterogenní. Oba dva jsou zřejmě výsledkem schopnosti bilirubinu inhibovat oxidaci LDL a dalších lipidů, vychytávat kyslíkové radikály a potlačovat oxidační stres [97]. Kromě již zmiňovaných účinků vykazuje bilirubin také významný protizánětlivý efekt. Mechanismů, kterými ho lze vysvětlit, existuje několik. Především se jedná o narušení interakce mezi imunoglobuliny IgG a IgM a C1-složkou komplementu. Dalším pravděpodobným mechanismem je potlačení komplementem zprostředkované

hemolýzy a cytotoxicity závislé na protilátkách. Důležitou roli hraje také schopnost bilirubinu ovlivňovat syntézu prostaglandinů. V neposlední řadě dochází prostřednictvím této látky k potlačení aktivace a adheze leukocytů a transendotelové migrace monocytů. Zajímavá je rovněž skutečnost, že albumin, který bývá součástí zánětlivého výpotku, umožňuje přechod bilirubinu přes stěnu cév do míst, kde hrozí poškození kyslíkovými radikály [96]. Mluvíme-li o protektivních účincích bilirubinu, nesmíme opomenout ani účinek antiproliferativní [97]

Ochranné účinky bilirubinu byly objeveny v podstatě nedávno a některé studie, které k tomuto objevu přispěly, určitě stojí za zmínku. Několik z nich ukázalo, že podávání bilirubinu má silný cytoprotektivní účinek v celé řadě patofyziologických stavů. Mezi ně patří např. ischemicko-reperfuční poškození nebo rejekce transplantátu [98]. V případě rejekce transplantátu bylo u myšího modelu transplantace jater potvrzeno, že exogenní podávání bilirubinu vykazuje stejný pozitivní efekt jako indukce HO-I. Zvláště hodnotné se zdají být účinky bilirubinu v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Bylo prokázáno, že lehce zvýšené hladiny sérového bilirubinu snižují riziko vzniku ischemické choroby srdeční a aterosklerózy u lidí. Další výsledky studií dokládají, že indukce bilirubinu zprostředkovaná pomocí HO-I vede ke snížení oxidačního stresu u renální ischemie a poskytuje cytoprotekci kardiomyocytům a neuronům, které jsou oxidačnímu stresu vystaveny [99]. Na zvířecím modelu byla mimo jiné prokázána ochranná funkce bilirubinu proti experimentálně vyvolanému zánětu. U experimentálního modelu astmatu BR dokonce snižoval prostupnost leukocytů do míst zánětu prostřednictvím interakce s adhezními molekulami. Nedávno bylo rovněž zjištěno, že u myšího modelu sepse blokuje jediná dávka BR toxicitu endotoxinu [100]. Exogenní suplementace bilirubinem se dále osvědčila u myšího modelu roztroušené sklerózy, kde snižovala oxidativní poškození míchy [99]. Epidemiologické studie také prokázaly, že mírně zvýšené koncentrace sérového bilirubinu jsou spojeny s nižším výskytem kolorektálního karcinomu [100].

2.4.6 Protektivní účinky hemoxygenázy-I

Enzym hemoxygenázu (HO) můžeme v lidském organismu najít ve dvou izoformách. Jedná se o hemoxygenázu-I, která je indukovatelná, a hemoxygenázu-II, která je označována jako konstitutivní [101]. Zatímco HO-II reguluje fyziologické

buněčné funkce, HO-I je indukována v rámci odpovědi na tkáňové poškození [99]. Nějakou dobu se rovněž hovořilo o existenci dalšího izoenzymu – HO-III. Tato teorie však nebyla potvrzena, jelikož se dospělo k závěru, že HO-III je pouhým nositelem pseudogenů pocházejících z transkriptů HO-II [102].

HO-I je mimo jiné považována za nejvíce indukovatelný enzym v těle [101]. Ačkoliv je exprimována prakticky ve všech tkáních a buňkách, za její imunomodulační funkci, zdá se, zodpovídá především HO-I přítomná v mononukleárních fagocytech a endoteliálních buňkách [103]. Za normálních podmínek nalezneme nejvíce HO-I ve slezině, játrech a kostní dřeni, jelikož zde dochází k degradaci červených krvinek. Ve většině ostatních tkání, které nejsou přímo zahrnuty v metabolismu hemoglobinu nebo erytrocytů, se HO-I běžně vyskytuje jen ve velmi malých, skoro až nedetekovatelných množstvích. Přitom je ale schopná velmi rychle reagovat na nejrůznější chemické a fyzikální podněty a zvýšit svou transkripční aktivitu [102]. HO-I je navíc aktivní i v případě, že je koncentrace jejích substrátů velmi nízká, a její aktivita se zvyšuje úměrně fyziologické koncentraci hemu. HO-II je naproti tomu schopná dosáhnout pouze 10% aktivity HO-I [93]. Vzhledem k tomu, že HO-I hraje důležitou roli v ochraně před oxidačním stresem, lze ji snadno indukovat faktory, které tento stres vyvolávají (hem, volné kyslíkové radikály, těžké kovy, bakteriální lypopolysacharidy, peroxid vodíku, UV záření, prozánětlivé cytokiny nebo tepelný šok) [101].

Nedávné studie prokázaly, že exprese HO-I může v rámci odpovědi na různé mediátory zánětu přispívat k potlačení zánětu a má protektivní účinky proti oxidačnímu poškození na celou řadu orgánů. Mechanismus protizánětlivého působení HO-I je prozatím velmi málo popsán [104]. Kromě antioxidačního a protizánětlivého účinku má tento enzym také účinky cytoprotektivní a antiapoptické [93, 105]. Všechny jsou v podstatě zprostředkovány prostřednictvím biliverdinu, bilirubinu a oxidu uhelnatého, které díky hemoxygenáze vznikají [105]. Z hlediska metabolismu je HO-I navíc velmi důležitá pro potenciaci účinku celé řady humánních léčiv (acetylsalicylové kyseliny, imunosupresiv nebo statinů), cytokinů a růstových faktorů [101].

V gastrointestinálním traktu je hemoxygenáza-I přímo indukována v rámci odpovědi na oxidační stres a zánět. Nedávné studie naznačují, že indukce exprese HO-I hraje významnou protektivní roli u modelů střevního poškození (modely indukované ischemicko-reperfučním poškozením, indometacinem, trinitrobenzensulfonovou kyselinou nebo dextran sulfátem sodným). Kromě této skutečnosti se oxid uhelnatý odvozený od HO-I prokazatelně podílí na regulaci gastrointestinální motility. Nejen

díky těmto datům můžeme předpokládat, že by se HO-I mohla stát terapeutickým terčem budoucnosti v oblasti gastrointestinálních chorob [104].

Exprese HO-I je také nedílnou součástí mnoha dalších chorobných stavů. Mezi tyto stavy patří např. ateroskleróza, hypertenze, rejekce transplantátu, akutní poškození ledvin a rakovina [106]. Dále sem můžeme zařadit revmatologická a neuropsychiatrická onemocnění a v neposlední řadě také diabetes [97].

2.4.6.1 Hemoxygenáza-I a zánět

Z výše uvedeného vyplývá, že HO-I hraje velmi důležitou roli v procesu zánětlivé odpovědi. Tento fakt je v současné době podložen nejednou studií. Několik z nich prokazatelně potvrdilo, že inhibice HO-I signifikantně zvyšuje množství zánětlivého infiltrátu [93, 106]. Stejně tak je tomu u knockoutovaných myši nebo u lidí, kterým tento enzym od narození chybí. U knockoutovaných myši je typickým projevem nedostatku HO-I především anémie, depozity železa v tkáních a těžké zánětlivé projevy (zvětšená slezina a lymfatické uzliny, infiltrace zánětlivých buněk v játrech, vaskulitida nebo glomerulonefritida). Tyto myši jsou mimo jiné velmi náchylné k oxidativnímu poškození a endotoxinem zprostředkované buněčné smrti. Typická je pro ně růstová retardace a sklony k potratům. Prakticky jediný zaznamenaný lidský případ vykazoval velmi podobné symptomy [93, 99, 107].

Indukce hemoxygenázy-I má naproti tomu za následek významnou redukci zánětu. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese HO-I v srdci chrání transgenní myši proti ischemicko-reperfučnímu poškození. Overexprese HO-I v plicích zase pomáhá předcházet rozvoji plicní hypertenze a vaskulární hypertrofie indukované chronickou hypoxií. Nedávné studie navíc potvrdily význam HO-I při procesu hojení ran, kdy dochází k její overexpresi přímo v kůži [107]. Všechna tato data jasně poukazují na fakt, že aktivita HO-I ovlivňuje zánětlivou odpověď a je klíčovým mechanismem v obraně proti tkáňovému poškození [93, 106, 107].

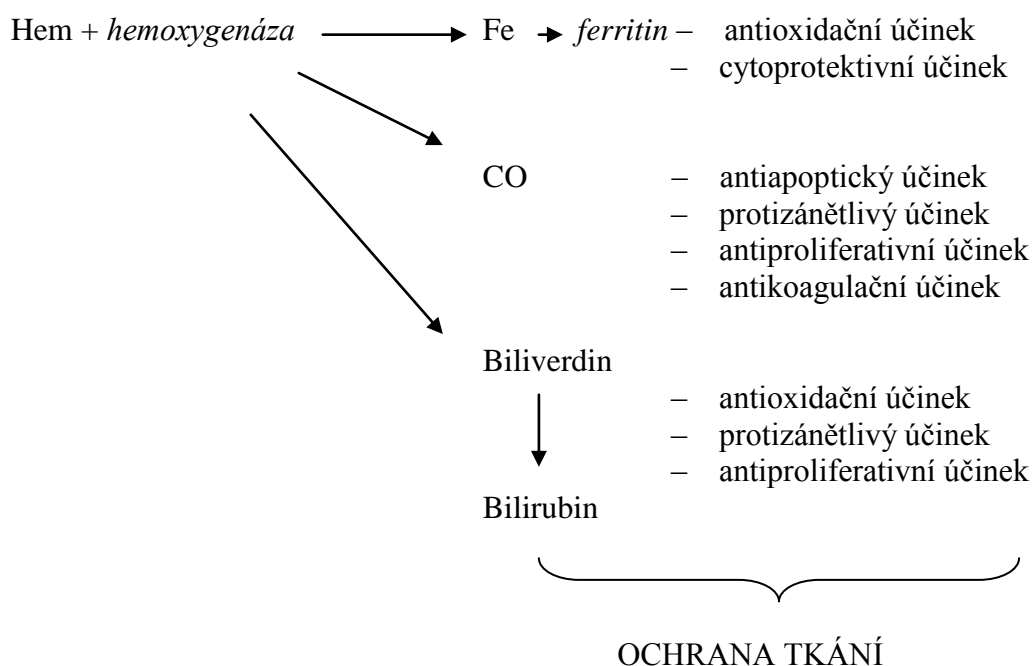
HO-I je mimo jiné upregulována prostřednictvím protizánětlivých mediátorů, např. pomocí IL-10 [93, 106]. Zajímavé je, že kromě protizánětlivých mediátorů indukují expresi HO-I také mediátory prozánětlivé, jako např. TNF- α nebo IL-1. U IL-13, imunoregulačního cytokinu, který je klíčovým mediátorem alergické zánětlivé reakce, byla schopnost indukce exprese HO-I rovněž prokázána. Navíc bylo zjištěno, že

některé adhezní molekuly, které jsou klíčovými mediátory zánětu, jako ICAM-1, VCAM-1 nebo selektiny, jsou aktivovány stejnými induktory jako HO-I [106]. Přitom právě snížení exprese adhezních molekul je jedním z předpokládaných mechanismů cytoprotektivního působení tohoto enzymu. Nesmíme ovšem zapomenout zmínit, že příliš vysoké hodnoty HO-I vedou k tkáňovému poškození způsobenému vysokými hladinami železa a hyperbilirubinemií [93].

2.4.6.2 Předpokládané mechanismy protizánětlivého působení HO-I

Ačkoliv byly cytoprotektivní účinky HO-I potvrzeny na řadě experimentálních modelů, přesný mechanismus tohoto působení nebyl do dnešního dne zcela objasněn. Na základě celé řady studií z posledních let lze předpokládat, že degradace prozánětlivé a prooxidační molekuly hemu, signalizační funkce oxidu uhelnatého, antioxidační schopnosti bilirubinu a sekvestrace železa pomocí ferritinu zapřičiňují dohromady protizánětlivé působení hemoxygenázového systému (*viz schéma č. 1*). V podstatě lze tedy říci, že tento systém přeměňuje prooxidační a prozánětlivou molekulu na molekuly protizánětlivé a antioxidační [98, 99, 105].

Schéma č. 1: Mechanismus protizánětlivého působení HO-I [107].



3 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledovat a popsat změny exprese hemoxygenázy-I ve stěně tlustého střeva normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn) potkanů po indukci akutního a chronického zánětu. Tento zánět byl indukován prostřednictvím dextran sulfátu sodného a celý experiment byl vyhodnocen pomocí imunohistochemických metod.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika pokusných zvířat, design experimentu

Pro tuto studii byly použity samice hyperbilirubinemických potkanů kmene Gunn. Druhou skupinu tvořili jejich normobilirubinemiční heterozygotní sourozenci (opět samice). Hmotnost hyperbilirubinemických potkanů činila v průměru 200-220 g, normobilirubinemiční potkani dosahovali váhy v rozmezí 270-290 g. Voda a potrava byly zvířatům poskytovány bez omezení podle jejich libosti.

Před začátkem studie byla zvířata přeléčena ivermektinem (Ivomec), jednorázovou dávkou 300 µg/kg/den. Toto antiparazitikum bylo potkanům podáno v pitné vodě za účelem eliminovat falešně pozitivní výsledky způsobené chronickým střevním zánětem, který by parazitární střevní infekce vyvolala. Účinnost antiparazitární léčby byla prokázána mikroskopicky. Po léčbě nebyly zjištěny žádné pozitivní výsledky.

Pro studii byly vybrány experimentální modely akutní i chronické chemicky indukované kolitidy. U akutního modelu kolitidy byl zvířatům (hyperbilirubinemickým i normobilirubinemickým) v pitné vodě podáván 4% dextran sulfát sodný po dobu pěti dnů. V případě chronické kolitidy dostávali potkani (opět obě skupiny) do pitné vody 2% DSS sedm po sobě jdoucích dní. Podávání dextran sulfátu sodného bylo následně vystřídáno pouhým podáváním pitné vody po dobu 14 dnů. Tento celý cyklus byl uskutečněn celkem třikrát. Současně byly ve studii použity kontrolní skupiny jak normobilirubinemických, tak hyperbilirubinemických potkanů, kterým nebyl DSS podáván vůbec.

4.1.1 Potkani kmene Gunn

Potkani kmene Gunn se vyznačují hereditární nehemolytickou nekonjugovanou hyperbilirubinemií, která je způsobená absencí UDP-glukuronyltransferázy. V podstatě se tedy jedná o zvířecí model lidského Crigler-Najjarova syndromu.

Tyto mutantní potkani byli poprvé pozorováni v Connaughtově laboratoři v Torontu v roce 1938. Jednalo se o spontánní mutaci, která se tehdy objevila v kolonii potkanů Wistar¹⁵. Charakteristická pro potkany kmene Gunn je žloutenka, která je přenášena jako autosomálně recesivní¹⁶ onemocnění. Zajímavé je, že na těchto zvířatech nebyly realizovány žádné studie až do roku 1957. Mutantní potkani tak mohli být navzdory ztraceni, nebýt profesora Williama E. Castela, který tuto kolonii po dobu téměř dvaceti let udržoval, vyčkávaje na rozvoj moderní enzymologie.

Heterozygotní potkani tohoto kmene známky žloutenky nevykazují. Jejich játra sice tvoří glukuronidy méně ochotně, avšak daleko ochotněji, než je tomu u homozygotních jedinců. To tedy v podstatě znamená, že enzymatický defekt není u heterozygotních potkanů natolik závažný, aby mohl vyústit v retenci bilirubinu v plasmě.

Žluč získaná z Gunn potkanů je kvůli nepřítomnosti glukuronidů bilirubinu téměř bezbarvá a obsahuje pouze stopové množství bilirubinu nekonjugovaného. Homozygotní potkani kmene Gunn produkují žlučový pigment běžnou rychlostí a množství nekonjugovaného bilirubinu v séru a tkáních je navzdory neschopnosti jater bilirubin konjugovat relativně konstantní. Tento fakt nasvědčuje skutečnosti, že je žlučový pigment těchto potkanů pravděpodobně odstraňován z těla prostřednictvím nějaké jiné metabolické cesty [108].

¹⁵ Wistar potkan pochází z outbreední (geneticky nedefinované) linie potkanů. Tato linie byla vyšlechtěna v roce 1906 ve Wistar institutu za účelem využití v biologickém a lékařském výzkumu. Jedná se v podstatě o první modelový organismus potkana. Tito potkani se vyznačují především albinismem, širokou hlavou, dlouhými ušima a ocasem kratším než tělo. I v dnešní době zůstává Wistar potkan jedním z nejčastěji používaných modelových organismů v oblasti laboratorního výzkumu [109].

¹⁶ Autosomálně recesivní onemocnění se projeví pouze u recesivních homozygotů, kteří mají obě recesivní alely mutované. To tedy znamená, že tito jedinci obdrželi mutovanou recesivní alelu od otce i od matky. Heterozygoti jsou ve většině případů pouhými přenašeči těchto nemocí, jelikož jedna mutovaná recesivní alela autosomálně recesivní onemocnění nezpůsobuje. U některých chorob můžeme však určité symptomy pozorovat i v případě heterozygotních jedinců [110].

4.2 Imunohistochemie

Imunohistochemie je histologická metoda prokazující přítomnost a lokalizaci různých proteinů (antigenů) v tkáňových řezech [111, 112]. Tato metoda je hojně používána pro posuzování progresu a léčby nejrozličnějších onemocnění, např. rakoviny.

Imunohistochemické barvení se provádí pomocí protilátek, které cílový protein rozpoznávají. Vzhledem k tomu, že jsou tyto protilátky vysoce specifické, vážou se pouze na požadovaný protein, nikoliv na jiné proteiny, které jsou v tkáňových řezech přítomny [111]. Na protilátce je navázána další chemická sloučenina – zpravidla enzym nebo fluorofor [111, 112]. Je-li s protilátkou konjugován enzym, používá se k vizualizaci interakce antigen-protilátka chromogenní detekce. Během ní štěpí tento enzym přidávaný substrát za vzniku barevné reakce v místě proteinu. V případě fluorescenční detekce je protilátka konjugovaná s fluoroforem, který je zobrazen pomocí fluorescenční mikroskopie [111].

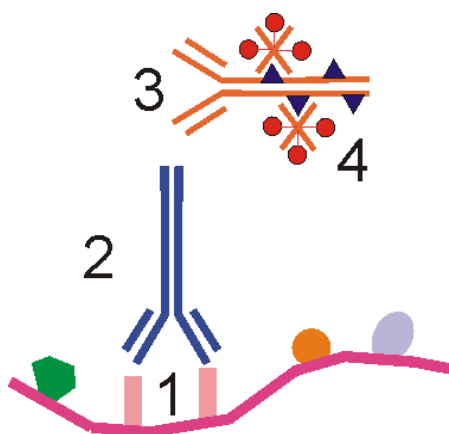
4.2.1 Avidin-biotin-peroxidázová metoda

V případě této metody hovoříme o jednom z nejcitlivějších, nejekonomičtějších a nejspolehlivějších imunoperoxidázových systémů vůbec. Vysoká citlivost má velký přínos především pro antigeny, které se v tkáních objevují jen v malých množstvích. Další výhodou je možnost zkrácení času barvení [113]. Pro všechny avidin-biotinové metody je zásadní silná afinita avidinu nebo streptavidinu k vitamínu biotinu. Avidin (pocházející z kuřecích vajec) i streptavidin (pocházející ze *Streptomyces avidinii*) poskytují biotinu celkem čtyři vazebná místa [114]. Jelikož je afinita mezi avidinem a biotinem zhruba milionkrát vyšší než mezi antigeny a protilátkami, jedná se v podstatě o ireverzibilní vazbu [113]. Díky tomu je tato metoda také nazývána metodou avidin-biotinového komplexu (ABC metoda). Molekula biotinu je rovněž snadno konjugovatelná s protilátkami a enzymy. To je velmi důležité pro konjugaci biotinu se sekundárními protilátkami. Tyto protilátky potom slouží jako jakýsi můstek mezi primárními protilátkami navázanými na tkáňové antigeny a avidin-biotin-peroxidázovým komplexem (*viz obr. č 14*) [114].

Obrázek č. 14: Avidin-biotin-peroxidázová metoda [2013-01.19].

<http://www.oncoprof.net/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-texte/dg_gb_ap_tech06.html>.

Princip této metody spočívá v navázání neznačené primární protilátky na antigeny ve zkoumané tkáni. Na primární protilátku poté nasedá sekundární biotinylovaná protilátka, na kterou se později váže avidin-biotin-peroxidázový komplex [84]. 1 – antigen, 2 – primární protilátka, 3 – sekundární biotinylovaná protilátka, 4 – avidin-biotin-peroxidázový komplex.



4.2.2 Detekce hemoxygenázy

Expres hemoxygenázy-I byla detekována pomocí ABC metody (DAKO EnVision). Pro vizualizaci antigenů ve tkáni byl použit DAB (diaminobenzidin) chromogen (DAKO), který se v případě pozitivní reakce barví dohněda.

4.2.2.1 Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek pomocí diaminobenzidinu byl použit světelný mikroskop Olympus BX. Fotodokumentace a digitalizace snímků byla realizována pomocí digitální kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp.). K práci byl po celou dobu využíván software LUCIA verze 5.0 (Laboratory Imaging).

4.2.2.2 Použité protilátky

Jako primární protilátka se pro světelnou mikroskopii uplatnila monoklonální protilátka rabbit anti-rat HO-I (Abcam) ve zředění 1:50.

Jako sekundární protilátka byla použita monoklonální protilátka goat anti-rabbit (DAKO).

4.2.2.3 Pracovní postup

Jednotlivé řezy byly na dvě hodiny vloženy do formaldehydových par, čímž bylo dosaženo jejich fixace a lepší adheze k podložnímu sklíčku. Po tomto procesu byly preparáty odparafinovány pomocí řady 3x xylen, aceton, ethanol 70%, ethanol 96% a destilovaná voda (vše po pěti minutách). Následovalo povaření v roztoku citrátu o pH 6 (3x5 minut) za účelem odkrytí antigenů na povrchu buněk, a tedy usnadnění pozdějšího navázání primární protilátky. Poté se sklíčka vložila na pět minut do roztoku PBS (phosphate buffered saline – pH 7,4).

Ještě předtím, než mohly být řezy inkubovány s primární protilátkou, bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa. Toho bylo dosaženo pomocí 10% roztoku goat sera (Sigma Aldrich) v PBS. Následovala čtyřiašedesátihodinová inkubace s primární protilátkou při teplotě okolo 4°C.

Druhý den se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Po promytí byly přesunuty do 3% roztoku peroxidu vodíku (15 minut) za účelem eliminace falešně pozitivní reakce při aplikaci chromogenu (peroxid vodíku vyčerpá peroxidázu, která může být v tkáňových řezech přítomná). Po opětovném oplachu v PBS (2x5 minut) byla provedena inkubace se sekundární protilátkou při pokojové teplotě (30 minut). Poté se preparáty znovu vložily do roztoku PBS (2x5 minut).

Pro vizualizaci sekundární protilátky značené peroxidázou byl použit chromogen DAB (DAKO) (15 sekund). Po aplikaci chromogenu se řezy propláchly roztokem PBS a byly dobarveny hematoxylinem (5 sekund + 1 minuta modráni). Nakonec byly jednotlivé preparáty opláchnuty v acetonu a odvodněny pomocí řady aceton-xylen (10:1), aceton-xylen (1:10) (obojí po třech minutách) a 3x xylen (po dvou minutách). Po odvodnění byla sklíčka zamontována do Eukittu (Fluka Analytical).

Protokol

1. fixace ve formaldehydových parách (2 hod)
2. odparafinování (3x xylen, aceton, ethanol 96%, ethanol 70%, destilovaná voda) (5 min)
3. vaření v citrátu o pH 6 (3x5 min)
4. promytí v PBS (5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra v PBS (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace přes noc)
7. promytí v PBS (2x5 min)
8. promytí v 3% H₂O₂ (15 min)
9. promytí v PBS (2x5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2x5 min)
12. aplikace roztoku chromogenu (inkubace 15 sec)
13. propláchnutí v PBS
14. dobarvení jader hematoxylinem (5 sec + 1 min modrání)
15. opláchnutí v acetonu
16. odvodňování (aceton-xylen (10:1), aceton-xylen (1:10)) (3 min) + odvodňování (3x xylen) (2 min)
17. zamontování do Eukittu

5 VÝSLEDKY

5.1 Histologická analýza

Histologická analýza se zaměřila na sledování morfologických změn ve stěně tlustého střeva po akutním či chronickém podávání DSS u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických potkanů. Byl hodnocen distální úsek střeva cca 2-5 cm od *recta*, který bývá u kolitidy indukované pomocí DSS nejvíce poškozen.

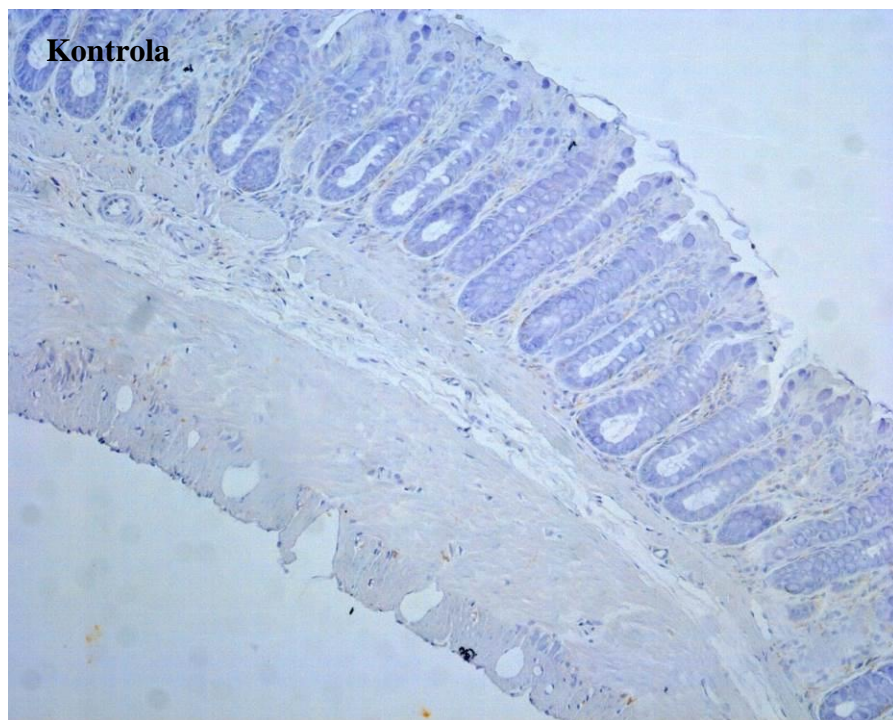
Z hlediska histologie jsme nepozorovali žádné morfologické rozdíly mezi normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířaty, kterým nebyl podáván DSS. Pozorovali jsme dlouhé Lieberkühnovy krypty zasahující až k *lamina propria mucosae*. Poškození epitelálních buněk ani infiltrace granulocytů nebo dalších imunitních buněk nebyly patrné (*viz obr. č 15*).

Podávání DSS vedlo k jistým změnám zejména v oblasti *tunica mucosa*. Typické změny byly patrné především po dlouhodobém chronickém podávání DSS, kdy docházelo k částečnému zkracování krypt a jejich zvýšené vakuolizaci. Na základě histopatologické klasifikace hodnotíme míru tohoto poškození jako stupeň 1 až 2. Zásadní histologické rozdíly mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými zvířaty však nebyly pozorovány (*viz obr. č 16*).

Akutní experiment vedl k podstatně dramatičtějším histologickým změnám, které jsme opět pozorovali především v *tunica mucosa*. V některých úsecích již krypty zcela chyběly, někde byl jejich epitel ještě zachován. Z hlediska histopatologické klasifikace lze tyto změny hodnotit jako stupeň 3. Ani u tohoto experimentu jsme nepozorovali zásadní rozdíly mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými potkany (*viz obr. č 17*).

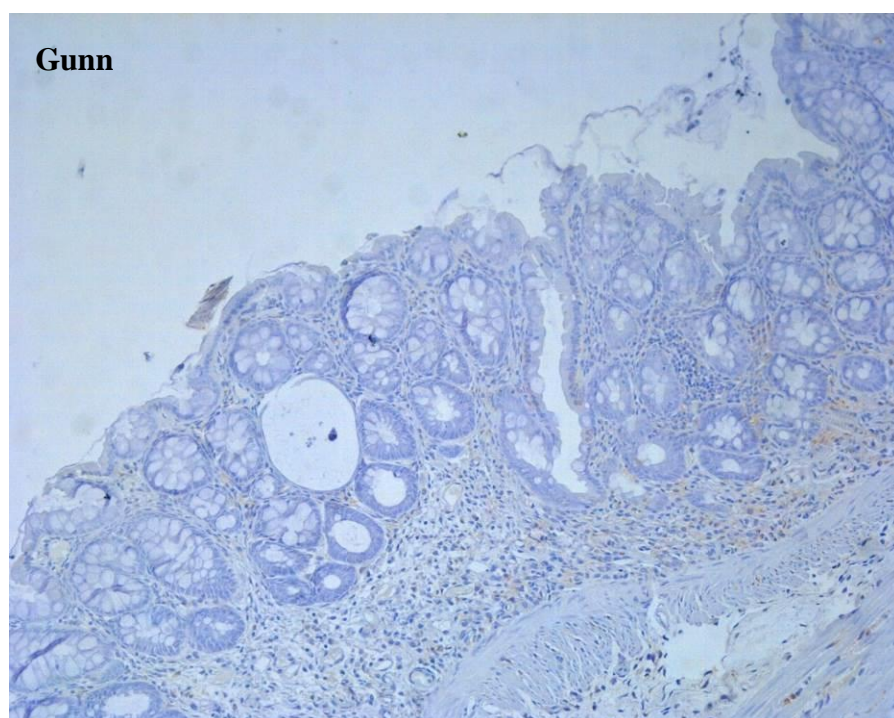
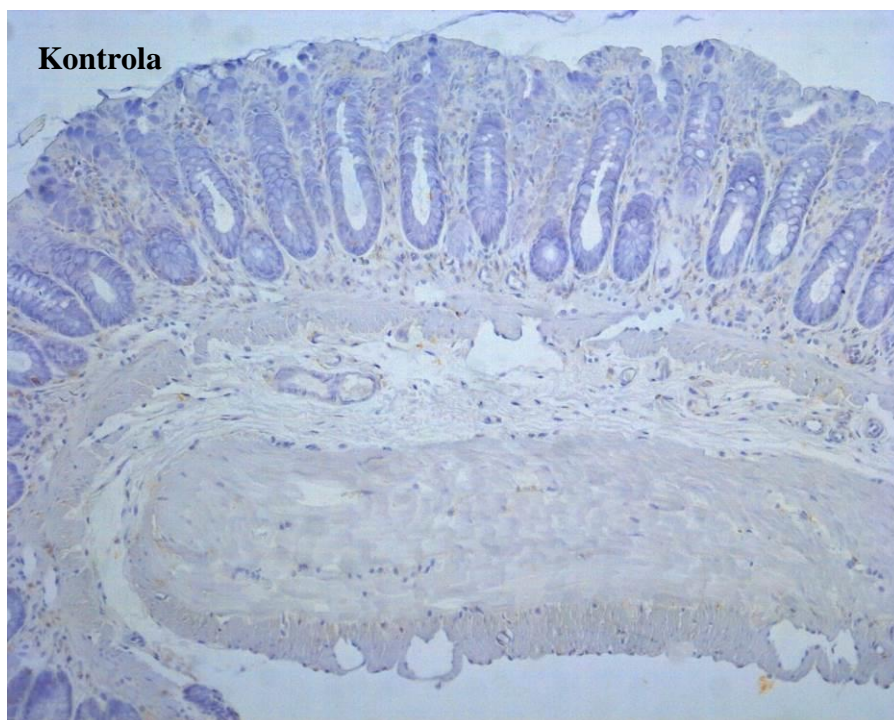
Obrázek č. 15: Reprezentativní obrázky distálního úseku střeva u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat.

Nebyly pozorovány rozdíly v histologické struktuře mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

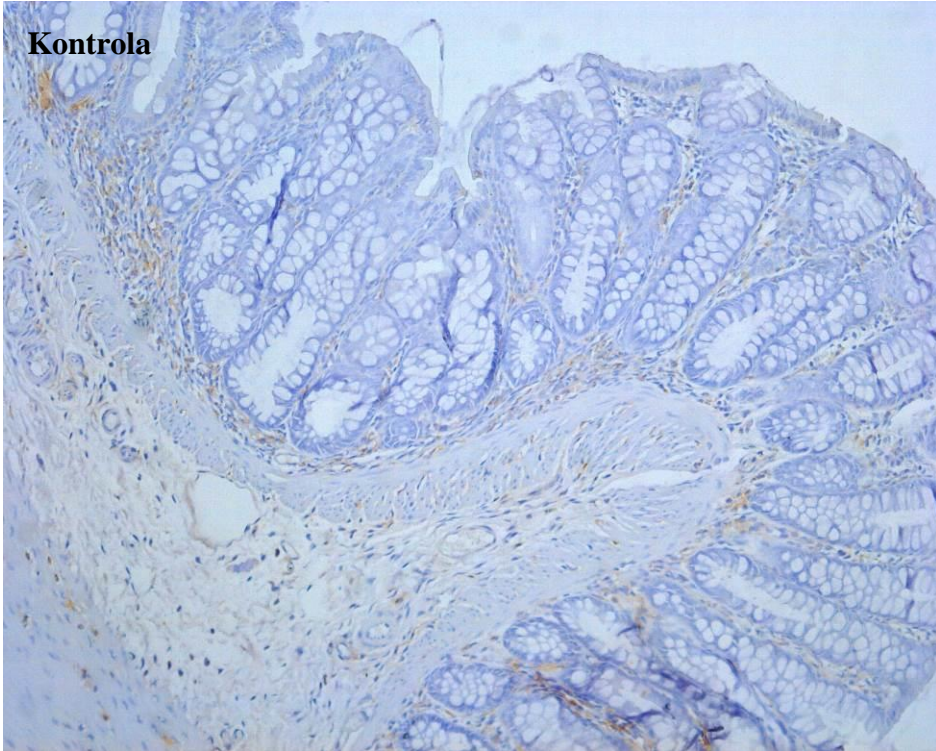


Obrázek č. 16: Reprezentativní obrázky distálního úseku střeva u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat po dlouhodobém podávání DSS.

Některé krypty jsou zkráceny a vakuolizovány. Nebyly pozorovány rozdíly v histologické struktuře mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



Kontrola

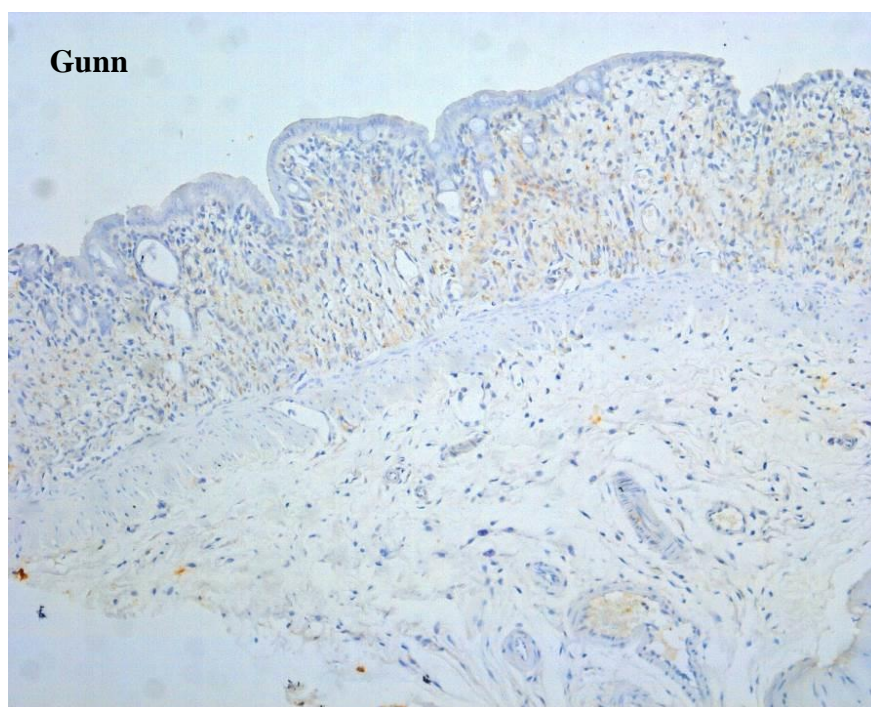
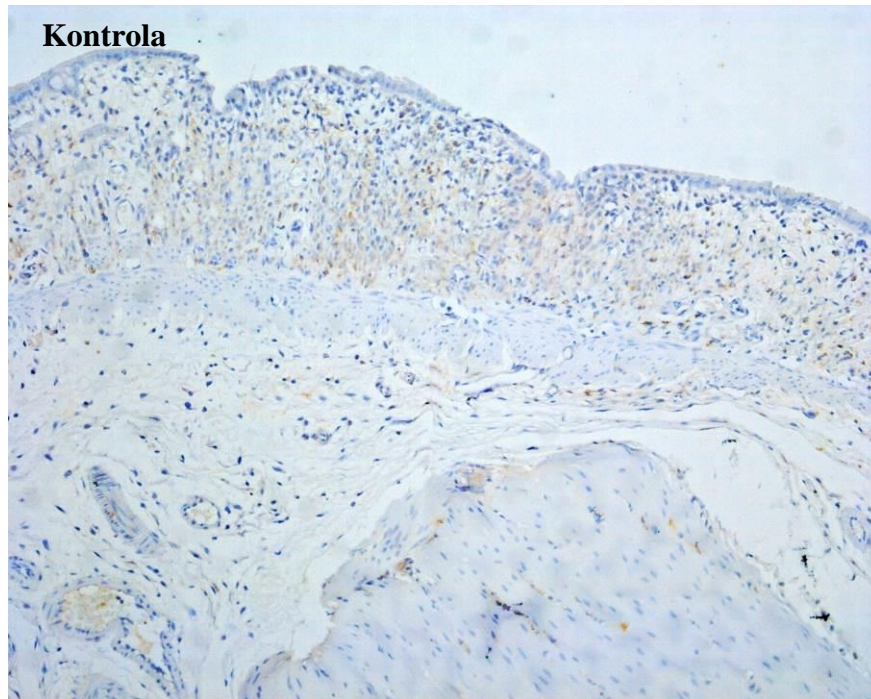


Gunn



Obrázek č. 17: Reprezentativní obrázky distálního úseku střeva u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat po krátkodobém podávání DSS.

Bylo pozorováno masivní poškození krypt a jejich vymizení u obou skupin zvířat. Nebyly pozorovány významné rozdíly v histologické struktuře mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



5.2 Imunohistochemická analýza exprese HO-I

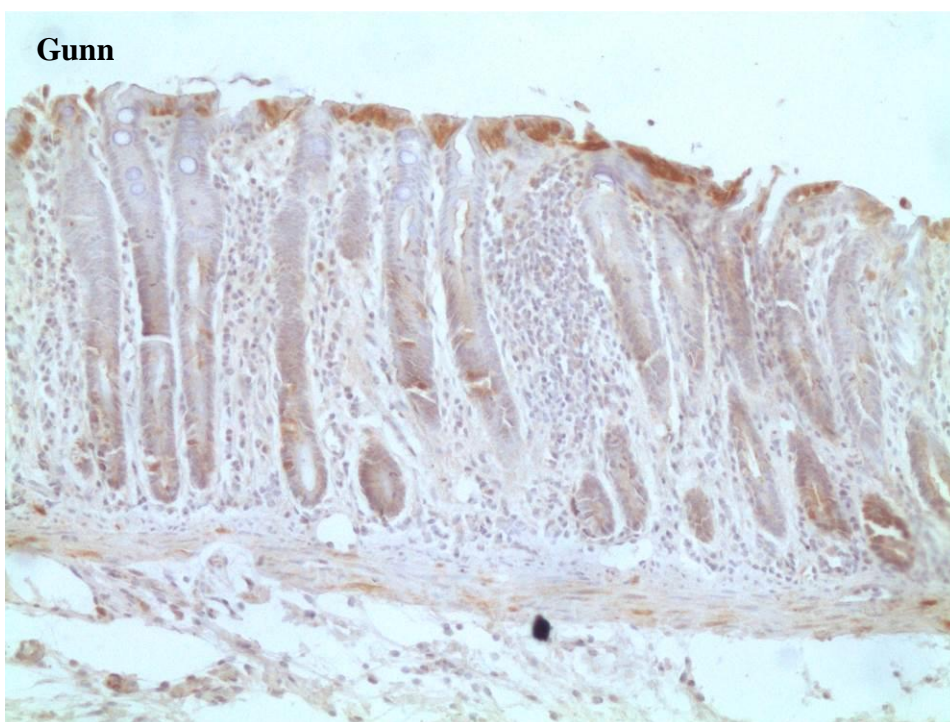
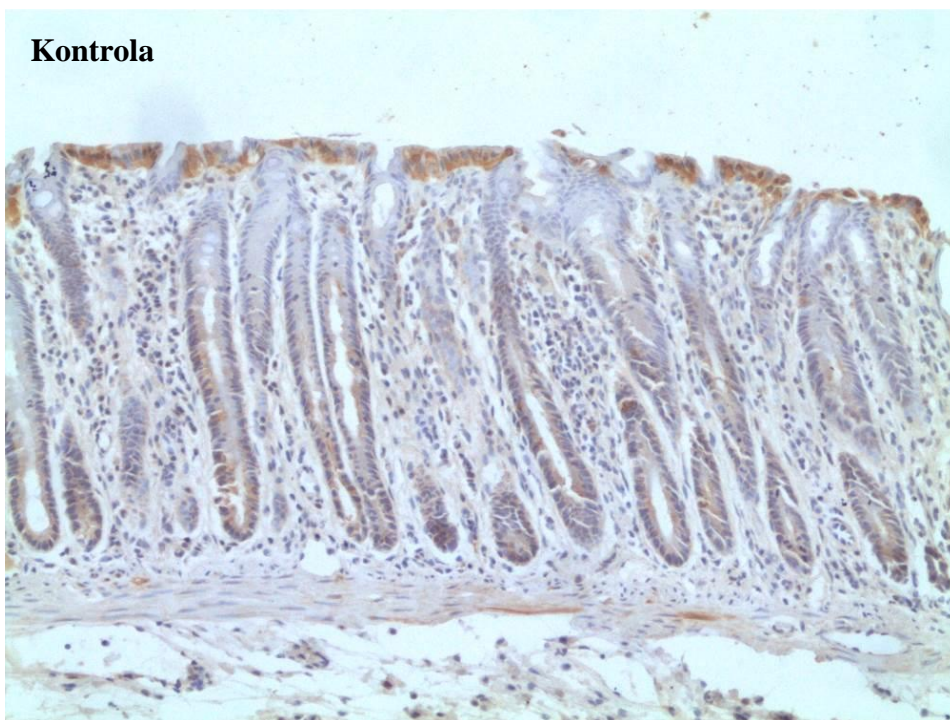
Imunohistochemická analýza byla provedena na 5 řezech z každého zvířete ze všech sledovaných skupin. Expres HO-I byla lokalizována zejména v *tunica mucosa*, konkrétně v epiteliálních buňkách a někde také v buňkách krypt. U kontrolních zvířat jsme mezi hyperbilirubinemickými a normobilirubinemickými potkany nezaznamenali rozdíly v ploše ani intenzitě barvení a pozorována nebyla ani odlišná lokalizace exprese HO-I (viz obr. č. 18).

Dlouhodobé podávání DSS nevedlo u sledovaných zvířat k zásadním změnám v expresi HO-I. Expres byla stále dominantní zejména v povrchovém epitelu a opět jsme nepozorovali rozdíly mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými potkany (viz obr. č. 19).

U krátkodobého experimentu jsme navzdory významným změnám ve struktuře *tunica mucosa* opět detekovali expresi HO-I zejména v epiteliálních buňkách na povrchu střeva. V některých případech byla tato exprese pozorována rovněž v místech krypt a v oblasti *tunica submucosa*. Ani zde jsme nepozorovali rozdíly v expresi mezi normobilirubinemickými a hyperbilirubinemickými zvířaty (viz obr. č. 20).

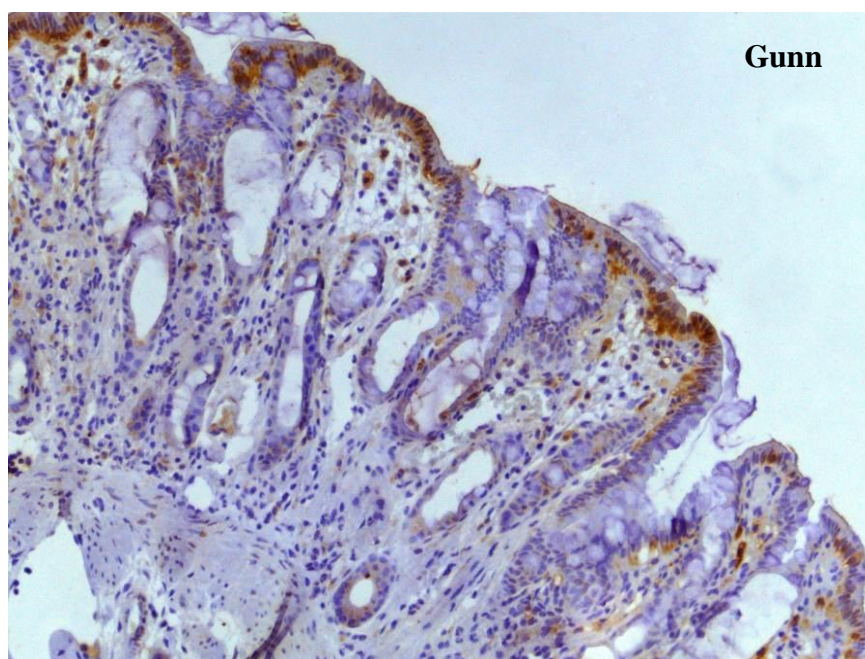
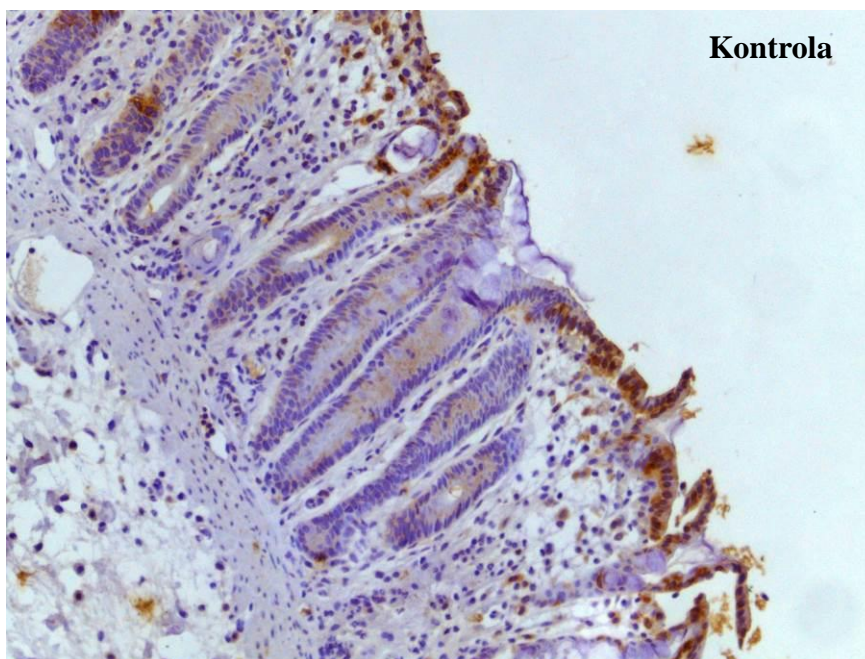
Obrázek č. 18: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení HO-1 u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat bez DSS.

Exprese HO-1 je zobrazena jako hnědá barva zejména v epitelu a částečně také v oblasti krypt tunica mucosa. Nebyly pozorovány významné rozdíly v expresi HO-1 mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.



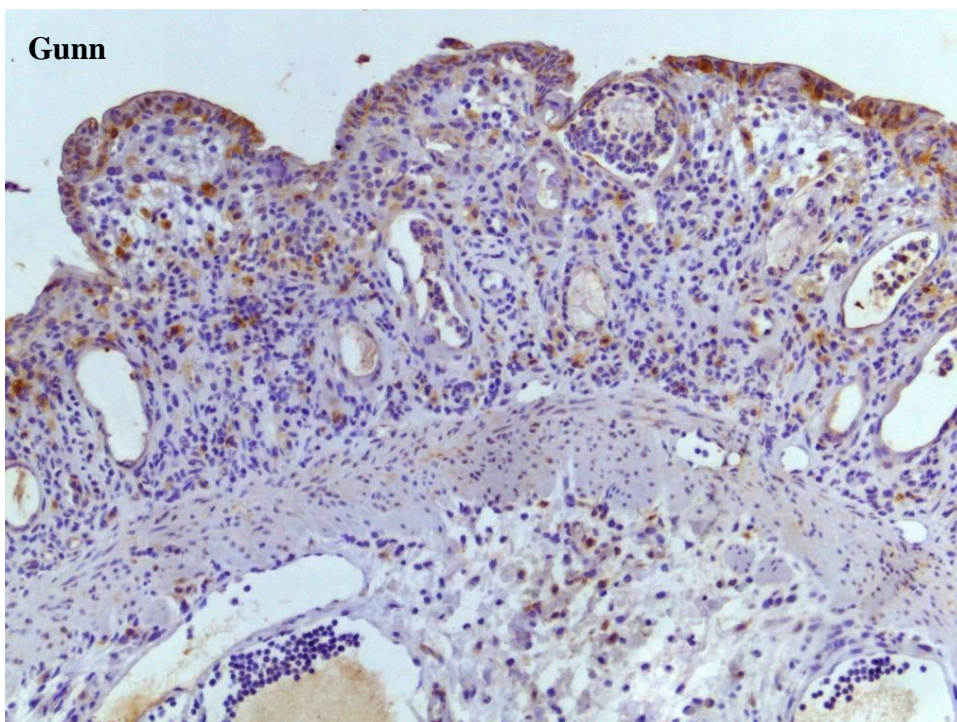
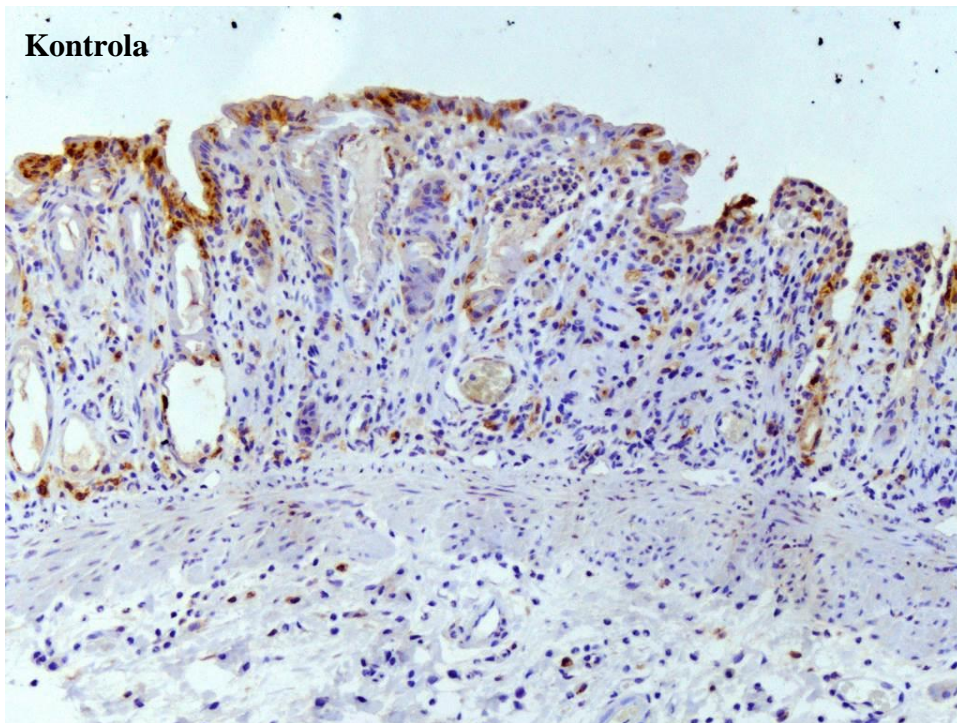
Obrázek č. 19: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení HO-1 u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat po dlouhodobém podávání DSS.

Expresi HO-1 je zobrazena jako hnědá barva zejména v epitelu a částečně také v oblasti krypt tunica mucosa. Nebyly pozorovány významné rozdíly v expresi HO-1 mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.

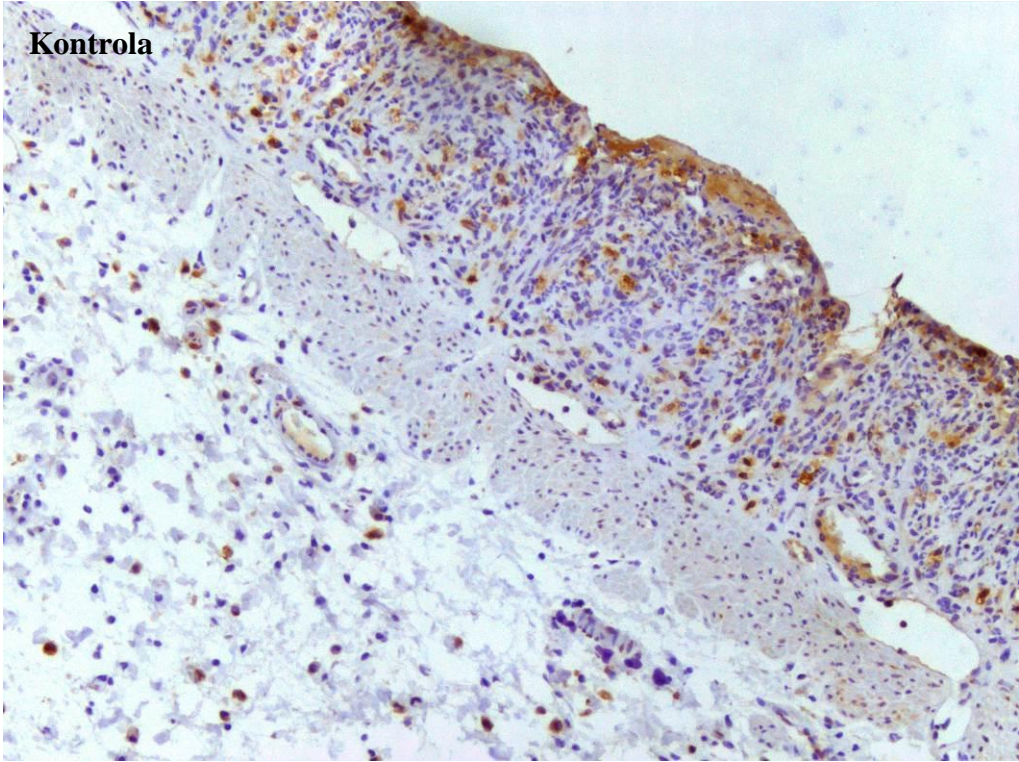


Obrázek č. 20: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení HO-1 u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických zvířat po krátkodobém podávání DSS.

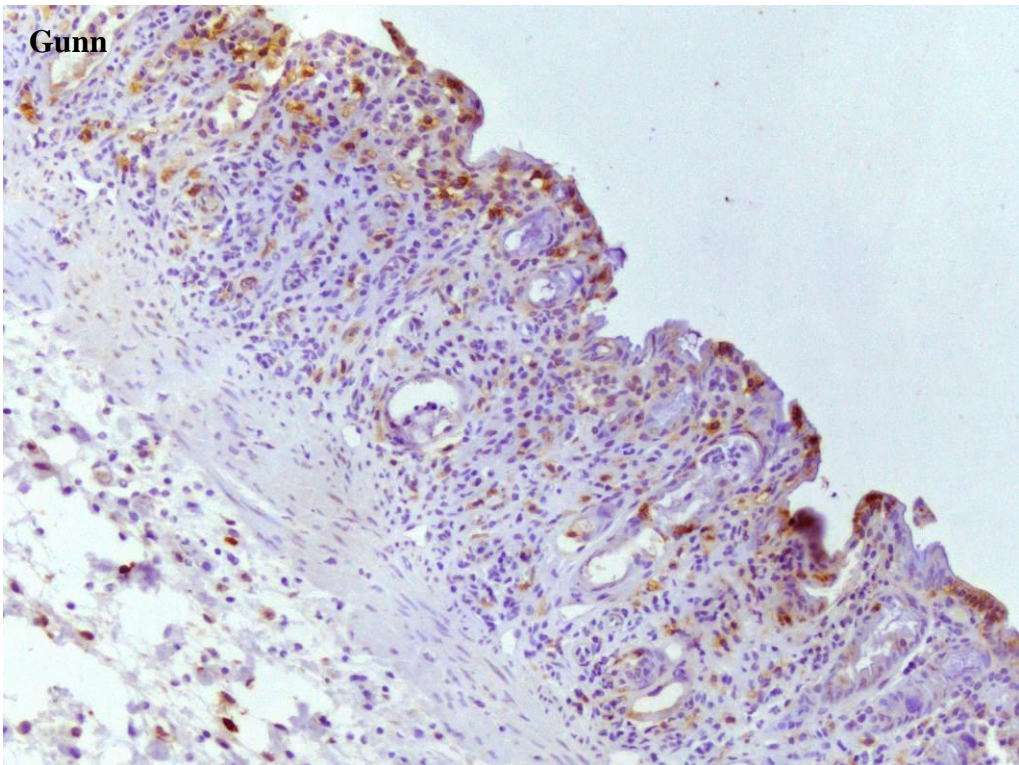
Exprese HO-1 je zobrazena jako hnědá barva zejména v epitelu a částečně také v oblasti krypt tunica mucosa. Nebyly pozorovány významné rozdíly v expresi HO-1 mezi kontrolními a Gunn zvířaty. Řezy dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.



Kontrola



Gunn



6 DISKUSE

Nespecifické střevní záněty jsou chronické záněty tenkého a tlustého střeva. Jedná se o autoimunitní onemocnění, jejichž příčiny vzniku nejsou do dnešního dne zcela známy [10]. Pravděpodobně se jedná o poruchu vzniklou na podkladě interakce mezi genetickými faktory a faktory vnějšího prostředí, která vede k chronické aktivaci imunitních buněk ve střevech člověka [19]. Tkáňové poškození je částečně způsobeno trvalou expozicí střevní sliznice reaktivním formám kyslíku. Tvorba těchto kyslíkových metabolitů je vyvolána oxidačním stresem [103].

Hemoxygenáza-I je enzym, jež zprostředkovává přeměnu hemu na biliverdin/bilirubin, železo a oxid uhelnatý [85, 87]. Všechny produkty této reakce jsou potenciálními antioxidanty. Lze tedy předpokládat, že HO-I poskytuje silný cytoprotektivní účinek [98, 99, 105]. Ten byl ostatně prokázán na celé řadě modelů buněčného a tkáňového poškození [93, 104, 105]. Díky těmto datům je HO-I předmětem vědeckého zkoumání nejen v oblasti gastrointestinálních chorob [106].

Cílem této diplomové práce bylo sledovat změny exprese HO-I v závislosti na rozdílných hladinách bilirubinu v séru. K tomu byli použiti potkani kmene Gunn, kteří mají sérové hladiny bilirubinu zvýšené. Snažili jsme se zjistit, zda potkani s rozdílnými hladinami bilirubinu reagují jinak na indukci nespecifického střevního zánětu po podání DSS. Použili jsme dva experimentální designy, a to akutní a chronickou formu indukované kolitidy.

Expresí hemoxygenázy-I byla v minulosti zkoumána ve střevech konkrétních pacientů, kteří trpí Crohnovou nemocí nebo ulcerózní kolitidou, popř. jinými střevními onemocněními. V roce 2003 vyšla imunohistochemická studie zabývající se expresí HO-I ve střevě zdravých lidí a lidí, kteří trpí Crohnovou nemocí (CD) nebo ulcerózní kolitidou (UC). *Barton et al* tak jako první uskutečnili studii zkoumající expresi HO-I přímo v lidském kolon. Měli k dispozici střeva zdravých jedinců (kontrolní vzorky) a pacientů s UC v aktivním stádiu i v její inaktivní formě. Dále byla k barvení použita střeva jedinců s aktivní a inaktivní CD a v neposlední řadě také střeva postižená jiným typem střevního zánětu. Expresí HO-I byla detekována pomocí avidin-biotin-peroxidázové techniky, kterou jsme použili také my pro tuto diplomovou práci. Výsledky ukázaly přítomnost HO-I v *lamina propria* u všech skupin pacientů, včetně zdravých jedinců. Difúzní cytoplazmatické barvení bylo kromě toho pozorováno také

na povrchu epitelálních buněk a uvnitř krypt u pacientů s ulcerózní kolitidou, Crohnovou nemocí a u pacientů s jinými typy kolitidy. Intenzita barvení byla prokazatelně větší v případě aktivní ulcerózní kolitidy než u kolitidy v klidovém stádiu nebo u kontrolních vzorků. Rozdíly mezi aktivní a neaktivní Crohnovou nemocí a kontrolou však nebyly signifikantní [103]. *Paul et al* publikovali v roce 2005 velmi podobnou studii, kterou rovněž vyhodnotili pomocí metody avidin-biotinového komplexu. Její výsledky se ovšem od výše zmiňované studie lišily. Tato práce měla k dispozici kromě pacientů s UC a CD také pacienty s divertikulitidou a střevní ischemií. V případě těchto dvou dalších onemocnění korelovala exprese HO-I se stupněm zánětu. U CD a UC tomu však bylo právě naopak. Pacienti, kteří vykazovali vysokou aktivitu zánětu, měli expresi hemoxygenázy-I výrazně sníženou [115].

Co se zvířecích modelů týče, studie na myších modelech IBD prokázaly, že upregulace HO-I prokazatelně snižuje střevní poškození indukované trinitrobenzensulfonovou kyselinou nebo dextran sulfátem sodným. Bylo zjištěno, že již samotné podávání TNBS expresi a aktivitu HO-I zvyšuje [104]. Podání inhibitoru hemoxygenázy její aktivitu naopak snižuje a potencuje poškození kolon u modelů kolitidy indukovaných pomocí TNBS nebo DSS [103, 104]. Nepřímé důkazy o tom, že by HO-I mohla hrát roli v patogenezi IBD, byly nalezeny také u myši knockoutovaných pro gen *Nrf2*, který je jejím hlavním transkripčním regulátorem. *Nrf2* deficientní myši byly více náchylné k rozvoji experimentální kolitidy vyvolané DSS ve srovnání s kontrolní skupinou tvořenou divokými jedinci stejného druhu [100].

Zajímavé je, že upregulace HO-I hraje roli také v protizánětlivých účincích některých běžně užívaných léčiv. Jedná se např. o 5-aminosalicylovou kyselinu, v případě které byla schopnost upregulace HO-I prokázána u kolitidy indukované trinitrobenzensulfonovou kyselinou [98, 100].

V neposlední řadě je třeba poukázat na fakt, že cílená indukce HO-I u zvířecího modelu kolitidy vyvolaného pomocí DSS neposkytovala protizánětlivou ochranu, pakliže byla provedena až po nástupu IBD. Zůstává tedy otázkou, do jaké míry může být indukce HO-I užitečná pro léčbu IBD a zda nebude mít pouze preventivní význam v klidové fázi nemoci [100].

V našich experimentech jsme navzdory výše uvedeným informacím nepozorovali změny exprese a lokalizace HO-I. U všech studovaných zvířat byla exprese HO-I nalezena především v *tunica mucosa*. Imunohistochemická analýza prokázala její přítomnost zejména v epitelu, a to zvláště na povrchu lumenální strany

střeva. Podáváním DSS nebyla exprese HO-I ovlivněna. Rozdíl nebyl pozorován ani mezi chronickým a akutním experimentem navzdory faktu, že akutní podávání DSS způsobilo významnou destrukci krypt v *tunica mucosa* jak u normobilirubinemických, tak u hyperbilirubinemických zvířat. Celkově lze tedy konstatovat, že se exprese HO-I nezměnila ani ve vztahu k podávání DSS, ani ve vztahu k hladinám bilirubinu v séru.

Bilirubin se jakožto hlavní produkt katabolické dráhy hemu řadí mezi nejúčinnější endogenní antioxidanty. Tento antioxidační účinek byl potvrzen na celé řadě studií, které probíhaly v posledních dvou desetiletích. Kromě antioxidačního účinku, vykazuje tento žlučový pigment rovněž silný protizánětlivý efekt. Jeho protektivní účinky jsou v současné době zkoumány u těch chorobných stavů, na jejichž patogenезi se významně podílí oxidační stres [83, 96].

Letos na jaře (březen 2014) vyšla studie, která prokázala, že lidé s Crohnovou nemocí mají oproti zdravé populaci sérové hladiny bilirubinu nižší. *Leníček et al* tuto skutečnost vysvětlují jako důsledek působení oxidačního stresu, který toto onemocnění doprovází. Zvýšené sérové hladiny bilirubinu, zdá se, naopak projevy tohoto onemocnění mírní [116].

Navzdory tomu, že jsme neprokázali změny exprese HO-I, nemůžeme konstatovat, že hladiny bilirubinu nehrají v tomto modelu protektivní roli. V současné době ještě nemáme k dispozici výsledky dalších analýz z těchto experimentů a nejsme tedy schopni učinit finální rozhodnutí.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat změny exprese HO-I v tlustém střevě normobilirubinemických a hyperbilirubinemických (Gunn) potkanů po indukci akutní či chronické kolitidy pomocí DSS. Exprese HO-I byla vyhodnocena imunohistochemickými metodami.

U všech sledovaných skupin zvířat byla nalezena exprese HO-I zejména v *tunica mucosa*. Tato exprese byla detekována především v epitelových buňkách, zvláště na povrchu lumenální strany střeva. V případě akutního modelu byla HO-I částečně přítomná také v *tunica submucosa* a v místech krypt.

U žádného ze studovaných zvířat nebyla po podávání DSS prokázána změna exprese HO-I. Stejně tak se nepodařilo prokázat rozdíl v expresi tohoto enzymu u normobilirubinemických a hyperbilirubinemických jedinců. Odlišná exprese nebyla pozorována ani při srovnávání akutního a chronického modelu kolitidy

Závěrem lze konstatovat, že podávání dextransulfátu sodného nevedlo v našich experimentech ke změně exprese HO-I v tlustém střevě potkana a stejně tak nebyla tato exprese ovlivněna ani odlišnými hladinami bilirubinu v séru.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PÁČ, L. Trávicí systém. In: GRIM, M. – DRUGA, R. – et al. *Základy anatomie 3. Trávicí, dýchací, močopohlavní a endokrinní systém*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2005. 163 s. ISBN 80-7262-302-8 (Galén), ISBN 80-246-0989-4 (Karolinum). Tlusté střevo, intestinum crassum, s. 39-40.
- [2] JUNQUEIRA, L.C. – CARNEIRO, J. – KELLEY, R.O. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H&H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7. Trávicí ústrojí. Tlusté střevo, s. 294.
- [3] KONRÁDOVÁ, V. – UHLÍK, J. – VAJNER, L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H, 2000. 292 s. ISBN 80-86022-80-3. Trávicí systém. Tlusté střevo, s. 164-165.
- [4] DYLEVSKÝ, I. *Anatomie a fyziologie člověka: učebnice pro zdravotnické školy*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 1998. 429 s. ISBN 80-901667-0-9. Tlusté střevo, s. 263.
- [5] ČIHÁK, R. *Anatomie 2*. 2. vyd. Praha: Grada, 2002. 470 s. ISBN 80-247-0143-X. Intestinum crassum – tlusté střevo, s. 96-97.
- [6] JUNQUEIRA, L.C. – CARNEIRO, J. – KELLEY, R.O. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H&H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7. Trávicí ústrojí. Obecná stavba trávicího ústrojí, s. 268.
- [7] KONRÁDOVÁ, V. – UHLÍK, J. – VAJNER, L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H, 2000. 292 s. ISBN 80-86022-80-3. Trávicí systém, s. 154.
- [8] KONRÁDOVÁ, V. – UHLÍK, J. – VAJNER, L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H, 2000. 292 s. ISBN 80-86022-80-3. Trávicí systém. Tenké střevo, s. 161.
- [9] TRÁVICÍ POTÍŽE.CZ. *Tlusté střevo – informace* [online]. [cit. 2014-03-05]. <<http://www.travici-potize.cz/index.php/tluste-strevo-informace.html>>.
- [10] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Idiopatické střevní záněty, s. 9.
- [11] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Definice, s. 9.
- [12] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Definice, s. 25.

- [13] MAČÁK, J. – MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 348 s. + 24 s. barevné přílohy. ISBN 80-247-0785-3. Proliferativní záněty, s. 99.
- [14] VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. *Katar* [online]. [cit. 2014-02-25]. <<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/katar>>.
- [15] KLENER, P. – et al. *Gastroenterologie, hepatologie. Vnitřní lékařství, svazek IV*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-7262-139-4 (Galén), 80-246-0389-6 (Karolinum). Crohnova nemoc. Etiologie a patogeneze, s. 93.
- [16] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu, s. 73.
- [17] KLENER, P. – et al. *Gastroenterologie, hepatologie. Vnitřní lékařství, svazek IV*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-7262-139-4 (Galén), 80-246-0389-6 (Karolinum). Idiopatická proktokolitida. Etiologie a patogeneze, s. 87.
- [18] SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 2006, Vol. 3. No. 7. s. 391.
- [19] DANESE, S. – FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, Vol. 12. No. 30. s. 4807.
- [20] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu. Formální patogeneze ISZ, s. 75.
- [21] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu. Formální patogeneze ISZ. Iniciální fáze, s. 76.
- [22] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu. Formální patogeneze ISZ. Fáze rozvoje zánětu, s. 76-77.
- [23] HOŘEJŠÍ, V. – BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005. 279 s. ISBN 80-7254-686-4. Typy (třídy) řetězců imunoglobulinů, s. 62.
- [24] MATRICON, J. – BARNICH, N. – ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonself*. 2010, Vol. 1. No. 4. s. 304.

- [25] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu. Formální patogeneze ISZ. Odchylná imunoregulační reakce, s. 79.
- [26] LUKÁŠ, M. – et al. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 363 s. ISBN 80-85824-79-5. Patogeneze zánětu. Formální patogeneze ISZ. Poškození tkáně, s. 82-83.
- [27] HENDRICKSON, B. A. – GOKHALE, R. – CHO, J. H. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, Vol. 15. No. 1. s. 88.
- [28] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Crohnova nemoc. Projevy, s. 15-17.
- [29] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Klinický obraz. Crohnova nemoc. Příznaky, s. 28.
- [30] CROHNOVA NEMOC.CZ. *Idiopatické střevní záněty. Crohnova nemoc* [online]. [cit. 2013-12-02]. <<http://www.crohnovanemoc.cz/idiopaticke-strevni-zanety/crohnova-nemoc.html>>.
- [31] KLENER, P. – et al. *Gastroenterologie, hepatologie. Vnitřní lékařství, svazek IV*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-7262-139-4 (Galén), 80-246-0389-6 (Karolinum). Crohnova nemoc. Klinický obraz, s. 95.
- [32] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Ulcerózní kolitida. Projevy, s. 21-22.
- [33] KLENER, P. – et al. *Gastroenterologie, hepatologie. Vnitřní lékařství, svazek IV*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-7262-139-4 (Galén), 80-246-0389-6 (Karolinum). Idiopatická proktokolitida. Patologicko-anatomický obraz, s. 87-88.
- [34] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Klinický obraz. Ulcerózní kolitida. Příznaky, s. 25-26.
- [35] STŘEVNÍ-ZÁNĚTY.CZ. *Komplikace nespecifických střevních zánětů* [online]. [cit. 2014-02-26]. <<http://www.strevni-zanety.cz/komplikace-ibd>>.

- [36] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Komplikace idiopatických střevních zánětů. Lokální střevní komplikace, s. 25-27.
- [37] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Komplikace idiopatických střevních zánětů. Vzdálené projevy, s. 27-28.
- [38] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Extraintestinální manifestace. Kožní manifestace, s. 72.
- [39] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Extraintestinální manifestace. Oční manifestace, s. 72.
- [40] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Extraintestinální manifestace. Kloubní manifestace, s. 71.
- [41] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Extraintestinální manifestace. Jaterní a biliární manifestace, s. 73.
- [42] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Komplikace idiopatických střevních zánětů. Metabolické komplikace, s. 28-29.
- [43] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Průběh a vývoj. Ulcerózní kolitida, s. 34.
- [44] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Průběh a vývoj. Crohnova nemoc, s. 35.
- [45] STŘEVNÍ-ZÁNĚTY.CZ. *Průběh onemocnění* [online]. [cit. 2013-12-03]. <<http://www.strevni-zanety.cz/prubeh>>.
- [46] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Průběh a vývoj. Reaktivace, recidiva, rekurence, relaps, s. 36.

- [47] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Ulcerózní kolitida. Průběh a chování nemoci, s. 22-23.
- [48] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba, s. 126.
- [49] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba, s. 41.
- [50] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba. Aminosalicyláty, s. 126-127.
- [51] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Léčba medikamentózní. Aminosalicyláty, s. 41-43.
- [52] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba. Kortikosteroidy, s. 134.
- [53] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Léčba medikamentózní. Hormonální léčba, s. 44.
- [54] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Léčba medikamentózní. Imunosupresiva, s. 45.
- [55] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Léčba medikamentózní. Biologická léčba, s. 46-48.
- [56] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Podpůrná a doplňková léčba, s. 50-52.
- [57] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba. Umělá výživa, s. 140.
- [58] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba. Umělá výživa. Parenterální výživa, s. 140.

- [59] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Podpůrná a doplňková léčba. Substituční léčba, s. 50.
- [60] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Konzervativní léčba. Antibakteriální léčba, s. 138.
- [61] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Podpůrná a doplňková léčba. Protibakteriální léčba (antibiotika), s. 51-52.
- [62] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Podpůrná a doplňková léčba. Bakteriální léčba (probiotika), s. 52.
- [63] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Léčba chirurgická, s. 149.
- [64] ČERVENKOVÁ, R. *Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 111 s. ISBN 978-80-7262-600-7. Léčba. Chirurgická léčba, s. 53.
- [65] POVÝŠIL, C. – et al. *Speciální patologie II. díl*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 151 s. ISBN 80-7184-484-5. Záněty nejasné etiologie. Crohnova choroba, s. 34-35.
- [66] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Patologická anatomie. Crohnova nemoc. Makroskopický nález, s. 47.
- [67] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Patologická anatomie. Ulcerózní kolitida. Makroskopický nález, s. 45.
- [68] POVÝŠIL, C. – et al. *Speciální patologie II. díl*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 151 s. ISBN 80-7184-484-5. Záněty nejasné etiologie. Ulcerózní kolitida, s. 35.

- [69] ODZE, R.D. – GOLDBLUM, J.R. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pankreas* [online]. 2. vyd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. 1368 s. ISBN 978-14160-4059-0. Polyps of the Large Intestine. Inflammatory pseudopolyp, s. 482. [cit. 2014-03-14].
<<http://books.google.cz/books?id=8ITX093f1j0C&pg=PA482&dq=pseudopolyp&hl=cs&sa=X&ei=VcMiU46-NIrywPct4K4Cw&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=pseudopolyp&f=false>>.
- [70] VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. *Lymfatický folikul* [online]. [cit. 2014-02-27].
<<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/lymfaticky-folikul>>.
- [71] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Patologická anatomie. Crohnova nemoc. Mikroskopický nález, s. 47.
- [72] VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. *Histiocyt* [online]. [cit. 2014-03-14].
<<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/histiocyt>>.
- [73] LUKÁŠ, K. *Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 1997. 175 s. ISBN 80-85875-31-4. Patologická anatomie. Ulcerózní kolitida. Mikroskopický nález, s. 46.
- [74] KAWADA, M. – ARIHIRO, A. – MIZOGUCHI, E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2007, Vol. 13. No 42. s. 5581-5583.
- [75] PERŠE, M. – CERAR, A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, s. 1, 3.
- [76] LOW, D. – NGUYEN, D. D. – MIZOGUCHI, E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Design, Development and Therapy*. 2013, Vol. 7. s. 1342-1345.
- [77] WIKIPEDIE. *Dáňio pruhované* [online]. 2013 [cit. 2013-12-08].
<http://cs.wikipedia.org/wiki/D%C3%A1nio_pruhovan%C3%A9>.
- [78] WIKIPEDIE. *Octomilka* [online]. 2013 [cit. 2013-12-08].
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Octomilka>>.
- [79] YAN, Y. – et al. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS ONE*. 2009, Vol. 4. No. 6. s. 4-5.

- [80] COOPER, H. S. – et al. Clinicopathologic Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. *Laboratory Investigation*. 1993, Vol. 69. No. 2. s. 239-242.
- [81] MAČÁK, J. – MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 348 s. + 24 s. barevné přílohy. ISBN 80-247-0785-3. Systémová amyloidóza, s. 59.
- [82] ABZ SLOVNÍK CIZÍCH SLOV. *Hyperplazie, hyperplasie* [online]. [cit. 2013-12-19]. <<http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/hyperplazie-hyperplasie>>.
- [83] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Úvod, s. XI.
- [84] EHRMANN, J. – HŮLEK, P. – et al. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. 590 s. ISBN 978-80-247-3118-6. Analyty měřící transportní a exkreční kapacitu jater. Bilirubin, s. 46.
- [85] VÍTEK, L. – et al. Metabolismus bilirubinu a způsoby eliminace jeho toxicity. *Chemické listy*. 2003, Vol. 97. No 1. s. 24-26.
- [86] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Fyzikálně-chemické vlastnosti bilirubinu, s. 5-6.
- [87] LEDVINA, M. – STOKLASOVÁ, A. – CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009. 546 s. ISBN 987-80-246-1415-1. Osudy krevního barviva po degradaci. Rozpad hemoglobinu a vznik žlučových barviv, s. 352-354.
- [88] LEDVINA, M. – STOKLASOVÁ, A. – CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009. 546 s. ISBN 987-80-246-1415-1. Osudy krevního barviva po degradaci. Metabolické osudy bilirubinu, s. 356.
- [89] EHRMANN, J. – HŮLEK, P. – et al. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. 590 s. ISBN 978-80-247-3118-6. Familiární hyperbilirubinemie, s. 148.
- [90] NAVRÁTIL, L. – et al. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. 424 s. ISBN 978-80-247-2319-8. Familiární konjugované hyperbilirubinemie, s. 282.
- [91] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Familiární hyperbilirubinemie. Rotorův syndrom, s. 44.

- [92] EHRMANN, J. – HŮLEK, P. – et al. *Hepatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. 590 s. ISBN 978-80-247-3118-6. Familiární hyperbilirubinemie. Criglerův-Najjarův syndrom, s. 149.
- [93] WAGENER, F. A. D. T. G. – et al. Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation. *Pharmacological Reviews*. 2003, Vol. 55. No. 3. s. 553, 554, 557, 558, 559, 560, 562, 563, 564.
- [94] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Familiární hyperbilirubinemie. Gilbertův syndrom, s. 36-41.
- [95] KLENER, P. – et al. *Gastroenterologie, hepatologie. Vnitřní lékařství, svazek IV*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-7262-139-4 (Galén), 80-246-0389-6 (Karolinum). Gilbertův syndrom, s. 207-208.
- [96] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Úloha bilirubinu. Experimentální studie, s. 92.
- [97] SCHWERTNER, H. A. – VÍTEK, L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008, Vol. 198. No 1. s. 2, 8.
- [98] ZHU, X. – et al. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: A short review. *World Journal of Gastroenterology*. 2011, Vol. 17. No. 38. s. 4284-4285.
- [99] KIRKBY, K. A. – ADIN, C. A. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. 2006, Vol. 290. s. F563-F567.
- [100] VIJAYAN, V. – et al. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology*. 2010, Vol. 16. No. 25. s. 3113-3116.
- [101] VÍTEK, L. *Bilirubin a interní choroby – Význam pro kliniku a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 123 s. ISBN 978-80-247-2351-8. Úloha HO v obraně před oxidačním stresem, s. 83.
- [102] RYTER, S. W. – ALAM, J. – CHOI, A. M. K. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*. 2006, Vol. 86. No. 2. s. 588, 609, 614.

- [103] BARTON, S. G. R. G. – et al. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress & Chaperones*. 2003, Vol. 8. No. 4. s. 330, 332, 333.
- [104] NAITO, Y. – et al. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2011, Vol. 48. No. 2. s. 126, 129.
- [105] LUNDEVIG, D. M. S. – IMMENSCHUH, S. – WAGNER, F. A. D. T. Hemeoxygenase, inflammation and fibrosis: the good, the bad and the ugly? *Frontiers in Pharmacology*. 2012, Vol. 3, No. 81. s. 3-6.
- [106] DESHANE, J. – WRIGHT, M. – AGARWAL, A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochimica Polonica*. 2005, Vol. 52. No. 2. s. 274, 275.
- [107] RYTER, S. W. – CHOI, A. M. K. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Metabolism to Molecular Therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009, Vol. 41. No. 3. s. 253-256.
- [108] CORNELIUS, C. E. – ARIAS, I. M. Animal model of human disease. Crigler-Najjar Syndrome. Animal model: hereditary nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in Gunn rats. *American Journal of Pathology*. 1972, Vol. 69. No 2. s. 369-370.
- [109] WIKIPEDIA. *Laboratory rat* [online]. 2014 [cit. 2014-02-23]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Wistar_rat#Wistar_rat>.
- [110] VROZENÉ VADY. *Základní typy dědičnosti* [online]. [cit 2014-03-16]. <<http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>>.
- [111] ABCAM. *IHC-P paraffin staining protocol – detailed guide* [online]. [cit. 2014-01-19]. <<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11384>>.
- [112] VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK. *Imunohistochemie* [online]. [cit. 2014-03-04]. <<http://lekarske.slovniky.cz/pojem/imunohistochemie>>.
- [113] VECTOR LABORATORIES. *Vectastain Elite ABC Kit* [online]. 2011 [cit. 2014-01-19]. <<http://www.vectorlabs.com/Protocols/VECTASTAIN/PK-6100.pdf>>.
- [114] DAKO. *Educational Guide – Immunohistochemical Staining Methods. Fifth edition* [online]. 2006 [cit. 2014-01-19]. <http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf>.

- [115] PAUL, G – et al. Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005, Vol. 140. No. 3. s. 548-549.
- [116] LENÍČEK, M. – et al. The Relationship Between Serum Bilirubin and Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2014, Vol. 20. No. 3. s 48.