

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Ing. Peter Ergang

Periferní metabolismus glukokortikoidů v imunitních buňkách

Peripheral metabolism of glucocorticoids in immune cells

Disertační práce

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.5 2013

Peter Ergang

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji tímto všem, kdo mi pomohli při návrhu a realizaci této práce. Jmenovitě děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc a celému kolektivu Oddělení funkce epitelu Fgu AV ČR v.v.i. v Praze za cenné rady a obětavou pomoc. Především bych chtěl poděkovat své matce Márii Ergangové bez které by tato práce nevznikla.

OBSAH

1. SOUHRN.....	1
2.1 GLUKOKORTIKOIDY	4
2.1.1 Syntéza glukokortikoidů.....	4
2.1.2 Metabolismus glukokortikoidů.....	5
2.1.3 Glukokortikoidní receptor a jeho struktura	8
2.1.4 Transkripční a translační regulace isoform GR	10
2.1.5 Intracelulární přenos glukokortikoidního signálu	11
2.2 PERIFERNÍ METABOLISMUS GLUKOKORTIKOIDŮ	11
2.2.1 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy.....	11
2.2.2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 1 (11HSD1).....	12
2.2.4 11HSD1 a její regulace zánětem	13
2.2.5 11HSD1 a imunitní systém	15
3. CÍLE	17
4. MATERIÁL A METODY	18
4.1. Použité chemikálie.....	18
4.2 Experimentální TNBS kolitida	19
4.2.1 Použitá zvířata a indukce TNBS kolitidy	19
4.2.2 Izolace intraepiteliálních lymfocytů.....	20
4.2.3 Izolace lymfocytů z lamina propria (LPL).....	21
4.2.4 Příprava obohacené frakce T buněk ze sleziny a mezenterálních lymfatických uzlin.....	21
4.2.5 Inkubace střevních tkáňových explantátů	22
4.2.6 Průtoková cytometrie (FACS).....	22
4.2.7 Měření aktivity 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy v tkáňových řezech.....	23
4.2.8 Extrakce glukokortikoidů.....	23
4.2.9 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	24
4.2.10 Stanovení proteinu.....	24
4.2.11 Izolace totální RNA ze střevní tkáně	24
4.2.12 Příprava cDNA knihovny.....	25
4.2.13 Kvantitativní Q-PCR.....	25
4.3 EXPERIMENTÁLNÍ DSS KOLITIDA U MYŠÍ KMENE BALB/C	27
4.3.1 Použitá zvířata a indukce DSS kolitidy.....	27
4.4 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL ADJUVANTNÍ ARTRITIDY	28
4.4.1 Příprava inokula pro indukci adjuvantní artritidy	29
4.4.2 Izolace synoviocytů ze synoviální tkáně.....	30
4.4.3 Izolace totální RNA ze synoviální tkáně	30
4.4.4 Příprava suspence buněk z lymfatických uzlin.....	31
4.4.5 Měření aktivity 11HSD1 a exprese 11HSD1 mRNA	31
4.5 REGULACE EXPRESE 11HSD1 PROSTŘEDNICTVÍM PPAR γ DRÁHY	31
5. VÝSLEDKY	32
5.1. EXPERIMENTÁLNÍ DSS KOLITIDA U MYŠÍ	32
5.2 EXPERIMENTÁLNÍ TNBS KOLITIDA U POTKANA.....	36
5.3. EXPERIMENTÁLNÍ ADJUVANTNÍ ARTRITIDA U POTKANŮ KMENE LEWIS.....	41
5.4 REGULACE EXPRESE 11HSD1 PROSTŘEDNICTVÍM PPAR γ SIGNALIZACE.....	44
6. DISKUZE.....	46
7. ZÁVĚR.....	49
8. LITERATURA.....	51

PŘÍLOHA 1	62
PŘÍLOHA 2	63
PŘÍLOHA 3	64
PŘÍLOHA 4	65
PŘÍLOHA 5	66

1. Souhrn

Glukokortikoidy představují klíčový prvek v regulaci zánětlivé odpovědi a jsou široce používány v léčbě nejrůznějších, hlavně chronických zánětlivých onemocnění. Jejich působení v cílové tkáni bude záviset nejen na plazmatické hladině hormonu, rezpozibilitě buněk a hustoty receptorů, ale také na lokálním metabolismu glukokortikoidů. Hlavním enzymem tohoto metabolismu glukokortikoidů je 11β -hydroxysteroiddehydrogenáza (11HSD1). Zatím byly objeveny 2 isoformy 11HSD. Isoforma 11HSD1 katalyzuje in vivo přeměnu neaktivního 11-oxo derivátu na aktivní 11-hydroxy derivát glukokortikoidu a tím lokálně zvyšuje koncentraci aktivního glukokortikoidu, který se pak váže na glukokortikoidní receptor. Isoforma 11HSD2 pracuje výlučně jako dehydrogenáza, která oxiduje aktivní 11-hydroxy derivát glukokortikoidu na neaktivní 11-oxo derivát a tím lokálně snižuje koncentraci aktivního glukokortikoidu. Byla publikována řada prací, které se zabývají funkcí 11HSD v různých typech buněk a tkání. Velice málo je ale známo o funkci 11HSD v imunitních buňkách. Proto bylo cílem mé práce:

- (1) Zjistit, zda ovlivňují zánětlivé procesy při experimentální kolitidě lokální metabolismus glukokortikoidů (exprese a aktivita 11HSD1 a 2).
- (2) Prozkoumat, jak ovlivňuje kolitida lokální metabolismus glukokortikoidů v imunitních buňkách s důrazem na buňky střevního imunitního systému.
- (3) Zjistit, zda dochází při experimentální adjuvantní artritidě ke změnám lokálního metabolismu glukokortikoidů v synoviální tkáni a příslušné lymfatické tkáni. Ovlivní podávání látek ovlivňujících metabolismus glukokortikoidů artritidu?
- (4) Určit, jak ovlivňují agonisté PPAR γ receptorů expresi 11HSD1.

K řešení otázek č.1 a 2 byl použit DSS model kolitidy u myši kmene Balb/c a TNBS model kolitidy u potkanů kmene Wistar. Otázka 3 byla řešena s použitím samců potkanů kmene Lewis, u kterých byla experimentálně navozena artritida. Otázka 4 byla řešena na primární kultuře krysích hladkých svalových buněk izolovaných z aorty. Pro měření výstupních parametrů byly použity metody stanovení enzymatické aktivity pomocí radioaktivně značených substrátů, kvantitativní polymerázová řetězová reakce, izolace buněčných populací, laserová mikrodisekce, průtoková cytometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

- (1) Bylo zjištěno, že střevní zánět u myší s DSS kolitidou zvyšuje expresi mRNA 11HSD1 ve střevě, zatímco exprese 11HSD2 změněna nebyla. Kolitida signifikantně zvýšila expresi 11HSD1 ve intraepiteliálních lymfocytech a mezenterálních lymfatických uzlinách.
- (2) Bylo zjištěno, že TNBS kolitida u potkana je doprovázena zvýšením exprese 11HSD1 mRNA v obohacené frakci T lymfocytů získaných ze sleziny a z mezenterálních lymfatických uzlin, ale již ne ve stromatu obou orgánů. Podobně enzymatická aktivita 11HSD1 byla kolitidou signifikantně zvýšena jak ve slezině, tak i v mezenterálních uzlinách. Experimentální TNBS kolitida rovněž zvýšila expresi 11HSD1 mRNA v intraepiteliálních lymfocytech a v lymfocytech izolovaných z lamina propria.
- (3) Artritida zvýšila expresi mRNA pro 11HSD1 jak v synoviu, tak v inguinálních uzlinách. Zároveň došlo ke zvýšení enzymatické aktivity 11HSD1 v synoviocytech a imunitních buňkách inguinálních uzlin, ale již ne ve stromatu uzlin. Podávání antagonistů IL-1 receptoru (anakinra) a TNF- α cytokinu (etanercept) snížilo expresi 11HSD1 v synoviu artritických zvířat.
- (4) Agonista PPAR- γ receptoru pioglitazon zvýšil mRNA expresi a enzymatickou aktivitu 11HSD1 v závislosti na své koncentraci. Tento nárůst byl doprovázen zvýšenou expresí transkripčního faktoru E/CBP α a E/CBP ζ .

Výsledky dokládají, že lokální metabolismus glukokortikoidů ovlivňuje zánětlivou odpověď a ovlivněním tohoto metabolismu lze částečně měnit průběh zánětu.

2. Úvod

Úloha prereceptorového metabolismu glukokortikoidů je stále více studovaným tématem hlavně v souvislosti s rolí, kterou hraje v patogeneze řady nemocí, jako jsou metabolický syndrom, revmatoidní artritida, inzulínová resistance, osteoporóza, ulcerózní kolitida a karcinomu (CRC). Společným znakem těchto onemocnění se zdají být změny v regulaci enzymu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy (11HSD)..

Existují dvě isoformy 11HSD, které se mohou uplatnit v konverzi aktivního glukokortikoidu (kortisol, kortikosteron) na neaktivní derivát a naopak, a tak umožnit nebo zabránit vazbě na glukokortikoidní receptor. V situaci in vivo 11HSD1 katalyzuje konverzi neaktivní 11-keto formy glukokortikoidu na aktivní 11-hydroxy derivát a je bohatě exprimována v širokém spektru tkání a buněk, kde plní funkci lokálního modulátoru glukokortikoidní odpovědi. Isoenzym 11HSD2 objevený v ledvinách naproti tomu vykazuje pouze oxidázovou aktivitu a jeho patofyziologické projevy (mutace v 11HSD2) směřují k poruchám sodíkové homeostázy a krevního tlaku.

Známý a v praxi běžně používaný je imunosupresivní a imunomodulační efekt glukokortikoidů - hlavně u chronických zánětů. Dlouhodobé podávání vysokých dávek však způsobuje nežádoucí účinky jako je snížení imunitní odpovědi, iatrogenní Cushingův syndrom nebo celkové negativní ovlivnění metabolismu. Málo se ale ví o metabolismu glukokortikoidů v buňkách imunitního systému a jeho regulaci.

2.1 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy představují skupinu steroidních sloučenin produkovaných hlavně v zona fasciculata kůry nadledvin, které jsou schopny vazby na glukokortikoidní receptor. Kromě glukokortikoidů jsou nadledviny zdrojem dalších steroidních molekul, jako jsou mineralokortikoidy a v menší míře androgeny. Glukokortikoidy vykazují pleiotropní účinky na řadu tkání. V kostech, svalech a tuku zvyšují katabolizmus, naproti tomu v játrech mají anabolický účinek. Dále ovlivňují řadu fyziologických funkcí jako jsou - stresová odpověď, udržování krevního tlaku, kognitivní a emocionální funkce a také se spolupodílí na řízení prenatálního a postnatálního vývoje. Pro glukokortikoidy je charakteristickým rysem mohutný efekt na imunitní systém. V nižších dávkách snižují počet lymfocytů, monocytů a eozinofilů a snižují fagocytózu, ve vyšších dávkách způsobují apoptózu imunitních buněk. Naproti tomu zvyšují počet cirkulujících erytrocytů a snižují proliferaci, migraci a diferenciaci imunitních buněk. V buňkách imunitního systému také snižují produkci prozánětlivých a zvyšují produkci protizánětlivých proteinů (1).

Hlavním glukokortikoidem u člověka je kortisol a v menší míře kortikosteron. Naopak u laboratorních hlodavců, ptáků a obojživelníků je hlavním glukokortikoidem kortikosteron. Jeho plazmatické hladiny se u dospělého člověka v průběhu dne mění a pohybují se v rozsahu 80-700 nmol/l. Celková denní produkce a clearance se u člověka pohybuje kolem 17 mg kortisolu, přičemž biologický poločas kortisolu je 60-90 minut a kortikosteronu 50 minut.

Syntetizovaný kortisol se transportuje krevním řečištěm ve vázané formě. Asi 90 % se váže na CBG (corticosteroid binding globulin), menší množství na albumin a volný kortisol představuje pouze 1% z celkového množství (2).

2.1.1 Syntéza glukokortikoidů

Steroidy jsou amfipatické sloučeniny odvozené od základního C17 cyklopentanoperhydrofenatrénového skeletu. Společným prekurzorem pro biosyntézu všech steroidů je cholesterol. Syntéza glukokortikoidů probíhá v buňkách kůry nadledvin. Tyto buňky obsahují velké lipidové deposity ve formě kapek, které slouží pro skladování cholesteryl esterů. Kromě toho tyto buňky obsahují velké množství mitochondrií a hladkého endoplazmatického retikula, které jsou potřebné pro biosyntézu steroidů a na povrchové membráně exprimují velké množství receptorů pro LDL částice. Cholesterol je krví transportován ve formě LDL nebo HDL. Existují zatím dvě známé cesty pro vstup cholesterolu do buněk kůry nadledvin. Selektivní transport probíhá za účasti proteinu Sr-B1, který je

exprimován na vnějším povrchu buněk a váže jak LDL tak HDL částice. Neselektivní transport využívá interakci LDL receptoru s LDL částicí a následnou endocytózu, kdy jsou vezikuly za účasti SCP-2 (sterol carrier protein 2) transportovány k mitochondriím. Cholesterol je za pomoci STARD 1 (steroidogenic acute regulatory transfer domain 1) proteinu transportován dovnitř mitochondrií (3).

Prvním krokem biosyntézy kortisolu a kortikosteronu je odštěpení bočního řetězce z cholesterolu enzymem P450_{ssc} (cholesterol side chain cleavage enzyme). Štěpení bočního řetězce je nejpomalejším krokem celé syntézy a tudíž rychlost určujícím prvkem. Tento krok je řízen ACTH. Produktem reakce je pregnenolon, který difunduje do hladkého endoplasmatického retikula, kde dochází k hydroxylaci na 17 α -hydroxypregnenolon pomocí P450-17 α (17 α -hydroxyláza). Ten je následně oxidován za účasti enzymu 3 β -hydroxysteroiddehydrogenázy. V následujících krocích dochází nejdříve k hydroxylaci v poloze 21 pomocí P450-21 (21-hydroxyláza) na 11-deoxykortisol. Ten je transportován do mitochondrií a následně 11 β -hydroxylázou hydroxylován za vzniku kortisolu. Progesteron jako intermediát syntézy kortikosteronu vzniká oxidací pregnenolonu pomocí 3 β HSD. Hydroxylaci progesteronu pomocí P450-21 vzniká 11-deoxykortikosteron, který je následně v mitochondriích 11 β -hydroxylázou oxidován na kortikosteron.

Kortisol a kortikosteron nejsou nijak skladovány a jejich biosyntéza probíhá v okamžiku potřeby (4).

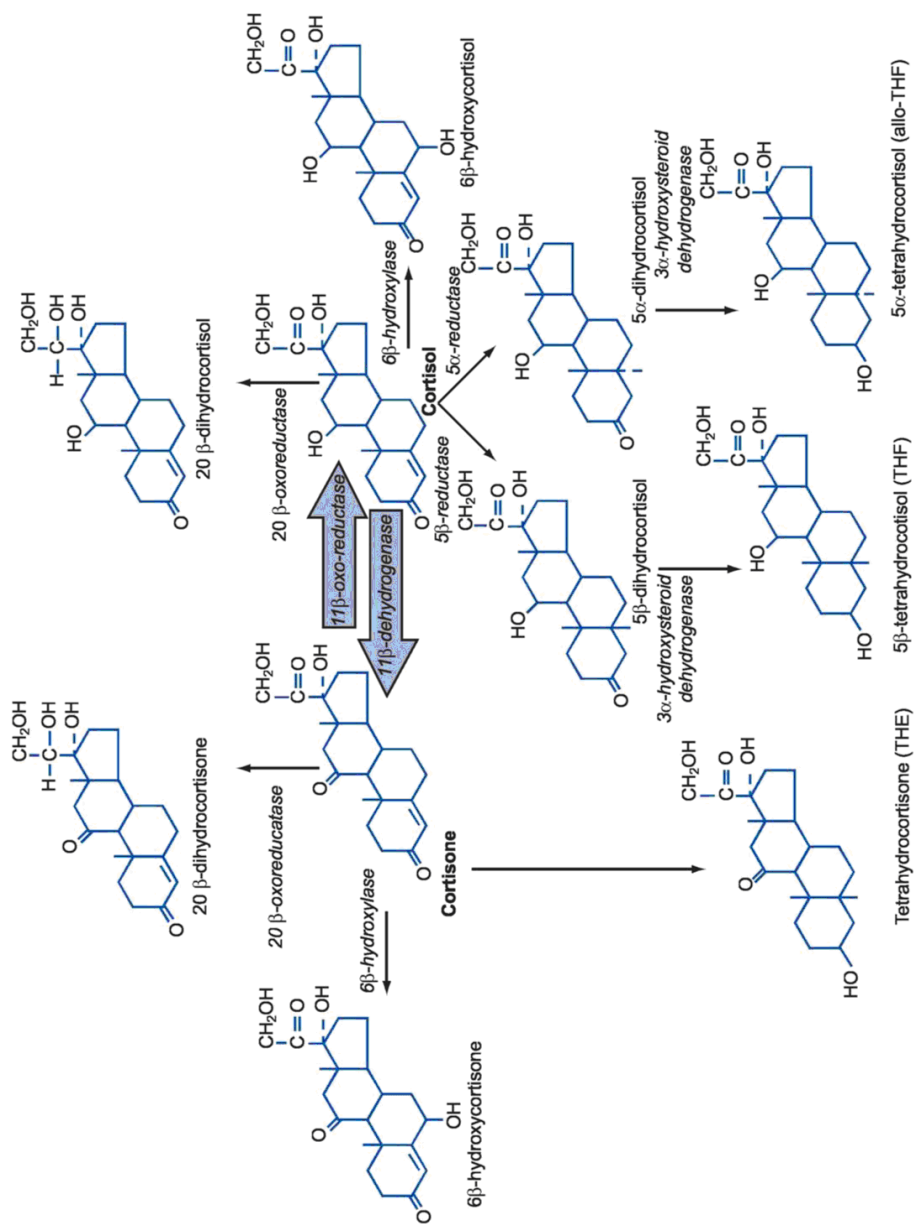
2.1.2 Metabolismus glukokortikoidů

Degradace glukokortikoidů probíhá hlavně v játrech, v menší míře v ledvinách a gonádách. Odbouráváním vznikají metabolity, které vykazují slabší hormonální účinky a mohou se dále uplatňovat v modulaci glukokortikoidní odpovědi. Vzniklé konečné produkty odbourávání jsou ve formě konjugátů vylučovány močí. Existuje několik způsobů, kterými se organismus zbavuje glukokortikoidních sloučenin (obr. 2.1).

Hlavním místem pro degradaci jsou hepatocyty, odbourávání začíná redukcí C4-C5 dvojně vazby 5 α nebo 5 β reduktázou za vzniku dihydrokortisonu nebo dihydrokortisolu. Účinkem 3 α -hydroxysteroiddehydrogenázy na tyto metabolity dochází k redukcí 3-oxo skupiny a vznikají tetrahydrokortison (THE) a tetrahydrokortisol (THF). Ty jsou následně konjugovány s kyselinou glukuronovou a vyloučeny ve formě rozpustných glukuronidů močí. Tímto způsobem se mohou odbourávat všechny steroidy obsahující C3-ketoskupinu. Ve formě THE a THF se vyloučí asi 50% odbouraných glukokortikoidů.

Asi 25 % glukokortikoidů se odstraní působením 20-hydroxysteroiddehydrogenázy (20HSD), kdy vznikají kortolony a kortoly. Dalším možným krokem je oxidace těchto molekul enzymem 21-oxidase, čímž vznikají dobře rozpustné deriváty kortolové nebo kortolonové kyseliny. Podobně se 20HSD účastní degradace progesteronu na neaktivní 20-hydroxyprogesteron. Protože progesteron je hlavním prekurzorem syntézy dalších biologicky aktivních steroidů jako jsou androgeny a estrogeny, je možné, že 20HSD se podílí na regulaci syntézy těchto látek.

Dalším alternativním způsobem je hydroxylace kortisolu za účasti 6 β -hydroxylázy. Vzniklý 6 β -hydroxykortisol je vyloučen v nekonjugované formě močí. Tvoří asi 5% z celkového vyloučeného množství (4).

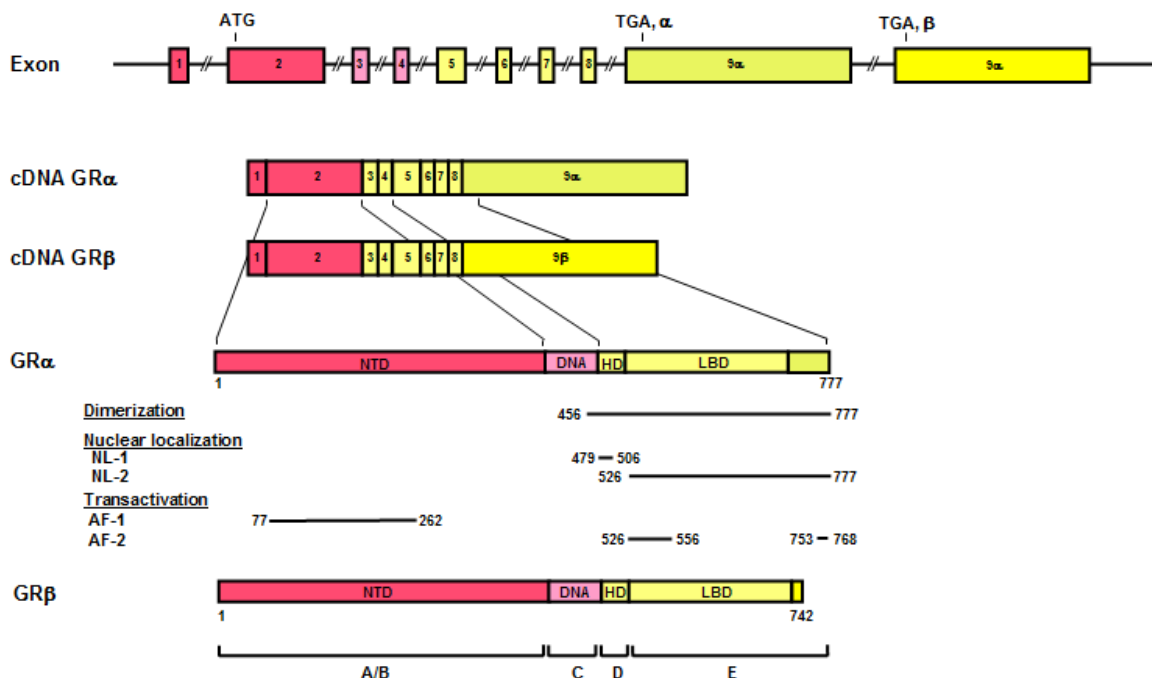


Obr. 2.1 Schéma metabolismu glukokortikoidů. Převzato z (5).

2.1.3 Glukokortikoidní receptor a jeho struktura

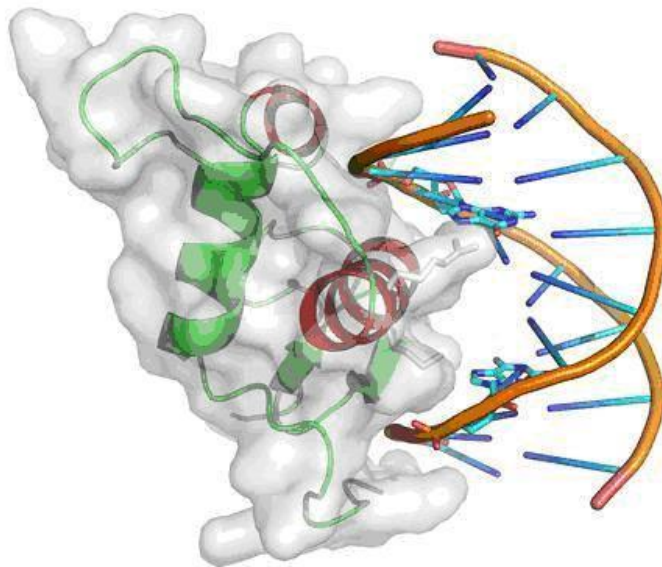
Glukokortikoidní receptor je protein dislokovaný v cytosolu s vysokou afinitou ke kortisolu a kortikosteronu.

Patří do široké rodiny nukleárních receptorů a je lokalizován na 5. chromosomu. Lidský gen pro GR je složen z 9 exonů, který různým sestřihem vytváří dvě vysoce homologní formy GR receptoru, GR α a GR β . Jejich struktura je identická po aminokyselinu 727, přičemž isoforma α obsahuje dalších 50 aminokyselin a isoforma β jen 15 aminokyselin. Molekulární hmotnost je pro GR α 97 kD a pro GR β 94 kD (obr. 2.2).



Obr. 2.2 Schéma lidského genu pro GR. Převzato z (4).

Terminální N-doména (NTD) isoformy α obsahuje hlavní transaktivační doménu AF-1 (activation function) mezi aminokyselinami 77-262. AF-1 sestává ze 4 α -helixů a účastní se komunikace mezi molekulami potřebnými k zahájení transkripce jako jsou RNA polymeráza, TBP protein a další asociované proteiny. DNA vázající doména (DBD) se nachází mezi aminokyselinami 420-480 a obsahuje 2 „zinc finger“ struktury odpovědné za vazbu na specifické DNA sekvence (GRE). N-konec prvního helixu se váže do velkého žlábků DNA, zatímco C-konec každého helixu zapadá do malého žlábků DNA (obr.2.3).



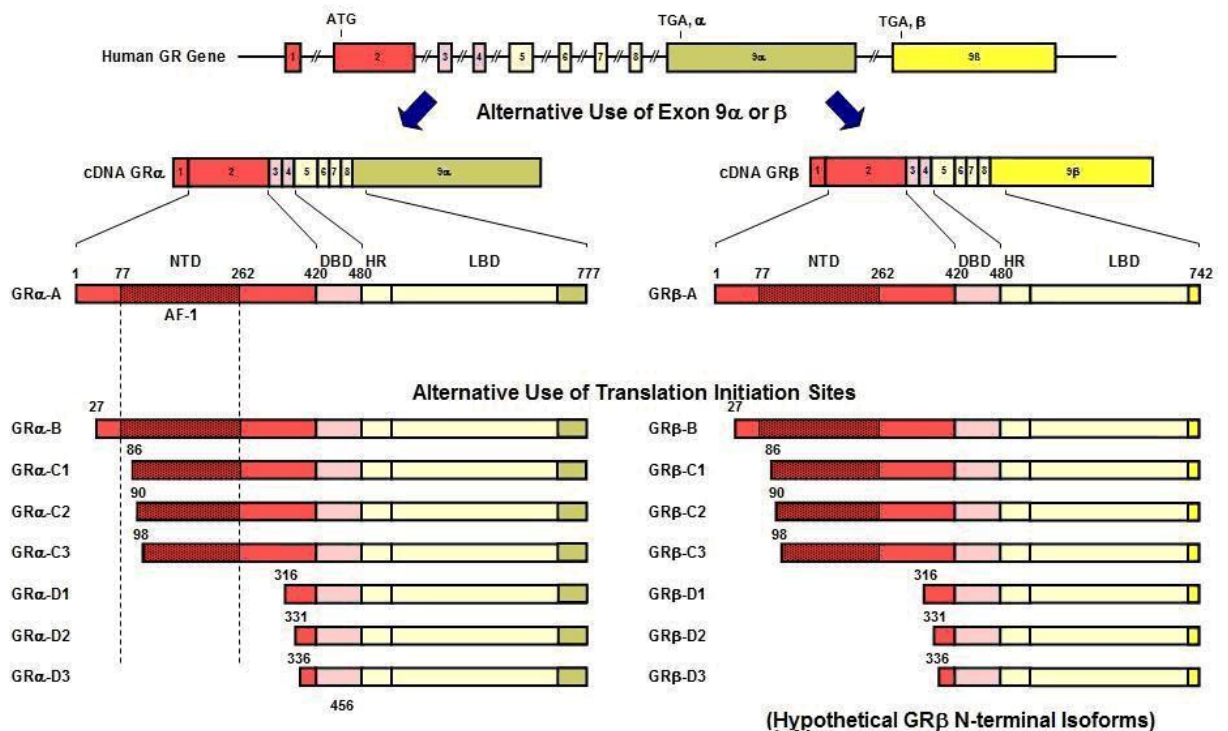
Obr. 2.3 Prostorový model DBD s navázanou strukturou DBD. Převzato z Protein Data Bank.

Bylo prokázáno, že GRE s různými sekvencemi pozměňuje prostorovou strukturu DBD a indukuje transkripční aktivitu různým způsobem, takže DNA představuje sekvenčně specifický alosterický modulátor transkripční aktivity indukované glukokortikoidním receptorem.

Ligand vázající doména (LBD) lidského GR α se nachází mezi aminokyselinami 481-777 a má schopnost vázat glukokortikoidy. Tato doména je tvořena 12 α -helixy a 4 β -strukturami. Helixy 1 až 3 tvoří jednu stranu sendvičové struktury, zatímco helixy 7 a 10 formují stranu druhou. Střední vrstva tvořená helixy 4,5,8,9 se nachází na vrchní straně struktury. Toto uspořádání vytváří kavitu, která je obklopena helixy 3,4,11,12. Interakcí LBD s HSP90 proteinem dojde ke změně konformace proteinové struktury a následnému navázání ligandu. Navázání vede k dalším prostorovým změnám, kdy GR α interaguje s NIS (nuclear import system), který spouští iniciační část transkripce (6).

2.1.4 Transkripční a translační regulace isoform GR

Lidský gen pro GR exprimuje 2 varianty mRNA alternativním sestřihem exonu 9 α a 9 β . Samotná mRNA pro isoformu GR α tvoří různým sestřihem 8 variant GR α receptoru (Obr. 2.4).



Obr. 2.4 Alternativní sestřihové varianty glukokortikoidního receptoru. Převzato z (4).

Jednotlivé isoformy GR α vykazují různou transkripční aktivitu. Zatímco GR α -A, GR α -C2 a GR α -C mají při použití syntetického GRE silnější transkripční aktivitu, isoformy GR α -D1, GR α -D2 a GR α -d3 transkribují méně. Transkripční aktivita isoformem GR α -Ba GR α -C je přibližně na úrovni GR α -A. Všechny isoformy GR α jsou schopny translokace do jádra po navázání ligandu.

Isoforma GR β nemá schopnost vázat glukokortikoidy a tudíž se nemůže podílet na genomických účincích glukokortikoidů. Protein GR β může ale tvořit heterodimery s proteinem GR α a tím ovlivňovat jeho funkci. Tato schopnost pravděpodobně vede ke glukokortikoidní resistenci, která se vyznačuje zvýšenou expresí GR β . Bylo zjištěno, že prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1 β zvyšují expresi GR β a tvořením heterodimerů s GR α mohou snižovat citlivost ke glukokortikoidům.

2.1.5 Intracelulární přenos glukokortikoidního signálu

Bez přítomnosti ligandu vytváří GR α komplex se dvěma molekulami HSP90. Po navázání ligandu se HSP 90 odštěpí a translokuje do jádra pomocí translokačních struktur (NL1, NL2). Tato translokace je závislá na proteinu importin α . Po vstupu do jádra dochází k dimerizaci ve formě homodimeru GR α /GR α a následně k interakci s GRE. Projevem transkripční aktivity GR α je jeho vazba na GRE v oblasti příslušného promotoru. GRE se nachází v promotorových oblastech genů GRG (glucocorticoid responsive genes), přičemž vazebné místo je tvořeno inverzními hexamérními palindromatickými strukturami oddělenými třemi páry bazí a každá molekula GR se váže na jeden palindrom. Navázání GR na GRE vede k formování transkripčního iniciačního komplexu, který zahrnuje RNA polymerázu 2 a další komponenty, které interagují přes AF-1 a AF-2 domény GR. Tvorba iniciačního komplexu začíná interakcí AF-2 domény GR s koaktivátory, které tvoří spojovací můstek mezi GR, DNA a přenosem glukokortikoidního signálu k RNA polymeráze II. V tomto přenosu se uplatňují proteiny p300, CREB (cAMP-responsive element binding protein), p/CAF (p300/CBD-associated factor), ACTR (activator of thyroid receptor) a RAC3 (receptor associated coactivator 3). Transaktivační doména AF-2 poté interaguje s SWI/SNF komplexem tak, že AF-2 prostorově váže mezi GR α a SWI/SNF. Pak dochází k interakci s DRIP/TRAP multiproteinovým komplexem a zahájení aktivace transkripce.

2.2 Periferní metabolismus glukokortikoidů

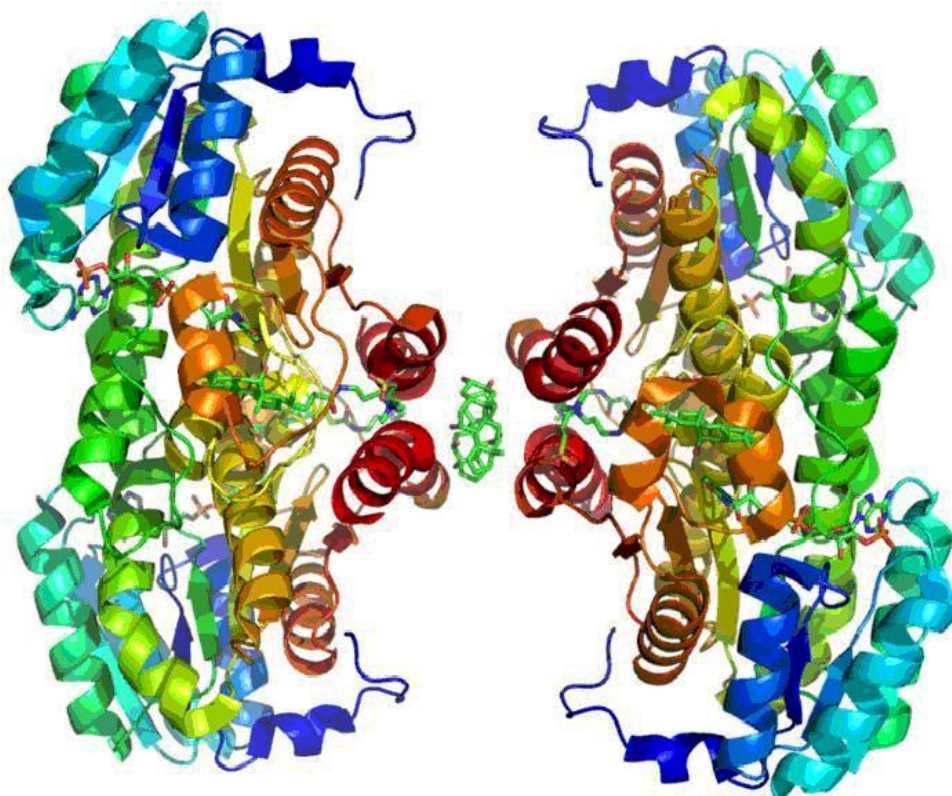
2.2.1 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy

Poprvé byla pozorována aktivita 11HSD Kendallem v padesátých letech (7). Pozdější studie demonstrovaly přítomnost 11HSD v řadě tkání jako je placenta (8), ledviny (9) a játra

10). Zatímco v placentě a ledvinách převažovala oxidační aktivita 11HSD, v játrech dominovala redukce kortisonu na kortisol. Tyto nálezy vedly k objevu dvou isoform 11HSD, jaterní NADPH-dependentní isoformě 1 s převažujícím redukčním působením a renální NAD⁺-dependentní isoformě 2 se striktně oxidačním působením.

2.2.2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza 1 (11HSD1)

11HSD1 patří do rodiny SDR (Short-chain Dehydrogenases/Reductases). Tyto proteiny jsou tvořeny 250-300 aminokyselinami, s vazbou kofaktoru na N-koncovou doménu a aktivním místem uprostřed molekuly (11). Prostorová struktura je tvořena α -helixy a β -listem v kombinaci (α - β - α - β x2), jež vytváří Rossmannovu strukturu pro navázání kofaktoru (12) (obr. 2.5).



Obr. 2.5 Prostorový model 11HSD1 s navázaným ligandem. Převzato z Protein Data Bank.

2.2.3 Enzymologické vlastnosti 11HSD1

11HSD1 je mikrosomální NADP⁺-dependentní oxidoreduktáza. Konstanta Michaelise a Mentenové (K_m) pro 11HSD1 izolovanou z jater potkana je pro kortikosteron 1.83±0.06

μM a pro kortisol $17.3 \pm 2.24 \mu\text{M}$ (13). Měřením aktivity purifikované jaterní 11HSD1 byl demonstrován jak oxidativní tak reduktivní směr reakce, nicméně redukce byla v podmínkách *in vitro* nestabilní (14). Následující studie ukázaly, že reduktázová aktivita je podmíněna zachováním buněčné integrity: 11-redukce byla prokázána v primokulturách hepatocytů (15), fibroblastů (16), adipocytů (17) a v plicích (18) a hippokampálních buňkách (19). Naproti tomu v čerstvé primokultuře Leydigových buněk převládala 11β -dehydrogenázová aktivita, která prudce klesala po několika dnech kultivace (20). Ve většině případů lze říci, že reduktázová aktivita je spojena se zachováním buněčné struktury, což by odpovídalo lokalizaci 11HSD1 v membráně endoplazmatického retikula obsahující enzymy produkující NADPH.

2.2.4 11HSD1 a její regulace zánětem

Expozice prozánětlivým stimulům vede v některých buňkách ke stimulaci 11HSD1 a zároveň k poklesu 11HSD2 v buňkách jiných. Při obezitě, která je asociovaná s mírným zánětem, se zvyšuje aktivita 11HSD1 v tukové tkáni, přičemž v játrech zůstává nezměněna nebo je redukována (21). Existuje také několik studií, které ukazují na přímý vztah mezi změnami exprese 11HSD1 a 11HSD2 v různých typech buněk a působení prozánětlivých faktorů (IL- 1β , TNF- α) (22-27). V kultuře hladkých svalových buněk z myši aorty lze indukovat expresi 11HSD1 inkubací s IL- 1β . Za podmínek *in vivo* lze zvýšit expresi 11HSD1 v myši aortě také injekcí LPS (28). Podobně v kultuře lidských peritoneálních buněk zvýšil cytokin IL- 1α expresi 11HSD1 a COX-2 a tento efekt bylo možné synergně ovlivnit inkubací s $1 \mu\text{M}$ kortisolem (29). Rovněž inkubací primokultury fibroblastů izolovaných ze synovia artritických pacientů lze zvýšit expresi 11HSD1 působením IL- 1β a TNF- α a tuto expresi lze ještě zvýšit koinkubací s kortisonem (30). Tyto nálezy vedou k představě, že změny aktivity 11HSD1 vyvolané prozánětlivými cytokiny tvoří součást zpětnovazebné regulace zánětu. Mechanismus, jak TNF- α , a IL- 1β ovlivňují expresi 11HSD1, není znám, zatím lze předpokládat úlohu p38 MAPK dráhy v regulaci 11HSD1 (31). Regulační faktory, které jsou schopny ovlivňovat mRNA expresi a aktivitu 11HSD1 shrnuje tabulka (obr 2.6). Je z ní patrné, že většina experimentů byla prováděna na izolovaných buňkách různého původu a jen ve velmi omezené míře na buňkách imunitního systému.

TABLE 4. Regulation of 11 β -HSD1 activity and/or expression

Regulatory factor	Cell type/tissue	11 β -HSD1 activity and/or expression	Ref.	
Cytokines TNF α	Rat glomerular mesangial cells	↑	164	
	Human preadipocytes	↑	183, 184	
	Differentiating human sc adipocytes	↑	185	
	Human hepatocytes	←	183	
	MG63 osteosarcoma cells	↑	309	
	Human osteoblasts	↑	309	
	Human aortic smooth muscle cells	↑	374	
	Human bronchial smooth muscle cells	↑	374	
	Differentiating human monocytes	←	328	
	Human amnion fibroblasts (+ dexamethasone)	← (↑)	378	
	IL-1	Human sc and omental preadipocytes	↑	183
		Differentiating human sc adipocytes	↑	185
		Human hepatocytes	←	183
Rat glomerular mesangial cells		↑	164	
Rat granulosa cells		↑	265	
MG63 osteosarcoma cells		↑	309	
Human aortic smooth muscle cells		↑	374	
Human bronchial smooth muscle cells		↑	374	
Differentiating human monocytes		←	328	
Human ovarian surface epithelial cells		↑	266	
Human amnion fibroblasts (+ dexamethasone)		← (↑)	378	
IL-2	Human granulosa-lutein cells	←	379	
IL-4	Human granulosa-lutein cells (leukocyte depleted)	↑	379	
	Differentiating human monocytes	↑	328	
IL-5	Human granulosa-lutein cells	↑	379	
IL-6	Human sc preadipocytes	↑	183	
	Human granulosa-lutein cells	↑	379	
IL-13	Differentiating human monocytes	↑	328	
	Human granulosa-lutein cells (leukocyte depleted)	↑	379	
IFN γ	Human omental preadipocytes	↑	183	
Leptin	Human hepatocytes	←	183	
	Mouse liver (<i>in vivo</i> , leptin-deficient mice)	↑	204	
	Mouse hepatocytes	↑	204	
Growth factors GH	Human sc and omental preadipocytes	←/↓	183, 227	
	293T1 cells	←	227	
	3T3-L1 cells	←	227	
	Human hepatocytes	←	183	
	Rat hepatocytes	←/↓	67, 228	
	Rat liver (<i>in vivo</i>)	↓	156, 157	
	Hypopituitary patients		29, 226	
	Obese patients		380	
	IGF-I	Human preadipocytes	↓	183, 227
		293T1 cells	↓	227
3T3-L1 cells		↓	227	
Human hepatocytes		←	183	
2S FAZA rat hepatoma cell line		↓	175	
EGF	Rat and human hepatocytes	←	171	
	Rat Leydig cells	↑ Reductase	74	
		↓ Dehydrogenase		
TGF β	Rat hepatocytes	←	171	
bFGF	Rat hepatocytes	←	171	
HGF	Rat hepatocytes	←	171	
Glucocorticoids Cortisol or corticosterone	Human omental and sc preadipocytes	↑ (om > sc)	69, 191	
	Fetal ovine pituitary (<i>in vivo</i>)	←	147	
	Rat Leydig cells	↓ Dehydrogenase	381	
	Human skeletal myoblasts	↑	225	
	Fetal ovine liver (<i>in vivo</i>)	↑	382	
	Rodent testis (<i>in vivo</i>)	↑	383	
	Rodent liver (<i>in vivo</i>)	←	383	
	Baboon placenta (<i>in vivo</i>)	←	384	
	Betamethasone Dexamethasone	Rat hepatocytes	↑	67, 228
		Rat liver (<i>in vivo</i>)	↓	198, 383
		Rat testis/rat Leydig cells	↓ Reductase	74, 383
		↑ Dehydrogenase		
Rat hippocampus (<i>in vivo</i>)		↑	144	
Human skin fibroblasts	↑	68		
2S FAZA rat hepatoma cell line	↑	175		

TABLE 4. Continued

Regulatory factor	Cell type/tissue	11 β -HSD1 activity and/or expression	Ref.	
Insulin	3T3-F442A and 3T3-L1 cells	↑	193	
	Human chorionic trophoblast	↑	385	
	Human amnion fibroblast	↑	378	
	Omental preadipocytes	↑	70	
	Rat hepatocytes (<i>in vivo</i>)	↑	228	
	2S FAZA rat hepatoma cells	↑	175	
Vitamin D ₃	Human skin fibroblasts	↑	68	
	3T3-F442A and 3T3-L1 cells	↑	193	
	Human monocytes	↑	328	
Sex steroids	Estradiol	↑	386	
				Rat uterus (<i>in vivo</i>)
Medroxyprogesterone acetate	Endometrial stromal cells	↑	387	
	Rat liver (<i>in vivo</i>)	↑	174, 383	
	Rat testis (<i>in vivo</i>)	↑	383	
	Rat kidney (<i>in vivo</i>)	↑	388	
	Endometrial stromal cells	↑	387	
	Human hepatocytes	↑	171	
Progesterone	Rat hepatocytes	↑	171	
	Rat testis (<i>in vivo</i>)	↑ Dehydrogenase	383	
	Rat liver (<i>in vivo</i>)	↑	174, 383	
Testosterone	Rat testis (<i>in vivo</i>)	↓ Reductase	383	
	Rat kidney (<i>in vivo</i>)	↓	388	
	Rat testis (<i>in vivo</i>)	↓	388	
Gonadotropins	FSH	↑ (After FSH)	265	
				Rat granulosa cells
LH	Rat granulosa cells	↑	265	
	Rat Leydig cells	↓ Dehydrogenase	74	
PMSG	Rat uterus (<i>in vivo</i>)	↑	386	
	Rat uterus (<i>in vivo</i>)	↑	386	
hCG	Rat uterus (<i>in vivo</i>)	↑	386	
	Rat granulosa cells	↑	265	
LHRH	Rat granulosa cells	↑	265	
	Rat granulosa cells	↑	265	
Thyroid hormones	T ₃	↑	176	
				Rat pituitary (<i>in vivo</i>)
PKA activators	Forskolin	↓ Reductase	175	
				2S FAZA rat hepatoma cells
				Rat granulosa cells
				Human skin fibroblasts
				Rat granulosa cells
				Rat granulosa cells
8-bromo-cAMP	Human skin fibroblasts	↑	68	
	Rat granulosa cells	↑	265	
Dibutyryl-cAMP	Human skin fibroblasts	↑	68	
	Rat granulosa cells	↑	265	
PKC activators	Phorbol ester	↑	68	
				Human skin fibroblasts
Others	C/EBP α	↑	133	
				HepG2 cells
C/EBP β	HepG2 cells	↑	133	
	Differentiated sc human adipocytes	↓ Reductase	185	
CRH	Guinea pig (<i>in vivo</i>)	↑ Reductase	389	
	Rodent testis	↑	390	
ACTH	Differentiated sc human adipocytes	↓ Reductase	185	
	Rat liver (<i>in vivo</i>)	↓	391	
Dehydroepiandrosterone	Human placental trophoblast	↑	392	
	Human placental trophoblast	↑	392	
Sodium nitroprusside	Human placental trophoblast	↑	392	
	Human placental trophoblast	↑	392	
Penicillamine	Human placental trophoblast	↑	392	
	Human placental trophoblast	↑	392	
Metyrapone ^a	Sheep liver microsomes	↑	179	
	Differentiated sc human adipocytes	↑ Reductase	185	
Salbutamol	Differentiated sc human adipocytes	↑ Reductase	185	
	Differentiated sc human adipocytes	↑ Reductase	185	
Thiazolidinediones	3T3-L1 adipocytes	↑	195	
	Epididymal white fat (<i>db/db</i> mice)	↑	195	
15-Deoxy12,14-prostaglandin J2	Human sc and omental preadipocytes	↑	183	
	Human chorionic trophoblast cells	↑	393	
Prostaglandin F2 α	Human chorionic trophoblast cells	↑	393	
	Human chorionic trophoblast cells	↑	393	
COOH (nonthiazolidinedione PPAR γ agonist)	Rat (<i>in vivo</i>)	↑ (sc fat)	394	
	Rat (<i>in vivo</i>)	↓ (Visceral fat)	394	
PPAR α	Mouse liver (<i>in vivo</i>)	↓	395	
	Mouse liver (<i>in vivo</i>)	↓	395	
Liver X receptor antagonists	3T3-L1 cells	↑	196	
	3T3-L1 cells	↑	196	
Protease inhibitors	Human omental and sc preadipocytes	↑	227	
	Human omental and sc preadipocytes	↑	227	
Clovidine	Differentiated sc human adipocytes	↓ Reductase	185	
	Differentiated sc human adipocytes	↓ Reductase	185	

IFN, Interferon; EGF, epidermal growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PMSG, pregnant mare serum gonadotropin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; hCG, human chorionic gonadotropin; ↑, increase; ↓, decrease; —, unchanged.

^a Metyrapone and its analogs are known to act as substrates for 11 β -HSD1 (100).

Obr. 2.6 Tabulka regulačních faktorů ovlivňujících expresi a aktivitu 11HSD1. Převzato z (5).

2.2.5 11HSD1 a imunitní systém

Glukokortikoidy jsou známy svým imunosupresivním a imunomodulačním účinkem. Tato vlastnost je využívána dlouhá léta v terapii různých, hlavně chronických zánětlivých onemocnění. Účinek glukokortikoidů na imunitní systém ovlivňuje nejen složky imunitního

sytému, ale také neuroendokrinní a centrální nervový systém (32). Kromě imunosupresivního a imunomodulačního efektu glukokortikoidy ovlivňují celou řadu efektorových funkcí imunitního systému, např. diapedézu a chemotaxi. Glukokortikoidy působí na imunitní systém především přes HPA osu, kdy aktivací HPA osy dochází ke zvýšené produkci GC které pak ovlivňují aktivitu např. neutrofilů a makrofágů. Bylo prokázáno, že zvířata se sníženou schopností aktivace HPA osy jsou náchylnější na různá zánětlivá a autoimunitní onemocnění než zvířata s normální citlivostí (33).

Glukokortikoidy mohou také ovlivňovat imunitní systém modulací periferního metabolismu glukokortikoidů. Poprvé byla popsána oxidázová aktivita 11HSD v šedesátých letech minulého století, kdy byl prokázán aktivní metabolismus glukokortikoidů ve slezině a thymu (34). Následné *in vitro* studie ukázaly expresi proteinu 11HSD1 ve slezině, lymfatických uzlinách, Peyerových placích a thymu (35). Nicméně zvýšená exprese a aktivita 11HSD1 byla detekována také v průběhu diferenciaci monocytů na makrofágy a tuto aktivitu bylo možno zvýšit Th2 cytokiny IL-4 a IL-1, nebo naopak utlumit funkčními antagonisty (Th1 cytokiny, IFN- γ) (36). Podobně aktivita 11HSD1 je u potkanů větší v oblastech bohatých na Th1 buňky (slezina, mezenterální lymfatické uzliny). Inhibicí 11HSD1 glycyrrhetinovou kyselinou dochází v imunitních orgánech k nárůstu exprese Th2 cytokinů (IL-4, IL-10) a k útlumu produkce Th1 cytokinů (IL-2, IFN- γ). Kromě makrofágů byla objevena exprese mRNA a aktivita enzymu také v CD4+, CD8+, B220 lymfocytech a CD11c+ dendritických buňkách (36). U myši s experimentálním popálením se zvyšuje v thymu exprese GR a tím taky citlivost thymocytů ke glukokortikoidům. Souběžně s tím se zvyšuje exprese 11HSD1 v thymocytech jako následek působení IL-1 β , IL-6, a TNF- α . To vede ke zvýšené citlivosti thymocytů na glukokortikoidy a následně ke glukokortikoidy indukované apoptóze thymocytů a involuci thymu (37). U makrofágů inhibují glukokortikoidy produkci prozánětlivých cytokinů a naopak stimulují produkci IL-10. U eosinofilů glukokortikoidy blokují syntézu a produkci reaktivních kyslíkových radikálů a snižují počet cirkulujících eosinofilů. Podobný účinek mají glukokortikoidy na T lymfocyty, kde inhibují aktivaci, proliferaci a přežívání buněk a také inhibují produkci cytokinů IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 a IL-13. Epiteliální buňky reagují na glukokortikoidy sníženou produkcí TNF- α a IL-8 a také na sníženou expresi genů pro iNOS, COX-2 a cPLA₂ (38).

3. Cíle

Obecně lze tvrdit, že glukokortikoidy vykazují jednoznačně pleiotropní efekty při zánětu. Na jedné straně mají imunopresivní efekt, kterým potlačují zánět, na druhé straně však vykazují schopnost odlišně modulovat imunitní reakce prostřednictvím Th1/Th2 drah (39) a ovlivňovat diferenciaci makrofágů ve směru vysoce fagocytujících buněk (40). V souladu s výše popsány efekty prozánětlivých cytokinů na 11HSD1 byl prokázán nárůst exprese mRNA a aktivity 11HSD1 také při ulcerózní kolitidě pacientů (41). Uvážíme-li, že kolitida je spojena s aktivací imunitních buněk (42) a že imunitní buňky exprimují 11HSD1 (viz kap. 2.2.5), je otázkou, zda změny v 11HSD1 při zánětu neodrážejí změny metabolismu glukokortikoidů v imunitních buňkách a zda tyto změny mohou mít fyziologický efekt. Cílem předkládané práce proto bylo řešit následující otázky:

Otázka 1

Ovlivňují zánětlivé procesy při experimentální kolitidě lokální metabolismus glukokortikoidů (expresi a aktivitu 11HSD1 a 2)?

Otázka 2

Ovlivňuje kolitida lokální metabolismus glukokortikoidů v imunitních buňkách s důrazem na buňky střevního imunitního systému?

Otázka 3

Dochází při experimentální adjuvantní artritidě ke změnám lokálního metabolismu glukokortikoidů v synoviální tkáni a příslušné lymfatické tkáni?

Otázka 4

Ovlivňují agonisté PPAR γ receptorů expresi 11HSD1?

4. Materiál a metody

4.1. Použité chemikálie

Použité chemikálie byly dodány firmami *Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA)*: karbenoxolon, Percoll, mifepriston, Gene Elute Mammalian Total RNA Kit, Enhanced Avian Reverse transcriptase with Rnase inhibitor *Biochrome AG (Berlín, Německo)*: RPMI 1640 10X, FBS (fetal bovine serum), Collagenase 4; *Roche (Mannheim, Německo)*: Fast Start DNA Master Sybr Green I; *Invitrogen (Lofer, Rakousko)*: RNaseOUT, M-MLV reverzní transkriptáza, random primers. Od firmy *Kisker (Steinfurt, Německo)*: nylonová vlna; *Top-Bio (Praha, Česká republika)*: RNA Blue, TAE elektroforetický pufr pro agarosové gely, PCR Ethidium Bromid; *Phenomenex (Torrance, CA, USA)*: Strata-X C 18 Polymeric Solid Phase Extraction Kit; *Fluka (Buchs, Švýcarsko)*: 2,4,6-trinitrobenzenesulfonová kyselina; *Penta Chemicals (Praha, Česká republika)*: methanol p.a. kvalita a *AstraZeneca (Londýn, Velká Británie)*: budesonid. Specifické primery pro 11HSD1 (5'→3'; GAGTTCAGACCAGAAATGCTCC- forward, TGTGTGATGTGATTGAGAATGAGC-reverse), pro 11HSD2 (5'→3'; GATGTTCCCCTCGCCTGAA-forward, TGAGCAGTGCAATAGCTGCCTTG-reverse) a pro β -aktin(5'→3'; CCGTAAAGACCTCTATGCCA-forward, AAGAAAGGGTGTAACGCA-reverse) byly dodány firmou *VBC-Genomics (Wien, Rakousko)* a dextransulfát sodný (M.W. 40000-50000) od firmy *USB (Cleveland, USA)*. Od firmy *Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA)* byly zakoupeny: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpEraseUNG, TaqMan Gene Expression Assays pro COX-2 (kat.č. Rn00568225 -m1), 11HSD1 (kat.č. Rn00567167-m1), TNF- α (kat.č. Rn00562055-m1), IL-1 β (kat.č. Rn015-14151-m1), MUC-2 (kat.č. Rn01498195-m1) OPN (kat.č. Rn 01449972-m1), GR (kat.č. Rn 00561369-m1), S100A4 (kat.č. Rn 01451938-m1), C/EBP α (kat.č. Rn00560963-s1,), C/EBP β (kat.č. Rn01423818-m1), C/EBP δ (kat.č. Rn02532069-m1), C/EBP ζ (kat.č. Rn01499036-m1), PPARj (kat.č. Rn00440945-m1,) a TaqMan Endogenous Control Rat GAPDH (kat.č. 4352338). Od firmy *Exbio (Praha, Česká republika)* byly zakoupeny protilátky: anti-rat CD45 Alexa Fluor 488, anti-rat macrophage HIS 36 phycoerithrin, granulocyty anti-rat granulocyte HIS 48 biotin, anti-rat CD45-RA-fluorescein

isothiocyanate, anti-rat CD3-biotin, anti-rat CD4-phycoeritrin Cy5, anti-rat CD8a-phycoerithrin, anti-rat CD161-fluorescein isothiocyanate, Qdot 605 Streptavidin a Hoechst 33258. Heat-killed dry *Mycobacterium butyricum*, inkompletní Freundovo adjuvans; dar od Doc.Ing. Jany Jurčovičové. Od firmy *MP Biomedicals (Solon, OH, USA)* byl zakoupen Corticosterone RIA 3H kit a od firmy *Perkin Elmer (Waltham, USA)* [³H] kortikosteron a scintilační roztok UltimaFlo M cocktail pro HPLC detekci radioaktivních steroidů. [³H]11-dehydrokortikosteron byl vyroben enzymatickou reakcí na našem oddělení.

4.2 Experimentální TNBS kolitida

4.2.1 Použitá zvířata a indukce TNBS kolitidy

K experimentům byli použiti dospělí samci kmene Wistar o hmotnosti 300-350g z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Zvířata byla chována za standardních podmínek při teplotě 22 °C na světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy a měla neomezený přístup k vodě a standardní laboratorní dietě ST 1.

Experimentální kolitida byla vyvolána enterální aplikací 100 µl 50% etanolického roztoku kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové (TNBS) pomocí sondy zavedené do tračniku anestetizovaných zvířat do hloubky 8,5 cm (43). Podle potřeby byly použity jednorázové dávky 30 mg/zvíře nebo pro indukci mírnějšího zánětu dávky 16 nebo 8 mg/zvíře. Kontrolní skupině byla obdobným způsobem aplikována dávka 100 µl fyziologického roztoku.

Zvířata s TNBS indukovanou kolitidou byla rozdělena do 4 skupin. Zvířata dostávala rektálně látky ovlivňující metabolismus glukokortikoidů. Kontrolní skupině bylo aplikováno 100 µl fyziologické roztoku. Druhá skupina byla léčena nespecifickým inhibítorem 11HSD karbenoxolonem v dávce 4 mg/zvíře.den. Třetí skupina dostávala kombinaci karbenoxolonu (4 mg/zvíře.den) a antagonisty glukokortikoidního receptoru mifepristonu (1 mg/zvíře.den). Čtvrté skupině byl podáván glukokortikoid budesonid v dávce 200 µg/zvíře.den. Všechny látky byly podávány po dobu 5 dnů.

Sedmý den byla zvířata usmrcena, tlusté střevo bylo vyjmuto a 3x propláchnuto ledovým fyziologickým roztokem. Následně bylo střevo podélně rozstříženo, zánětem postižená část byla rozdělena na dvě části, z nichž jedna byla uložena do 7% roztoku formaldehydu pro histologickou analýzu a druhá byla použita pro stanovení oxidázové a reduktázové aktivity v tkáňových řezech in vitro. Malá část tkáně byla zmrazena a následně skladována v tekutém dusíku pro potřeby molekulárně biologické analýzy.

4.2.2 Izolace intraepiteliálních lymfocytů

Intraepiteliální lymfocyty byly izolovány upravenou metodou dle Lyscoma a Bruetona (44). Tlusté střevo bylo důkladně očištěno od obsahu opakovaným propláchnutím ledovým fyziologickým roztokem. Následně byly odstraněny zbytky tukové tkáně a střevo bylo rozřezáno na fragmenty o rozměru přibližně 5x5 mm. Ty byly následně vloženy do 50 ml vysilanizovaných Erlenmeyerových baněk naplněných 40 ml media RPMI-1640 obohaceného fetálním bovinním sérem (koncentrace 12,5%) a 10 mM Na₂EDTA. V tomto mediu byla tkáň inkubována při 200 rpm na magnetické míchačce po dobu 20 minut při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Poté byl obsah baněk přefiltrován přes nylonové sítko o průměru 0,45 μm. Filtrát byl přenesen do čistých Erlenmeyerových baněk a uložen na ledu. Obsah sítka byl smíchán s 20 ml RPMI-1640 obohaceného fetálním bovinním sérem o koncentraci 12,5% a směs byla opět důkladně promíchávána po dobu 15 s a následně přefiltrována přes nylonové sítko. Filtrát byl opět uložen na ledu a celý krok byl ještě jednou opakován. Filtráty ze všech tří cyklů inkubace byly následně smíchány a centrifugovány při 700 x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující intraepiteliální lymfocyty a buňky střevní sliznice byla resuspendována v 5 ml RPMI-1640 o teplotě 4°C a uchována na ledu. Tento roztok byl přefiltrován přes nylonové sítko a opět centrifugován při 700 x g po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 44% Percollu pokojové teploty o objemu 24 ml. Do každé z předem připravených centrifugačních zkumavek bylo odměřeno 15 ml 67% Percollu, na který byla opatrně navrstvena směs buněčné suspenze v 44% Percollu popsaná výše. Následovala centrifugace při 700 x g po dobu 20 minut při pokojové teplotě s maximální akcelerací a bez brzdění. Po centrifugaci byla odsáta horní polovina gradientu a následně byly pipetou odebrány buňky na rozhraní gradientu. Takto odebraná suspenze buněk byla naředěna v poměru 1:3 s RPMI-1640 o teplotě 4 °C a centrifugována při 700 x g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující frakci intraepiteliálních lymfocytů byla resuspendována v RPMI-1640 a použita k dalšímu zpracování.

4.2.3 Izolace lymfocytů z lamina propria (LPL)

Izolaci LPL z tlustého střeva předcházela izolace intraepiteliálních lymfocytů. Fragmenty tkáně, které zbyly po filtraci na 0,45 μm sítku se přemístily do vysilanizované Erlenmeyerovy baňky, do které bylo přidáno 30 ml RPMI-1640 obsahující kolagenázu typu 4 v koncentraci 1 mg/ml. Vzniklá směs se inkubovala 30 min v inkubátoru při 37 °C za stálého míchání rychlostí 200 rpm. Směs byla průběžně kontrolována a v případě poklesu pH bylo toto upraveno přidáním dalších 10 ml RPMI-1640 s kolagenázou. Následně se reakční směs přefiltrovala a v případě viditelných, dosud nenatravených fragmentů na sítku, byl celý proces ještě jednou opakován. Do vzniklého filtrátu byl ihned po filtraci přidán FBS (výsledná koncentrace 10%) a filtráty byly až do dalšího zpracování uskladňovány na ledu. Následně byly filtráty centrifugovány při 700 x g při 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl opatrně slit a peleta resuspendována v 10 ml RPMI-1640 obsahujícím 10% FBS a opět stočena za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn, peleta resuspendována v 24 ml 44% Percollu a vzniklá směs byla opatrně navrstvena na 15 ml 67% Percollu. Hustotní gradient byl centrifugován při 700 x g při pokojové teplotě po dobu 20 minut s maximální akcelerací a bez brzdění. Poté byl gradient opatrně rozebrán. Horní vrstva, která obsahovala hlavně epiteliální buňky a hleny, byla odstraněna a rozhraní gradientu s LPL bylo přepipetováno do zvláštní nádoby. Získaná frakce LPL byla smíchána s 50 ml RPMI-1640 obsahujícími 10% FBS a stáčena při 700 x g po dobu 5 minut. Proces promytí byl opakován ještě jednou a buňky byly uskladněny na ledu pro další použití.

4.2.4 Příprava obohacené frakce T buněk ze sleziny a mezenteriálních lymfatických uzlin

Z čerstvě zabitého zvířete byly jemnou preparací odstraněny mezenteriální lymfatické uzliny a slezina. Orgány byly v průběhu preparace shromažďovány v roztoku RPMI-1640 na ledu. Suspenze byla připravena roztíráním nastříhnutého orgánu v 3 ml RPMI-1640 v Petriho misce pístem sterilní injekční stříkačky. Takto připravená suspenze byla přefiltrována přes 45 μm nylonové sítko. Erytrocyty byly ze suspenze sleziny odstraněny 5 minutovou lyzí v ACK roztoku (NH_4Cl 0,15M, KHCO_3 10mM, EDTA 0,1mM) a následnou centrifugací při 700 x g. Suspenze buněk zbavených erytrocytů byla pak přenesena do kolony s nylonovou vlnou nasycenou RPMI-1640 a inkubována při 37 °C 45 minut (45). Následně byla frakce

obohacených T-splenocytů zachycena v 50 ml zkumavce typu Falcon a umístěna na led do dalšího zpracování. Kolona byla 3 x promyta 50 ml RPMI-1640 při teplotě 37 °C. Pak byla nylonová vlna umístěna do RPMI-1640 s teplotou 4 °C a mechanicky rozvolněna. Roztok s uvolněnými adherentními buňkami byl přemístěn do 50 ml zkumavky typu Falcon a uchován na ledu do dalšího zpracování.

4.2.5 Inkubace střevních tkáňových explantátů

Pro přípravu byly použity dvoudenní mláďata samců Wistar, která byla usmrcena dekapitací. Poté jemnou preparací byl asepticky odebrán distální kolon. Střevo bylo nastříháno na 2 mm fragmenty a inkubováno při 37 °C v atmosféře pneumoxidu v DMEM obsahujícím 10% FBS a TNF- α nebo IL-1 β v koncentraci 10 ng/ml po dobu 24 a 48 hodin. Následně byly explantáty vyjmuty pinzetou, osušeny od přebytečného média a homogenizovány v lyzačním roztoku pro izolaci RNA.

4.2.6 Průtoková cytometrie (FACS)

Pro charakterizaci buněk izolovaných ze sleziny, střeva a mezenterálních lymfatických uzlin byla použita metoda průtokové cytometrie (Flow Analysis Cytometry System). Čerstvě vyizolované buňky byly resuspendovány v PBS obsahujícím 0,1% želatiny a 0,01% NAN₃ a následně rozpipetovány do 96-jamkové destičky, kde byly označeny fluorescenčními protilátkami proti specifickým CD (cluster definition) znakům jednotlivých typů buněk. Leukocyty byly označeny anti-rat CD45 Alexa Fluor 488, makrofágy anti-rat macrophage HIS 36 phycoerithrin a granulocyty anti-rat granulocyte HIS 48 biotin. Pro označení B buněk, T buněk a Th a Tc podtypů T buněk byly použity protilátky anti-rat CD45-RA-fluorescein isothiocyanate, anti-rat CD3-biotin, anti-rat CD4-phycoerithrin Cy5 a anti-rat CD8a-phycoerithrin. NK buňky byly označeny pomocí specifického znaku NKR-P1 protilátkou anti-rat CD161-fluorescein isothiocyanate. Pro detekci protilátek s biotinem byla použita fluorescenčně značená sekundární protilátka Qdot 605 Streptavidin. Označené buňky byly dvakrát promyty s PBS, resuspendovány a měřeny pomocí LSRII průtokového cytometru (BD Systems, San Jose, USA) a analyzovány pomocí softwaru FlowJo 9.2. Výsledky představují procento pozitivně označených buněk vztažených k celkovému počtu buněk.

4.2.7 Měření aktivity 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy v tkáňových řezech

Enzymatická aktivita 11HSD byla měřena v obou směrech, tj. jako oxidace radioaktivně značeného [^3H]kortikosteronu a redukce [^3H]11-dehydrokortikosteronu. Vzorky střevní tkáně byly rozřezány na fragmenty o velikosti přibližně 1-2 mm a vloženy do Erlenmeyerových baněk společně s 10 ml inkubačního pufru v poměru 250 mg tkáně na 10 ml pufru. Inkubační pufr měl následující složení: NaCl 119,0 mM; CaCl₂ 1,2 mM; MgCl₂ 1,2 mM; NaHCO₃ 21,0 mM; K₂HPO₄ 2,4 mM; KH₂PO₄ 0,6 mM; glukosa 10,0 mM; glutamin 2,5 mM; β -hydroxybutyrát sodný 0,5 mM; manitol 10,0 mM. Inkubační pufr byl oxygenován pneumoxidem (95% O₂ /5% CO₂), pH 7,4. Vzorky tkáně spolu s inkubačním pufrem byly nejdříve preinkubovány po dobu 20 minut při teplotě 37 °C v Erlenmeyerové baňce v atmosféře pneumoxidu. Následně byl přidán [^3H]kortikosteron (1,45·10⁻⁶M) nebo [^3H]11-dehydrokortikosteron (1,45·10⁻⁶M). Po přidání substrátů byla tkáň inkubována dalších 80 minut. Pak byl přidán neradioaktivní kortikosteron (10⁻⁴M), reakční směs okamžitě ochlazená na ledu a centrifugována při 1600 x g po dobu 10 min při 4 °C. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy pomocí Strata-X C 18 Polymeric Solid Phase Extraction Kit a ty pak následně analyzovány pomocí HPLC. Peleta po centrifugaci byla použita ke stanovení sušiny. Výsledky byly vyjádřeny v pmolech vzniklého [^3H]11-dehydrokortikosteronu nebo [^3H]kortikosteronu vztahených na mg suché váhy a hodinu.

4.2.8 Extrakce glukokortikoidů

Extrakce steroidů byla prováděna metodou extrakce na pevné fázi (SPE) pomocí kolonek reverzní fáze C 18 Strata-X C 18 na extrakční platformě. Kolonky byly nejdříve aktivovány 1 ml metanolu a poté promyty 1 ml vody. Po nanesení vzorku o objemu 2 ml byla kolonka propláchnuta 1 ml 5% methanolu a následně byly steroidy 2 x vyextrahovány pomocí 500 μl metanolu. Vzorky vyextrahovaných steroidů byly do sucha odpařeny v atmosféře dusíku při teplotě 45 °C, následně uskladněny při teplotě -20 °C a analyzovány pomocí HPLC, jak je podrobně popsáno v kapitole 4.2.9.

4.2.9 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tritiem značené kortikosteroidy byly analyzovány na přístroji HPLC Agilent 1100 od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Vzorky byly rozpuštěny v 50 μ l metanolu a 25 μ l bylo nastříknuto na kolonu Merck C18 reverse phase. Eluce byla provedena pomocí lineárního gradientu voda-metanol od 58:42 (v/v) do 38:62 (v/v) po dobu 15 minut při průtokové rychlosti 1 ml/min a teplotě kolony 46 °C. Následně byla kolona izokraticky promývána po dobu 5 min 100 % methanolem průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Po ukončení eluce, před aplikací dalšího vzorku, byla kolona promývána směsí methanol-voda 42:58 (v/v) po dobu 5 minut. Pro detekci byl použit detektor Beckman 171 (Beckman, Fullerton, CA, USA) a scintilační UltimaFlo M cocktail. Identifikace byla provedena na základě srovnání retenčních časů jednotlivých standardů.

4.2.10 Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno Bradfordovou metodou. Nejdříve bylo následujícím způsobem připraveno reakční činidlo: 25 mg Coomassie Brilliant Blue bylo rozpuštěno v 12,5 ml 96% ethanolu, poté bylo přidáno 25 ml 85 % kyseliny fosforečné a vzniklá směs byla doplněna vodou na celkový objem 250 ml a přefiltrována. Vlastní reakční směs o celkovém objemu 1100 μ l byla složena ze vzorku, 10 - 100 μ l, 150 mM NaCl a 1000 μ l reakčního činidla. Po přidání reakčního činidla byla směs inkubována po dobu 20 minut a následně měřena absorbance při 595 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí standardu BSA.

4.2.11 Izolace totální RNA ze střevní tkáně

Totální RNA byla vyizolována ze vzorku zánětem postižené tkáně zamražené v tekutém dusíku pomocí RNA Blue (Top-Bio) dle návodu výrobce. Vlastní izolace byla prováděna ze 100 mg střevní tkáně. Vzorek tkáně byl vložen do 1 ml RNA Blue a poté zhomogenizován pomocí homogenizátoru Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při rychlosti 13000 otáček za minutu. Po inkubaci bylo přidáno 200 μ l chloroformu a směs byla vortexována asi 10 sekund. Následně byl vzorek centrifugován při 12000 x g po dobu 10 min

při teplotě 4 °C. Vodní fáze obsahující RNA byla odebrána pomocí pipety do nové zkumavky a následně vysrážena přidáním 0,5 ml isopropylalkoholu. Precipitace probíhala po dobu minimálně 10 minut při teplotě -20 °C. Poté byla směs zcentrifugována při 12000 x g po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Supernatant byl odsát, k peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu, vzniklá směs byla důkladně protřepána a poté zcentrifugována. Po centrifugaci byl důkladně odstraněn supernatant a vzorek vysušen při 45 °C volně na vzduchu až peleta zprůhledněla. Následně byla RNA rozpuštěna v 20 µl vody pro PCR.

4.2.12 Příprava cDNA knihovny

Vzorky RNA byly přepsány do cDNA pomocí reverzní transkripce za pomoci Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptázy (M-MLV) ve výrobce doporučeném objemu 20 µl. Nejdříve byla napipetována směs: 1 µg totální RNA se 100 ng random primers, 1 µl 10 mM dNTP mix a 12 µl PCR H₂O. Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut při teplotě 75 °C a následně ochlazená. Po ochlazení byly přidány 4 µl reakčního pufru, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl (40 jednotek) rekombinantního ribonukleázového inhibitoru RNase OUT a 1 µl (200U) M-MLV RT. Poté následovala inkubace 50 minut při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena zahřátím směsi na 70 °C po dobu 5 minut. Vzniklé vzorky cDNA byly 10 x naředěny PCR vodou a zmrazeny při teplotě -20 °C.

4.2.13 Kvantitativní Q-PCR

Pro kvantifikace genů 11HSD1 a 11HSD2 ve střevních vzorcích byl použit přístroj LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) a jako referenční gen byl použit β-aktin. Při RT-PCR analýze cDNA pro geny TNF-α, IL-1β, COX-2 a MUC-2 a pro stanovení mRNA pro 11HSD1 z intraepiteliálních lymfocytů a lymfocytů lamina propria byl použit přístroj AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument od firmy Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Při měření pomocí přístroje LightCycler byl použit kit Fast Start DNA Master Sybr Green I. Celkový objem reakční směsi činil 20 µl a byl složen z reakčního pufru LightCycler-DNA Master Sybr Green I mix, 10 µl, 1 µl 10 x naředěné cDNA; MgCl₂ 3 mM (11HSD1), 4 mM (11HSD2) nebo 5 mM (β-aktin); každý z páru primeru 0,5 nM. K analýze vzorku byl

použit následující program: počáteční preinkubace a denaturace při teplotě 95 °C po dobu 10 min; následná amplifikace, nejdříve při teplotě 95 °C po dobu 15 sekund, dále 55 °C po dobu 10 sekund (11HSD1, β -aktin) nebo 60 °C po dobu 5 sekund (11HSD2) a následně při teplotě 72 °C po dobu 15 sekund (11HSD1, β -aktin) nebo 20 sekund (11HSD2). Pro amplifikaci bylo použito 40 cyklů. Rychlost teplotní změny byla 20 °C/s. Akvizice fluorescence byla na konci elongace. Pro verifikaci čistoty produktu amplifikace byla provedena rozpouštěcí analýza (melting analysis): 72 °C po dobu 10 sekund (rychlost změny teploty 20°C/s) a 97 °C po dobu 10 sekund (rychlost změny 0,1°C/s). Při rozpouštěcí analýze byla měřena fluorescence kontinuálně. V každé prováděné analýze byl se vzorky analyzován i interní standard pro následnou korekci výsledku mezi jednotlivými analýzami. Po rozpouštěcí analýze byly z každého cyklu měření náhodně vybrány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu pro stanovení délky nasyntetizovaných fragmentů. Z hodnot získaných z Q-PCR byla následně vypočítána hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen. Kalibrační křivky byly vyrobeny sériovým řaděním ze standardního vzorku cDNA pocházejícího ze zdravé střevní tkáně (rozsah řaděním 5-1000 x pro 11HSD1, 5-10000 x pro 11HSD2).

Při Q-PCR pomocí přístroje AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument bylo celkové množství reakční směsi 20 μ l. Směs se skládala z 1 μ l 10 x naředěné cDNA získané reverzní transkripcí, 10 μ l reakčního pufru TaqMan Universal PCR Master Mix s AmpEraseUNG a 1,5 μ l firemně vyrobeného TaqMan Gene Expression Assay pro konkrétní geny. K vlastní analýze byl použit následující program: nejdříve aktivace uracyl-N-glykosylasy při teplotě 50 °C po dobu 2 min, poté „hotstart“ polymerasy při teplotě 95 °C po dobu 10 min a následně 40 cyklů sestávajících z 15 sekund trvající denaturace, annealing primerů a extenze při 60 °C po dobu 1 min. Ze získaných hodnot CT byla následně vypočtena hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen. Jako standard byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně naředěná v rozsahu 1-10000 x. Výsledky byly vypočteny jako poměr relativních koncentrací zkoumaných genů a referenčního genu.

4.3 Experimentální DSS kolitida u myši kmene Balb/c

4.3.1 Použitá zvířata a indukce DSS kolitidy

Pro indukci experimentální DSS kolitidy (46) byly použity tříměsíční myši kmene Balb/c od firmy Velaz. Po celou dobu experimentů byla zvířata ustájena v příručním zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR a chována za standardních podmínek při teplotě 22 °C, fotoperiodě 12 hod. světla a 12 hod. tmy s volným přístupem ke dietě a pití. Experimentální DSS kolitida u myši byla indukována podáváním 3% roztoku dextran sulfátu sodného v pitné vodě po dobu 7 dní. Zvířata byla průběžně kontrolována na okultní krvácení. Zvířata byla na konci experimentu usmrcena dekapitací a použita pro další účel.

4.3.2 Laserová mikrodisekce (LCM)

Pro přípravu vzorků pro LCM (Laser Captured Microdissection) byly z čerstvě zabitého zvířete jemnou preparací vyjmuty střevo, mezenterální lymfatické uzliny a slezina. Všechny tkáně byly pečlivě očištěny od tuku a pojiva. Tkáně pak byly zality do bločku s použitím montovacího média Tissue-Tek tak, aby byla jednoznačně zaručena orientace vzorku. Bločky byly následně zmrazeny a uskladněny v kapalném dusíku. Do dalšího zpracování byly bločky umístěny do kapalného dusíku. Před samotným krájením byly bločky temperovány 30 minut v mikrotomu Leica CM1850 Cryocut při teplotě -19 až -20 °C. Temperovaný bloček byl namontován na držák vzorku pomocí Tissue-Teku a krájen žiletkovým nožem na 8-12 µm řezy. Následně byly řezy umístěny na sklíčko pokryté PEN membránou a umístěny na dobu 5 minut do 75% etanolu. Fixovaný a Tissue-Teku zbavený preparát byl nejdříve barven 5% roztokem kresolové violeti v etanolu po dobu 45 sekund a následně 4% roztokem eosinu B po dobu 5 sekund. Sklíčko pak bylo odbarveno několikanásobným ponořením do čistého etanolu a bylo ponecháno několik sekund volně schnout. Obarvený preparát byl umístěn do platformy LCM, kde byly vyřezávány žádané struktury. Vyřezané oblasti byly shromažďovány ve víčku mikrozkuhavky naplněné 75 µl RLT lyzačního roztoku. Po vyřezání všech oblastí byly mikrozkuhavky krátce stočeny na stolní centrifuze a skladovány při -80 °C do dalšího zpracování.

4.3.3 Izolace totální RNA z LCM vzorků

Pro izolaci totální RNA ze vzorků zpracovaných pomocí laserové mikrodisekce byl použit komerčně dostupný kit Qiagen RNeasy Micro Kit přesně podle návodu výrobce. Eluce

totální RNA byla provedena 13 μ l PCR vody a získaná RNA byla okamžitě reverzně transkribována.

4.3.4 Příprava cDNA knihovny z LCM vzorků

Totální RNA získaná izolací byla přepsána pomocí Enhanced Avian Reverse Transcriptase podle návodu výrobce. Objem reakční směsi byl 20 μ l. V první fázi byla připravena směs 1 μ l DTP mixu, 1 μ l Random Primers a 8 μ l totální RNA. Směs byla inkubována 5 minut při 70 °C. Poté byla směs ochlazena a následně byl přidán Master Mix se složením 2 μ l 10x Reaction Buffer, 1 μ l Enhanced Avian Reverse Transcriptase, 1 μ l RNase OUT a 6 μ l PCR vody. Reakční směs byla promíchána a inkubována při 25 °C 15 minut a následně při 42 °C 50 minut. Získaná cDNA byla skladována při -20 °C.

4.3.5 Izolace totální RNA, reverzní transkripce a kvantitativní Q-PCR makrovzorků střeva a imunitních orgánů

Izolace totální RNA ze vzorků střeva a imunitních orgánů byla prováděna pomocí komerčně dostupného kitu Gene Elute Mammalian Total RNA Kit stejně jako v kapitole 4.3.2. Pro reverzní transkripci byl použit komerčně dostupný kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit přesně podle doporučení výrobce. Kvantifikace genů byla provedena pomocí přístroje AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument jak je uvedeno v kapitole 4.2.13.

4.4 Experimentální model adjuvantní artritidy

K experimentům s adjuvantní artritidou byli použiti dospělí samci kmene Lewis ve věku 7-9 týdnů, kteří pocházeli ze standardního chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Po celou dobu trvání pokusů byla zvířata ustájena v příručním zvěřinci za standardních podmínek při teplotě 22°C, fotoperiodě 12 hod. světla a 12 hod. tmy a volném přístupu k vodě a standardní dietě. Adjuvantní artritida byla indukována subkutánní injekcí tepelně upravených bakterií *Mycobacterium butyricum* v kompletním Freudovu adjuvans do proximální části ocasu (47). Kontrolní skupina byla obdobně očkována fyziologickým roztokem. Nejdříve

byly hodnoceny rozdíly mezi otoky artritických a kontrolních zvířat do osmého dne po aplikaci. Poté byla zvířata se slabě indukovaným zánětem odstraněna a zbylí potkani rozděleni do 5 skupin. První skupině byl denně subkutánně podáván rekombinační kompetitivní inhibitor receptoru pro TNF- α (Etanercept) v množství 4 mg/kg. Druhá skupina byla ovlivněna kompetitivním antagonistou receptoru IL-1 β (Anakinra) pomocí subkutánně aplikované miniosmotické pumpy Alzet 2ML1 (Alzet, Cupertino CA, USA). Dávkování bylo zajištěno kontinuální rychlostí 5 mg/kg/hod. Třetí skupina dostávala denně subkutánně nespecifický inhibitor 11HSD karbenoxolon v dávce 12,5 mg/kg ve fyziologickém roztoku. Čtvrté skupině byl denně intraperitoneálně podáván antagonist glukokortikoidních receptorů mifepriston v dávce 30 mg/kg ve fyziologickém roztoku. Poslední skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok. Zvířata byla usmrcena v 18. den experimentu a následně byly vypreparovány inguinální, kaudální a lumbální lymfatické uzliny a zmrazeny v tekutém dusíku pro potřeby molekulárně-biologické analýzy. Kolenní klouby posloužily k přípravě primární kultury synoviocytů.

4.4.1 Příprava inokula pro indukci adjuvantní artritidy

Inokulum bylo připraveno rozetřením 100 mg tepelně inaktivovaných bakterií *Mycobacterium butyricum* v třecí misce. K rozdrčeným bakteriím byly přidány 3 ml nekompletního Freundova adjuvans (parafrinový olej:fyziologický roztok:Tween 80 v poměru 1:0,67:0,17) a směs dále roztírána po dobu 2 minut. Produkt byl odložen do 15 ml zkumavky. Do třecí misky byly přidány další 3 ml nekompletního Freundovo adjuvans. Směs byla po 30 sekundách roztírání přidána k ostatnímu podílu. Takto připravené inokulum lze skladovat při 4 °C ve tmě několik měsíců.

Vlastní indukce adjuvantní artritidy byla prováděna subkutánní injekcí 100 μ l inokula do proximální části ocasu ve vzdálenosti 2 cm od kořene ocasu v éterové narkóze. V průběhu očkování zvířat docházelo k fázové separaci inokula, kterému se zamezovalo vortexováním nebo inverzním mícháním. Pro sledování rozvoje artritidy byla každodenně měřena hmotnost zvířat a otoky končetin v místech hlezenního kloubu a v oblasti poloviny hlezenní kosti. Vlastní měření bylo prováděno pomocí strojnického posuvného měřítka ve dvou na sebe navzájem kolmých rovinách v předozadním a bočním směru. Na výpočet plochy elipsy postiženého kloubu byl použit vztah S elipsy = $\pi \times a \times b$, přičemž a představuje rozměr v bočním směru a b v předozadním směru (48).

4.4.2 Izolace synoviocytů ze synoviální tkáně

Synoviocyty byly izolovány z čerstvě odebrané synoviální tkáně kolenního kloubu. Jemnou preparací pomocí nůžek a pinzety byl kolenní kloub pečlivě očištěn od svalové a tukové tkáně. Kloubní pouzdro bylo otevřeno pomocí zašpičatěných nůžek a synovium jemně odpreparováno. Tkáň byla přemístěna do vysilanizované Erlenmeyerovy baňky s roztokem RPMI-1640 (20 ml) obsahujícím kolagenázu typu 4 v koncentraci 1 mg/ml. Směs byla inkubována při 37 °C a atmosféře 95% O₂/5% CO₂ za stálého míchání 200 rpm po dobu 40-60 min. Po skončení inkubace bylo trávení zastaveno přidáním 5 ml FBS a roztok byl přefiltrován přes 45 µm nylonové sítko. Směs byla centrifugována při 700 x g po dobu 5 minut, supernatant odstraněn a peleta znovu resuspendována v RPMI-1640 bez FBS a následně centrifugována. Supernatant byl odstraněn do sucha a peleta byla zpracována pro přípravu totální RNA anebo použita na kultivaci buněk.

4.4.3 Izolace totální RNA ze synoviální tkáně

Ze zpracovávaných vzorků byla vyextrahována RNA prostřednictvím produktu Genelute Mammalian Total RNA Kit. Vlastní lýze buněk byla provedena smícháním suspenze buněk s roztokem „Lysis solution“, který byl obohacen 2-merkaptanolem v množství 10 µl/ml. Roztok obsahující lyzované buňky byl přenesen do filtrační kolonky a zcentrifugován při 14000 x g po dobu 2 min při teplotě 4 °C. Po ukončení centrifugace byl filtrát smíchán s 250 µl 70% ethanolu. Vzniklý roztok byl důkladně protřepán a následně přenesen do vázací kolonky. Následovala centrifugace při 14000 x g po dobu 15 sekund při teplotě 4 °C. Poté byla kolonka opět za pomoci centrifugace promyta 500 µl roztoku „Wash solution 1“ a následně 500 µl roztoku „Wash solution 2“. Po promytí následovala centrifugace vázací kolonky s 500 µl roztoku „Wash solution 2“ při 14000 x g po dobu dvou minut při teplotě 4 °C. V poslední fázi bylo do kolonky přidáno 50 µl roztoku „Elute solution“ a následovala centrifugace při 14000 x g po dobu 1 min při teplotě 4 °C. Získaná RNA byla uskladněna při teplotě -70 °C nebo použita pro přípravu cDNA knihovny.

4.4.4 Příprava suspence buněk z lymfatických uzlin

Z čerstvě zabitého zvířete byly jemnou preparací sterilně odděleny inguinální, kaudální a lumbální lymfatické uzliny. Uzliny byly průběžně během izolace uchovávány v roztoku RPMI 1640 na ledu. Poté byly jednotlivé podíly přeneseny do 5 ml čerstvého RPMI-1640 v středně velké Petriho misce a každá uzlina byla nastřížena. Buněčná směs byla získána krouživým pohybem pístu jednorázové plastové injekční stříkačky. Po rozdrčení jednotlivých uzlin byla směs přefiltrována přes 45 µm sítko a přemístěna do 15 ml zkumavky typu Falcon. Suspenze se centrifugovala 5 min při 700 x g, supernatant byl slit a peleta ještě 2 x promyta inkubačním médiem RPMI-1640. Vyizolované buňky byly použity pro izolaci RNA nebo pro přípravu primokultury.

4.4.5 Měření aktivity 11HSD1 a exprese 11HSD1 mRNA

Aktivita 11HSD1 byla měřena na buňkách synoviální tkáně. Po izolaci byly synoviocyty vysety na 24-jamkovou kultivační destičku v RPMI 1640 v počtu 15000 buněk na jamku. Objem RPMI 1640 byl 2ml na jamku a obsahoval 21 nmol/l [³H]kortikosteronu nebo [³H]11-dehydrokortikosteronu. Inkubace se substrátem trvala 24 hodin. Glukokortikoidy byly z média extrahovány pomocí Strata-X C18 kolonek, tak jak je uvedeno v kapitole 4.2.8. Reverzní transkripce a Q-PCR byly prováděny přesně podle kapitoly 4.3.5.

4.5 Regulace exprese 11HSD1 prostřednictvím PPAR γ dráhy

Efekt agonisty PPAR γ receptoru pioglitazonu byl testován na primární kultuře hladkých svalových buněk (VSMC) izolovaných z aorty potkana (49). Po dosažení konfluence VSMC, byl do tkáňové kultury přidán pioglitazon ve finální koncentraci 0,001-10 µM po dobu 24 hodin. Následně byla měřena enzymová aktivita nebo byly buňky sklizeny pro molekulárně-biologickou analýzu.

4.5.1. Měření reduktázové aktivity 11HSD1

Měření reduktázové aktivity 11HSD1 v primární kultuře hladkých svalových buněk bylo prováděno podobně jako v kapitole 4.2.7.

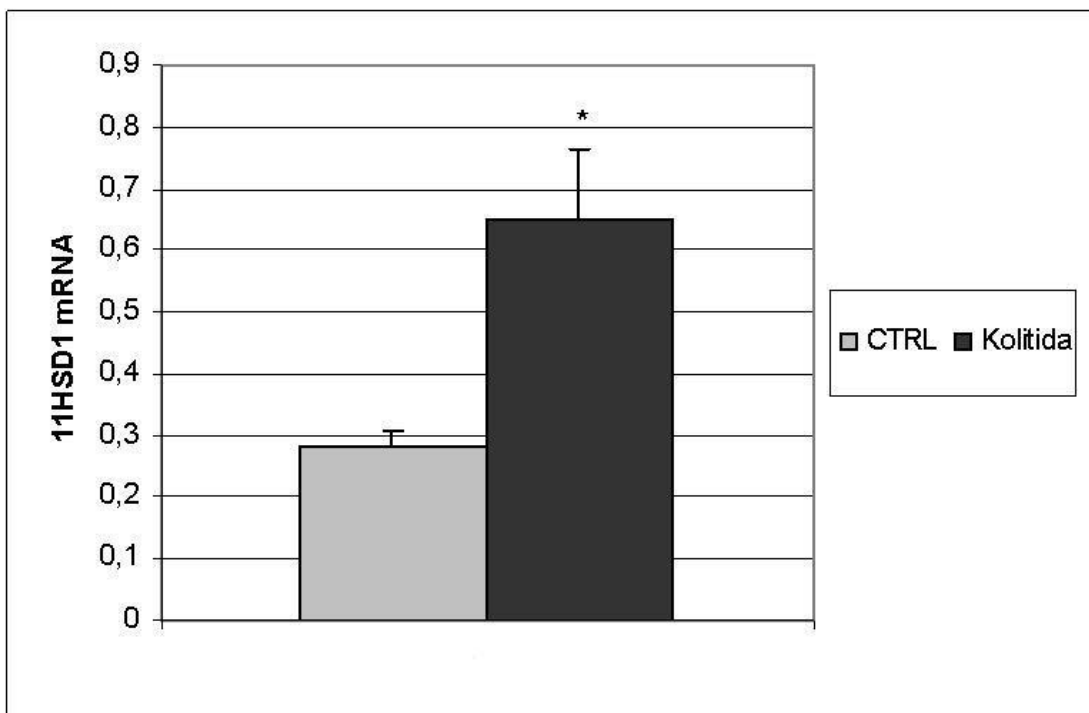
4.5.2 Izolace RNA, reverzní transkripce a měření exprese 11HSD1 a transkripčních faktorů C/EBP ve vzorcích VSMC

Totální RNA byla izolována z buněk VSMC pomocí Trizolu podle návodu výrobce. Izolovaná RNA byla zbavena kontaminace DNA pomocí AMP-D1 DNázy a reverzní transkripce byla provedena přesně podle kapitoly 4.2.12. a Q-PCR podle kapitoly 4.3.5.

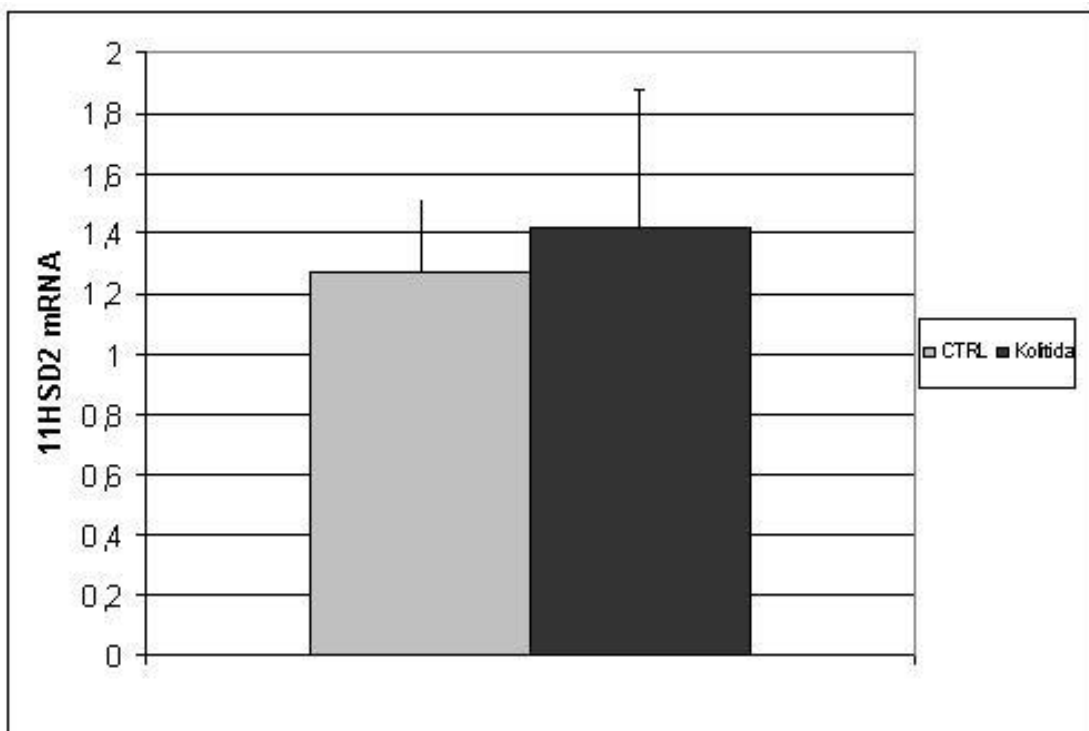
5. Výsledky

5.1. Experimentální DSS kolitida u myši

Střevní zánět u myši s DSS kolitidou byl spojen s průjmem, střevním krvácením a snížením tělesné hmotnosti použitých zvířat. Pro stanovení vlivu kolitidy na periferní metabolismus glukokortikoidů byly metodami Q-PCR kvantifikovány geny pro 11HSD1 a 11HSD2 a měřena aktivita 11HSD1 a 11HSD2. Experimentální DSS kolitida zvýšila expresi mRNA 11HSD1 (Obr. 5.1) ve střevě, zatímco exprese 11HSD2 (Obr. 5.2) změněna nebyla. Obdobně také aktivita 11HSD1 byla zvýšena, zatímco aktivita 11HSD2 se při kolitidě neměnila (příloha č. 1).

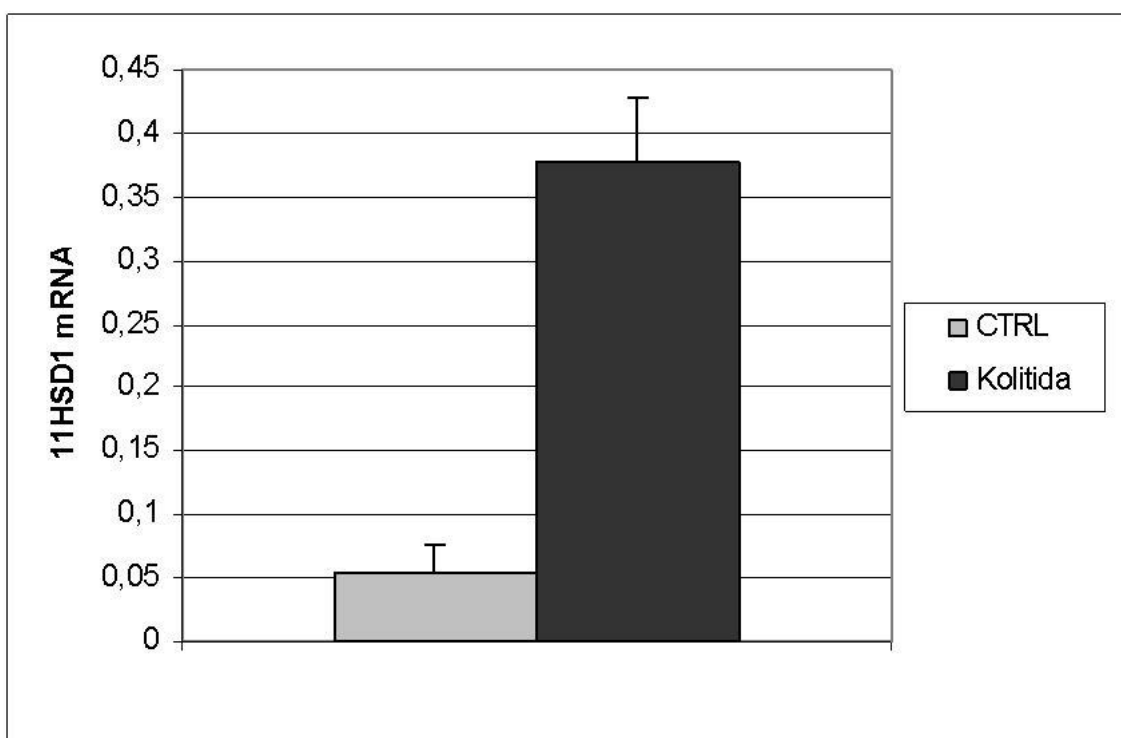


Obrázek 5.1 Expresse 11HSD1 mRNA ve vzorcích tlustého střeva kontrolních a kolitických zvířat. (*P<0,05)

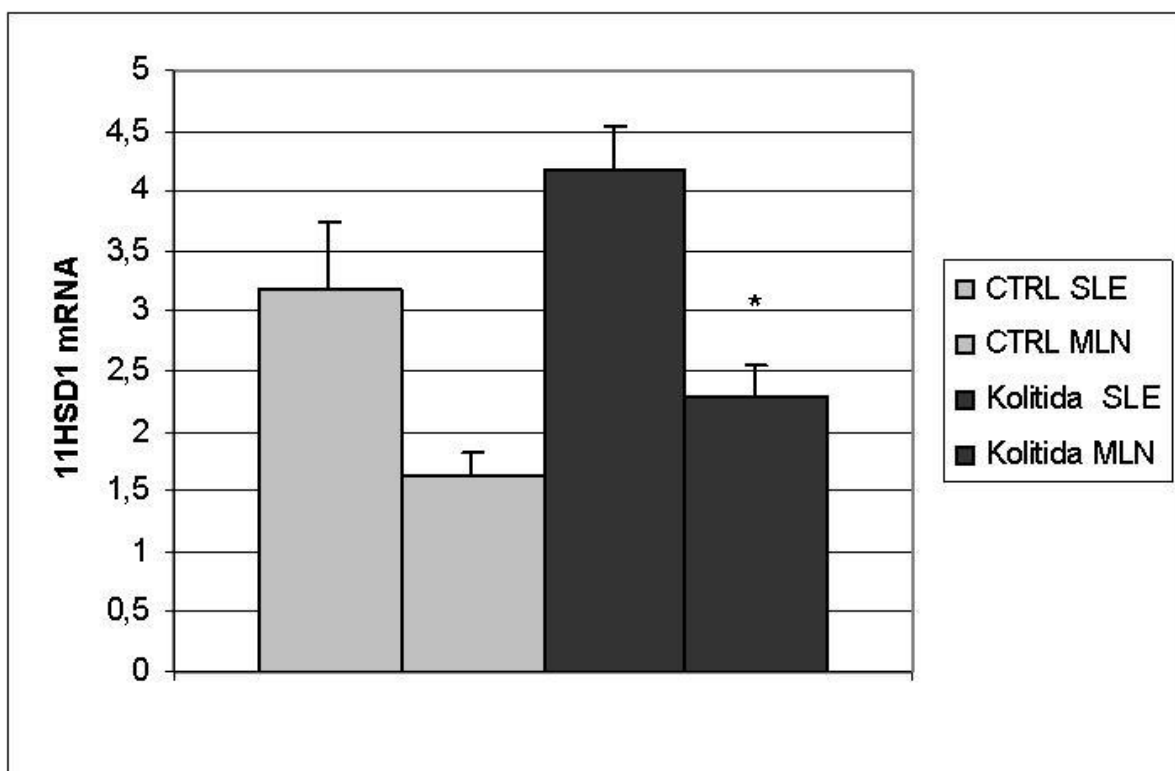


Obrázek 5.2 Expresse 11HSD2 mRNA ve vzorcích tlustého střeva kontrolních a kolitických zvířat.

Pro určení vlivu DSS kolitidy na glukokortikoidní metabolismus v imunitních buňkách střeva a v asociovaných lymfatických tkáních byla měřena exprese 11HSD1 mRNA ve vzorcích mezenteriálních lymfatických uzlin, sleziny a intraepiteliálních lymfocytů izolovaných z kontrolních myší a ze zvířat s kolitidou. Kolitida signifikantně zvýšila expresi 11HSD1 ve intraepiteliálních lymfocytech (Obr. 5.3) a v mezenteriálních lymfatických uzlinách (Obr. 5.4)

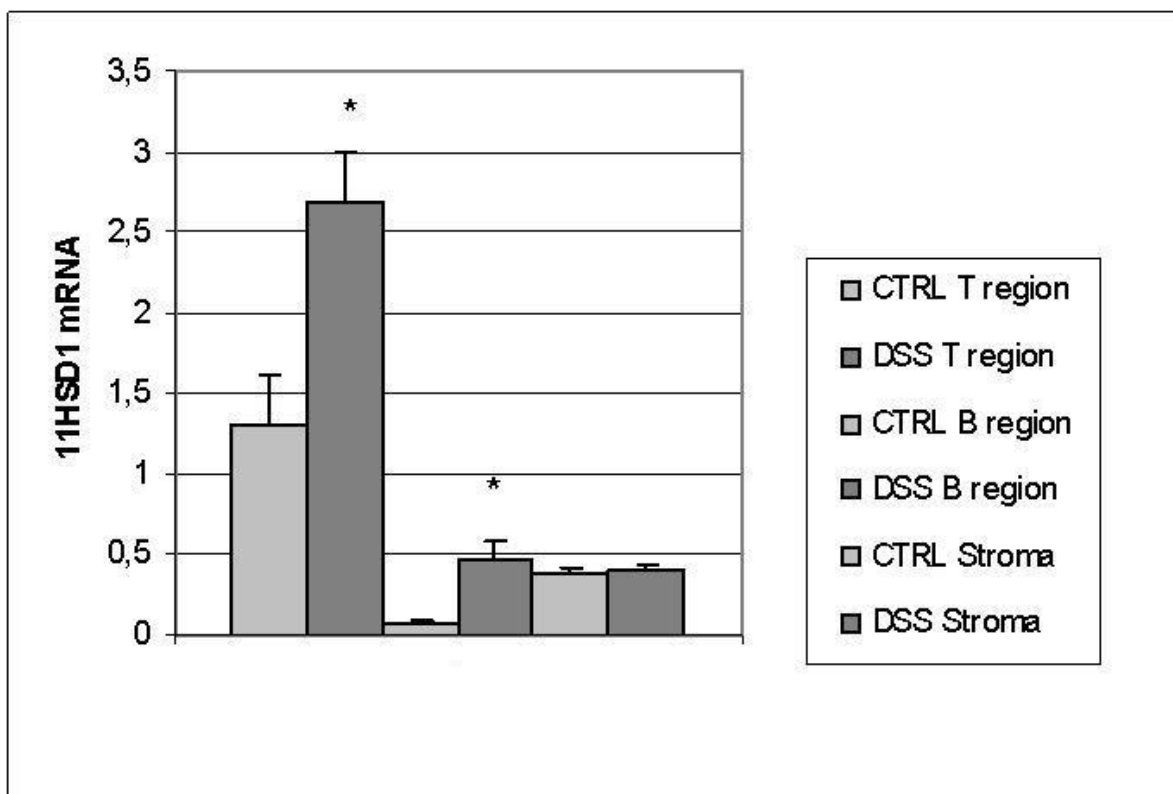


Obrázek 5.3 Expresi 11HSD1 mRNA ve vzorcích mezenteriálních lymfatických uzlin kontrolních a kolitických zvířat. (*P<0,05)



Obrázek 5.4 Expresie 11HSD1 mRNA ve vzorcích mezenterálních lymfatických uzlin a sleziny kontrolních a kolitických zvířat. (* $P < 0,05$)

Pokus provedený u myši s DSS kolitidou ukázal že DSS kolitida zvyšuje expresi 11HSD1 mRNA v mezenterálních lymfatických uzlinách. Lymfatické uzliny lze z histologického hlediska rozdělit na oblasti s folikuly bohaté na B lymfocyty a folikuly dominantně osídlené T lymfocyty. Protože T lymfocyty (CD4+, CD8+) exprimují 11HSD1 a u B lymfocytů nebyla exprese prokázána, byly vyřezány oblasti bohaté na T a B lymfocyty ve kterých byla stanovena exprese 11HSD1.

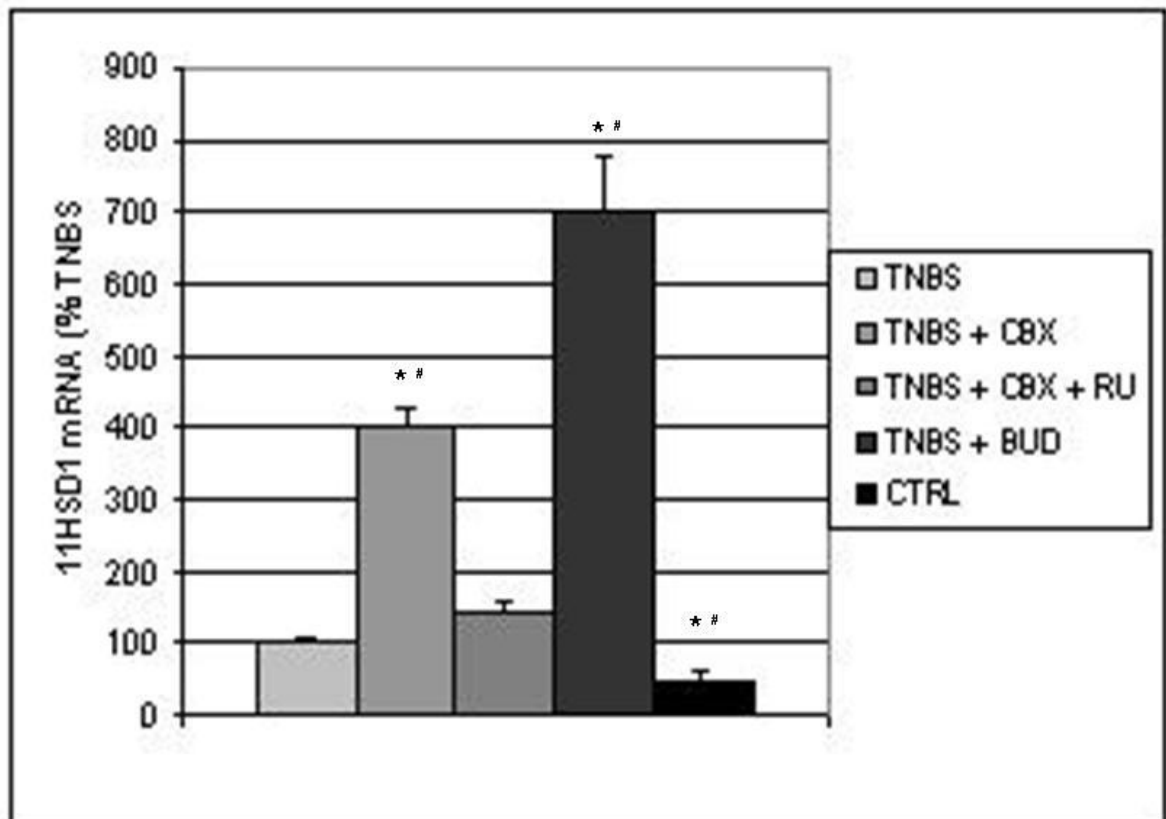


Obr. 5.5 Expres 11HSD1 mRNA ve vzorcích mezenteriálních lymfatických uzlin kontrolních (CTRL) a kolitických zvířat (DSS). (T region * $P < 0,01$) (B region * $P < 0,05$)

5.2 Experimentální TNBS kolitida u potkana

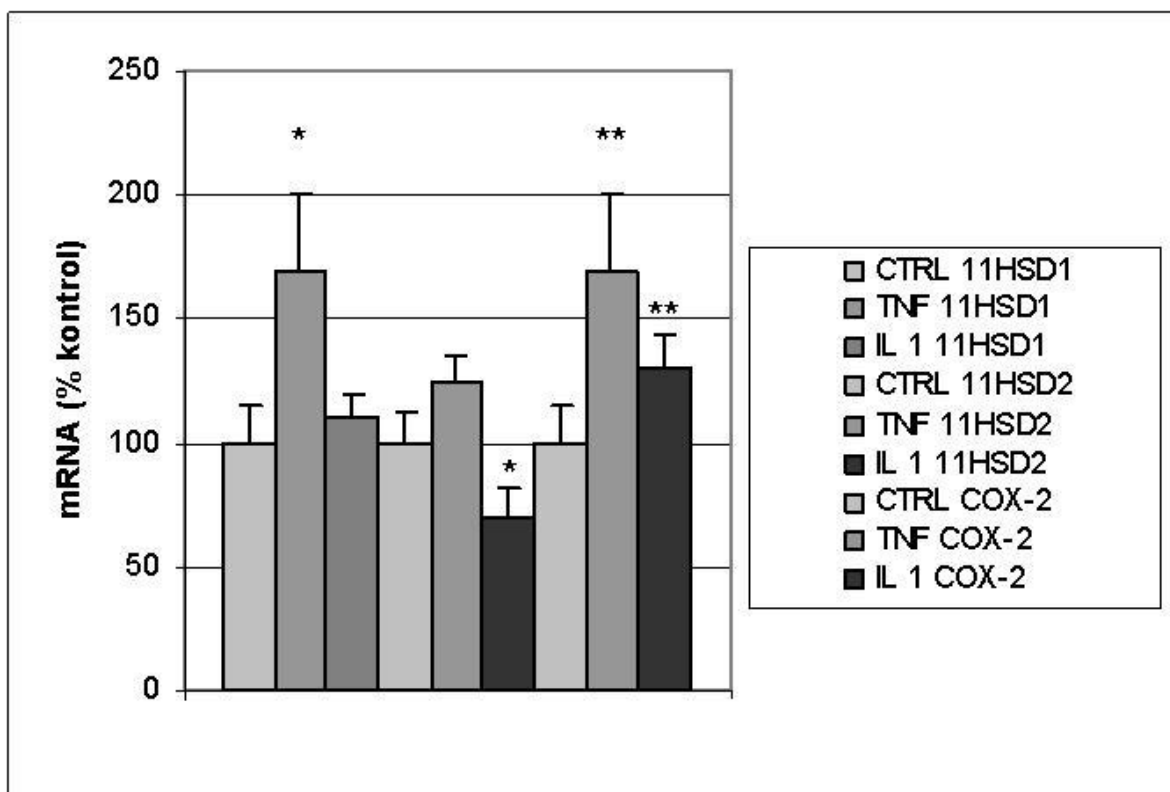
Pokusy provedené u myši s DSS kolitidou (příloha č. 1) a s TNBS kolitidou u potkana (51) prokázaly, že střevní zánět doprovází zvýšená schopnost lokálně konvertovat v zanícené neaktivní tkáni 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron. Otázkou ovšem bylo, zda změněný lokální metabolismus glukokortikoidů může ovlivňovat střevní zánět. Abychom zjistili roli 11HSD v tomto procesu, podávali jsme potkanům s TNBS kolitidou blokátor 11HSD, karbenoxolon a sledovali jsme, jak se inhibice 11HSD projeví na vybraných parametrech zánětu ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, cyklooxygenáza 2, mucin 2). Účinnost karbenoxolonu byla porovnávána se steroidem budesonidem, který bývá používán při léčbě kolitidy. Zjistili jsme, že topické podávání jak karbenoxolonu, tak i budesonidu zvýšilo expresi 11HSD1 v porovnání s neléčenými TNBS zvířaty a že efekt karbenoxolonu je možné inhibovat současným podáváním antagonisty glukokortikoidních receptorů RU486 (Obr. 5.6), což dokládá, že exprese 11HSD1 v tračníku je řízena glukokortikoidy. Zároveň karbenoxolon a

budesonid významně snížily schopnost fragmentů střevní tkáně inaktivovat kortikosteron (příloha č. 2). Oproti efektu na 11HSD1 nevedlo topické podávání karbenoxolonu na rozdíl od budesonidu k výraznému poklesu prozánětlivých markerů, i když kombinace karbenoxolonu a RU-486 vedla ke zvýšené mRNA expresi TNF- α a MUC-2 a k nárůstu aktivity myeloperoxidázy (příloha č. 2). Tyto nálezy svědčí nejspíše o tom, že systémový kortikosteron je důležitější v regulaci některých prozánětlivých markerů, než jeho lokální změny.



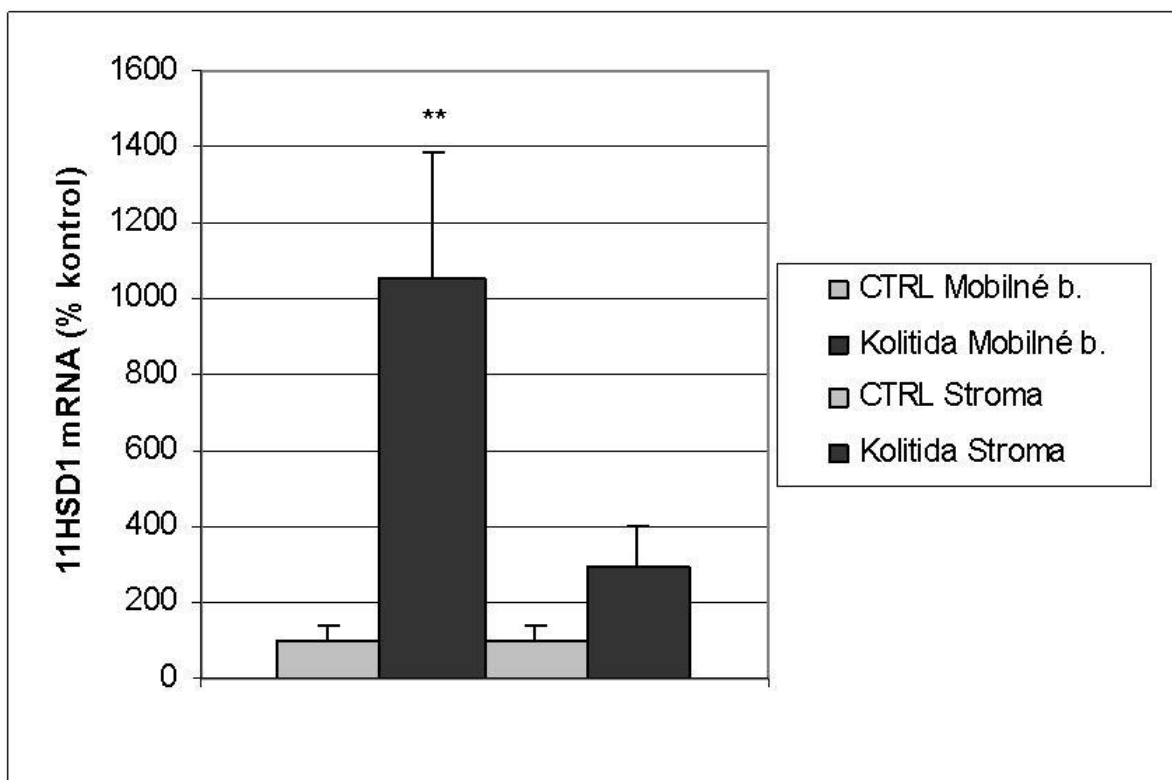
Obrázek 5.6 Expresie 11HSD1 mRNA ve vzorcích tlustého střeva TNBS zvířat. **Signifikantně odlišný od TNBS zvířat. (P<0,01)

Abychom zjistili, zda jsou prozánětlivé cytokiny schopny modulovat 11HSD1 a 11HSD2 ve střevu a zda 11HSD1 exprimovaná v buňkách sekundárních lymfatických orgánů je schopna odpovídat na zánět, studovali jsme (1) efekt prozánětlivých cytokinů na expresi 11HSD1, 11HSD2 a cyklooxygenázu 2 v tkáňových explantátech a (2) vliv experimentální TNBS kolitidy na expresi 11HSD1 mRNA a periferní metabolismus glukokortikoidů v buňkách imunitních orgánů potkana. Jak je ukázáno na obr. 5.7, TNF- α ale již ne IL-1 β zvýšil expresi 11HSD1 v tkáňových explantátech. Na druhou stranu IL-1 β významně snížil expresi 11HSD2. Oba použité cytokiny zvýšily expresi COX-2.

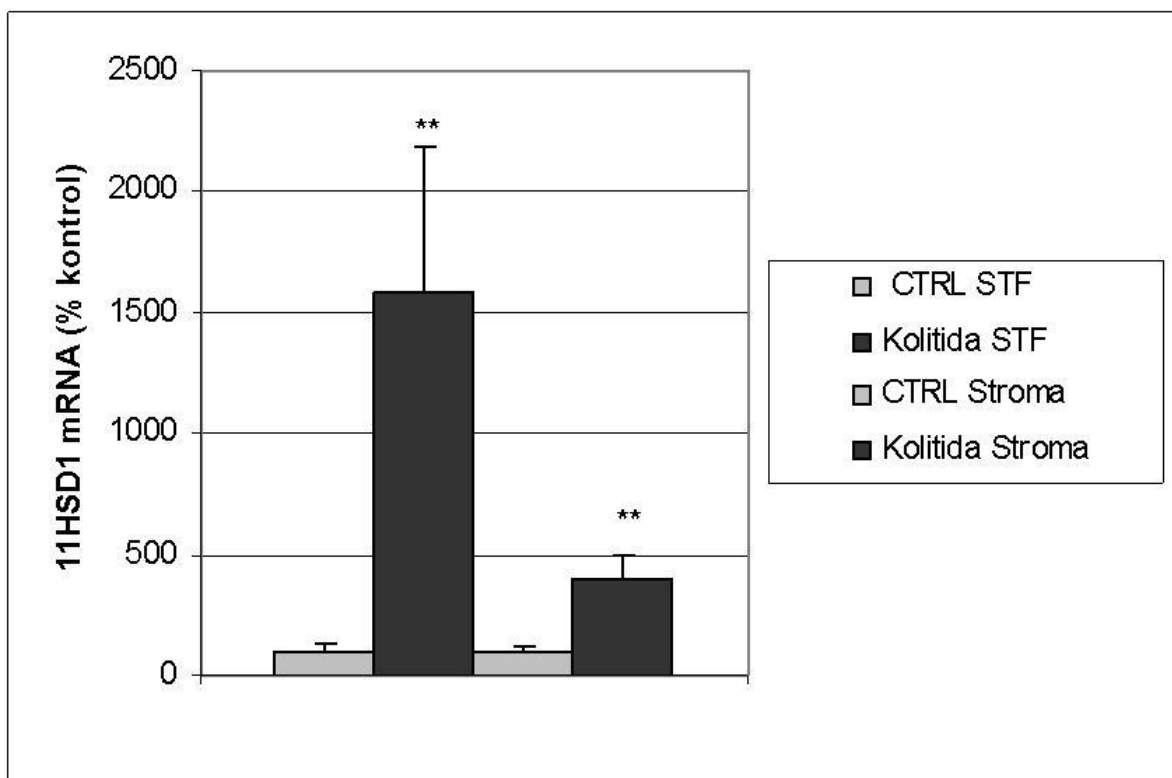


Obrázek 5.7 Expres 11HSD1, 11HSD2 a cyklooxygenázy 2 v tkáňových explantátech ovlivněných prozánětlivými cytokiny. ($P < 0,05$)

Analýza 11-reduktázové aktivity ve slezině a mezenteriálních lymfatických uzlinách prokázala výrazný nárůst reduktázové aktivity (příloha č. 3). Tato změna byla doprovázena nárůstem exprese 11HSD1 mRNA v obohacené frakci T lymfocytů získaných ze sleziny (Obr. 5.9) a z mezenteriálních lymfatických uzlin (Obr. 5.8), ve stromatu daných orgánů k obdobnému nárůstu nedošlo.

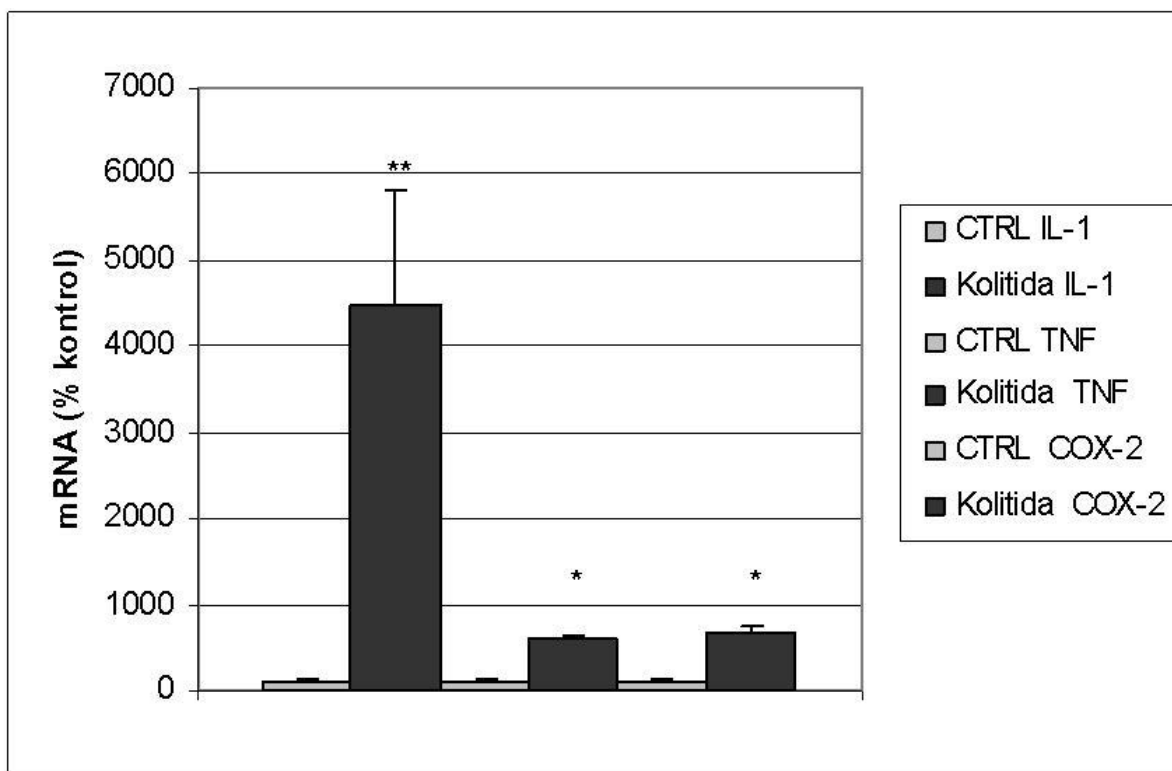


Obrázek 5.8 Expresie 11HSD1 mRNA ve stromatu a mobilních buňkách mezenterických lymfatických uzlin. (**P<0,01)

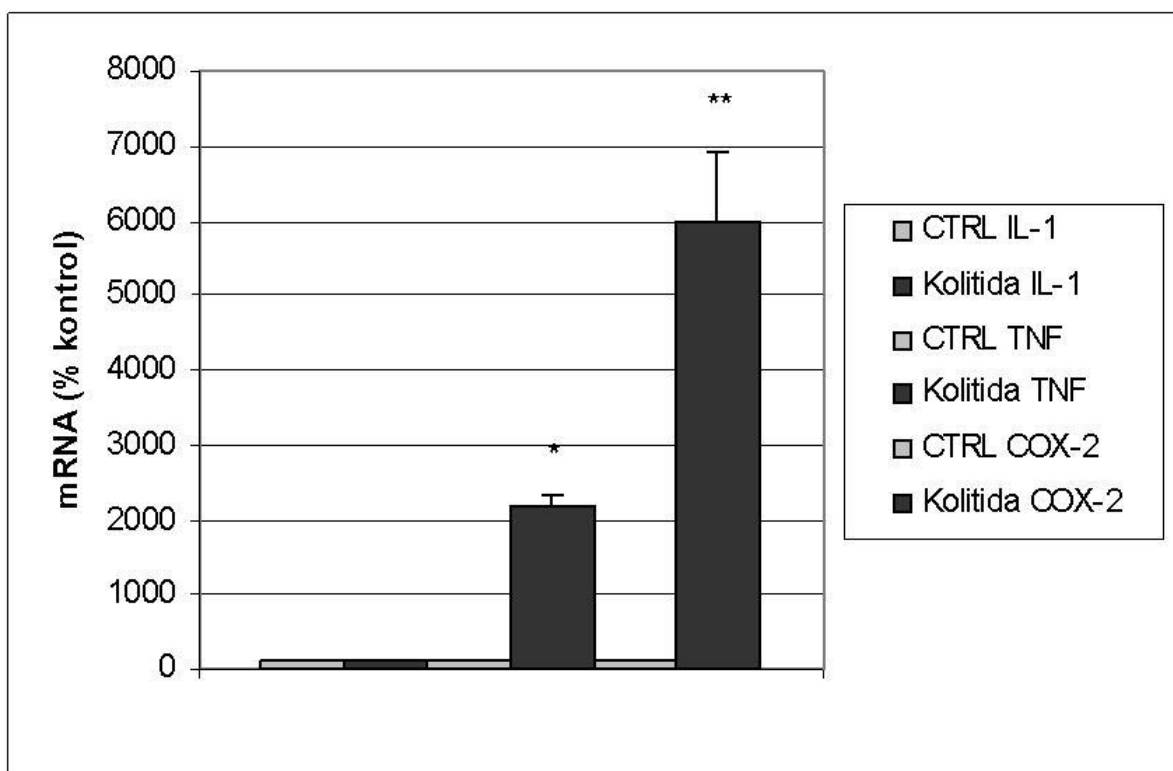


Obrázek 5.9 Expresie 11HSD1 mRNA ve stromatu sleziny a obohacené frakci slezinných T buněk (STF). (**P<0,01)

Intraepiteliální lymfocyty izolované z tračniku TNBS potkanů vykazují zvýšenou expresi 11HSD1 mRNA (příloha č. 2), a proto jsme dále studovali otázku, zda v těchto buňkách existuje korelace s expresí prozánětlivých markerů. Jak je vidět z obrázku 5.10, je kolitida spojena se zvýšenou expresí prozánětlivých markerů TNF- α , IL-1 β a cyklooxygenázy 2. Ve srovnání s lymfocyty vykazovaly mezenteriální lymfatické uzliny výraznou stimulaci exprese TNF- α a COX-2, ale žádný efekt na IL-1 β (Obr. 5.11).



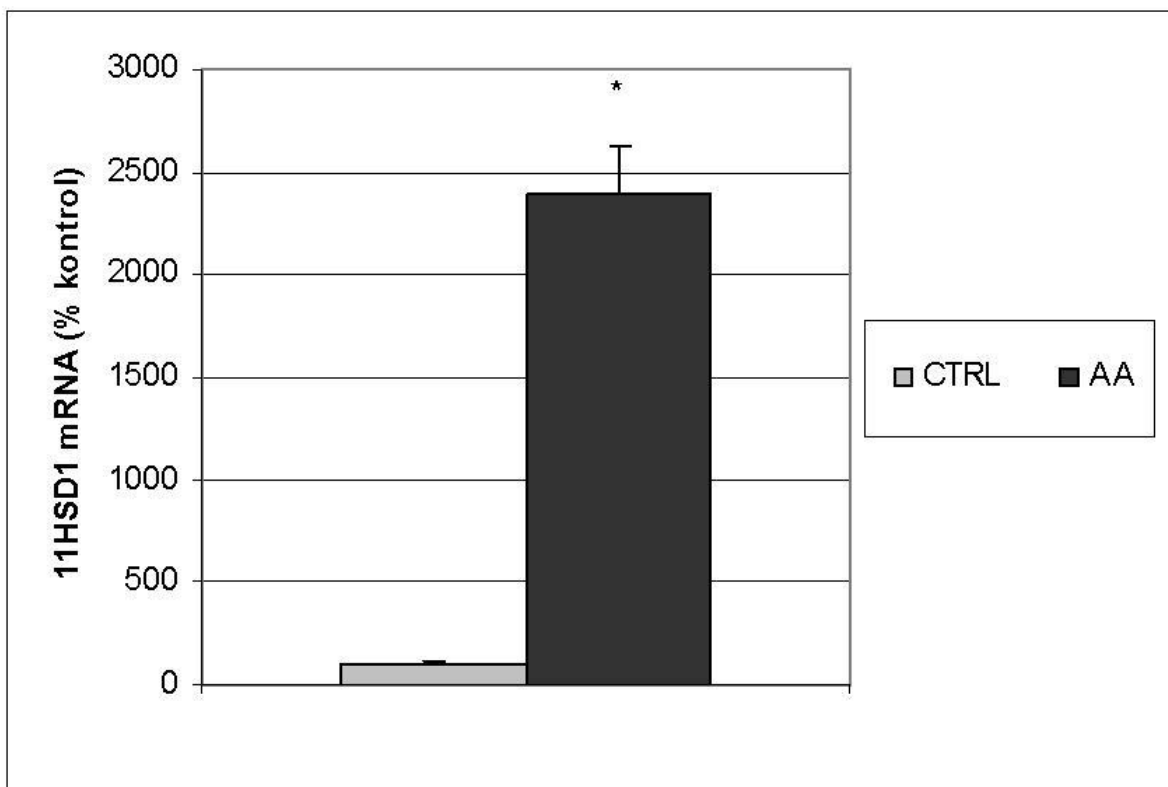
Obrázek 5.10 Expese mRNA prozánětlivých markerů ve vzorcích intraepiteliálních lymfocytů. (*P<0,05; **P<0,01)



Obrázek 5.11 Expres mRNA prozánětlivých markerů ve vzorcích mezenterálních lymfatických uzlin. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)

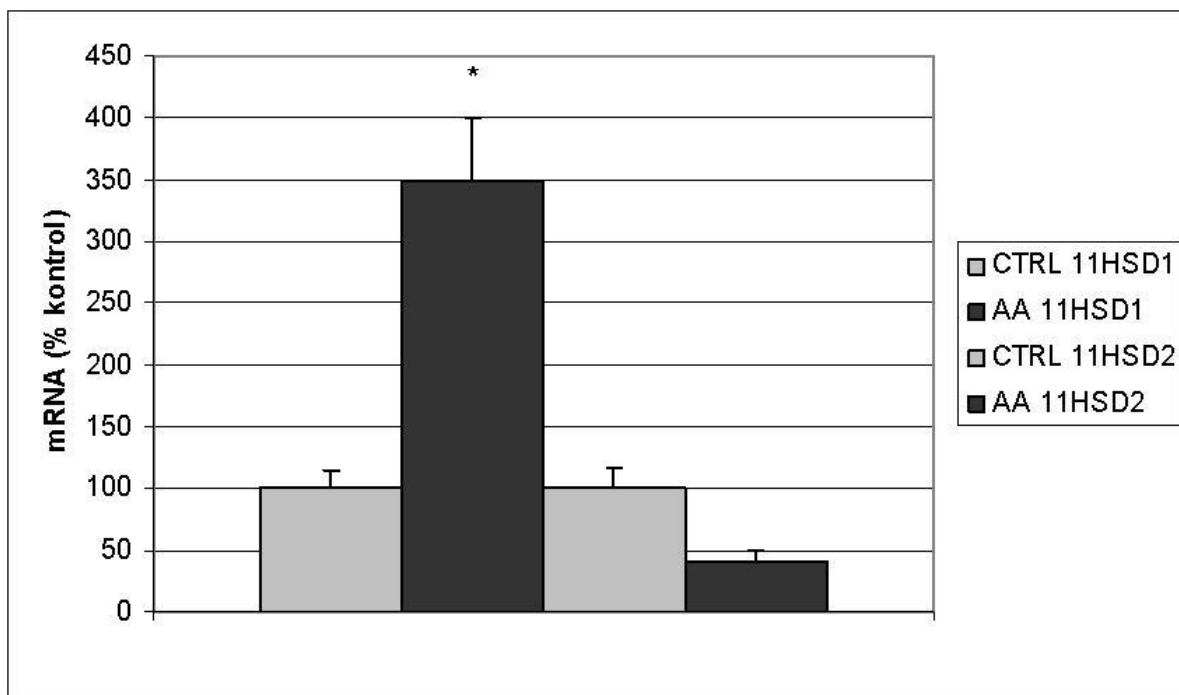
5.3. Experimentální adjuvantní artritida u potkanů kmene Lewis

Obdobně jako u kolitidy a dalších zánětlivých onemocnění také u rheumatoidní artritidy existuje úzká souvislost s glukokortikoidy, které jsou schopny potlačovat synoviální zánět a destrukci kostí. Studovali jsme proto na zvířecím modelu adjuvantní artritidy otázku, zda artritida moduluje 11HSD1, jaká je úloha prozánětlivých cytokinů v tomto procesu a zda lokální metabolismus glukokortikoidů v synoviu může přispívat k zpětnovazební regulaci zánětu. Ve vzorcích synoviální tkáně a inguinálních uzlinách kontrolních a artritických potkanů byla měřena exprese 11HSD1 mRNA a v izolovaných synoviocytech a buňkách inguinálních uzlin enzymatická aktivita 11HSD1.

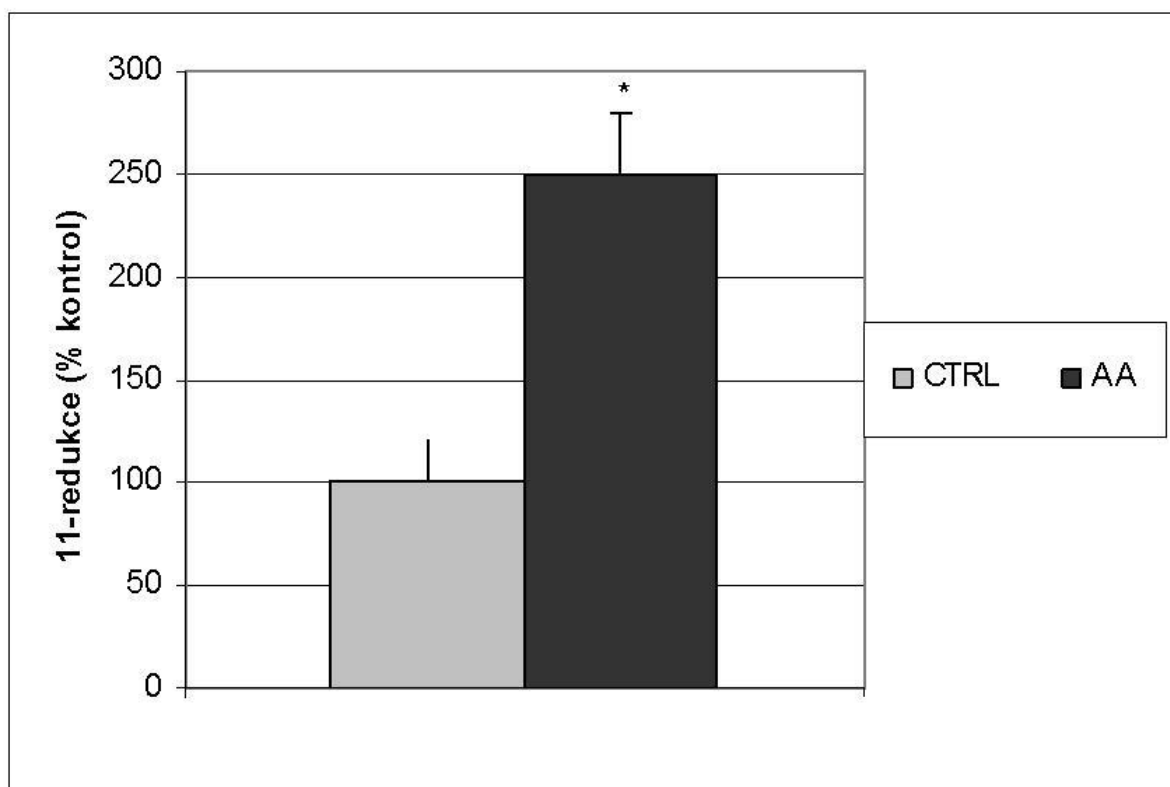


Obrázek 5.12 Expres 11HSD1 mRNA v synoviu kontrolních (CTRL) a artritických (AA) potkanů . (*P<0,05)

Artritida zvýšila expresi mRNA pro 11HSD1 jak v synoviu (Obr. 5.12), tak i v inguinálních uzlinách (Obr. 5.13). V souladu s tím byl zjištěn také signifikantní nárůst reductázové aktivity 11HSD1 v synoviocytech (Obr. 5.14) a mobilních lymfocytech inguinálních uzlin (příloha č. 4). Oproti tomu ve stromatu uzlin nedošlo k signifikantním změnám exprese 11HSD1 a 11HSD2 a ani ke změnám 11HSD oxidázové a reductázové aktivity (příloha č. 4).

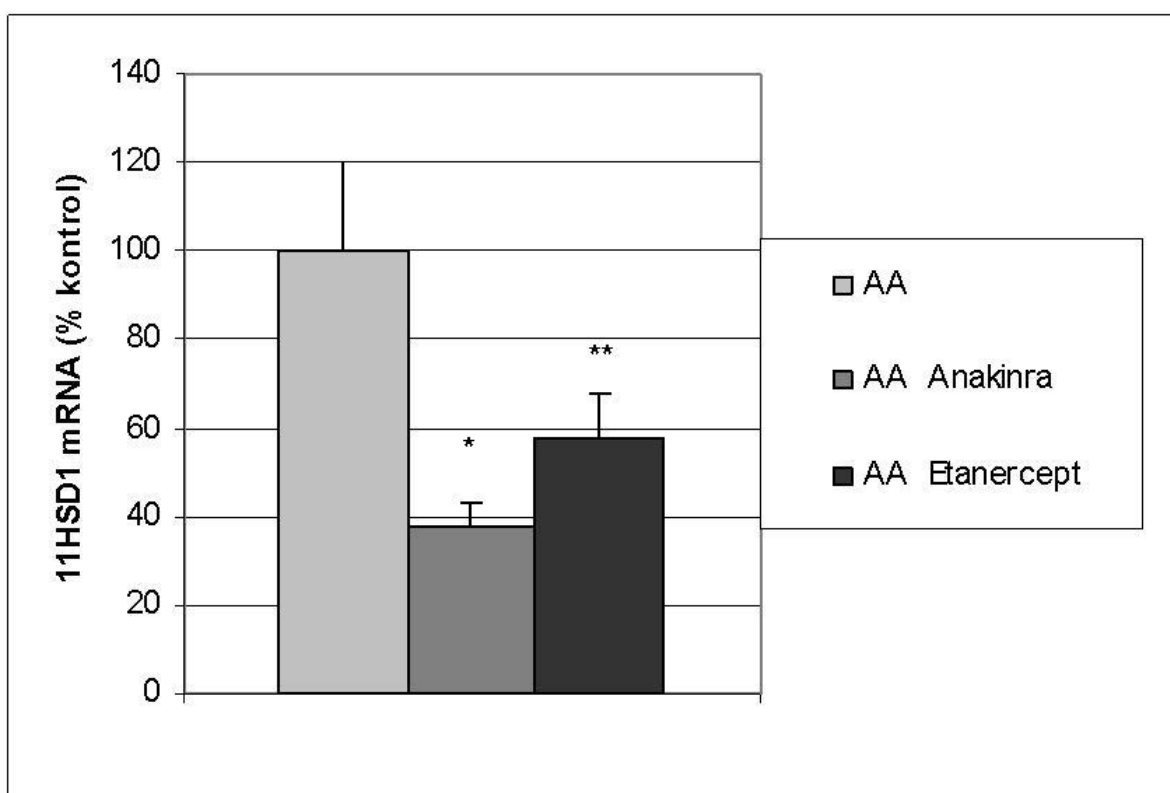


Obrázek 5.13 Exprese 11HSD1 a 11HSD2 mRNA v inguinálních uzlinách kontrolních (CTRL) a artritických (AA) potkanů. (*P<0,01)



Obrázek 5.14 Enzymatická aktivita 11HSD1 mRNA v izolovaných synoviocytech kontrolních (CTRL) a artritických (AA) potkanů. Enzymatická aktivita je vyjádřena ve fmol/mg proteinu/h. (*P<0,01)

Podávání antagonisty IL-1 receptoru (anakinra) nebo antagonisty TNF- α (etanercept) významně snížilo expresi 11HSD1 (Obr. 5.15). Podávání 11HSD1 blokátoru karbenoxolonu výrazně zvýšilo expresi prozánětlivých markerů TNF- α a cyklooxygenázy 2 (příloha č. 4) v synoviu artritických potkanů.

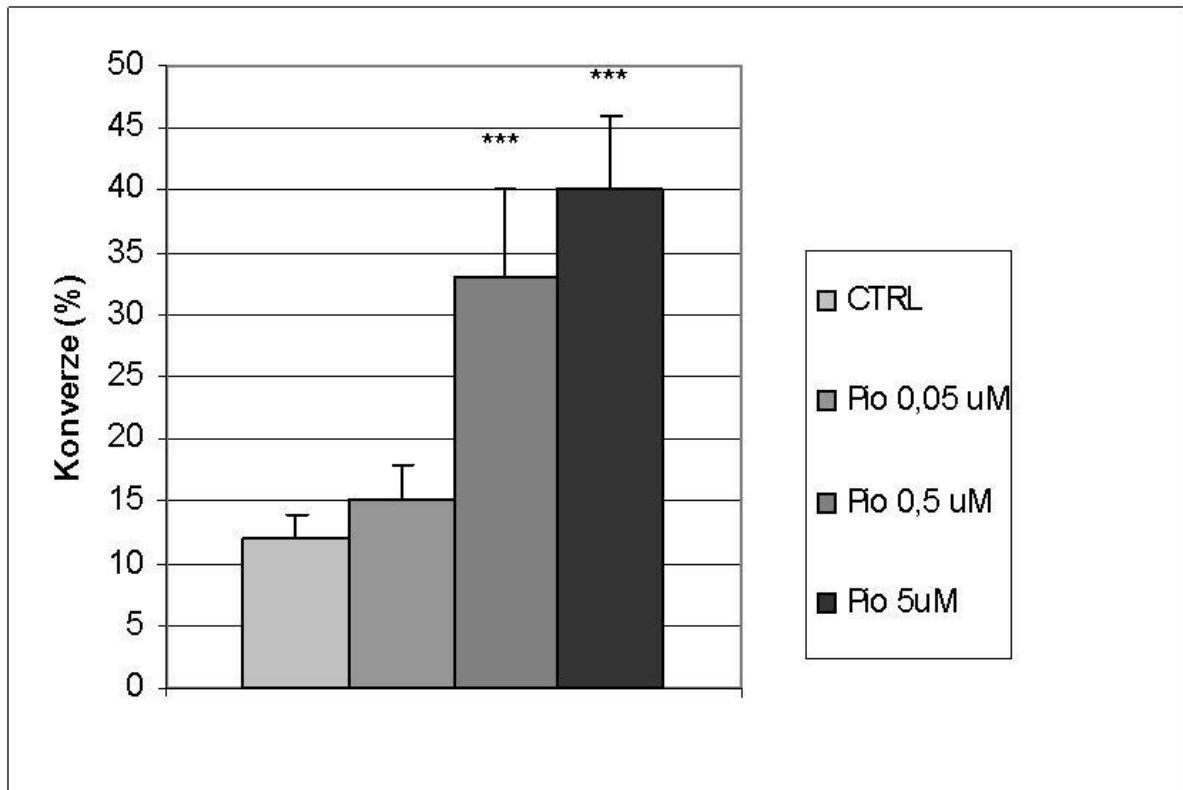


Obrázek 5.15 Expres 11HSD1 mRNA v synoviu artritických potkanů (AA) ovlivněných anakinrou (antagonista IL-1 receptoru) a etanerceptu (antagonisty TNF- α). (**P<0,05; *P<0,01)

5.4 Regulace exprese 11HSD1 prostřednictvím PPAR γ signalizace

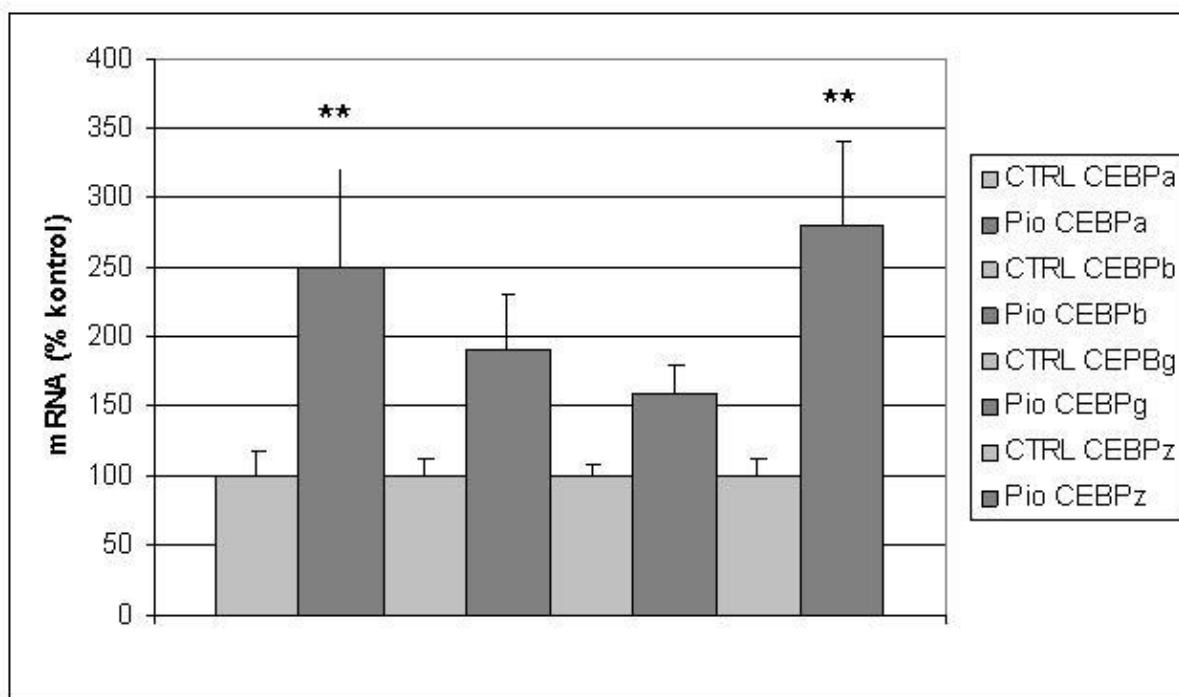
Vzhledem k tomu, že některé C/EBP transkripční faktory (CCAAT/enhancer-binding proteins) byly identifikovány jako faktory regulující transkripci 11HSD1 (50) a PPAR γ může

interagovat s C/EBP (51), studovali jsme efekt agonisty PPAR γ pioglitazonu na expresi a aktivitu 11HSD1. Jak je uvedeno na obr. 5.16, pioglitazon v závislosti na použité koncentraci zvyšoval reduktázovou aktivitu 11HSD1. Obdobně jsme pozorovali koncentračně závislý nárůst exprese 11HSD1 mRNA (příloha č. 5).



Obrázek 5.16 Enzymatická aktivita 11HSD1 v primární kultuře hladkých svalových buněk ovlivněných pioglitazonem. (**P<0,001)

Pioglitazon zároveň stimuloval transkripci C/EBP α a C/EBP ζ , ale již ne C/EBP β a C/EBP δ (Obr. 5.17). Oproti tomu glukokortikoidy, které jsou také schopné stimulovat expresi 11HSD1, zvyšovaly C/EBP β a C/EBP δ , ale již ne C/EBP α a C/EBP ζ (příloha č. 5).



Obr. 5.15 Expresa C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ a C/EBP ζ mRNA v primární kultuře hladkých svalových buněk ovlivněných pioglitazonem. (**P<0,01).

6. Diskuze

Glukokortikoidy jsou hormony regulující široké spektrum homeostatických procesů jako jsou metabolismus, buněčná proliferace a diferenciacce a zánětlivá odpověď. Zánětlivý proces je spojen se zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů a následnou aktivací HPA osy která vede ke zvýšené produkci glukokortikoidních hormonů. Secernované glukokortikoidy tlumí produkci prozánětlivých cytokinů, čímž umožňují systémovou kontrolu zánětlivého procesu (52). Kromě imunopresivního účinku mohou mít glukokortikoidy za jistých okolností také imunomodulační efekt na imunitní systém (39). Jedním z mechanismů, kterým glukokortikoidy mohou modulovat imunitní funkce, je jejich lokální metabolismus. Je to dáno tím, že účinek glukokortikoidů nezávisí pouze na plazmatické koncentraci, druhu cílové tkáně a koncentraci receptorů, ale také na prereceptorovém metabolismu. Endogenní glukokortikoidy existují ve dvou formách, jako 11-hydroxy deriváty (kortisol, kortikosteron), které se mohou vázat na glukokortikoidní receptor a neaktivní 11-oxo deriváty, které mají podstatně nižší afinitu k receptoru. Lokální účinek glukokortikoidů obsažených v plasmě je tudíž podmíněn prereceptorovou konverzí aktivních 11-hydroxy derivátů na neaktivní 11-oxo deriváty a naopak. Tato konverze je katalyzována dvěma isoformami 11HSD. 11HSD1 je za

podmínek *in vivo* NADPH-dependentní reduktáza, která konvertuje 11-oxo deriváty (kortison, 11-dehydrokortikosteron) na aktivní 11-hydroxy deriváty (kortisol, kortikosteron) a tím lokálně zvyšuje koncentraci biologicky aktivního ligandu. Naproti tomu 11HSD2 je NAD⁺-dependentní oxidáza katalyzující deaktivaci kortisolu a kortikosteronu na inaktivní 11-oxo deriváty, čímž lokálně snižuje koncentraci biologicky aktivního ligandu. Lokální metabolismus glukokortikoidů může proto prostřednictvím regulované exprese jedné nebo druhé isoformy 11HSD modulovat průběh zánětlivé odpovědi (53). Bylo prokázáno, že inhibice 11HSD karbenoxolonem, vede k potenciaci protizánětlivého účinku glukokortikoidů v mesangiálních a v plicních epiteliálních buňkách (5). Obdobně inhibice 11HSD2 karbenoxolonem zvyšuje v plicích antiastmatickou odpověď vyvolanou glukokortikoidy (54).

V souladu s prací na modelu myší peritonitidy (55) a u pacientů se zánětlivou střevní chorobou (IBD) (41,56) jsme prokázali, že zánět (experimentální artritida nebo kolitida) jsou doprovázeny zvýšením 11-reduktázové aktivity a exprese 11HSD1 a v případě kolitidy také s poklesem exprese 11HSD2. Absence 11HSD2 v synoviální tkáni pozorovaná v našich experimentech je v rozporu s dříve naměřenými daty, kde 11HSD1 byla primárně exprimovaná ve fibroblastům podobných synoviocytům zatímco 11HSD2 byla identifikována v synoviocytech podobných makrofágům (57). Protože naše experimenty byly prováděny na potkanech kmene Lewis, které mají sníženou citlivost HPA osy a práce (57) je na lidských synoviích, je možné, že rozdíly v expresi 11HSD2 odrážejí rozdíly mezidruhové nebo kmenové.

Zesílení glukokortikoidní signalizace v zánětu díky poklesu lokální 11-oxidázové a vzestupu 11-reduktázové aktivity je pravděpodobně spojeno s nárůstem lokální koncentrace prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1 β a TNF- α . V řadě prací shrnutých v přehledu (5) bylo prokázáno, že v tkáňových kulturách prozánětlivé cytokiny stimulují expresi 11HSD1 a tlumí expresi 11HSD2, což naznačuje, že prozánětlivé cytokiny by mohly být schopny modulovat intracelulární metabolismus glukokortikoidů v zánětu a tak vyvažovat svůj prozánětlivý efekt zvyšováním lokální tvorby kortisolu nebo kortikosteronu. V souladu s touto představou jsme našli zvýšenou expresi 11HSD1 a IL-1 β a TNF- α v synoviích a inguinálních uzlinách artritických potkanů a v intraepiteliálních lymfocytech a mezenterálních lymfatických uzlinách potkanů s kolitidou. Kromě toho podávání 11HSD blokátoru karbenoxolonu zvyšovalo nárůst exprese TNF- α a COX-2 (příloha č. 3) v synoviu artritických potkanů, zatímco aplikace TNF- α a IL-1 β antagonistů nejenže zlepšila klinický obraz, ale zároveň zabránila nárůstu 11HSD1 při artritidě. Tyto nálezy podporují představu, že zánět stimuluje

11HSD1, že tato stimulace je alespoň částečně řízena prozánětlivými cytokiny a že zvýšená lokální koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů přispívá k zpětnovazebné regulaci zánětu při adjuvantní artritidě, DSS-kolitidě a TNBS-kolitidě. Význam prozánětlivých cytokinů v regulaci 11HSD1 a 11HSD2 v našich modelech rovněž dokládá pokus s inkubací střevních fragmentů s TNF- α a IL-1 β , který prokázal stimulační efekt TNF- α na 11HSD1 a COX-2 a inhibiční efekt IL-1 β na 11HSD2. Tento nálezn je v plnš shodš s pozorovanými zmšnami 11HSD2 a 11HSD1 u TNBS-kolitidy (Bryndová et al., piloha . 2) a DSS-kolitidy (piloha . 1) a u pacientů se znštlivou strevn chorobou (41,56)

Protože 11HSD2 je exprimovaná pouze v epiteliln vrstevš střeva, zatímco 11HSD1 v submukozn vrstevš lamina propria (58), lze předpokládat, že za zmšny v expresi 11HSD1 odpovdj buňky lamina propria a imunitního systému střeva. Kolitida je spojena s transmurální infiltraci imunitních bunšek (59) a 11HSD1 je exprimována v makrofázích (25), imunitních buňkách a orgánech (35,37,38) a fibroblastech (16). Tomu odpovd zvýšen exprese 11HSD1 v intraepiteliálních lymfocytech a lymfocytech v lamina propria pozorovaná v našich experimentech. Lze tedy předpokládat, že zvýšen exprese 11HSD1 ve stevš postiženm kolitidou je podmnšna masivn infiltraci imunitních bunšek ve střevu a stimulaci 11HSD1 proznštlivmi cytokiny. Stimulace 11HSD1 asociovan s aktivaci imunitních bunšek byla prokázána u CD4+ T bunšek (36) a u dendritických bunšek (60). Naše nález y rovnšž dokazují, že k stimulaci 11HSD1 nedochází pouze v imunitních buňkách reprezentujících efektorov bunšen kompartment strevnho imunitního systému (buňky lamina propria a intraepiteliální lymfocyty), ale takš v kompartmentech, kde dochází k indukci imunitní odpovšdi jako jsou lymfatickš tknš asociovanš s mukozou (nepublikované výsledky) a prslušnš mezenterální uzliny.

Vyše zmnšnš nález y podporují hypotšzu, že znšet zvyšuje v lymfatických orgánech a imunitních buňkách jejich kapacitu reaktivovat z neaktivních glukokortikoidů aktivní hormony. V tšto souvislosti jsou zajmav dvš další zjištšn. Zaprvš, mezi 11HSD1 aktivitou a produkcí cytokinů v lymfatických uzlinách byla prokázána prm souvislost (35,38) a zadruhš, intracelulrn amplifikace glukokortikoidního signálu v makrofázích moduluje v tšchto buňkách expresi TNF- α a IL-1 β (61) a fagocytární aktivitu (55).

Mechanismus jakým způsobem dochází pr znšetu k stimulaci 11HSD1 není dosud znám. Je to dáno mimo jinš i tm, že existuje velké množství prací, které dokldj stimulační nebo naopak inhibiční efekt celš řady biologicky aktivních látek na expresi 11HSD1 (5), avšak se zdá, že vštšina tšchto látek působí neprmo. Prm efekt na úrovni promotoru

11HSD1 byl prokázán pouze pro C/EBP rodinu transkripčních faktorů (62). Efekt TNF- α na stimulaci 11HSD1 v jaterních buňkách se zdá být zprostředkován pomocí MAP kinázové signalizace a C/EBP β (27). Rovněž efekt stimulace 11HSD1 cytokinem IL-13 v hladkých svalech dýchacích cest je zprostředkován MAP kinázovou signalizací (63).

Obdobně také u přírodních nebo syntetických ligandů PPAR γ receptorů byly prokázány pozitivní efekty u různých modelů zánětu, což vedlo k úvahám o možnosti terapeutického využití (64). Vzhledem k tomu, že PPAR γ je exprimován v řadě typů buněk včetně makrofágů a lymfocytů (65), studovali jsme rovněž efekt agonisty PPAR γ na expresi 11HSD1. Prokázali jsme stimulaci 11HSD1 pod vlivem syntetického agonisty PPAR γ pioglitazonu. Tento nálezn je v souladu s dřívějším zjištěním, že endogenní PPAR γ ligand 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ₂ signifikantně zvyšuje 11HSD1 v primárních kulturách lidských adipocytů (29). Přestože „PPAR γ response element“ nebyl identifikován u 11HSD1, řada studií prokázala spojitost mezi PPAR γ a E/CBP transkripčními faktory (66,67). Kromě toho, sekvence promotoru u PPAR γ dependentních genů obsahuje C/EBP vazebný motiv a C/EBP transkripční faktory regulují expresi PPAR γ genů (68,69). Náš nálezn, aktivace PPAR γ stimuluje 11HSD1 expresi a reaktivaci 11-oxo derivátů na biologicky aktivní glukokortikoidy a že zároveň dochází k stimulaci exprese E/CBP α a E/CBP ζ naznačuje, že regulace 11HSD1 prostřednictvím PPAR γ je zprostředkována přes α a ζ transkripční faktory. Tento nálezn je v souladu s pracemi (70) a (71), které prokázaly stimulaci C/EBP α a C/EBP ζ syntetickými ligandy PPAR γ .

Závěrem je možné shrnout, že záněť je doprovázen zvýšenou schopností konvertovat biologicky neaktivní 11-oxo deriváty glukokortikoidů na aktivní glukokortikoidní hormony v buňkách zanícené tkáně a v lymfatických tkáních a buňkách, přičemž prozánětlivé cytokiny hrají v tomto procesu významnou roli.

7. Závěr

Výsledky prezentované v této disertační práci je možné shrnout do následujících bodů, které odpovídají na otázky vytčené v kap. 3:

Otázka 1

Ovlivňují zánětlivé procesy při experimentální kolitidě lokální metabolismus glukokortikoidů (exprese a aktivita 11HSD1 a 2)?

Prezentované výsledky jednoznačně dokládají, že oba experimentální modely kolitidy (DSS kolitida u myši a TNBS kolitida u potkana) zvyšují expresi 11HSD1 mRNA. 11HSD1 ve střevě zatímco exprese 11HSD2 buď klesá, nebo není změněna. Obdobně také aktivita 11HSD1 měřená jako 11-reduktázová aktivita je při střevním zánětu zvýšena a 11 β -dehydrogenázová aktivita se při kolitidě nemění nebo je snížena. Stimulace exprese 11HSD1 je spojena s působením TNF- α a pokles 11HSD2 s cytokinem IL-1 β .

Otázka 2

Ovlivňuje kolitida lokální metabolismus glukokortikoidů v imunitních buňkách s důrazem na buňky střevního imunitního systému?

Kolitida signifikantně stimuluje expresi 11HSD1 v intraepiteliálních lymfocytech a v mezenterálních lymfatických uzlinách. K nárůstu exprese 11HSD1 mRNA a 11-reduktázové aktivity dochází v mobilních buňkách lymfatických uzlin charakterizovaných dominantně jako T buňky, zatímco ve stromatu k obdobné stimulaci nedochází. K obdobným změnám jako v mezenterálních uzlinách dochází také ve slezině zvířat s kolitidou. Tyto nálezy dokládají, že k indukci 11HSD1 nedochází pouze v efektorových imunitních buňkách střevního imunitního systému (intraepiteliální lymfocyty) ale také v buněčných kompartmentech (lymfatické uzliny, slezina), kde dochází k indukci imunitní odpovědi.

Otázka 3

Dochází při experimentální adjuvantní artritidě ke změnám lokálního metabolismu glukokortikoidů v synoviu a příslušné lymfatické tkáni? Ovlivní podávání látek ovlivňujících metabolismus glukokortikoidů artritidu?

Artritida zvyšuje expresi 11HSD1 mRNA jak v synoviu tak i v inguinálních uzlinách, což je doprovázeno zvýšenou 11-reduktázovou aktivitu v synoviocytech a v mobilních lymfocytech inguinálních uzlin. Podávání antagonisty IL-1 receptoru (anakinra) nebo antagonisty TNF- α (etanercept) signifikantně snížilo expresi 11HSD1 a zlepšilo klinický obraz zatímco podávání 11HSD1 blokátoru karbenoxolonu výrazně zvýšilo expresi prozánětlivých markerů TNF- α a COX-2 v synoviu artritických potkanů. Tyto nálezy ukazují, že artritida stimuluje synoviální 11HSD1, že tento proces je regulován cytokiny TNF- α a IL-

1 β a že zvýšená lokální dostupnost glukokortikoidních hormonů může přispívat k zpětnovazebné regulaci zánětu.

Otázka 4

Ovlivňují agonisté PPAR γ receptorů expresi 11HSD1?

Agonista PPAR γ receptoru pioglitazon zvyšuje expresi 11HSD1 mRNA a 11-reduktázovou aktivitu v závislosti na koncentraci. Tato stimulace je doprovázena zvýšenou expresí transkripčních faktorů C/EBP α a C/EBP ζ . Protože u C/EBP α byla v dřívějších pracích prokázána regulace transkripce 11HSD1 a interakce mezi C/EBP α a PPAR γ , předpokládáme, že regulace 11HSD1 prostřednictvím aktivace PPAR γ je spojena s aktivací transkripce závislé na C/EBP α .

8. Literatura

- [1] Munck A, Naray-Fejes-Toth A. The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol Cell Endocrinol* 1992;90:C1-C4.
- [2] Cope CL, Black E. The production rate of cortisol in man. *Br Med J* 1958;1:1020-4.
- [3] Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:646–58.
- [4] Fox S. *Human Physiology*, McGraw-Hill 2008, New York.
- [5] Tomlinson JW, Stewart PM. Cortisol metabolism and the role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:61-78.
- [6] Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE. Crystal

structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 2002;110:93-105.

- [7] Kendall EC. Cortisone. pp. 121-137, Charles Scribner's Sons, New York 1971.
- [8] Osinski PA. Steroid 11 β -ol dehydrogenase in human placenta. *Nature* 1960;187:777.
- [9] Jenkins JS. The metabolism of cortisol by human extrahepatic tissues. *J Endocrinol* 1966;34:51-6.
- [10] Bush IE. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase: contrast between studies in vivo and studies in vitro. *Adv Biosci* 1969;3:23-39
- [11] Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Biochemistry* 1995;34:6003-13.
- [12] Grundy WN, Bailey TL, Elkan CP, Baker ME. Hidden Markov model analysis of motifs in steroid dehydrogenases and their homologs. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:760-6.
- [13] Ozols J. Luminal orientation and post-translation modification of the liver microsomal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1995;270:2305-2312.
- [14] Lakshmi V, Monder C. Purification and characterization of the corticosteroid 11 β -dehydrogenase component of the rat liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* 1988;266:16653-58.
- [15] Jamienson PM, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 β -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 1995;136:4754-61.
- [16] Hammami MW, Siiteri PK. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblast: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:326-34.

- [17] Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1999;140:3188-96.
- [18] Hundertmark S, Buhler H, Ragosch V, Dinkelborg L, Arabin B, Weizel HK. Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fetal lung. *Endocrinology* 1995;136:2573-78.
- [19] Rajan V, Edwards CR, Seckl JR. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *J Neurosci* 1996;16:65-70.
- [20] Gao HB, Ge RS, Lakshmi V, Marandici A, Hardy MP. Hormonal regulation of oxidative and reductive activities of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* 1997;138:156-61.
- [21] Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 2005;54:1023-31.
- [22] Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, Stewart PM. Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001;16:1037-44.
- [23] Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 β enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* 1997;186:189-98.
- [24] Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM. Regulation of expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology* 2001;142:1982-9.

- [25] Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai TQ, Wong B, Wright SD, Hermanovski-Vosatka A. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol* 2001;167:30-5.
- [26] Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Matsuda Y, Suzuki T, Krozowski ZS, Sasano H, Kondo T. Inflammatory mediators down-regulate 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a human lung epithelial cell line BEAS-2B and the rat lung. *Tohoku J Exp Med* 2005;207:293-301.
- [27] Ignatova ID, Kostadinova RM, Goldring CE, Nawrocki AR, Frey FJ, Frey BM. Tumor necrosis factor- α upregulates 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by CCAAT/enhancer binding protein-b in HepG2 cells. *Am J Physiol* 2009;296:E367-77.
- [28] Dover AR, Hadoke PWF, Macdonald LJ, Miller E, Newby DE, Walker BR. Intravascular glucocorticoid metabolism during inflammation and injury in mice. *Endocrinology* 2007;148:166-72.
- [29] Fegan KS, Rae MT, Critchley HOD, Hillier SG. Anti-inflammatory steroid signalling in the human peritoneum, *J Endocrinol* 2008;196:369-376.
- [30] Kaur K, Hardy R, Ahasan MM, Eijken M, van Leeuwen JP, Filer A, Thomas AM, Raza K, Buckley CD, Steward PM, Rabbit EH, Hewison M, Cooper MS. Synergistic induction of local glucocorticoid generation by inflammatory cytokines and glucocorticoids: implication for inflammation associated bone loss. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1185-90.
- [31] Hu A, Fatma S, Cao J, Grunstein JS, Nino G, Grumbach Y, Grunstein MM. Th2 cytokine-induced upregulation of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 facilitates glucocorticoid suppression of proasthmatic airway smooth muscle function. *Am J Physiol* 2009; 296: L790-L803.

- [32] Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125–63.
- [33] Million M, Tache Y, Anton P. Susceptibility of Lewis and Fischer rats to stress-induced worsening of TNB-colitis: protective role of brain CRF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999;276:G1027-36.
- [34] Dougherty TF, Berliner ML, Berliner DL. 11β -Hydroxy dehydrogenase system activity in thymi of mice following prolonged cortisol treatment. *Endocrinology* 1960;66:550–8.
- [35] Hennebold JD, Ryu SY, Mu HH, Galbraith A, Daynes RA. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *Am J Physiol* 1996;270:R1296–R1306.
- [36] Zhang TY, Ding X, Daynes RA. The expression of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *J Immunol* 2005;174(2):879-89.
- [37] D'Ellia M, Patenaude J, Bernier J. Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E97-E104.
- [38] Barne PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanism. *Clin Sci* 1998;94:557-572.
- [39] Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to diseases. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:359-68.
- [40] Giles KM, Ross K, Rossi AG, Hotchin NA, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxilin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac. *J Immunol* 2001;167:976-86.

- [41] Žbáňková S, Bryndová J, Leden P, Kment M, Švec A, Pácha J. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1019-23.
- [42] Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-67.
- [43] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in rat colon. *Gastroenterology* 1989;99:795-803.
- [44] Lyscom N, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 1982;45:775-83.
- [45] Hatcock KS. 1992 T cell enrichment by nonadherence to nylon. *Curr Protocols Immunol* 1992; Chapter 3, Unit 3.2.
- [46] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
- [47] Calvino B, Maillet S, Pradelles P, Besson JM, Couraud JY. Variation of substance P-like immunoreactivity in plasma and cerebrospinal fluid in the course of arthritis induced by Freund adjuvant in rats, a model for the study of chronic pain. *C R Acad Sci III* 1991; 312:427-32.
- [48] Earp JC, Dubios DC, Molano DS, Pyszczyński NA, Keller CE, Almon RR, Jusko WJ.. Modeling corticosteroid effects in rat model of rheumatoid arthritis I: mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:532-45.

- [49] Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Mesenteric smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats display increased calcium responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens* 1999;12:663-73.
- [50] Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE. C/EBP regulates hepatic transcription of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275:30232-9.
- [51] Takata Y, Kitami Y, Okura T, Hiwada K. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation inhibits interleukin-1 β -mediated platelet-derived growth factor- α receptor gene expression via CCAAT/enhancer-binding protein- δ in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001;276:12893-7.
- [52] McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 1997; 23:79-133.
- [53] Chapman KE, Countiho AE, Gray M, Gilmour JS, Savill JS, Seckl JR, The role and regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the inflammatory response. *Mol Cell Endocrinol* 2009;301:123-31.
- [54] Josephson MB, Jiao J, Xu S, Hu A, Paranjape C, Grunstein JS, Grumbach Y, Nino G, Kreiger PA, McDonough J, Grunstein MM. IL-13-induced changes in endogenous glucocorticoid metabolism in the lung regulate the proasthmatic response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L382-90.
- [55] Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier JF, Man TY, Clay M, Thomas G, Harris HJ, Mullins JJ, Seckl JR, Savill JS, Chapman KE. Local amplification of glucocorticoids by 11 β -

- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 2006;176:7605-11.
- [56] Stegk JP, Ebert B, Martin HJ, Maser E. Expression profiles of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and type 2 in inflammatory bowel diseases. *Mol Cell Endocrinol* 2009;301:104-8.
- [57] Hardy RS, Filer A, Cooper MS, Parsonage G, Raza K, Hardie DL, Rabbitt EH, Stewart PM, Buckley CD, Hewison M. Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R108–18.
- [58] Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM. Epithelial cell localization of type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon. *Endocrinology* 1994;135:2533-41.
- [59] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066-78.
- [60] Freeman L, Hewison M, Hughes SV, Evans KN, Hardie D, Means TK, Chakraverty R. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood* 2005;106:2042-9.
- [61] Ishii T, Masuzaki H, Tanaka T, Arai N, Yasue S, Kobayashi N, Tomita T, Noguchi M, Fujikura J, Ebihara K, Hosoda K, Nakao K. Augmentation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages – Role of 11 β -HSD1 in proinflammatory properties in macrophages. *FEBS Let* 2007;581:349-354
- [62] Gout J, Tirard J, Thévenon C, Riou JP, Bégeot M, Naville D. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells. *Biochimie* 2006;88:1115-24.

- [63] Hu A, Fatma S, Cao J, Grunstein JS, Nino G, Grumbach Y, Grunstein MM. Th2 cytokine-induced upregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 facilitates glucocorticoid suppression of proasthmatic airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L790-803.
- [64] Annese V, Rogai F, Settesoldi A, Bagnoli S. PPAR γ in inflammatory bowel disease. *PPAR Res.* 2012;2012:620839.
- [65] Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, Chamailard M, Desreumaux P. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2006;55:1341-9.
- [66] Fukuoka T, Kitami Y, Kohara K, Hiwada K. Molecular structure and function of rat CCAAT-enhancer binding protein-delta gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:30-6.
- [67] Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999;3:151-8.
- [68] Shi XM, Blair HC, Yang X, McDonald JM, Cao X. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPAR γ 2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* 2000;76:518-27.
- [69] Elberg G, Gimble JM, Tsai SY. Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 2000; 275:27815-22.
- [70] Choi SS, Cha BY, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. Magnolol enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 2009; 84:908-14.

[71] Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, Monden T, Yamada M, Shimizu H, Miyamoto K, Mori M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21:2171-80.

Příloha 1

Příloha 2

Příloha 3

Příloha 4

Příloha 5