

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Role 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy  
u zánětlivých chorob střevních a střevních tumorů**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

v oboru fyziologie a patofyziologie

**Praha 2007**

**MUDr. Šárka Žbánková**

---

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na realizaci mé disertační práce.

Tímto děkuji především:

Doc. MUDr. Milanu Kmentovi, CSc. za vedení disertační práce;

Doc. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc. za poskytnuté zázemí při řešení práce, teoretické i praktické rady při realizaci práce, za vedení v práci a za neocenitelnou pomoc při vlastním řešení disertační práce;

RNDr. Janě Bryndové, PhD. za pomoc a spolupráci v oboru molekulární biologie;

Ivaně Meztekové za technickou spolupráci při řešení práce;

Doc. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc. z Oddělení analýzy fyziologicky aktivních látek FgÚ AVČR za pomoc při analýze vzorků.

MUDr. Alexandru Švecovi z Ústavu patologické anatomie FNKV za histologickou verifikaci vzorků modelů ulcerózní kolitidy i vzorků pacientů z naší práce

---

## OBSAH:

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>4</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Glukokortikoidy</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	8
2.1.1.1. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 .....	10
2.1.1.2. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 2 .....	12
2.1.1.3. Inhibitory 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy .....	13
2.1.1.4. Orgánová distribuce 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas .....	14
2.1.1.4.1. <i>Orgánová distribuce 11<math>\beta</math>HSD1</i> .....	14
2.1.1.4.2. <i>Orgánová distribuce 11<math>\beta</math>HSD2</i> .....	16
<b>2.2. 11<math>\beta</math>-hydroxysteroiddehydrogenasa v patofyziologických procesech</b> .....	<b>17</b>
2.2.1. Hypertenze .....	17
2.2.1.1. Zdanlivý nadbytek mineralokortikoidů .....	18
2.2.1.2. Lékořice a hypertenze .....	19
2.2.1.3. Preeklampsie .....	20
2.2.2. Obezita, insulinová rezistence a metabolický syndrom .....	20
2.2.3. Deficit redukce kortisonu .....	22
2.2.4. Zánět .....	23
2.2.4.1. Zánět a jeho ovlivnění glukokortikoidy .....	23
2.2.4.2. Zánět a 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa .....	25
2.2.5. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa v procesu onkogeneze a tumorogeneze .....	28
<b>3. CÍLE</b> .....	<b>33</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1. Příprava a odběr vzorků</b> .....	<b>34</b>
4.1.1. Zvířecí modely zánětlivých chorob střevních .....	34
4.1.1.1. Použitá zvířata .....	34
4.1.1.2. Postup indukce kolitidy .....	34
4.1.1.2.1. <i>TNBS kolitida</i> .....	34
4.1.1.2.2. <i>Akutní a chronická DSS kolitida</i> .....	35
4.1.1.3. Odběr vzorku .....	35
4.1.2. Bioptické vzorky lidských zánětlivých chorob .....	35
4.1.3. Vzorky z operačních resektátů .....	36
<b>4.2. Měření hladiny mRNA 11<math>\beta</math>HSD 1 a 2</b> .....	<b>37</b>
4.2.1. Isolace RNA .....	37
4.2.1.1. Isolace RNA ze vzorků zvířecích modelů .....	37
4.2.1.2. Isolace RNA z lidských bioptických vzorků .....	38
4.2.1.3. Isolace RNA ze vzorků tumorů a okolní nenádorové tkáně .....	38
4.2.2. Syntéza cDNA .....	38
4.2.3. Kvantitativní PCR .....	39
4.2.3.1. Potkan .....	39
4.2.3.2. Lidské vzorky .....	39
<b>4.3. Měření aktivity 11<math>\beta</math>HSD</b> .....	<b>42</b>
4.3.1. Měření aktivity 11 $\beta$ HSD 1 a 2 v tkáňových řezech .....	42
4.3.2. Měření aktivity 11 $\beta$ HSD 1 a 2 v tkáňovém homogenátu tumorů a okolní nenádorové tkáni .....	42
<b>4.4. Stanovení MPO</b> .....	<b>43</b>

---

---

<b>4.5. Stanovení proteinu</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6. Extrakce steroidů</b> .....	<b>44</b>
<b>4.7. Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC</b> .....	<b>44</b>
4.7.1. HPLC – neradioaktivní metoda – tkáňové řezy .....	44
4.7.2. HPLC – radioaktivní metoda – tkáňový homogenát .....	45
<b>4.8. Použité chemikálie</b> .....	<b>45</b>
4.8.1. Zvířecí a lidské kolitidy .....	45
4.8.2. Stanovení aktivity a exprese mRNA 11 $\beta$ HSD v lidských tumorech a okolní nenádorové tkáni.....	46
<b>4.9. Statistické metody</b> .....	<b>46</b>
4.9.1. Změny exprese a aktivity obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD ve vzorcích střeva zvířecích modelů zánětlivých střevních chorob .....	46
4.9.2. Změny exprese obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD v bioptických vzorcích ulcerosní kolitidy .....	46
4.9.3. Změny aktivity a exprese obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD ve vzorcích lidských tumorů střeva a okolní nenádorové tkáni .....	47
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1. 11<math>\beta</math>HSD a zánětlivé střevní choroby</b> .....	<b>48</b>
5.1.1. 11 $\beta$ HSD a zvířecí modely zánětlivých chorob střevních .....	48
5.1.2. 11 $\beta$ HSD v lidských biopsiích ulcerosní kolitidy .....	49
<b>5.2. 11<math>\beta</math>HSD a střevní tumory</b> .....	<b>52</b>
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>54</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>61</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>63</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>78</b>
<b>10. SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>80</b>

---

---

## 1. ÚVOD

Glukokortikoidy jsou hlavními steroidními hormony kůry nadledvin, které v lidském organismu zasahují do širokého spektra fyziologických pochodů. Hrají klíčovou úlohu v metabolismu sacharidů, aminokyseliny, pomáhají při regulaci krevního tlaku, modulují stresovou a zánětlivou reakci organismu a uplatňují se v celé řadě dalších procesů <sup>(1)</sup>. Díky svému silnému imunosupresivnímu a antiproliferačnímu účinku se glukokortikoidy efektivně využívají při léčbě mnoha zánětlivých, autoimunitních a nádorových onemocnění a u mnoha dalších chorob.

Biologická aktivita glukokortikoidů nezávisí pouze na dávce, hustotě jejich receptorů a responsibilitě cílových buněk, ale také na jejich lokálním metabolismu, který díky své prereceptorové regulaci moduluje koncentraci glukokortikoidů v cílové tkáni a buňkách.

Klíčovým enzymem prereceptorové modulace glukokortikoidních signálů je enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 $\beta$ HSD), která se vyskytuje minimálně ve dvou typech lišících se svými biochemickými vlastnostmi, genovou lokalizací a tkáňovou distribucí.

Tento enzym katalyzuje oxidaci biologicky aktivních glukokortikoidů (kortisol, kortikosteron) na jejich neaktivní 11-oxo metabolity (kortison, 11-dehydrokortikosteron) nebo v závislosti na reakčních podmínkách a typu 11 $\beta$ HSD redukcí 11-oxo derivátů na aktivní glukokortikoid. Jinými slovy výsledné působení glukokortikoidů ve tkáni je tak ovlivněno i enzymem 11 $\beta$ HSD, který nezávisle na plazmatické koncentraci steroidu může zesílit nebo zeslabit steroidní signál.

Vzhledem k tomu, že se glukokortikoidy uplatňují v celé řadě fyziologických a patofyziologických procesů, narůstá v posledních dvou desetiletích zájem o problematiku prereceptorového metabolismu kortikosteroidních hormonů s cílem určit jeho roli v patofyziologických procesech a vyvinout specifické inhibitory jednotlivých typů 11 $\beta$ HSD tak, aby mohly být použity jako farmaka.

Je známo, že glukokortikoidy výrazně ovlivňují funkci imunitního systému a proces tumorogeneze. Nespecifické střevní záněty a střevní karcinomy patří k onemocněním, v jejichž léčbě se s efektem využívá terapie kortikoidy. Vzhledem k tomu, že dosud nebyl podrobněji prostudován prereceptorový metabolismus kortikoidů u těchto chorob, bylo cílem této práce objasnit, zda u obou onemocnění nedochází k eventuelní alteraci lokálního metabolismu kortikosteroidů, která by tak mohla přispívat k patofyziologii obou chorob.

---

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1. Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony cirkadiálně produkované nadledvinami, i když byla popsána i jejich extraadrenální syntéza. Substrátem extraadrenální syntézy glukokortikoidů je buď cholesterol nebo některé plazmatické steroidní prekurzory, avšak tato syntéza prakticky neovlivňuje celkovou plazmatickou hladinu kortikosteroidů, spíše se spekuluje o možných parakrinních a autokrinních účincích <sup>(2,3)</sup>.

Sekrece glukokortikoidů ovlivňují četné faktory jak zevního tak vnitřního prostředí, výrazně se podílí např. trauma, infekce, stres, psychická a fyzická zátěž <sup>(4)</sup>.

Glukokortikoidy mají široké spektrum účinků vzhledem k tomu, že jejich působení v organismu ovlivňuje většinu buněk v těle a přispívají k homeostáze organismu. Hlavní metabolické důsledky ať už vnitřně produkovaných nebo zevně aplikovaných kortikoidů jsou způsobeny jejich přímými účinky na buňky.

Přestože je velká část hormonálních účinků kortikoidů závislá na jejich plazmatické koncentraci a zesiluje se po jejich podání, mnohé fyziologické pochody nejsou po větším množství kortikoidů dále stimulovány, hovoříme o tzv. permisivním působení.

K nejdůležitějším metabolickým účinkům kortikoidů patří stimulace glukoneogeneze a glykogeneze a potenciace příjmu aminokyselin játry a ledvinami. V tukové tkáni inhibují příjem glukosy, což stimuluje lipolýzu, avšak zvýšená sekrece insulinu vede v závěru k lipogenezi. Ve svalích stimuluje katabolismus proteinů, což vede k uvolnění aminokyselin do cirkulace jako potenciální zdroj glukosy pro CNS.

Glukokortikoidy disponují i četnými katabolickými účinky, které realizují především v kůži, tukové, pojivové, lymfatické, kostní a svalové tkáni. Tyto účinky dobře demonstrují pacienti s Cushingovým syndromem nebo dlouhodobě užívající suprafyziologické dávky kortikoidů. U dětí se k těmto symptomům ještě přidává alterace růstu, kterou nelze ovlivnit aplikací růstového hormonu.

Glukokortikoidy výrazně působí i na CNS, kde ovlivňují chování (pozitivní supresní dexamethasonový test u některých depresivních onemocnění), paměti (zvýšený počet GR v CNS u pacientů s demencí), spánku (snížení hladiny kortikoidů zpomaluje na EEG  $\alpha$ -rytmus). Glukokortikoidy dále snižují vylučování ACTH a beta-lipotropinu z hypofýzy, TSH a FSH z hypothalamu. V gastrointestinálním traktu podporují tvorbu HCl a pepsinu, což bývá častou příčinou žaludeční lézí a krvácení ze žaludeční

---

sliznice. Ovlivňují absorpci tuků a negativně působí na absorpci vápníku. Nezanedbatelný je jejich vliv na hematopoetický systém, kde zvyšují počet neutrofilů, erytrocytů a trombocytů v periferní krvi. V uro-poetickém systému se nedostatek kortikoidů projeví především jako porucha glomerulární filtrace, v jejímž důsledku nejsou ledviny schopny dostatečně vylučovat vodní zátěž. Důležitou úlohu hrají korti-koidy v průběhu maturace plodu, prenatálně ovlivňují dozrávání struktur plicního parenchymu a tvorbu surfaktantu.

Je patrné, že glukokortikoidy zasahují do širokého spektra fyziologických reakcí v organismu, nicméně se zároveň podílí i na různých patofyziologických procesech, které souvisí se vznikem různých meta-bolických onemocnění a dalších chorob <sup>(5)</sup>. To že mají glukokortikoidy takto široké spektrum působnosti nejlépe dokládají poruchy a onemocnění, při nichž je glukokortikoidů nadbytek a nebo naopak nedos-tatek.

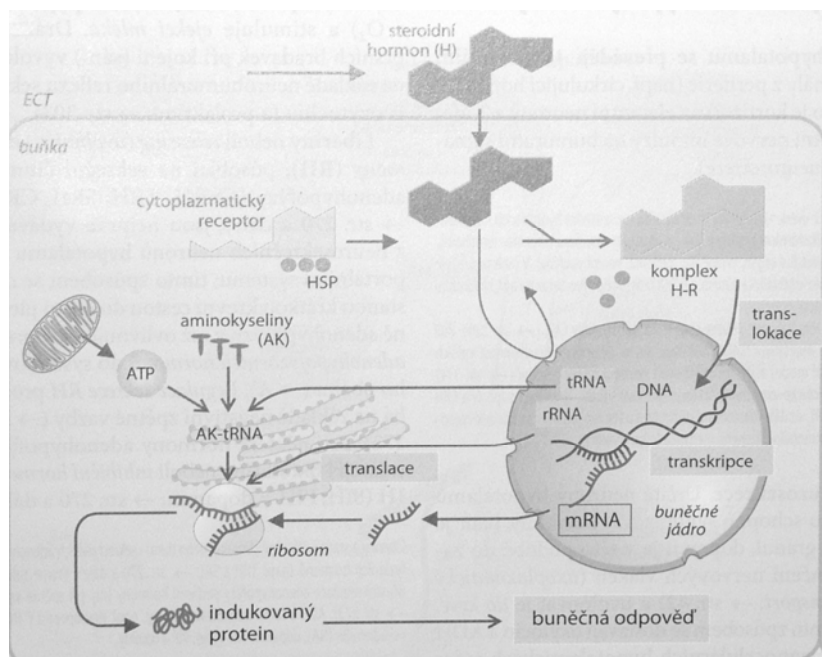
U lidí je hlavním glukokortikoidem kortisol. Sekrece kortisolu a jeho metabolismus jsou obezřetně regulovány tak, aby byla udržována jeho požadovaná hladina v krvi. Zvýšenou potřebu kortisolu dopro-vází zvýšení sekrece CRH s ACTH a následně tak kortisolu, což je kompenzační mechanismus, který umožňuje udržovat jeho požadovanou hladinu v krvi. Metabolismus kortisolu tak hraje klíčovou úlohu v aktivitě hypotalamo- hypofyzární osy <sup>(6)</sup>.

90 % kortisolu je v krvi vázáno, především na  $\alpha$ 2-globulin – CBG (cortisol binding globulin), avšak pou-ze volná frakce je biologicky aktivní <sup>(7)</sup>. Jinak je tomu u kortisonu, který se v plazmě vyskytuje přede-vším nevázaný a má možnost volně vstupovat do buněk <sup>(8,9)</sup>.

Obecným mechanismem působení steroidních hormonů, a tedy i glukokortikoidů, v buňce je jejich vaz-ba na odpovídající cytoplazmatický receptorový protein s následným odpoutáním inhibičních bílkovin (heat shock proteins, HSP – v případě glukokortikoidů jsou to HSP 90). Tento hormon-receptorový komplex dimerizuje, je translokován do buněčného jádra, kde se váže na odpovídající gen a indukuje nebo potlačuje transkripci <sup>(10)</sup>. Celý tento mechanismus je nazýván *trans-aktivace* <sup>(11,12,13)</sup>, viz obr. 2.1.1.

Intracelulárně jsou glukokortikoidy ligandy pro glukokortikoidní receptory (GR). GR patří do superrodiny intracelulárních receptorů, jejichž ligandy aktivují transkripční faktory <sup>(14)</sup>. Glukokortikoidní receptory jsou produkty GR genu a díky rozdílnému startovacímu exonu (exon 9 $\alpha$  a 9 $\beta$ ) odlišujeme i dva podtypy těchto receptorů GR $\alpha$  a GR $\beta$ . Tyto receptory se tkáňově odlišují v mnoha aspektech jak kvantitativně tak kvalitativně. Zastoupení těchto receptorů hraje důležitou úlohu při odpovědi na léčbu glukokortikoi-dy u chorob jako je např. revmatoidní artritida, renální forma lupus erythematosus nebo chronická lymfa-tická leukémie. Zatímco pacienti s převažujícím zastoupením GR $\alpha$  v periferních monocytech vykazují

dobrou odpověď na terapii kortikoidy, pacienti se zvýšeným zastoupením GR $\beta$  byli k léčbě glukokortikoidy rezistentní <sup>(15)</sup>.



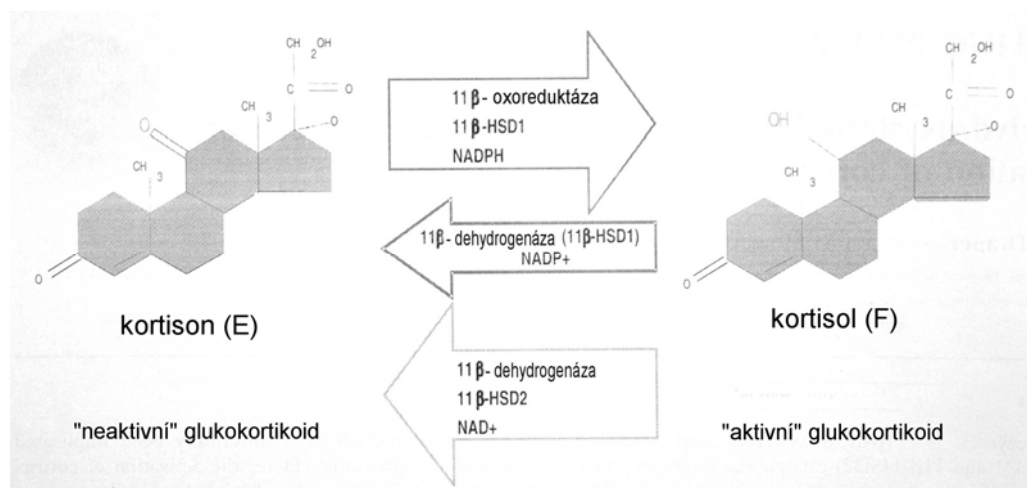
Obr. 2.1.1. **Mechanismus účinku steroidních hormonů** (převzato z S.Silbernagl, Atlas fyziologie člověka, Praha, GRADA 2004; str.279)

Za konečné množství glukokortikoidu, které se naváže a aktivuje jaderný receptor, zodpovídá mimo jiné i enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa. Enzymy ze skupiny hydroxysteroiddehydrogenas umožňují steroidním tkáním regulovat lokální hladinu aktivního steroidního hormonu, který se pak naváže a *trans*-aktivuje intracelulární receptor. Tento proces je znám pod pojmem *intrakrinní modula*ce <sup>(16)</sup>.

11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 $\beta$ HSD) hraje ústřední úlohu v metabolismu kortisolu. Umožňuje vzájemnou interkonverzi kortisolu a kortisonu a kontroluje tak množství aktivního glukokortikoidu navázaného na glukokortikoidní receptor. Navíc je schopna ochraňovat mineralokortikoidní receptor (MR) před nadbytkem kortisolu. Působení obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD demonstruje obr. 2.1.2.

Jako první z enzymů 11 $\beta$ HSD byl stanoven typ 1. Jedná se o nízkoafinní, NADP(H)<sup>+</sup> dependentní enzym, který je obousměrně aktivní, tedy má možnost pracovat jako oxidasa i reduktasa <sup>(17)</sup>. 11 $\beta$ HSD1 vykazuje silnou expresi v glukokortikoidních tkáních a usnadňuje vazbu glukokortikoidu na glukokortikoidní receptor tím, že redukuje neaktivní 11-oxo deriváty na jejich aktivní 11-hydroxy formy vykazující vyšší afinitu k receptoru než 11-oxo deriváty.





Obr. 2.1.2. Enzymatické působení obou typů enzymů 11βHSD na svých substrátech, vzájemná interkonverze aktivního a neaktivního glukokortikoidu (převzato N. Draper a P.M. Stewart, 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. Journal of Endocrinology 2005; 186, s.252)

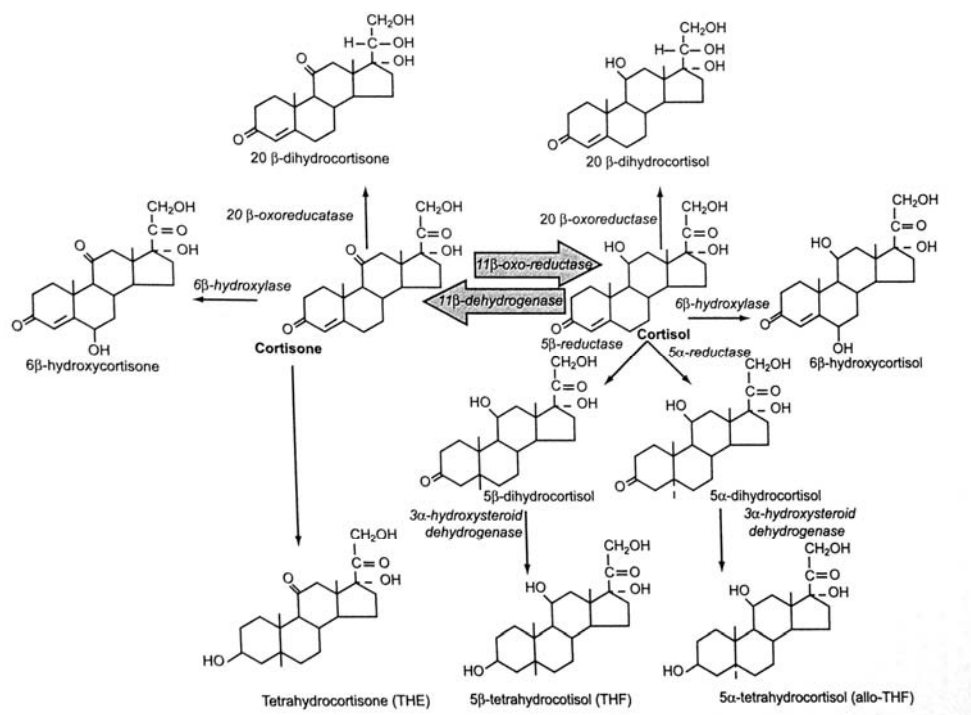
Druhý typ 11βHSD byla izolována z buněk ledvinných sběrných kanálků a z trofoblastu. Ve svých cílových tkáních využívá 11βHSD2 jako kofaktor NAD<sup>+</sup> a má pouze oxidasovou aktivitu <sup>(18)</sup>.

Kortisol i kortison jsou dále metabolizovány 5α a 5β-reduktasou a 3α-hydroxysteroiddehydrogenasou, což vede k tvorbě konečných produktů metabolismu kortisolu – tetrahydrokortisonu (THE), 5α-tetrahydrokortisolu (alloTHF) a 5β-tetrahydrokortisolu (THF). Další metabolity kortisolu mohou být tvořeny převážně v jaterní tkáni. Kortisol a kortison mohou být hydroxylovány v pozici 6 za tvorby 6β-hydroxykortisolu. Další metabolity mohou vznikat cestou 20β-oxoreduktasy, vedoucí k tvorbě 20β-dihydrokortisolu <sup>(6)</sup>, viz obr. 2.1.3.

### 2.1.1. 11B-HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASY

11β-hydroxysteroiddehydrogenasy jsou součástí superrodiny alkoholdehydrogenas s krátkým řetězcem. Do této superrodiny se řadí více než 100 různých enzymů, které sdílí asi 15-30% aminokyselinovou homologii.

Vyskytují se dva rozdílné typy 11βHSD, 11βHSD1 a 11βHSD2. Oba typy enzymů sdílí asi 21% homologii a to především v konzervativních oblastech, které jsou společné členům superrodiny alkoholdehydrogenas s krátkým řetězcem <sup>(19,20)</sup>.



Obr. 2.1.3. Přehled základních kroků v metabolismu kortisolu (převzato z J.W.Tomlinson a P.M. Stewart, Cortisol metabolism and the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Best Practise and Research Clinical Endocrinology and Metabolism 2001; 15, s.63 )

Základní součástí proteinu 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas je několik neměnných oblastí, které určují umístění uvnitř endoplazmatického retikula, vazebné místo kofaktoru a katalytickou doménu. N-koncová doména je zodpovědná za ukotvení na endoplazmatickém retikulu a nalezá se zde kofaktor-vazebná doména. Vazebné místo pro kofaktor je tvořeno tzv. Rossmanovým záhybem<sup>(21)</sup>. Oby typy 11 $\beta$ HSD mají odlišnou genetickou lokalizaci svého enzymu<sup>(22,23)</sup>.

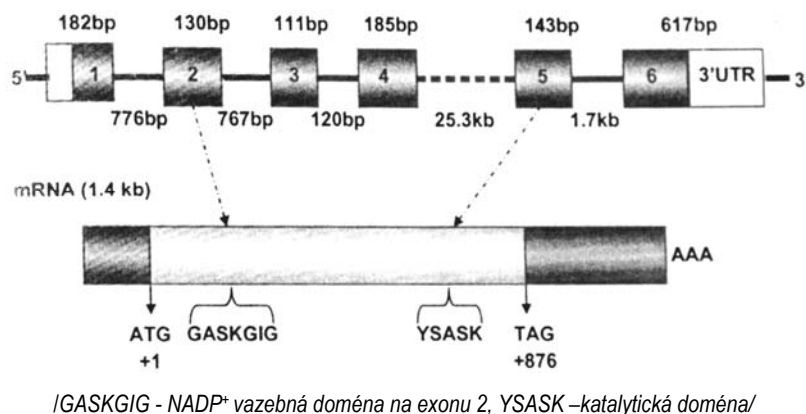
Tkáňově specifická exprese obou typů enzymů hraje důležitou roli ve fyziologii kortikosteroidů díky své schopnosti regulovat aktivaci glukokortikoidního a mineralokortikoidního receptoru. Mezi oběma typy enzymů 11 $\beta$ HSD existují četné rozdíly, které jsou sumarizovány v tabulce 2.1.1.1.<sup>(24)</sup>

Tabulka 2.1.1.1. Srovnání obou typů 11 $\beta$ HSD

Kofaktor	11 $\beta$ HSD1	11 $\beta$ HSD2
	NADPH/ NADP	NAD <sup>+</sup>
Tkáňová lokalizace	Játra, plíce, ledviny, mozek, varlata, lamina propria, tuková tkáň	kolon, ledviny slinné žlázy
K <sub>m</sub> pro kortison	$\mu$ M rozsah	nM rozsah
Aktivita	Redukce, oxidace	Oxidace
Počet aminokyselin enzymu	292	405
Molekulová hmotnost	34 kDa	40 kDa
Chromozomální lokalizace	Chromozom 1	Chromozom 16
Velikost cDNA	>20 kb cDNA	5.3 kb cDNA
Počet exonů	6	5

### 2.1.1.1. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

Enzym 11 $\beta$ HSD1 je glykoprotein, který byl poprvé izolován z mikrosomální frakce jater potkana (17). Jeho molekulová hmotnost je 34 kDa a vykazuje expresi v mnoha tkáních, především však v játrech, plicích, tukové tkáni, mozku, varlatech a decidui. V klasických mineralokortikoidně-dependentních tkáních jako jsou kolon, ledvina a slinné žlázy má nízkou expresi. 11 $\beta$ HSD1 je nízkoafinní NADP(H)<sup>+</sup> enzym, protože Michaelisova konstanta  $K_m$  je pro glukokortikoidy v mikromolárním rozsahu (25). Jedná se o obousměrně aktivní enzym, schopný jak dehydrogenasové tak reduktasové aktivity, interkonvertující inaktivní kortison a aktivní kortisol. V intaktních buňkách funguje především jako reduktasa (26), naproti tomu v buněčných homogenátech byla popsána i dehydrogenasová aktivita (27). Gen pro 11 $\beta$ HSD1 je uložen na 1. chromozomu (1q32-41) a tvoří ho 6 exonů s celkovou délkou 9 kb (23), viz obr. 2.1.1.1.1.



Obr. 2.1.1.1.1.: Gen 11beta-hydroxysteroiddehydrogenasy 1 (převzato z N.Draper a P.M. Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. Journal of Endocrinology 2005; 186, s.257)

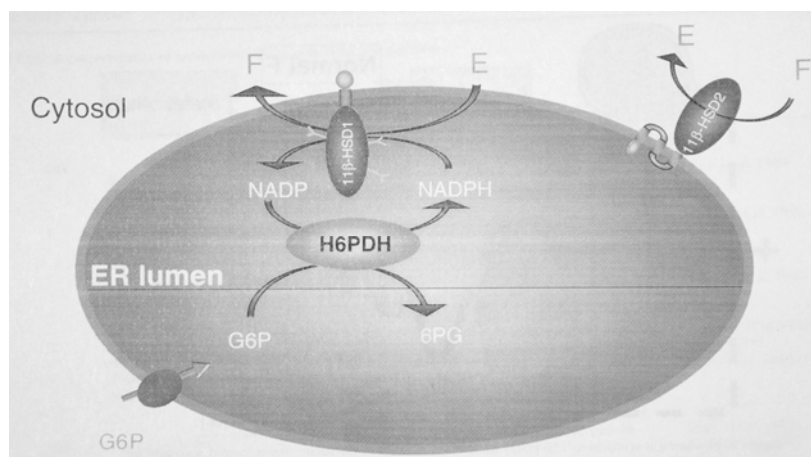
Protein 11 $\beta$ HSD1 tvoří 292 aminokyselin a je uložen na membráně endoplazmatického retikula tak, že jeho N-terminální konec směřuje do cytosolu a katalytická doména směřuje naopak do lumen endoplazmatického retikula .

Vytvoření modelu myši s delecí genu *HSD11B1* umožnilo lépe porozumět roli 11 $\beta$ HSD1 v organismu. Tyto myši nejsou schopné konvertovat 11-dehydrokortikosteron na aktivní kortikosteron a mají omezenou schopnost aktivace enzymů glukoneogeneze během hladovění společně s dalšími abnormalitami (28).

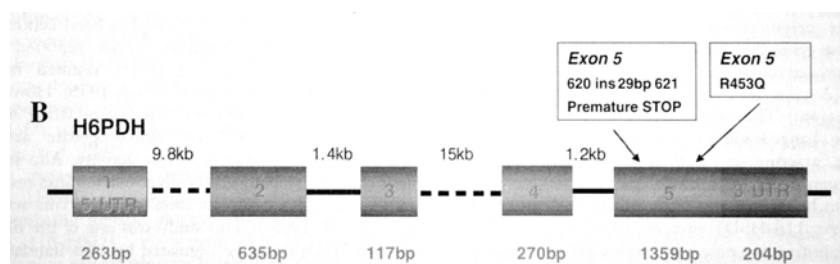
Jak bylo výše uvedeno, 11 $\beta$ HSD1 potřebuje ke své oxo-reduktasové aktivitě jako kofaktor NADPH. Jako možný zdroj tohoto kofaktoru byl dříve mylně pokládán enzym pentosového cyklu glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH) lokalizovaná v cytoplasmě. Tento enzym zajišťuje tvorbu NADPH v buňce spolu s katalýzou přeměny glukosa-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát (29).

Vzhledem k odlišné nitrobuněčné lokalizaci 11 $\beta$ HSD (endoplazmatické retikulum) a glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy (cytosol) a pravděpodobně i neschopnosti NADPH přestupu přes membránu endoplazmatického retikula se tato teorie nepotvrdila <sup>(30)</sup>.

Výše uvedené požadavky nakonec splnil jiný enzym pentosového cyklu, enzym hexosa-6-fosfát-dehydrogenasa (H6PDH) lokalizovaný na endoplazmatickém retikulu <sup>(31)</sup>. H6PDH katalyzuje první dva kroky endoluminálního pentosového cyklu doprovázené tvorbou NADPH. H6PDH je exprimována ve většině tkání, především ale v játrech a tukové tkáni. Gen pro H6PDH je lokalizován na chromozomu 1p36.2. <sup>(32)</sup>, viz obr. 2.1.1.1.3. Mutace tohoto genu může být příčinou syndromu nedostatečné redukce kortisonu, stejně jako mutace genu pro 11 $\beta$ HSD1. Tvorbu NADPH enzymem H6PDH znázorňuje obr. 2.1.1.1.2.



Obr. 2.1.1.1.2. Tvorba NADPH enzymem hexosa-6-fosfát-dehydrogenasou (převzato z N.Draper a P.M.Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. Journal of Endocrinology 2005; 186, s.264)



Obr. 2.1.1.1.3. Gen H6PDH a jeho mutace způsobující syndrom nedostatečné redukce kortisonu – CRH (převzato z N.Draper a P.M.Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. Journal of Endocrinology 2005; 186, s.257)

---

### 2.1.1.2. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 2

11 $\beta$ HSD2 je NAD<sup>+</sup>-dependentní dehydrogenasa, která byla poprvé izolována ze sběrného kanálku ledvin králíka. Enzym má vysokou afinitu ke kortisolu s Michaelisovou konstantou  $K_m$  50 nM (100x vyšší než 11 $\beta$ HSD1) a 5 nM pro kortikosteron, má pouze oxidasovou aktivitu a jeho molekulová hmotnost je přibližně 40 kDa <sup>(33-36)</sup>.

cDNA izolovaná z lidské ledviny sdílí asi 21% homologii s 11 $\beta$ HSD1. Gen 11 $\beta$ HSD2 o rozsahu asi 6,2 kb tvoří 405 aminokyselin, má 5 exonů a je uložen na 16. chromozomu <sup>(37)</sup>. Enzym je stejně jako první typ enzymu umístěn na endoplazmatickém retikulu, avšak oproti němu má obrácenou orientaci a 3x prochází skrze membránu. Katalytická doména směřuje do cytosolu (C-konec) a N-konec do endoplazmatického retikula <sup>(38)</sup>.

11 $\beta$ HSD2 je exprimována v klasických mineralokortikoidně-dependentních tkáních jako jsou ledviny, ileum a distální kolon a slinné žlázy, mimo to je exprimována také v placentě <sup>(39-41)</sup>. 11 $\beta$ HSD2 je v ledvinách lokalizována ve sběrných kanálcích kůry a dřeně, tenkém i tlustém raménku Henleho kličky a distálním tubulu. Mimo to vykazují silnou expresi buňky hladkého svalu cév a zdá se, že 11 $\beta$ HSD2 moduluje odpověď rezistenčních cév ke glukokortikoidům skrze sensitivitu ke katecholaminům <sup>(42-44)</sup>. Dalším orgánem je kůže, kde je 11 $\beta$ HSD2 lokalizována pouze v ekrinních žlázách <sup>(45)</sup>.

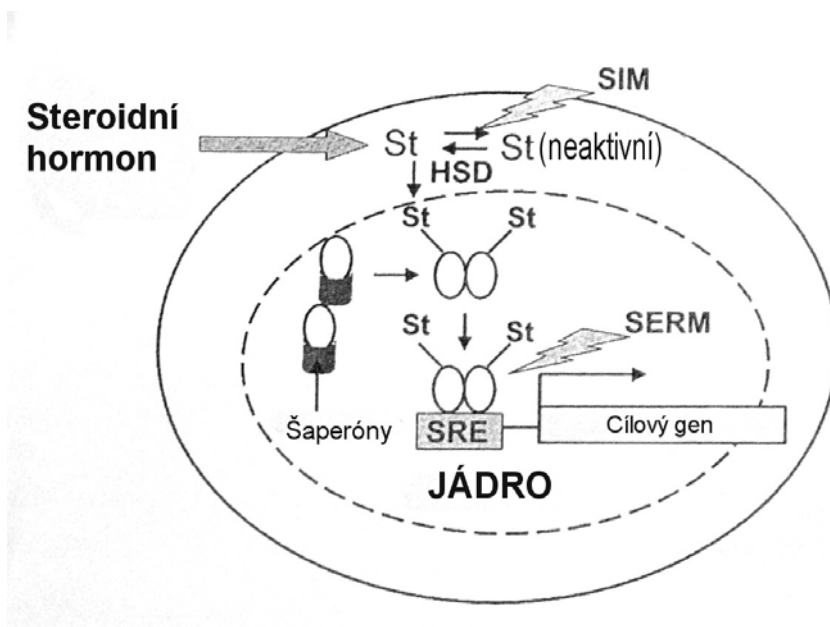
V epitelích exprimujících mineralokortikoidní receptor umožňuje oxidasová aktivita 11 $\beta$ HSD2 ochraňovat mineralokortikoidní receptor před nadbytečným obsazením glukokortikoidy, neboť volný kortisol a aldosteron mají shodnou afinitu pro mineralokortikoidní receptor. Pokud je MR exprimován v buňce sám, nachází se jak v cytosolu tak v jádře buňky. Pokud je exprimován v buňce současně s 11 $\beta$ HSD2, dochází zřejmě k asociaci obou proteinů a MR je lokalizován kolem endoplazmatického retikula <sup>(46)</sup>. Nedostatečná inaktivace kortisolu cestou 11 $\beta$ HSD2 je příčinou dědičné formy hypertenze, zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů (viz dále).

Je možné, že 11 $\beta$ HSD2 může modulovat působení glukokortikoidů ochranou glukokortikoidních receptorů <sup>(7)</sup>. Některé práce zvažují působení 11 $\beta$ HSD2 jako možného onkogenu. V těchto pracích byla 11 $\beta$ HSD2 zvýšeně exprimována v maligních tkáních oproti svým nezhoubným protějškům. Teoreticky může vysoká exprese 11 $\beta$ HSD2 v tkáních bohatých na GR potencovat proliferaci, neboť glukokortikoidy inhibují buněčnou proliferaci a stimulují diferenciaci <sup>(47)</sup>.

### 2.1.1.3. Inhibitory 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy

Od počátku výzkumu 11 $\beta$ HSD byly v klinickém i laboratorním testování použity různé syntetické i přírodní inhibitory tohoto enzymu. K nejvýznamnějším inhibitorům patří deriváty glycyrrhizinu, složky lékořice. K nejčastěji používaným patří kyselina glycyrrhetinová a její ester s kyselinou jantarovou karbenoxolon<sup>(48-50)</sup>, látka původně vyvinutá k léčbě peptického vředu. Z dalších přírodních inhibitorů lze uvést flavonoidy jako naringenin<sup>(51)</sup>, žlučové kyseliny jako je např. kyselina lithocholová<sup>(52)</sup> nebo některé endogenní steroidy<sup>(53)</sup>. Nutno podotknout, že všechny tyto látky jsou charakterizovány nízkou selektivitou, nízkou účinností a mají nepříznivé farmakochemické vlastnosti nebo kombinaci všech uvedených nevýhod.

Je pochopitelné, že vzrůstající význam role 11 $\beta$ HSD1 u mnoha metabolických onemocnění směřuje aktivitu ve farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu tímto směrem. Velká pozornost je věnována nové skupině terapeutik nazývané *selektivní intrakrinní modulátory (SIM)*, které patří do skupiny inhibitorů enzymů hydroxysteroiddehydrogenas (HSD). Díky inhibici HSD ovlivňují SIM ve svém důsledku koncentraci aktivního ligandu navázaného na steroidní receptor. Vzhledem k specificky rozdílné tkáňové expresi obou typů 11 $\beta$ HSD ovlivňují inhibitory obou enzymů 11 $\beta$ HSD odpověď tkáně k danému hormonu<sup>(54)</sup>. Mechanismus působení SIM ukazuje obrázek 2.1.1.3.1.



Obr. 2.1.1.3.1. Místa působení selektivních intrakrinních modulátorů (SIM) při mechanismu působení steroidních hormonů. St-steroid, SRE- místo působení steroidu na cílovém genu (steroid response element), HSD – hydroxysteroid dehydrogenasa (převzato z T.M. Penning, Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. Human Reproduction Update 2003; 9, s. 194)

---

S uplatněním inhibitorů 11 $\beta$ HSD se počítá např. při léčbě metabolických onemocnění jako je insulinová rezistence, metabolický syndrom nebo obezita. V současnosti patří k nejvíce diskutovaným syntetickým inhibitorům 11 $\beta$ HSD arylsulfonamidothiazol<sup>(55)</sup> a adamantyltriazol<sup>(56)</sup>.

Přesvědčivým důkazem, že inhibitory 11 $\beta$ HSD1 mohou být dobře využitelnými léčivy metabolického syndromu, bylo použití selektivního inhibitoru 11 $\beta$ HSD1 adamantyltriazolu v léčbě dietně navozené obezity u zvířecích modelů. Adamantyltriazol selektivně inhiboval aktivitu 11 $\beta$ HSD1 v játrech a tukové tkáni s následným poklesem váhy, příjmu potravy, zmenšením masy tukové tkáně, došlo k zlepšení lipidového profilu a insulinové sensitivity<sup>(57)</sup>.

#### **2.1.1.4. Orgánová distribuce 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas**

Jak bylo výše uvedeno, za lokální koncentraci kortikosteroidů v tkáních zodpovídá enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa. V současné době byly v lidských tkáních prokázány oba dva typy těchto enzymů 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2. Mezi oběma enzymy existují četné funkční rozdíly a mimo jiné se liší i svojí tkáňovou distribucí. Zatímco 11 $\beta$ HSD1 je ve vysoké míře zastoupena v glukokortikoidně-cílových tkáních, v klasických mineralokortikoidně-dependentních tkáních, jako jsou ledviny, kolon a slinné žlázy, je její exprese slabá. V mineralokortikoidně-dependentních tkáních má naopak vysokou expresi druhý z enzymů – 11 $\beta$ HSD2.

##### **2.1.1.4.1. Orgánová distribuce 11 $\beta$ HSD1**

11 $\beta$ HSD1 je lokalizována v mnoha tkáních, které disponují glukokortikoidními receptory, jako jsou např. játra, buňky imunitního systému, plíce, varlata, placentární decidua nebo kůra nadledvin.

V játrech je vysoká aktivita 11 $\beta$ HSD1 lokalizována především v oblasti centrální vény, v oblasti arteria hepatica, portální vény a žlučového kanálku je její exprese nízká<sup>(58,59)</sup>. Tato distribuce 11 $\beta$ HSD1 má svůj farmakologický význam - inaktivní glukokortikoidy jako kortison nebo prednison jsou po perorálním podání aktivovány na své 11-hydroxyderiváty. V situacích, které vyžadují vysoké hladiny kortikoidů, jako je např. stres, může být jaterní 11 $\beta$ HSD1 přídatným zdrojem aktivních glukokortikoidů<sup>(60)</sup>.

Další důležitou funkcí jaterní formy 11 $\beta$ HSD1 je indukce enzymů glukoneogeneze (glukosa-6-fosfataza, fosfoenolpyruvátcarboxykinasa), které se aktivují během lačnění glukokortikoidy<sup>(28)</sup>. U myši s delecí genu 11 $\beta$ HSD1 -/- bylo zjištěno, že jsou díky snížené schopnosti indukce glukoneogenetických

---

enzymů více rezistentní vůči hyperglykémii a mají i zlepšenou citlivost k insulinu v játrech oproti divokému kmenu.

Významné místo má 11 $\beta$ HSD1 i v imunitním systému. U potkana jsou hlavním zdrojem 11 $\beta$ HSD1 buňky stromatu sleziny, lymfatických uzlin a thymu. U lidí byla 11 $\beta$ HSD1 detekována v obou typech lidských lymfocytů, makrofázích a dendritických buňkách. Detekce druhého typu 11 $\beta$ HSD nebyla v lidských imunitních buňkách prokázána <sup>(61,62,63)</sup>.

Nedávná studie na myších thymocytech prokázala, že exprese 11 $\beta$ HSD1 v thymocytech vzrůstá od pozdního fetálního vývoje až do dospělosti, kdy dosahuje maxima. Tento fakt podporuje hypotézu, podle níž by glukokortikoidní signál a jeho zesílení skrze reduktasovou aktivitu 11 $\beta$ HSD1 mohl ovlivnit vývoj T-lymfocytů a uspořádání imunitního systému <sup>(64)</sup>.

11 $\beta$ HSD1 a různé prozánětlivé molekuly a cytokiny vzájemně ovlivňují svoji expresi. Studie na myších makrofázích prokázala, že v průběhu zánětu dochází k zvýšení aktivity i exprese 11 $\beta$ HSD1, která je doprovázena zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů. Inhibice 11 $\beta$ HSD1 výrazně snížila sekreci prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1 $\beta$ , MCP-1a TNF- $\alpha$ , což naznačuje, že intracelulární regenerace aktivních glukokortikoidů cestou 11 $\beta$ HSD1 zvyšuje prozánětlivý efekt aktivovaných makrofágů <sup>(65)</sup>.

Ve střevu je 11 $\beta$ HSD1 lokalizována v nonepiteliálních buňkách lamina propria – v buňkách stromatu a leukocytech <sup>(66)</sup>. Zde se předpokládá její významná úloha při regulaci glukokortikoidního signálu.

V lidské placentě jsou exprimovány oba typy enzymů 11 $\beta$ HSD. Vysoké hladiny aktivních glukokortikoidů způsobené zvýšenou expresí 11 $\beta$ HSD1 v placentární decidui umožňují implantaci blastocysty a imunologickou toleranci cizí tkáně <sup>(67)</sup>. Ve fetální tkáni hraje 11 $\beta$ HSD1 důležitou roli při konverzi inaktivního glukokortikoidu na aktivní, který je důležitý pro indukci syntézy surfaktantu a tím i pro proces maturace plicní tkáně <sup>(68)</sup>.

Je známo, že glukokortikoidy usnadňují diferenciaci preadipocytů na adipocyty. V průběhu maturace dochází v adipocytech k expresi 11 $\beta$ HSD1, která vede k zvýšení lokální koncentrace glukokortikoidů, čímž se dále zvětšuje masa tukové tkáně. Tento mechanismus může hrát důležitou roli v patogenezi centrální obezity <sup>(69,70)</sup>.



---

#### **2.1.1.4.2. Orgánová distribuce 11 $\beta$ HSD2**

Principiálně ale ne výlučně vykazuje 11 $\beta$ HSD2 expresi v mineralokortikoidně-dependentních tkáních. V ledvině se 11 $\beta$ HSD2 exprimuje ve sběrných kanálcích kůry a dřeni s výjimkou distální části papily, v tenkém i tlustém raménku Henleho kličky a distálním tubulu <sup>(7)</sup>. 11 $\beta$ HSD2 vykazuje expresi v mineralokortikoidně cílových segmentech nefronu, což má význam pro hospodaření se sodnými ionty. Funkcí 11 $\beta$ HSD2 v této oblasti je ochrana MR před nadměrným obsazením glukokortikoidy, které mají obdobnou afinitu k MR jako aldosteron, ale asi 10x vyšší koncentraci.

Důležitou cílovou tkání jak pro mineralokortikoidy tak pro glukokortikoidy je kolon, které tak přispívá k elektrolytové a vodní homeostáze organismu. 11 $\beta$ HSD2 je lokalizována v epitelích střevní sliznice <sup>(45,71)</sup>, kde je společně exprimována s MR. Jejich společná exprese pravděpodobně i zde zabraňuje nadbytečnému obsazení MR glukokortikoidy. Střevní sliznice hraje důležitou úlohu při vstřebávání vody a elektrolytů, neboť aldosteron stimuluje v kolon absorpci sodného iontu <sup>(72,73)</sup>. Inhibitory 11 $\beta$ HSD2 zvyšují absorpci sodíku ve střevu na úroveň srovnatelnou s aldosteronem, zatímco bez něj je jeho absorpce značně omezena <sup>(74,75)</sup>. Dehydrogenasová aktivita 11 $\beta$ HSD stoupá aborálním směrem, téměř neměřitelná je v duodenu, nejvyšší je v distálním kolon <sup>(76)</sup>.

V průběhu maturace a diferenciaci kolon dochází ke změnám v expresi 11 $\beta$ HSD2. Zatímco u dospělého člověka byla imunoreaktivita 11 $\beta$ HSD2 na povrchových epitelích kolon výrazně pozitivní, ve fetální tkáni byla detekována až okolo 25.týdne gestace, a teprve okolo 40. týdne koreluje s imunoreaktivitou u dospělých jedinců. Stejně tak dochází ke změnám i v průběhu diferenciaci kolon, kdy platí, že s přibývajícím stupněm diferenciaci dochází k zvýšení exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2 <sup>(77)</sup>.

11 $\beta$ HSD2 je v placentě je lokalizována v syncytiotrofoblastu, kde ochraňuje fetus před vysokými hladinami maternálních kortikosteroidů <sup>(78)</sup>. Schopnost 11 $\beta$ HSD2 inaktivovat glukokortikoidy v placentě je značná, navíc má placenta největší koncentraci tohoto enzymu na mg mokré váhy tkáně <sup>(79)</sup>. Expese tohoto typu enzymu 11 $\beta$ HSD se u lidí zvyšuje s týdnem gestace.

Nepochybně významnou roli hrají obě dehydrogenasy v kardiovaskulárním systému. V srdeční tkáni byla prokázána exprese jak glukokortikoidního tak mineralokortikoidního receptoru. Tyto receptory mohou být aktivovány nejenom plazmatickými, ale i srdcem produkovanými glukokortikoidy a je možné, že lokální syntéza těchto steroidů může auto i parakrinně ovlivňovat srdeční tkáň <sup>(80,81)</sup>. Koexpese MR a 11 $\beta$ HSD2 je stejně jako v jiných mineralokortikoidně – cílových tkáních nutná k selektivní vazbě aldosteronu na MR. V lidském srdci byla prokázána aktivita obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD a exprese mRNA (11 $\beta$ HSD2), nicméně není jasné, které buňky oba enzymy exprimují <sup>(82,83)</sup>. Glukokortikoidy se exprimují v lidských myocytech i fibroblastech <sup>(82,84)</sup>.

---

---

Zatímco v klasických mineralokortikoidně cílových tkáních jsou glukokortikoidy agonisté MR a 11 $\beta$ HSD2 funguje jako protektor MR před jeho nadbytečnou aktivací, v srdci se zdá působení glukokortikoidů opačné, tedy jsou antagonisté MR a 11 $\beta$ HSD2 zvyšuje mineralokortikoidní efekt <sup>(85,86,87)</sup>.

11 $\beta$ HSD1 s převládající oxoreduktasovou aktivitou vykazuje expresi zvláště v cévním řečišti, a to v hladkém svalstvu cév a endotheliálních buňkách <sup>(88,89)</sup>, 11 $\beta$ HSD2 byla prokázána pouze v cévním endotelu <sup>(90)</sup>. Vzhledem k tomu, že glukokortikoidy potencují účinek endogenních katecholaminů na cévní stěnu, mohou obě dehydrogenasy modulovat cévní reaktivitu, což může hrát důležitou úlohu při vzniku hypertenze <sup>(91-94)</sup>.

## **2.2. 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa v patofyziologických procesech**

### **2.2.1. HYPERTENZE**

Na regulaci krevního tlaku se významným způsobem podílí kortikoidy nadledvin. Důležitou roli kortikoidů na udržování krevního tlaku a natriémie můžeme zaznamenat u chorob s poruchou sekrece kortikoidů jako je Cushingův syndrom doprovázený hypertenzí s hypernatriémií a nebo naopak Addisonova choroba se symptomy hypotenze a hyponatriémie.

Lokální hladinu kortikoidů v tkáních reguluje enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa, která určuje množství aktivního kortikoidu, které se naváže na intracelulární receptor. V patofyziologii hypertenze se uplatňuje především druhý typ 11 $\beta$ HSD, který má pouze dehydrogenasovou aktivitu a konvertuje aktivní kortikoid na jeho neaktivní formu. Mutace genu pro 11 $\beta$ HSD2 (HSD11B2) doprovází dědičnou formu hypertenze zdánlivý nadbytek mineralokortikoidů, stejně tak konzumace inhibitorů 11 $\beta$ HSD2 jako jsou lékořice nebo karbenoxolon může vyústit v klinické projevy hypertenze. Snížená aktivita 11 $\beta$ HSD2 se vyskytuje u eklampsie, renálních chorob a jaterní cirhozy a je doprovázena sodíkovou retencí a hypertenzí. S poruchami aktivity a exprese 11 $\beta$ HSD2 se setkáváme ještě i u dalších forem hypertenze jako je ektopický ACTH syndrom nebo např. hypertenze v těhotenství <sup>(94)</sup>. Detailnější popis některých forem hypertenze předkládá následující kapitola.

### 2.2.1.1. Zdánlivý nadbytek mineralokortikoidů

Zdánlivý mineralokortikoidní nadbytek (Apparent mineralocorticoid excess – AME) je vrozená forma hypertenze, která byla poprvé zaznamenána na konci 70. let <sup>(95)</sup>.

Jeho podstatou je porucha periferní konverze kortisolu na kortison, kterou způsobuje snížená aktivita 11 $\beta$ HSD2. Kortisol a aldosteron mají přibližně stejnou afinitu k MR, avšak koncentrace cirkulujícího kortisolu je mnohonásobně vyšší. 11 $\beta$ HSD2 v normální tkáni fyziologicky konvertuje aktivní kortisol na kortison a má tak protektivní účinek na mineralokortikoidní receptor těchto tkání, neboť chrání MR před zaplavením aktivními glukokortikoidy. Mechanismus vzniku AME ukazuje obrázek 2.2.1.1.1.

AME je monogenně podmíněnou formou hypertenze s autosomálně recesivním přenosem, kterou způsobuje mutace na chromozomu 16, kde je gen pro 11 $\beta$ HSD2 lokalizován. Studie prokázaly, že mutace mohou postihnout kterýkoliv exon a byly popsány i ve 2 intronech. Dle tíže mutace je aktivita 11 $\beta$ HSD2 redukována a nebo zcela chybí <sup>(96-98)</sup>.

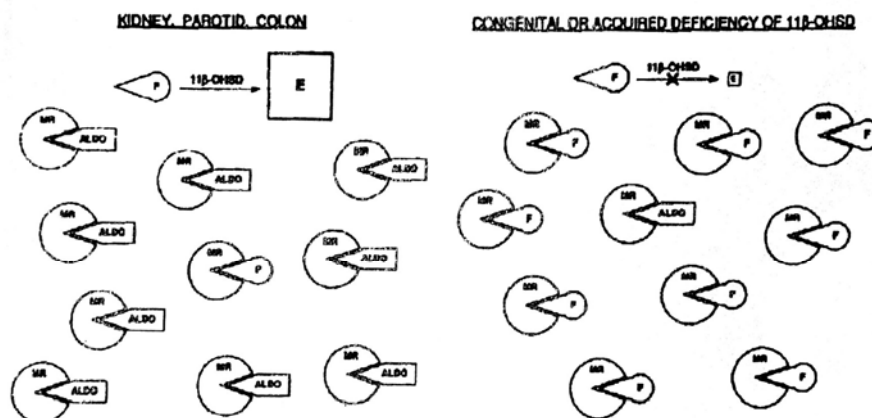


FIG. 8. Schema depicting the role of 11 $\beta$ -HSD2 in conveying specificity upon the mineralocorticoid receptor (MR). In normal physiology (left-hand panel), 11 $\beta$ -HSD2 inactivates cortisol (F) to cortisone (E) in mineralocorticoid target tissues, enabling aldosterone to occupy the MR *in vivo*. In 11 $\beta$ -HSD2-deficient states (right-hand panel), this inactivation does not occur and F gains access to the MR.

Obr. 2.2.1.1.1. Mechanismus vzniku AME, E - kortison, F - kortisol, ALDO - aldosteron, MR - mineralokortikoidní receptor (převzato z P.M. Stewart, Z.S. Krozowski, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Vitamins and Hormones 1999; 57: s.273)

Skupinu pacientů s AME tvoří děti nebo mladí dospělí s těžkou formou hypertenze a hypokalémií, suprimovanou plazmatickou hladinou aldosteronu, nízkou plazmatickou aktivitou reninu, prodlouženým poločasem plazmatického kortisolu. Těžká hypokalémie může zapříčinit rabdomyolýzu a nefrogenní diabetes insipidus <sup>(99,100)</sup>. Další ledvinné patologie zahrnují ledvinné cysty a nefrokalcinozu <sup>(101,102)</sup>. Z extrarenálních projevů byly popsány intrauterinní růstová retardace, malý vzrůst, žízeň, polyurie a postnatální neprospívání.

---

Hypertenzi lze léčit blokadou mineralokortikoidních receptorů kalium šetřícími diuretiky jako je amilorid, spironolaktonem a nebo dietou s nízkým příjmem soli <sup>(103)</sup>. Spironolakton má proměnlivý účinek vzhledem k nutnosti použít vysokých dávek pro zablokování mineralokortikoidního receptoru. Triamteren a amilorid, kalium šetřící diuretika, blokují tubulární sodíkové kanály a jsou také používána při terapii AME. Účinek dexamethasonu je variabilní, jeho efekt spočívá v potlačení sekrece kortisolu. K dalším léčivům přispívajícím k snížení krevního tlaku u AME lze uvést ACEI. Captopril potencuje zbytkovou aktivitu 11 $\beta$ HSD2 u těchto pacientů <sup>(104)</sup>. Ledvinná transplantace je léčbou volby u pacientů s AME, u kterých nelze použít výše uvedenou konzervativní terapii <sup>(105)</sup>.

### 2.2.1.2. Lékořice a hypertenze

Syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů nemusí být jen vrozenou chorobou, ale může být i vyvolán podáním inhibitorů 11 $\beta$ HSD jako je karbenoxolon nebo glycyrrhetinová kyselina. Tyto inhibitory působí na oba typy enzymů, ale zdá se, že různé inhibitory mohou mít různý účinek na oba typy 11 $\beta$ HSD <sup>(106)</sup>.

Lékořice je významným zdrojem inhibitorů 11 $\beta$ HSD, neboť obsahuje kyselinu glycyrrhetinovou a její derivát glukuronid glycyrrhizin. Obě látky byly po dlouhá léta s efektem používány k terapii peptického vředu <sup>(107)</sup>, časem k nim přibyl další účinný antiulcerosní lék, syntetický derivát karbenoxolon. Bohužel konzumace karbenoxolonu i lékořice vykazovaly u více než 50 % pacientů výrazné mineralokortikoidní účinky (hypertenze, edémy), a proto se v současnosti již nepoužívají.

Jak kyselina glycyrrhetinová tak glycyrrhizin mají nízkou afinitu k mineralokortikoidnímu receptoru, ale vysokou k 11 $\beta$ HSD. Kyselina glycyrrhetinová je silným kompetitivním inhibitorem 11 $\beta$ HSD2 ( $K_i \sim 5\text{-}10$  nM) <sup>(108,109)</sup>.

První viditelný efekt na krevní tlak, kalémii a plazmatický renin se dostavuje při požití minimálně 225-380 mg glycyrrhetinové kyseliny. Ačkoliv je množství glycyrrhetinové kyseliny a glycyrrhizinu variabilní v různých výrobcích obsahující lékořici, 200-400 mg glycyrrhetinové kyseliny koresponduje s 100-200 g „normální“ lékořice. Klinické symptomy charakteristické pro zvýšené požití lékořice jsou obdobné AME – nízký plazmatický renin a aldosteron, hypokalémie, zvýšená retence sodíku a zvýšený poměr kortisol:kortison v moči, arytmogenní změny na EKG v důsledku hypokalémie <sup>(110-114)</sup>.

---

### 2.2.1.3. Preeklampsie

Klinické symptomy preeklampsie vyjadřuje trias hypertenze, edémy a proteinurie vzniklé v třetím trimestru gravidity. Těhotenská hypertenze i preeklampsie jsou doprovázeny zvýšenou retencí sodíku, která je pravděpodobně důsledkem zvýšené aktivace MR.

V průběhu těhotenství dochází k elevaci progesteronu a jeho metabolitů, které patří mezi přirozené inhibitory 11 $\beta$ HSD2. Inhibice 11 $\beta$ HSD2 neznámým faktorem s následným zvýšením koncentrace kortisolu může být vysvětlením pro „down-regulaci“ mineralokortikoidního receptoru, sníženou hladinu plazmatického reninu a sérového aldosteronu, které se vyskytují při preeklampsii. Alterovaný metabolismus progesteronu v ledvinách by tak mohl hrát roli při patogenezi preeklampsie. Tuto hypotézu podporují nálezy poměru volného kortisolu k volnému kortisonu v moči u pacientek s preeklampsí, který byl zvýšen oproti ženám s fyziologickou graviditou <sup>(115-117)</sup>.

### 2.2.2. OBEZITA, INSULINOVÁ REZISTENCE A METABOLICKÝ SYNDROM

Role metabolismu kortisolu a zvláště 11 $\beta$ HSD1 v patogenezi viscerální obezity je předmětem vědeckého, klinického i farmakologického zájmu. V adipocytech se glukokortikoidy podílí na regulaci exprese mnoha genů, jejichž produkty jsou zapojeny v regulaci lipémie a metabolismu tuků v organismu (např. leptin, PPAR – „peroxisome proliferator activated receptor“, lipoproteinová a hormonsenzitivní lipasa)<sup>(118-121)</sup>. Patologický důsledek působení glukokortikoidů demonstrují pacienti s Cushingovým syndromem. U pacientů s metabolickým syndromem se setkáváme s podobnými nálezy jako u pacientů s Cushingovým syndromem, ačkoliv plazmatická hladina kortisolu není zvýšena <sup>(122)</sup>.

Obezita vzniká v důsledku expanze tukové tkáně, jejíž příčinou je hypertrofie adipocytů s akumulací lipidů a diferenciací preadipocytů (ASC – adipose stromal cells) na adipocyty. V lidské tukové tkáni je exprimována pouze 11 $\beta$ HSD1. Kortisol je důležitým působkem ovlivňující diferenciaci adipocytů, a proto autokrinní produkce kortisolu cestou 11 $\beta$ HSD1 umožňuje zvýšenou akumulaci viscerálního tuku <sup>(123)</sup>. U obesních pacientů je tkáňově specifická dysregulace aktivity 11 $\beta$ HSD1, kdy v játrech je aktivita nízká oproti vysoké v tukové tkáni. Příčina této dysregulace není známa <sup>(124)</sup>. Některé práce poukazují na to, že snížená exprese 11 $\beta$ HSD1 v játrech hraje protektivní úlohu vůči škodlivým následkům obezity u těchto pacientů.

---

Studie prokázaly, že tukové buňky omenta zvýšeně exprimují 11 $\beta$ HSD1, aktivita 11 $\beta$ HSD1 je signifikantně vyšší v omentálním tuku oproti subkutánnímu. Díky zvýšené expresi a aktivitě 11 $\beta$ HSD1 by bylo možno zajišťovat omentálním tukovým buňkám stálý přísun aktivního glukokortikoidu <sup>(69)</sup>.

Význam 11 $\beta$ HSD1 v patogenezi viscerální obezity podporují i studie na transgenních myších a myších s delecí genu 11 $\beta$ HSD1. Snížená exprese 11 $\beta$ HSD1 u myši s delecí genu 11 $\beta$ HSD1 ochraňovala tyto jedince před rizikovými následky obezity, naproti tomu transgenní myši se zvýšenou expresí 11 $\beta$ HSD1 manifestovaly fenotyp obesních jedinců s poruchou glukosové tolerance a insulinovou rezistencí, zvýšenou hladinou kortikosteronu v tkáních a normální hladinou cirkulujícího kortikosteronu <sup>(123,28)</sup>.

Insulinová rezistence je jedním ze symptomů metabolického syndromu a zároveň doprovodným příznakem diabetu mellitu II. typu, syndromu polycystických ovárií, deficitu růstového hormonu nebo esenciální hypertenze. V jaterní tkáni stimulují glukokortikoidy glukoneogenetické enzymy, mají tedy opačné účinky než insulin. Farmakologická inhibice 11 $\beta$ HSD1 u zdravých dobrovolníků <sup>(125)</sup> a diabetiků 2. typu <sup>(126)</sup>, která vedla k poklesu intrahepálního kortisolu, zvýšila katabolismus lipidů a omezila tvorbu glukózy v játrech. Myši s delecí genu pro 11 $\beta$ HSD1 disponují zvýšenou citlivostí k insulinu společně se zvýšenou oxidací lipidů <sup>(127,28)</sup>.

V současné době směřuje výzkum farmaceutických společností na vývoj specifických inhibitorů 11 $\beta$ HSD1. Jedním ze specifických inhibitorů *in vivo i vitro* je arylsulfonamidothiazol <sup>(55)</sup>. Z dalších nověji objevených inhibitorů lze jmenovat adamantyl-triazol, jehož chronické podávání u myších transgenních modelů snižovalo hladiny triglyceridů, insulinu, glykémie na lačno a redukovalo tělesnou hmotnost <sup>(56)</sup>.

Expresi mRNA 11 $\beta$ HSD1 lze ovlivnit i některými léky ze skupiny thiazolidinedionů, která se používají při léčbě diabetu 2. typu u obesních diabetiků. Příkladem je rosiglitazon, agonista PPAR $\gamma$  receptorů, který snížil schopnost adipocytů metabolizovat kortison na kortisol a zároveň snížil hladinu mRNA 11 $\beta$ HSD1. Bylo prokázáno, že jak thiazolidinedionové tak ne thiazolidinedionové agonisté PPAR $\gamma$  receptorů znatelně inhibují expresi 11 $\beta$ HSD1 v 3T3-L1 adipocytech. Tato exprese signifikantně koreluje s poklesem konverse kortisonu na kortisol. Podobně u kmene diabetických myši db/db došlo po léčbě rosiglitazonem k inhibici exprese 11 $\beta$ HSD1 a korelovalo se signifikantním poklesem plazmatického kortikosteronu <sup>(128)</sup>.

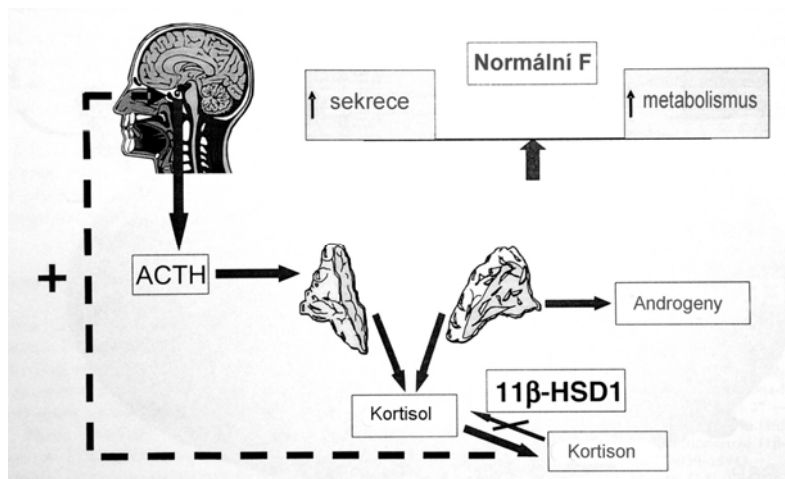
Toto snížení nemusí být způsobeno přímo, ale díky zánětlivým cytokinům TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6, jejichž produkci ligandy PPAR  $\gamma$  receptorů inhibují. Teprve tyto cytokiny mohou modulovat 11 $\beta$ HSD1 a ovlivnit tak množství tukové tkáně <sup>(129)</sup>.

### 2.2.3. DEFICIT REDUKCE KORTISONU

Deficit redukce kortisonu (Cortisone reductase deficiency – CRD) byl poprvé popsán v roce 1984 N.F. Taylorem. Podstatou tohoto syndromu je snížená aktivita prvního typu  $11\beta$ HSD, tedy porucha konverze kortisonu na kortisol<sup>(130-132)</sup>.

Pacienti s CRD sdílí mnohé klinické symptomy pacientek se syndromem polycystických ovárií. Během adolescence nebo brzké dospělosti se u pacientů manifestují příznaky hyperandrogenismu (akné, hirsutismus, oligo-amenorhea, infertilita), u některých se přidává obezita. Redukovaná aktivita jaterní  $11\beta$ HSD1 vede ke kompenzační aktivaci HHA osy se zvýšenou sekrecí ACTH, což stimuluje i zvýšenou produkci androgenů. Doprovodným nežádoucím symptomem tohoto mechanismu je u žen manifestace fenotypu výše zmíněného hyperandrogenismu, u mužů jsou příznaky nadbytku androgenů mírnější (předčasný nástup puberty okolo 7 let). Hladiny sérových androgenů (dehydroandrosteronu (DHEAS), androstenedionu a testosteronu) jsou zvýšeny, avšak rychle suprimovatelné podáním dexamethasonu. Vzhledem k supresi ACTH je dexamethason používán v léčbě CRD<sup>(133,134)</sup>.

Snížená hladina sérového kortisolu koreluje s nálezy v moči, v které je detekovatelná zvýšená koncentrace metabolitů kortisonu oproti nízké hladině metabolitů kortisolu. Deficit  $11\beta$ HSD1 je schématicky vyjádřen na obrázku 2.1.2.3.1.



Obr.2.1.2.3.1.: Mechanismus vzniku syndromu nedostatečné redukce kortisonu (CRD). Snížená aktivita  $11\beta$ HSD1 vede ke snížení kortisolu (F) v periferní tkáni, což je následováno zvýšenou aktivitou HHA osy a následnému zvýšení produkce androgenů v nadledvinách. Hladina cirkulujícího kortisolu je v normě za cenu jeho zvýšené sekrece (převzato z N. Draper, P.M. Stewart,  $11\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. Journal of Endocrinology 2005; 186: s. 263)

Předpokládaný genetický deficit  $11\beta$ HSD1 nebyl doposud v patogenezi CRD potvrzen, nicméně funkční abnormalita tohoto enzymu je více než pravděpodobná<sup>(135,136,137)</sup>.

---

## 2.2.4. ZÁNĚT

### 2.2.4.1. Zánět a jeho ovlivnění glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou v klinické medicíně využívány jako silná imunosupresivní a protizánětlivá léčiva. Od počátku svého objevu byly používány v klinické medicíně při léčbě chronických zánětů, autoimunitních onemocnění a později v transplantační medicíně jako prevence odmítnutí štěpu. Zatímco farmakologické dávky glukokortikoidů mají výše zmíněný protizánětlivý a imunosupresivní účinek, ve fyziologických koncentracích disponují výraznými imunomodulačními vlastnostmi. Proto je v současné době teorie prezentující glukokortikoidy pouze coby imunosupresivní a protizánětlivé působky považována za překonanou a zjednodušenou. Působení glukokortikoidů jako farmak na imunitní systém je nesmírně komplexní, ovlivněné mnoha faktory jako dávka, časový interval apod. <sup>(138,139)</sup>.

Akutní zánětlivá reakce je nespecifickou imunitní reakcí organismu na přítomnost škodliviny, která má stereotypní průběh, ať už je spuštěna antigenem nebo jiným podnětem jako je např. trauma. Za fyziologických podmínek je celý proces obezřetně regulován, mimo rychlé eliminace patogenu směřuje k co nejrychlejší reparaci poškozené tkáně nebo orgánu a nastolení normálního stavu. V počátku akutního zánětu dochází nejprve k aktivaci nespecifických složek imunity, mezi které patří polymorfonukleáry (PMN), komplement a žírné buňky. Prvními imunitními buňkami, které infiltrují zánětlivé ložisko jsou právě PMN, které mají schopnost aktivace dalších složek specifické i nespecifické imunity a spouští mechanismy a systémy zapojené do průběhu zánětu. Glukokortikoidy mají významnou schopnost potlačovat zánět, což je dáno jejich účinky na distribuci, počet a funkci imunokompetitivních buněk <sup>(140)</sup>.

V počáteční fázi imunitní odpovědi organismu jsou produkovány prozánětlivé mediátory a cytokiny, které mimo jiné vedou k vasodilataci a exudaci plazmy z cév do zánětlivého ložiska, zároveň aktivují a modulují působení dalších buněk imunitního systému. Glukokortikoidy mohou alterovat sekreci některých cytokinů spojenou se zánětlivými a imunitními procesy, naproti tomu zvyšují transkripci mnoha protizánětlivých proteinů jako IL-10 nebo antagonisty receptoru pro IL-1 <sup>(141)</sup>. K působení glukokortikoidů v časně fázi zánětu je nutno podotknout, že se liší v závislosti na jejich dávce. Podání glukokortikoidů v dostatečně dlouhé době před indukci zánětu LPS (lipopolysacharidem) inhibovalo sekreci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-6, zatímco pozdější podání tento efekt nemělo <sup>(142)</sup>. Tyto cytokiny současně stimulují tvorbu kortikotropinového releasing faktoru, což vede ke zvýšené tvorbě glukokortikoidů <sup>(143,144)</sup>. Nízké dávky glukokortikoidů v počátku zánětu mají stimulační efekt na proliferaci T-lymfocytů, zatímco vysoké hladiny glukokortikoidů proliferaci T-lymfocytů suprimují <sup>(145)</sup>. Lze tedy shrnout, že glukokortikoidy mají v časně fázi zánětu spíše imunomodulační roli odpovídající jejich dávce.



---

Zatímco v počáteční fázi je tvorba prozánětlivých cytokinů nutná k eliminaci patogenu, je naopak jejich protražované působení nežádoucí vzhledem k irreverzibilnímu poškození tkáně. Proto ve fázi reparace zánětu přebírají úlohu protizánětlivé cytokiny. Glukokortikoidy umožňují urychlit tvorbu protizánětlivých cytokinů, avšak předčasné načasování jejich působení může zavinit chronický průběh zánětu <sup>(146)</sup>.

Podání glukokortikoidů přímo do cév indukuje vasokonstrikci díky omezení tvorby bakteriálních toxinů, histaminu a aktivity kininového systému. Glukokortikoidy zvyšují expresi receptorů IL-6, signální transdukční komponenty gp13, receptorů IL-1 nebo mohou pomoci uvolnit zánětlivé molekuly jako TNF- $\alpha$ , IL-6 a MMIF. Glukokortikoidy mají tedy spíše než imunosupresivní efekt roli imunoregulační <sup>(147)</sup>.

V průběhu zánětu se zvyšuje se exprese adhezních molekul, které umožňují snazší průnik leukocytů do cévní stěny v místě zánětu <sup>(148)</sup>. Glukokortikoidy patří k látkám, které potlačují expresi snad všech známých adhezních molekul.

Mnoho buněk jak např. makrofágy, trombocyty, chondrocyty, mesangiální bb., hladké svaly cév syntetizuje fosfolipasu A<sub>2</sub>, která spouští kaskádu pochodů vedoucí k eliminaci patogenu jako je např. tvorba produktů metabolismu k. arachidonové – prostaglandinů, leukotrienů, tromboxanů a lipoxinů, dále kyslíkových a dusíkových radikálů, stimulace fagocytů. Glukokortikoidy snižují syntézu některých prostaglandinů a leukotrienů, a to zřejmě zvýšením koncentrace některých membránových fosfolipidů, které potlačují jejich syntézu. Mohou ovlivňovat i produkci některých lipomodulinů jako např. lipokortin, které modifikují produkci prostaglandinů a leukotrienů, navíc redukuje expresi cyklooxygenasy, která je klíčovým enzymem tvorby prostaglandinů <sup>(149,150)</sup>.

Roli PMN, které v průběhu zánětu podstupují konstitutivní apoptozu, přebírají cévní monocyty, které zde maturují na makrofágy a jsou zodpovědné za likvidaci apoptických PMN. Pokud je odstranění apoptických granulocytů ztíženo, rychle podstupují sekundární nekrozu, kterou následuje produkce prozánětlivých mediátorů uvolňovaných makrofágy, což prodlužuje zánětlivou odpověď. Díky tomu dochází k dalšímu poškození zanícené tkáně a chronicitě zánětu. Chronická zánětlivá onemocnění mohou vznikat jako následek redukované schopnosti imunitního systému odstranit patogen a mechanismů, které nastolí homeostázu v organismu <sup>(151-156)</sup>.

Glukokortikoidy potlačují funkce tkáňových makrofágů i leukocytů díky omezení schopnosti odpovídat na antigeny a mitogeny. Bylo prokázáno, že syntetické steroidy zvyšují kapacitu makrofágů fagocytovat více apoptických leukocytů a urychlují maturaci monocytů <sup>(157)</sup>. Mimoto bylo zjištěno, že pokud jsou monocyty v počátku jejich maturace na makrofágy vystaveny působení glukokortikoidů, dochází k následnému přesmyku jejich diferenciaci na „protizánětlivý“ fenotyp <sup>(141)</sup>.

---

Výdej glukokortikoidů centrálně reguluje osa hypotalamus – hypofýza – nadledvinky (HHA), která se dle některých prací zároveň spolupodílí za výskyt některých zánětlivých a autoimunitních onemocnění, což bylo prokázáno na zvířatech se změněnou aktivitou HHA osy. Zvýšení aktivity HHA osy a následně i plazmatických glukokortikoidů umožňuje „překmitnutí“ Th1 (prozánětlivého) na Th2 (protizánětlivý) cytokinový profil <sup>(158-161)</sup>.

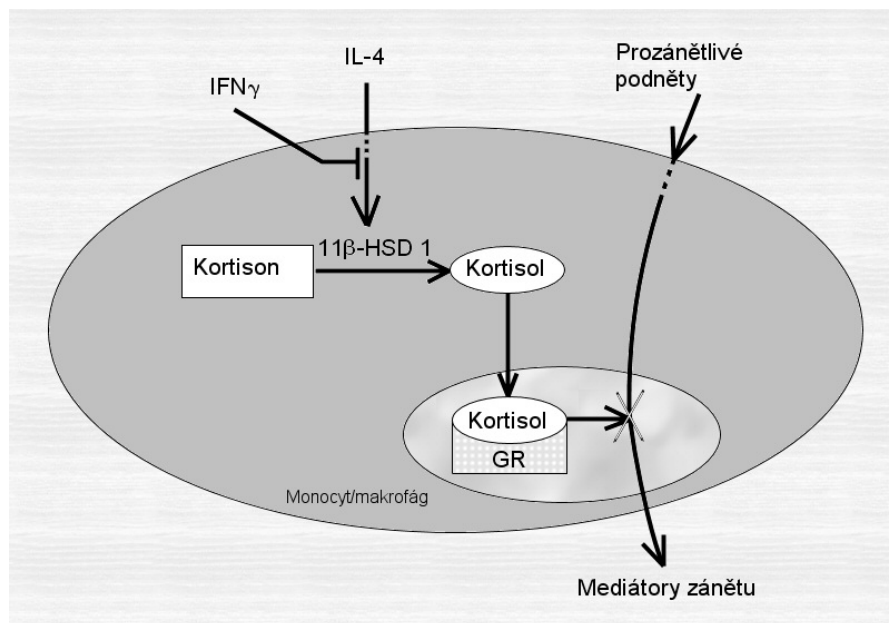
#### 2.2.4.2. Zánět a 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa

Zatímco HHA osa ovlivňuje plazmatickou koncentraci kortikoidu, o vlastní lokální (tkáňové) koncentraci rozhoduje enzym 11 $\beta$ HSD1, který konvertuje neaktivní kortikoid (kortison, 11-dehydrokortikosteron) na jeho aktivní formu (kortisol, kortikosteron). Exprese tohoto enzymu byla prokázána v obou typech lidských lymfocytů, v buňkách myši sleziny, kde byla nalezena v CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, T-lymfocytech a B220<sup>+</sup> B-lymfocytech, a dále v myších i lidských CD11c dendritických buňkách. V těchto buňkách byla popsána pouze reduktasová aktivita 11 $\beta$ HSD1, tedy intracelulárně dochází v imunitních buňkách ke konverzi neaktivního kortikoidu na jeho aktivní formu, mimo to vzrůstající aktivita koreluje u CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů s nárůstem aktivity a exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1<sup>(62)</sup>.

Práce s lidskými imunitními buňkami prokázaly, že např. monocyty, dendritické buňky a lymfocyty zvýšeně exprimují 11 $\beta$ HSD1 během své maturace a diferenciaci. Např. u monocytů dochází k expresi 11 $\beta$ HSD1 až během jejich diferenciaci na makrofágy. Exprese 11 $\beta$ HSD1 v buňkách monocytární řady je závislá na stádiu diferenciaci a aktivačních signálech. Protizánětlivé cytokiny IL-4 a IL-13 indukují v monocytech reduktasovou aktivitu 11 $\beta$ HSD1, a tak zvyšují i intracelulární koncentraci aktivního kortisolu, což inhibuje produkci prozánětlivých mediátorů makrofágy. Tento efekt lze tlumit podáním IFN- $\gamma$ , který patří k antagonistům těchto cytokinů, viz obr. 2.2.4.2.1.

Indukce 11 $\beta$ HSD1 cytokiny IL-4 a IL-13 může představovat jeden z přídatných mechanismů jejich protizánětlivého působení. Mimoto Th2 cytokiny, IL-4 a IL-13, umožňují diferenciaci nezralých T-lymfocytů na Th2 lymfocyty, které Th2 cytokiny produkují. Oba dva cytokiny významně redukují produkci prozánětlivých mediátorů <sup>(162)</sup>.

Prozánětlivé cytokiny jako např. IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  potencují expresi 11 $\beta$ HSD1 v mnoha typech lidských buněk, jako např. v mesangiálních buňkách, které sdílí některé charakteristiky makrofágů a podobně i v primárních kulturách lidských preadipocytů, buňkách blízkým makrofágům <sup>(124,163,164)</sup>.



Obr. 2.2.4.2.1.: Model protizánětlivého působení IL-4 cestou 11 $\beta$ HSD1. IL-4 indukuje v monocyttech expresi 11 $\beta$ HSD1. Zvýšená enzymatická aktivita 11 $\beta$ HSD1 elevuje intracelulární koncentraci kortisolu. Kortisol redukuje expresi prozánětlivých mediátorů během zánětu. Efekt IL-4 na expresi 11 $\beta$ HSD1 je antagonizován IFN- $\gamma$ . GR- glukokortikoidní receptor (převzato z R. Thieringer, Ch.B. Le Grand, L. Carbin, T.Q. Cai, B.Wong, S.D. Wright, A. Hermanowski-Vosatka, 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is Induced in Human Monocytes upon Differentiation to Macrophages. Journal of Immunology 2001;167: s. 34).

Zajímavým „modelem“ zánětlivé reakce, který demonstruje změny exprese obou typů 11 $\beta$ HSD v průběhu zánětu, je proces ovulace. Ovulace je zde representována jako fáze poškození, luteinizační fáze představuje proces hojení. V průběhu ovulace jsou buňky povrchového epitelu vaječníků (OSE) vystaveny působení celé řady prozánětlivých mediátorů jako jsou cytokiny (IL-1, IL-6), které zvyšují expresi COX-2 mRNA. Souběžně se zvýšenou expresí COX-2 během ovulace dochází i k zvýšené expresi 11 $\beta$ HSD1 v buňkách zona granulosa<sup>(165)</sup> a v lidských i ovčích OSE<sup>(166,167,168)</sup>. Tento mechanismus umožňuje minimalizovat poovulační poškození tkáně vaječniku díky lokálnímu zvýšení protizánětlivě působícího glukokortikoidu.

U buněk lidského osteosarkomu MG-63 a aortálních bb.hladkého svalu dochází pod vlivem prozánětlivých cytokinů nejen k zvýšení exprese 11 $\beta$ HSD1, ale navíc recipročně k snížení exprese 11 $\beta$ HSD2<sup>(169,170)</sup>. Snížení exprese 11 $\beta$ HSD2 pod vlivem prozánětlivě působícího endotoxinu a TNF- $\alpha$  byla prokázána v plicní tkáni potkana a v buňkách BEAS-2B, které byly odvozeny z buněk lidského bronchiálního epitelu<sup>(171)</sup>. Podobné nálezy byly popsány v práci na lidské placentě, podle které prozánětlivé cytokiny inhibují aktivitu placentární 11 $\beta$ HSD2. Na inhibici placentární 11 $\beta$ HSD2 prozánětlivými cytokiny se podílí mechanismy zvýšení intracelulárního vápníku a inhibice adenylylcyklasy<sup>(172)</sup>.

---

Je možné, že tato parakrinní regulace prozánětlivými cytokiny zajišťuje příslušným buňkám zvýšenou koncentraci aktivního kortikoidu a přispívá tak k tlumení zánětu.

Glukokortikoidy významným způsobem ovlivňují proces apoptózy v buňkách imunitního systému. Fyziologická koncentrace glukokortikoidů indukuje proces apoptózy v nezralých thymocytech během jejich klonální selekce v thymu <sup>(173)</sup>, zatímco zralé thymocyty jsou k fyziologickým hladinám glukokortikoidů relativně resistantní <sup>(174,175)</sup> a apoptózu prodělávají pouze při zvýšení hladiny glukokortikoidů na úroveň farmakologických koncentrací <sup>(176,177)</sup>. V práci na myších splenocytech bylo prokázáno, že jednorázové podání inhibitoru 11 $\beta$ HSD kyseliny glycyrrhetinové zvýšilo hladinu serového kortikosteronu, což bylo provázeno signifikantní involucí thymu a sleziny a zvýšeným počtem apoptických splenocytů <sup>(178)</sup>.

Vzhledem k tomu, že kortikosteron napomáhá při fagocytoze apoptických neutrofilů dřeňovými makrofágy, hraje 11 $\beta$ HSD1 důležitou úlohu při apoptoze imunitních buněk, což dokládají práce na myších s 11 $\beta$ HSD1  $-/-$ . Studie se zvířecími modely myší s delecí genu 11 $\beta$ HSD1  $-/-$  prokázaly, že 11 $\beta$ HSD1 hraje důležitou úlohu v průběhu zánětlivé odpovědi a potencuje fagocytozu apoptických leukocytů makrofágy. Makrofágy myší s delecí genu 11 $\beta$ HSD1  $-/-$  měly omezenou schopnost fagocytozy v porovnání s kontrolním kmenem myší. Tato data společně s informacemi o regulaci 11 $\beta$ HSD1 prozánětlivými cytokiny nasvědčují tomu, že 11 $\beta$ HSD1 je zavzata do procesu, který urychluje akutní fázi zánětu a nastolí fázi hojení <sup>(179)</sup>. Deficit reduktasové aktivity 11 $\beta$ HSD1 může být příčinou omezené fagocytární kapacity apoptických leukocytů makrofágy, což může vyústit v progresi chronického zánětu a různých autoimunitních chorob <sup>(146,147)</sup>. Ovlivnění aktivity 11 $\beta$ HSD1 v makrofázích by mohlo v budoucnosti přispět k léčbě mnohých chronických zánětlivých onemocnění.

Mezi první důležité studie vyzdvihující důležitost prereceptorového mechanismu glukokortikoidů, je studie zabývající se farmakologickou inhibicí 11 $\beta$ HSD u kožního zánětu. Lokální podání kortisolu tlumilo kožní zánět, avšak současné podání inhibitoru k.glycyrrhetinové/11 $\alpha$ -hydroxyprogesteronu s kortisolem vedlo ke snížení zánětu o 70 %. Naproti tomu samotné podání těchto inhibitorů (GA/11 $\alpha$ HP) zánět tlumilo daleko méně <sup>(180)</sup>. Inhibitory 11 $\beta$ HSD se jeví jako možná perspektivní léčiva některých autoimunitních chorob, což dokládají výsledky studie s myším kmenem MLR lpr/lpr, u kterého došlo po podání inhibitoru 11 $\beta$ HSD1 – GA k oddálení nástupu autoimunitního zánětu <sup>(181)</sup>.

Lze shrnout, že v průběhu zánětu dochází pod vlivem prozánětlivých cytokinů k zvýšení exprese 11 $\beta$ HSD1, což následně vede k zvýšení produkce cytokinů typu 2, dále k inhibici produkce prozánětlivých cytokinů a zlepšení lokální dostupnosti aktivních glukokortikoidů. Osvětlení problematiky transkripčních regulací 11 $\beta$ HSD1 v buňkách imunitního systému usnadní porozumět roli 11 $\beta$ HSD1 v zánětlivé reakci, což může mít důležitý terapeutický aspekt v rámci terapie četných zánětlivých onemocnění.

---

---

ní. Terapeutické využití inhibitorů 11 $\beta$ HSD1 v kombinaci s glukokortikoidy nebo jejich samotné podání se jeví jako jedna ze slibných cest v léčbě autoimunitních a zánětlivých onemocnění.

## 2.2.5. 11 $\beta$ -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V PROCESU ONKOGENEZE A TUMOROGENEZE

Glukokortikoidy patří mezi faktory, které výrazně zasahují do vzniku a průběhu nádorového bujení. Na buněčné úrovni jsou schopny inhibovat proliferaci a indukovat diferenciaci buněk, což je dáno jejich schopností zastavit buněčný cyklus v G<sub>1</sub> fázi <sup>(182,183)</sup>.

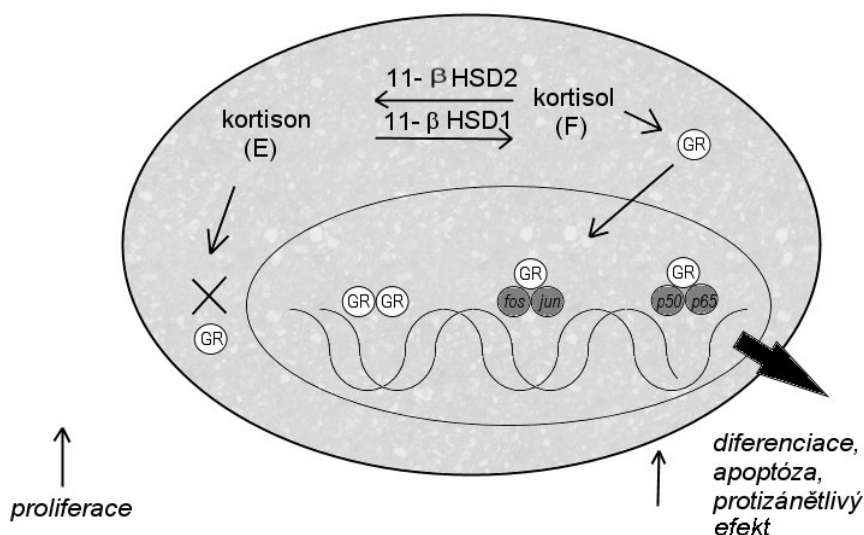
Ačkoliv je známo, že glukokortikoidy regulují transkripci mnoha genů, přesný mechanismus jakým ovlivňují buněčnou proliferaci a diferenciaci je dosud nejasný.

Mezi nejvýznamnější cílové geny pro glukokortikoidy patří cyklin-dependentní kinasy (CDK) se svými inhibitory (CDI) <sup>(184)</sup>. Některé z těchto inhibitorů jako např. Cip/Kip rodiny jsou regulovány glukokortikoidy, což umožňuje zastavení buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi <sup>(185)</sup>. Abnormální exprese CDI byla popsána u lidských tumorů hypofýzy a podobně i u myších hypofyzárních tumorů <sup>(186,187,188)</sup>, u myši s chybějícími p18 a p27Kip1 inhibitory došlo k rychlému rozvoji fatálních hypofyzárních adenomů <sup>(189)</sup>. Tento mechanismus je pravděpodobně zprostředkován přímou *trans*-aktivací exprese genu pro CDI, navíc je pravděpodobné, že glukokortikoidy zprostředkovaná *trans*-represe signalizace NF- $\kappa$ B taktéž přispívá ke kontrole průběhu buněčného cyklu <sup>(190,191,192)</sup>.

Glukokortikoidy mohou také alterovat buněčný cyklus pomocí růstových faktorů, které způsobují změny v tyrosinkinasovém signálu <sup>(193)</sup>. Buď se jedná o přímé ovlivnění exprese membránového receptoru a nebo nepřímo skrze regulaci fosforylace proteinu.

Jak bylo výše uvedeno, glukokortikoidy významně potencují buněčnou proliferaci a diferenciaci. Na koncentraci aktivního glukokortikoidu v tkáních se významně podílí i enzym 11 $\beta$ HSD. První typ tohoto enzymu, 11 $\beta$ HSD1, funguje v intaktních tkáních jako reduktasa, tedy katalyzuje konverzi neaktivního kortisonu na kortisol. Na buněčných liniích SV-HFO lidského osteoblastu bylo prokázáno, že v průběhu buněčné diferenciace dochází u nediferencovaných osteoblastů k nárůstu aktivity 11 $\beta$ HSD1, což auto-kritně zajišťuje požadované množství aktivního glukokortikoidu potřebného pro diferenciaci buněk. Dostatečně vysoká hladina zevně podaného glukokortikoidu inhibovala aktivitu i expresi 11 $\beta$ HSD1, což svědčí o tom, že v průběhu diferenciace osteoblastu jsou aktivita i exprese 11 $\beta$ HSD1 regulovány tak, aby byla v tkáních udržována požadovaná koncentrace aktivního glukokortikoidu <sup>(194)</sup>.

Je známo, že v mnoha tumorosních tkáních dochází k výraznému zvýšení aktivity 11 $\beta$ HSD2 oproti zdravé tkáni, zatímco nadprodukce 11 $\beta$ HSD1 proliferaci naopak snižuje. Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2 by tak mohla být autokrinním pro-proliferacním mechanismem vzniku nádorových onemocnění, neboť by omezovala obsazení glukokortikoidních receptorů jejich ligandy, antiproliferacně působícími glukokortikoidy, viz obrázek 2.2.5.1.



Obr. 2.2.5.1. Oba typy enzymů 11 $\beta$ HSD a proces transaktivace. Interkonverze kortisolu (F) a kortisonu (E) cestou 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 určuje vazbu ligandu (F) na glukokortikoidní receptor (GR). Ligovaný GR moduluje transkripci cílového genu vazbou na specifický GREs (glucocorticoid response elements) nebo interakcí s NF $\kappa$ -B (p50/p65) nebo AP-1 (fos-jun). Inaktivace glukokortikoidu dehydrogenasovou aktivitou 11 $\beta$ HSD2 omezuje schopnost aktivního kortikoidu, což usnadňuje proliferaci. Reduktasová aktivita 11 $\beta$ HSD1 zvyšuje lokální koncentraci kortisolu a vede k zvýšené diferenciaci a možné apoptóze (převzato z E.H. Rabbitt, N.J.L. Gittoes, P.M. Stewart, M. Hewison, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases, cell proliferation and malignancy, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003; 85: s.416)

Rozdílný vliv obou typů dehydrogenas na buněčnou proliferaci potvrzuje práce s buněčnou linií osteosarkomu ROS 17/2.8, která ve zvýšené míře exprimovala buď lidskou 11 $\beta$ HSD1 nebo 11 $\beta$ HSD2. Buňky se zvýšenou expresí 11 $\beta$ HSD1 měly oproti kontrolám nižší počet proliferací, a naopak u buněk zvýšeně exprimujících 11 $\beta$ HSD2 převyšoval poměr proliferací vůči kontrolám<sup>(47)</sup>. Změny v expresi glukokortikoidních receptorů neovlivňují působení obou typů 11 $\beta$ HSD na buněčnou proliferaci, což podtrhuje význam 11 $\beta$ HSD v tomto procesu.

Ačkoliv jsou oba typy enzymů 11 $\beta$ HSD produkty různých genů a jsou exprimovány v různých tkáních, teorie o jejich odděleném působení ve tkáních se nezdá být správná. Při rozvoji nádorového bujení zřejmě hraje úlohu „přepnutí“ mezi antiproliferativně působící 11 $\beta$ HSD1 a pro-proliferacně působící 11 $\beta$ HSD2<sup>(195)</sup>.

---

Pro-proliferační působení 11 $\beta$ HSD2 dokládají i práce provedené *in vitro* na buněčných kulturách izolovaných z karcinomu prsu MCF-7 a ZR-75-1, kde byl efekt antiproliferačně působících glukokortikoidů inhibován zvýšením aktivity 11 $\beta$ HSD2 <sup>(196)</sup>. Mimo výše uvedené tkáně byla exprese 11 $\beta$ HSD2 popsána i v mnoha tumorech zahrnující např. osteosarkomy, prsní karcinomy, adrenální adenomy a karcinomy, plicní adenokarcinomy a tumory hypofýzy <sup>(197-201)</sup>. Tyto závěry podporují myšlenku, podle které je 11 $\beta$ HSD2 zvažována jako potencionální onkogen. Mimo to je 11 $\beta$ HSD2 v průběhu fetálního vývoje zvýšeně exprimována v tkáních, v kterých se v dospělosti již nevyskytuje, a její místo zde zaujímá druhý typ enzymu, 11 $\beta$ HSD1 <sup>(202)</sup>.

Pravděpodobná příčina snížené exprese 11 $\beta$ HSD1 a zvýšené 11 $\beta$ HSD2 v některých tumorosních tkáních není dosud plně vyjasněná. Je možné, že odpověď na tuto otázku je zakódována v promotorové oblasti obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD. V promotorové oblasti genu 11 $\beta$ HSD1 se nachází vazebná místa pro NF- $\kappa$ B, CCAAT/enhancer vazebný protein (C/EBP), PPAR $\gamma$  a GRE (glucocorticoid response elements). Omezená aktivace v této genové oblasti by tak mohla vést k poruchám proliferace a diferenciace buněk ve smyslu nádorového bujení.

Kortisol sám je velmi silným aktivátorem exprese 11 $\beta$ HSD1, což odráží přítomnost GRE uvnitř promotoru pro gen 11 $\beta$ HSD1. V játrech je důležitým aktivátorem exprese 11 $\beta$ HSD1 C/EBP $\alpha$ , zatímco C/EBP $\beta$  jeho účinek antagonizuje <sup>(203)</sup>. Význam C/EBP $\alpha$  pro buněčnou proliferaci a diferenciaci dokládají práce, podle kterých zvýšená exprese C/EBP $\alpha$  je doprovázena inhibicí buněčné proliferace a naopak snížená exprese C/EBP $\alpha$  je asociována se zvýšením syntézy DNA <sup>(204)</sup>. Navíc bylo prokázáno, že u některých malignit jako je akutní myeloidní leukémie <sup>(205)</sup> nebo jaterní karcinom <sup>(206)</sup>, je exprese C/EBP $\alpha$  snižena. Důležitou úlohu v regulaci exprese 11 $\beta$ HSD1 hrají i PPAR $\gamma$ . Četné studie potvrzují důležitost PPAR $\gamma$  u nádorů jak z hlediska prognostického tak terapeutického, neboť receptoroví agonisté PPAR $\gamma$  mají inhibiční vliv na nádorové bujení <sup>(207)</sup>.

Na expresi 11 $\beta$ HSD2 se významně podílí vazebná místa Sp1 a NF- $\kappa$ B v oblasti proximálního promotoru. Na buňkách osteosarkomu bylo prokázáno, že aktivátory NF- $\kappa$ B mají silný vliv na inhibici exprese a aktivity 11 $\beta$ HSD2 <sup>(169)</sup>.

Některé práce svými výsledky naopak teorii o 11 $\beta$ HSD2 coby možném onkogenu nepotvrzují. Práce na adrenálních nebo prsních tumorech naopak prokázaly zvýšenou aktivitu 11 $\beta$ HSD1 a snížení aktivity u 11 $\beta$ HSD2 <sup>(208,209,210)</sup>. Mimo to bylo prokázáno, že v průběhu maturace a diferenciace dochází ve sliznici lidského kolona k nárůstu exprese 11 $\beta$ HSD2, která by zde naopak mohla sloužit jako marker buněčné diferenciace nebo neoplastického procesu <sup>(77)</sup>. Tabulka 2.2.5.1. uvádí krátký přehled některých studovaných tumorů a jejich vztah k 11 $\beta$ HSD.

Tabulka 2.2.5.1. Některé studované tumory a jejich vztah k 11 $\beta$ HSD

Typ tumoru	Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD1 (A/N)	Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2 (A/N)	Efekt inhibitoru 11 $\beta$ HSD	Poznámky
Adenom hypofýzy (201)	N	A	Kyselina glycyrrhetinová inhibovala proliferaci o 30 %	10x vyšší exprese 11 $\beta$ HSD2 vůči 11 $\beta$ HSD1
Buněčná linie osteosarkomu potkana ROS 17/2.8 (47)	A; u linie ROS 17/2.8 $\beta$ 1 (zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD1)	A; u linie ROS 17/2.8 $\beta$ 2 (zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2)	Glycyrrhetinová kyselina tlumila pro-proliferační efekt 11 $\beta$ HSD2	ROS 17/2.8 $\beta$ 2 byly rezistentní ke kortisolu ve studiích zkoumajících proliferaci a diferenciaci oproti ROS 17/2.8 $\beta$ 1, kde byla proliferace inhibována
Buněčné kultury karcinomu prsu MCF-7 a ZR-75-1 (196)	N	A	Glycyrrhetinová kyselina zvýšila antiproliferační efekt syntetických kortikoidů	Efekt zevně podaných kortikoidů byl významně potlačen vzhledem k silné oxidasové aktivitě těchto buněk
Buněčné linie osteosarkomu TE-85, MG-63, SaOS2, fibrosarkom H <sub>s</sub> 913T (197)	N	A	Neprovedeno	Významně asi 2-3 násobně vyšší počet glukokortikoidních receptorů v nádorové tkáni oproti buňkám normálního osteoblastu
Adrenální adenomy a karcinomy (198,199)	N	A	Neprovedeno	Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2 v adenomech, a to více v nefunkčních a s preklinickou manifestací m. Cushing oproti adenomům s manifestací m. Cushing
Plicní adenokarcinom (200)	N	A	Neprovedeno	Histologické stádium tumoru korelovalo s imunoreaktivitou 11 $\beta$ HSD2 a MR
Adenomy produkující aldosteron-aldosteromy (210)	A	N	Neprovedeno	Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD1 a snížení 11 $\beta$ HSD2 usnadňuje adenomům jejich steroidogenní funkci
Kortisol produkující adenomy (208)	A	N	Neprovedeno	Aktivita a exprese 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 pozitivně a negativně korelovala s intracelulární koncentrací kortisolu, oba typy 11 $\beta$ HSD potencují sekreci steroidních hormonů v adenomu
Prsní karcinom (209)	Neprovedeno	N	Neprovedeno	Expres 11 $\beta$ HSD2 a MR byla závislá na stádiu diferenciacie prsních karcinomů
Adenokarcinom kolon (78)	Neprovedeno	N	Neprovedeno	Expres 11 $\beta$ HSD2 je závislá na stádiu diferenciacie a maturace epitelu lidského kolon, 11 $\beta$ HSD2 může sloužit jako marker stádia vývoje kolonocyty a jeho neoplastických změn

A-ano, N-ne

Dalším možným mechanismem, kterým glukokortikoidy omezují buněčnou proliferaci, je schopnost 11 $\beta$ HSD1 metabolizovat některé karcinogeny. Jako příklad lze uvést schopnost inaktivace nitrosaminů tabákového kouře (4-methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonu) jaterní a plicní formou 11 $\beta$ HSD1 (211,212).



---

V posledních letech se poukazuje na možný terapeutický význam inhibitorů 11 $\beta$ HSD v léčbě rakoviny. Do popředí se vyzdvihuje především antiproliferativní efekt derivátů lékořice, konkrétně kyseliny glycyrrhetinové a glycyrrhizinu <sup>(213,214)</sup>. Práce provedené na vzorcích buněk adenomů získaných z lidských hypofýz prokázaly, že podání k. glycyrrhetinové vedlo k snížení proliferace nádorových buněk o 30 % <sup>(201)</sup>. Kyselina glycyrrhetinová je v japonské medicíně klíčovou ingrediencí protinádorových léčiv, nicméně deriváty lékořice ovlivňují 11 $\beta$ HSD2 i v jejích klasických cílových tkáních jako jsou ledviny a mohou pak demonstrovat i svoje nežádoucí účinky, jako např. symptomatologii AME. Je paradoxní, že zatímco inhibice 11 $\beta$ HSD2 k. glycyrrhetinovou tumorogenezi oslabuje, inhibice 11 $\beta$ HSD1 může tumorogenezi naopak potencovat omezenou dostupností glukokortikoidních ligandů.

Vzhledem k možným nežádoucím účinkům, které se mohou vyskytovat při inhibici 11 $\beta$ HSD2, může být další možností, jak potlačit tumorogenezi, případné zvýšení exprese 11 $\beta$ HSD1.

---

### 3. CÍLE

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony, které jsou známy svými antiproliferačními a protizánětlivými účinky. Pro tyto vlastnosti jsou v medicíně s úspěchem používány především v terapii různých nádorových a zánětlivých onemocnění, ale i u mnoha dalších chorob.

Biologická aktivita glukokortikoidů nezávisí pouze na počtu receptorů, jejich plazmatické koncentraci a responsibilitě cílových buněk, ale i na periferním metabolismu glukokortikoidů, který určuje koncentraci aktivního glukokortikoidu v tkáni. Lokální metabolismus glukokortikoidů v tkáni katalyzuje enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa, která se vyskytuje ve dvou typech, které se liší v mnoha vlastnostech, viz tabulka 2.1.1.1.

První typ enzymu 11 $\beta$ HSD1 pracuje v intaktních tkáních jako reduktasa, tedy konvertuje inaktivní steroid kortison na aktivní formu kortisol. Naproti tomu druhý typ 11 $\beta$ HSD2 inaktivuje kortisol na kortison a funguje tedy jako oxidasa. V posledních letech se dostává stále většímu zájmu studium prereceptorového metabolismu glukokortikoidů, za který je v tkáních zodpovědná právě enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa.

Četná zánětlivá a nádorová onemocnění jsou spojena se změnami exprese a aktivity obou typů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy (viz kapitoly 2.2.4., 2.2.5.). Nespecifické střevní záněty a střevní karcinomy patří mezi choroby, kde se s úspěchem využívá protizánětlivého, prodiferenčního a antiproliferačního účinku glukokortikoidů, nicméně informace o prereceptorovém metabolismu kortikoidů u těchto chorob jsou velmi omezené <sup>(77,215)</sup>.

Vzhledem k výše uvedenému a faktu, že jednou z obávaných komplikací dlouhodobě trvajících ulcerosní kolitidy je zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu, bylo cílem této práce objasnit roli 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy v patofyziologii nespecifických střevních zánětů a střevním karcinomu. Konkrétně jsme řešili tyto otázky:

- 1) Dochází u pacientů s ulcerosní kolitidou v postiženém kolon ke změnám v lokálním metabolismu kortikoidů a změnám exprese a aktivity obou typů enzymů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy?
- 2) Jsou změny v lokálním metabolismu kortikosteroidů u pacientů s ulcerosní kolitidou porovnatelné s modely experimentálních zvířecích kolitid?
- 3) Dochází u pacientů se střevními tumory ke změnám v lokálním metabolismu kortikoidů a změnám exprese enzymů 1 a 2 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy oproti „zdravé“ tkáni?

---

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1. Příprava a odběr vzorků

#### 4.1.1. ZVÍŘECÍ MODELY ZÁNĚTLIVÝCH CHOROB STŘEVNÍCH

##### 4.1.1.1. Použitá zvířata

K indukci modelů zvířecích kolitid byli použiti samci rodu Wistar (chov Velaz, Praha) o hmotnosti 200-250 g, kteří byli drženi za standardních chovných podmínek, ve 12 : 12 h světelném režimu, krmeni a napájeni *ad libitum*. Samci byli rozděleni do tří skupin. První tvořili samci s kolitidou indukovanou kyselinou trinitrobenzensulfonovou (TNBS kolitida, n=16), druhá skupina měla kolitidu indukovanou dextran sulfátem (DSS kolitida, n=14) a třetí skupina byla kontrolní (n=23).

TNBS a DSS kolitidy byly vybrány jako modely nespecifických střevních zánětů vzhledem k tomu, že TNBS imituje některé charakteristiky Crohnovy choroby, zatímco DSS znaky ulcerosní kolitidy. Haptenem indukovaná TNBS kolitida vytváří v postiženém kolon transmurální zánět, na jehož vzniku se podílí mnohé interakce mezi různými skupinami T-lymfocytů<sup>(216)</sup>. DSS kolitida vzniká poškozením bariérové funkce povrchového epitelu, v kterém je následně indukován zánět za účasti aktivovaných makrofágů a dalších imunitních buněk<sup>(217)</sup>.

##### 4.1.1.2. Postup indukce kolitidy

###### 4.1.1.2.1. TNBS kolitida

Indukce TNBS kolitidy byla u zvířat provedena dle dříve popsané metody<sup>(216)</sup>. Dva dny před indukcí TNBS kolitida zvířata lačnila a pila pouze pitnou vodu, aby se dosáhlo dostatečného vyprázdnění rekta a zamezilo se tak vypuzení TNBS roztoku v průběhu aplikace.

Po 48-hodinovém lačnění následovala samotná indukce TNBS kolitidy. Za lehké etérové anestezie byl zvířatům intrarektálně zaveden polyethylenový katetr, kterým bylo aplikováno 30 mg TNBS rozpuštěné v 0.2 ml 50% ethanolu do vzdálenosti cca 8 cm od anu. Kontrolní skupině zvířat bylo podáno stejné

---

množství 0,9% roztoku NaCl. Po indukci kolitidy byla zvířata dále držena za stejných chovných podmínek jako před indukcí kolitidy. Každý den byla zvířata zvážena. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací 7.den po aplikaci TNBS.

#### **4.1.1.2.2. Akutní a chronická DSS kolitida**

Akutní i chronická DSS kolitida byla provedena dle dříve popsané metody <sup>(221)</sup>. Akutní DSS kolitida byla u zvířat indukována perorálním příjmem 3% roztoku DSS v pitné vodě, který byl zvířatům podáván *ad libitum*. Zvířata pila pouze tento roztok po dobu 10dnů před usmrcením a odebráním vzorků.

V případě chronické kolitidy vystřídal po desetidenním příjmu 3% roztoku DSS pití pitné vody po dobu 20 dnů. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací na konci 3. cyklu podávání 3% roztoku DSS.

#### **4.1.1.3. Odběr vzorku**

Po přetnutí krční míchy byl proveden okamžitý odběr vzorku kolon. V případě TNBS kolitidy byla odebrána ta část střeva, kde bylo TNBS aplikováno. U DSS kolitidy byla odebrána distální část kolon. Vzorky střeva z každého jedince byly použity pro měření myeloperoxidase aktivity (MPO), enzymové aktivity 11 $\beta$ HSD a změn v expresi mRNA pro 11 $\beta$ HSD.

### **4.1.2. BIOPTICKÉ VZORKY LIDSKÝCH ZÁNĚTLIVÝCH CHOROB**

Bioptické vzorky byly získány od pacientů (n=26), kteří podstoupili běžnou diagnostickou kolonoskopií. Biopsie byly ihned po odběru vloženy do RNAlateru. Všechny bioptické vzorky byly histologicky verifikovány na Ústavu patologické anatomie FNKV MUDr. Alexandrem Švecem. Vzorky pacientů s ulcerózní kolitidou byly odebrány ze zánětlivě změněného kolon, které vykazovalo mírný až střední stupeň zánětu. Aktivita onemocnění byla hodnocena dle Mayo Clinic score <sup>(218)</sup>. U vyšetřovaných pacientů s ulcerózní kolitidou bylo onemocnění v jeho akutním stádiu a byli zaléčeni 5-aminosalicyláty nebo kortikosteroidy. Demografická a klinická data pacientů s ulcerózní kolitidou a kontrol demonstruje tabulka 4.1.2.1.

Kontrolní skupinu tvořili pacienti, kteří byli vyšetřováni pro symptomy obstrukce nebo průjmů a nebo v rámci onkologického skríningu. Biopsie byly odebrány z makroskopicky normálního střeva a jejich

histologická kontrola nepotvrdila zánět nebo jinou patologickou diagnózu. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s odběrem bioptického vzorku.

Tab.4.1.2.1. Demografická a klinická data pacientů s ulcerózní kolitidou a kontrolních subjektů

	pacienti s ulcerózní kolitidou	kontrolní skupina pacientů
Počet pacientů (muži/ženy)	8/6	6/6
Věk pacientů	63.0 (34.0-69.0)	64.5 (55.0-70.5)
Trvání choroby (v letech)	6.5 (5.0-10.0)	-
Mayo skóre	3.5 (3.0-5.0)	-
Léčba 5-aminosalicyláty	12	-
Léčba 5-aminosalicyláty + prednison	2	-
<i>Hodnoty jsou uvedeny jako medián (25.-75.percentil). Pacienti byli léčeni 5-aminosalicyláty v dávce 2.0-2.5 g denně, dávka prednisonu byla 10 až 20 mg denně.</i>		

### 4.1.3. VZORKY Z OPERAČNÍCH RESEKÁTŮ

Vzorky adenokarcinomů rekta a sigmatu společně s okolní nenádorovou tkání byly získány z operačních resekátů 11 dospělých pacientů operovaných na Chirurgické klinice FNKV a FN Bulovka v Praze. Skupinu pacientů ve věkovém rozmezí 52 – 75 let tvořili 3 ženy a 8 mužů. Po vyjmutí resekátu byl vzorek odebraného tumoru a okolní nenádorové tkáně určený pro stanovení hladiny mRNA transportován v RNAlateru (Ambion, Austin, TX). Na ostatní stanovení byl vzorek rychle zamražen v tekutém dusíku a transportován na suchém ledu s jeho následným uchováním v tekutém dusíku při teplotě -80°C ne déle než 1 týden.

Před operací nebyli pacienti léčeni steroidy a 3 z nich podstoupili předoperační ozáření tumoru rekta. Naměřené hodnoty u těchto tří pacientů se pohybovaly v rozmezí intervalu naměřených hodnot u ostatních pacientů. V klasifikaci tumorů dle Dukese <sup>(219)</sup> převažoval stupeň B, mimo to byl zastižen 1x stupeň A, C a D. Nebyla zaznamenána korelace mezi enzymovou aktivitou 11βHSD nebo mRNA abundancí. Charakteristiku klinických a demografických dat skupiny pacientů ukazuje tabulka 4.1.3.1.

Studijní protokol byl vypracován dle principů Etické komise 3.LF UK v Praze a všichni pacienti s ním vydali písemný souhlas.

Tab. 4.1.3.1. Klinická a demografická data pacientů se střevními tumory

Počet pacientů (muži/ženy)	8/3
Věk pacientů	63.0 (52.0-75.0)
Radioterapie před operací	3
Skóre dle Dukese	A-1, B-8, C-1, D-1
Léčba steroidy	0

---

## 4.2. Měření hladiny mRNA 11 $\beta$ HSD 1 a 2

### 4.2.1. ISOLACE RNA

#### 4.2.1.1. Isolace RNA ze vzorků zvířecích modelů

Totální RNA byla ze zaníceného kolon zvířecích modelů extrahována thiokyanátovou metodou <sup>(220)</sup>. Vzorek zaníceného kolon byl zhomogenizován v ledovém denaturačním roztoku (4 M guanidinthiokyanát; 25 mM citrát sodný, pH 7,0; 0,1 M  $\beta$ -merkaptoethanol; 0,5% sarkosyl; 1 ml roztoku na 100 g tkáně) na Polytronu PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při 13000ot/min po dobu 1 minuty. Na 1 ml použitého denaturačního roztoku bylo k homogenátu přidáno 0,1 ml 2 M acetátu sodného, pH 4,0; 1 ml vodou saturovaného fenolu a 0,2 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (49:1). Po protřepání a 15 min inkubace při 4°C následovala centrifugace vzorku při 10 000 x g, 20 min, 4°C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a RNA 30 min precipitována isopropylalkoholem v poměru 1:1 (supernatant: isopropylalkohol) při -20°C. Následovala opětovná centrifugace vzorku (10 000 x g, 20 min, 4°C), peleta (RNA) rozpuštěna v 0,4 ml denaturačního roztoku a znovu precipitována s 0,4 ml isopropylalkoholu 30 min při -20°C. Následovala centrifugace (10 000 x g, 20 min, 4°C), poté byla peleta omyta v 75% ethanolu a vzorek znovu centrifugován (10 000 x g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn, RNA peleta byla vysušena při 37°C, rozpuštěna ve vodě pro injekce a uskladněna při -70°C. Pro odstranění kontaminující DNA ze vzorku byla použita RQ1-DNAsa postupem uvedeným dle návodu výrobce. Po přeštípání bylo ke vzorku přidáno jednou tolik směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), následovala centrifugace (10 000 x g, 10 min, 4°C), horní vodná fáze s RNA byla přenesena do nových zkumavek, kde byla RNA přes noc srážena (-20°C) pomocí 3 M octanu sodného, pH 5,0 a 96% ethanolu (vzorek: octan:ethanol, 1:0,1:4). Po precipitaci byl vzorek centrifugován (10 000 x g, 20 min, 4°C), peleta byla omyta v 75% ethanolu a opět následovala centrifugace (10 000 x g, 20 min, 4°C), vysušení pelety, rozpuštění v vodě na injekce a uskladnění při -70°C.

Zda vzorek obsahuje DNA či nikoliv bylo stanoveno pomocí PCR. Reakce byly provedeny na přístroji PCRcycler-Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo) v celkovém objemu 25  $\mu$ l dle návodu dodaného s Taq DNA-polymerasou. Byl použit 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPmix (0,1 mM každý nukleotid dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0,25  $\mu$ M každý z párů primerů pro  $\beta$ -aktin, a následující program: 95°C 2 min, 95°C 40 s, 60°C 30 s a 72°C 50 s, celkem 35x; a 72°C 5 min. Po ochlazení byl vzorek přeštípan ribonklesou A 20 min při pokojové teplotě (dle návodu dodaného s chemikálií). Ke vzorku bylo dále

---

přidáno 5  $\mu$ l 6x koncentrovaného vkladacího pufru na elektroforézu. 18  $\mu$ l vzorku bylo naneseno na agarosový gel (1 g agarosy povařen v 50 ml TAE pufru) a následná elektroforéza proběhla v TAE pufru s ethidium bromidem (0,1  $\mu$ g/ml) při 100 V přibližně 40 minut. DNA marker a případné produkty amplifikace byly vyhodnoceny v UV světle. V případě, že v původním vzorku s RNA byla přítomna i DNA byl vzorek znovu přeštipán DNAasou. Množství RNA ve vzorku bylo stanoveno absorbcí při 260 nm na přístroj Biophotometr (Eppendorf).

#### **4.2.1.2. Isolace RNA z lidských bioptických vzorků**

Totální RNA byla extrahována a izolována za použití Gene Elute Mammalian Total RNA Kitu dle firemního návodu

#### **4.2.1.3. Isolace RNA ze vzorků tumorů a okolní nenádorové tkáně**

Totální RNA byla extrahována z donesených vzorků tumorů a okolní netumorosní tkáně pomocí TRIZOLu, postupováno bylo dle doporučeného návodu. K ověření přítomnosti kontaminující DNA a případně k jejímu odstranění bylo použito stejného postupu jako v kap 4.2.1.1., pouze primery byly jiné. Byly použity primery pro lidský aktin.

K stanovení celkového množství RNA ve vzorku byl použit přístroj Biophotometr, měření bylo prováděno při absorbcí 260 nm. RNA byla uskladněna při  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.2. SYNTÉZA cDNA**

Isolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverzní transkriptasy a oligo(dT) 12-18 primerů. Postupováno bylo podle firemního protokolu. Do 20  $\mu$ l reakce bylo použito 3-7 ng totální RNA. K stanovení celkového množství RNA ve vzorku byl použit přístroj Biophotometr, měření bylo prováděno při absorbcí 260 nm. RNA byla uskladněna při  $-70^{\circ}\text{C}$ .

---

### 4.2.3. KVANTITATIVNÍ PCR

Produkt reverzní transkripce byl 10x naředěn a 1 μl aliquotu byl použit pro kvantitativní stanovení hladin transkriptů metodou real time PCR. Pro měření byl použit přístroj Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) a souprava reagensů Light-Cycler-DNA Master Sybre Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

#### 4.2.3.1. Potkan

Pro kvantitativní PCR ze vzorků potkanů byly použity primery, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.2.3.1. (221,222).

Tab. 4.2.3.1. Sekvence použitých primerů pro oba typy 11βHSD a β-aktin pro kvantitativní PCR ze vzorků kolon potkana

	Sekvence primerů v pořadí (5'→3')
11βHSD1	5-GAGTTCAGACCAGAAATGCTCC-3 5-TGTGTGATGTGATTGAGAATGAGC-3
11βHSD2	5-GATGTTCCCCTCGCCTGAA-3 5-ATGAGCAGTGCAATAGCTGCCTTG-3
β-aktin	5-CCGTAAAGACCTCTATGCCA-3 5-AAGAAAGGGTGTA AACGCA-3

Koncentrace všech primerů byla 0.5 μl, zatímco koncentrace MgCl<sub>2</sub> pro 11βHSD1 byla 3 mM, pro 11βHSD2 4 mM a 5 mM pro β-aktin. Protokol pro amplifikaci 11βHSD1 a β-aktinu byl následující: 10 minut aktivace polymerasy, následně 45 cyklů amplifikace cDNA (95°C 15 s, 55°C 10 s, 72°C 15 s). Protokol pro amplifikaci 11βHSD2 byl odlišný: 10 minut aktivace polymerasy následovaný 45 cykly amplifikace cDNA (95°C 15 s, 60°C 5 s, 72°C 20 s). Po amplifikaci byla čistota produktu ověřena dle teploty tání duplexu DNA. Pro analýzu byly použity tyto podmínky: 95°C 10 s, 72°C 10 s (teplotní spád vždy 20°C/s) a 95°C 10 s (teplotní spád 0,1°C/s). Hladiny mRNA byly vypočteny dle standardních kalibračních křivek odvozených z cDNA ledvin pro každý pár primerů a hodnoty pro 11βHSD1 a 11βHSD2 byly normalizovány k β-aktinu.

#### 4.2.3.2. Lidské vzorky

Kvantitativní PCR z lidských vzorků byla měřena za použití primerů, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4.2.3.2.1.



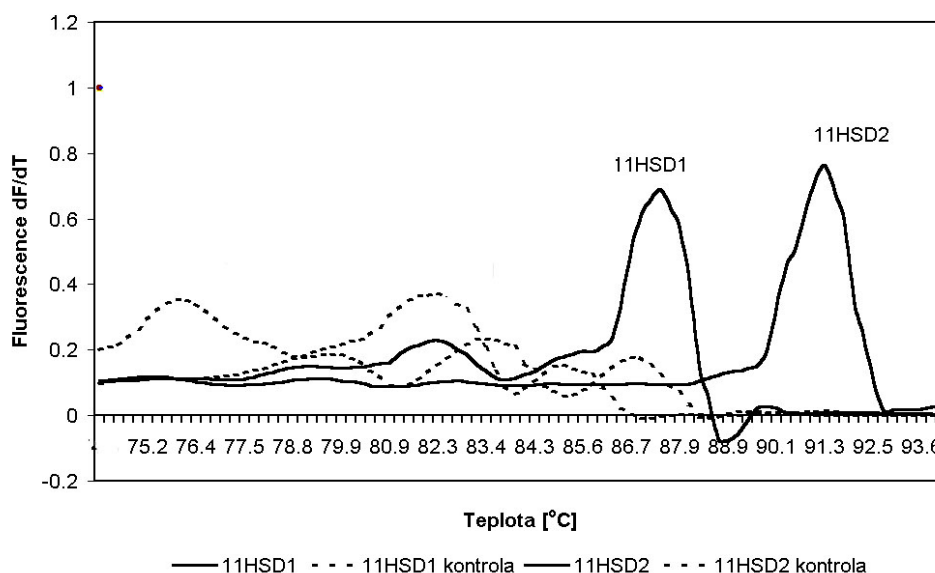
Tab. 4.2.3.2.1. Sekvence použitých primerů pro oba typy 11βHSD a β-aktin pro kvantitativní PCR ze vzorků kolon člověka

	Sekvence primerů v v pořadí (5'→3')
11βHSD1	5-CTCGAGTCCGGATGGCTTTTATG-3 5-ACTTGCTTGCAGAATAGG-3
11βHSD2	5-ACCGTATTGGAGTTGAACACG-3 5-TCACTGACTCTGTCTTGAAGC-3
β-aktin	5-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3 5-CTGGTGCCTGGGGCG-3
TNF-α	5-AGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTT-3 5-ACGGCGATGCGGCTGATGGT-3
IL-1β	5-CAGGCCGCGTCAGTTGTTGT-3 5-TTATATCCTGGCCGCCTTTGGTC-3

Protokol pro oba typy enzymů 11βHSD byl stejný a to: 10 minut aktivace polymerasy následovaný 45 cykly amplifikace cDNA (95°C 15 s, 60°C 10 s, 72°C 25 s). Pro amplifikaci β-aktinu byl použit odlišný protokol: 45 cyklů ( 95°C 15 s, 54°C 10 s, 72°C 7 s).

Protokol pro amplifikaci TNF-α byl následující: 5 minut aktivace polymerasy následovaný 45 cykly amplifikace cDNA (95°C 10 s, 64°C 10 s, 72°C 20 s). Pro amplifikaci IL-1β byl použit podobný protokol: 5 minut aktivace polymerasy následovaný 45 cykly amplifikace cDNA (95°C 10 s, 64°C 10 s, 72°C 24 s).

U všech stanovení byl výsledný produkt kontrolován rozpouštěcí analýzou, typický průběh rozpouštěcí analýzy ukazuje obr. 4.2.3.2.1.

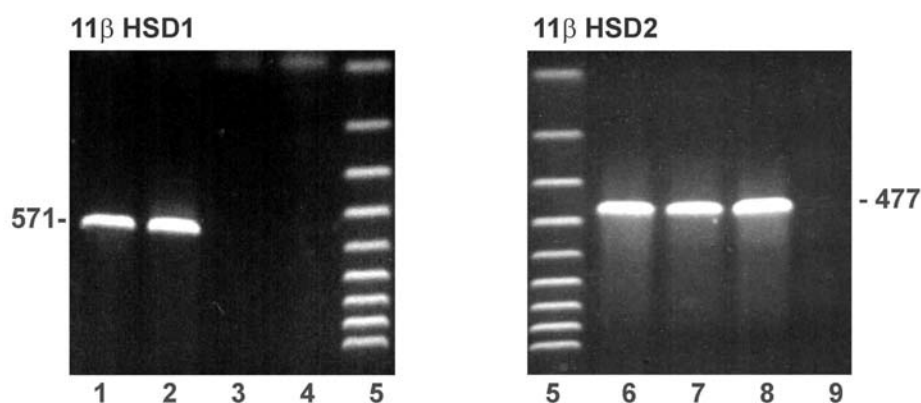


Obr. 4.2.3.2.1. Průběh rozpouštěcí analýzy.

Obrázek 4.2.3.2.1. demonstruje typický průběh rozpouštěcí analýzy pro produkty odpovídající fragmentům, které vznikly v průběhu PCR za použití primerů pro 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2. Charakteristická teplota produktu vznikajícího při použití výše uvedených primerů pro 11 $\beta$ HSD1 je 88,5°C, zatímco pro 11 $\beta$ HSD2 je to 92,0°C. Tato teplota odpovídá teplotě, při které je pouze 50 % přítomné DNA vázáno vodíkovými můstky v dvojšroubovici a je pro daný úsek genu charakteristická. Nespecifické produkty vznikající ve vzorcích, které tento gen neobsahují, nevykazují na rozpouštěcí analýze charakteristický pík.

Píky s výše uvedenými teplotami tání zároveň odpovídaly vznikajícím fragmentům DNA o velikosti 571 párů bází pro gen 11 $\beta$ HSD1 a 477 párů bází pro gen 11 $\beta$ HSD2. Vzorky bez reverzní transkripce a vzorky s velmi nízkou celkovou koncentrací cDNA neobsahovaly fragmenty o příslušné velikosti a teplotě tání.

Velikost fragmentů vznikajících při PCR reakci byla ověřena elektroforézou v 2% agarózovém gelu, viz. obr. 4.2.3.2.2. Pro přípravu gelu byl použit pufr o složení TRIS-acetát -EDTA. Bylo nanášeno 10  $\mu$ l vzorku z kapiláry po proběhlé reakci. Elektroforéza proběhla za při napětí 90 mV po dobu 40 min.



Obr. 4.2.3.2.2. Elektroforéza vzorků tumorů kolon a okolní nenádorové (zdravé) tkáně 3 pacientů s diagnózou adenokarcinomu kolon; 1 - zdravá tkáň kolon pacienta č.1; 2 - zdravá tkáň kolon pacienta č.2; 3 - zdravá tkáň kolon pacienta č.3; 4 - vzorek bez reverzní transkripce; 5 - DNA marker; 6 - tumor kolon pacienta č.1; 7 - tumor kolon pacienta č.2; 8 - tumor kolon pacienta č.3; 9 - vzorek bez reverzní transkripce

Hladiny mRNA byly vypočteny ze standardních kalibračních křivek, konstruovaných ze vzorků naředěné směsi cDNA. Výsledky byly vypočteny jako poměr 11 $\beta$ HSD1/ $\beta$ -aktinu, 11 $\beta$ HSD2/ $\beta$ -aktinu, TNF- $\alpha$  /  $\beta$ -aktinu a IL-1 $\beta$ / $\beta$ -aktinu. Všechna měření byla prováděna v tripletech.

---

### 4.3. Měření aktivity 11 $\beta$ HSD

#### 4.3.1. MĚŘENÍ AKTIVITY 11 $\beta$ HSD 1 A 2 V TKÁŇOVÝCH ŘEZECH

K neradioaktivnímu stanovení aktivity 11 $\beta$ HSD v tkáňových řezech bylo použito dříve popsané metody<sup>(223)</sup>. Zvířata s experimentálně vyvolaným zánětem viz 4.1.1.2. byla usmrcena přerušením krční míchy a zanícená část distálního kolon byla vyjmuta, omyta ve fyziologickém roztoku a na ledu očištěna od tukové tkáně. Kolon bylo podélně rozříženo, podélně rozděleno na tři části, z nichž jedna ( $m = 250$  mg) byla žiletkou rozřezána na malé části a vložena do Erlenmayerových baněk (zbývající dvě části byly použity pro měření MPO a RT-PCR).

Tkáň střeva byla inkubována s kofaktory  $\text{NAD}^+$  (k stanovení oxidasové aktivity) a  $\text{NADP}^+$  (k stanovení reduktasové aktivity) v 10 ml Krebs-Ringerova pufru, který obsahoval (v mM) : 119,0 NaCl; 1,2  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 21,0  $\text{NaHCO}_3$ ; 2,4  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,6  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10,0 glukosa; 2,5 glutamin; 0,5  $\beta$ -hydroxybutyrát sodný; 10,0 manitol. Vše bylo probubláno pneumoxidem (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) při pH 7,4. Doba preinkubace trvala 20 minut a probíhala v neprodyšně uzavřených baňkách pod atmosférou pneumoxidu při konstantní teplotě 37°C.

Po preinkubaci byla reakce zahájena přidáním kortikosteronu ( $1,45 \times 10^{-6}$ ) a 11-dehydrokortikosteronu ( $1,45 \times 10^{-6}$ ), které sloužily jako substrát pro měření oxidasové resp. reduktasové aktivity enzymu 11 $\beta$ HSD. Vlastní doba inkubace trvala 80 minut, následně byla reakce zastavena na ledu. Následovala centrifugace a extrakce steroidů (viz 4.6.) ze supernatantu. Tkáňové řezy byly použity na stanovení sušiny a steroidy byly analyzovány na HPLC (viz 4.7.)

#### 4.3.2. MĚŘENÍ AKTIVITY 11 $\beta$ HSD 1 A 2 V TKÁŇOVÉM HOMOGENÁTU TUMORŮ A OKOLNÍ NENÁDOROVÉ TKÁNI

Radioaktivní stanovení aktivity 11 $\beta$ HSD 1a 2 bylo provedeno dle dříve popsané metody<sup>(224)</sup>. Rozmražené vzorky tumorů a okolní netumorosní tkáně kolon byly zhomogenizovány na přístroji Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) v ledovém pufru dle dříve popsaného protokolu<sup>(53)</sup> za vytvoření 20% homogenátu. Homogenáty byly sonikovány 20 s a následně byly centrifugovány při 1000 x g /10 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl odebrán a stanoveno v něm množství proteinu dle Bradfordové<sup>(225)</sup> viz 4.5.

---

Po 10ti minutové preinkubaci reakční směsi obsahující 1ml supernatantu o koncentraci proteinu 1 mg/ml a 0,4 mM NAD<sup>+</sup> byla oxidasová aktivita enzymu zahájena přidáním 20 nM [3H] kortikosteronu. Po 10 minutové preinkubaci reakční směsi obsahující taktéž 1 ml supernatantu o koncentraci proteinu 1 mg/ml, dále 0,4 mM NADP<sup>+</sup> a 50 mM natrium pyrofosfát (inhibitor pyrofosfatas eliminující konverzi NADP<sup>+</sup> na NAD<sup>+</sup>), byla reduktasová aktivita enzymu zahájena přidáním 5,02 μM kortikosteronu (5 μM neradioaktivního a 20 nM radiativního steroidu). Inkubace reakční směsi probíhala při 37°C 60 minut. Po inkubaci byla reakce zastavena na ledu, vzorky zcentrifugovány při 3000 x g po dobu 15 minut. Následovala extrakce steroidů (viz 4.6.), odpaření v dusíku a analýza na HPLC (viz 4.7.). Výsledky byly vyjádřeny v pmol vzniklého produktu na miligram proteinu za hodinu. Měření vzorků probíhala v dubletech.

#### 4.4. Stanovení MPO

Tíže zánětu byla hodnocena měřením aktivity enzymu myeloperoxidasy, který se nachází v cytoplazmě neutrofilů infiltrující zánětlivou tkáň. Stanovení MPO bylo provedeno metodou dle Bradleyho <sup>(226)</sup>.

K měření byly použity vzorky distálního kolon potkanů s indukovanou TNBS a DSS kolitidou, které byly po odběru ihned zamrazeny a skladovány při teplotě -70°C. Tkáň byla nejdříve 3x zamrazena a rozmrazena, zhomogenizována na přístroji Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) v 50 mM fosfátovém pufru (pH 6.0) s 0,5% hexadecyltrimethylammonium bromidem (HETAB). Následovala 10 sekundová sonikace a poté 15 minutová centrifugace při 40 000 g. Aktivita MPO byla měřena v supernatantu spektrofotometrickou metodou při absorpenci 460 nm. Reakční směs každého vzorku obsahovala 0,1 ml supernatantu, 2,9 ml 50 mM fosfátového pufru o pH 6,0, který obsahoval 167 mg/ml o-dianisidine dihydrochloridu a 0,0005% peroxid vodíku.

Aktivita MPO byla vyjádřena v jednotkách enzymatické aktivity za minutu na miligram tkáně. Jako jedna jednotka enzymové aktivity bylo definováno množství enzymu schopné degradovat 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v průběhu 1 minuty při teplotě 22°C.

---

## 4.5. Stanovení proteinu

Ke stanovení proteinu v tkáňovém homogenátu byla použita metoda dle Bradfordové <sup>(225)</sup>. Objem měřené reakční směsi byl 1,1 ml a obsahoval: 1 ml reakčního činidla CBBS (25 mg Coomassie Brilliant Blue v 12,5 ml 96% ethanolu + 25 ml 85% k. fosforečné, doplněno vodou na objem 250 ml a přefiltrováno), vzorek nebo hovězí sérový albumin (BSA) a 50-100  $\mu$ l pufru o následujícím složení: (vše v mM, pH 7,4) – 250 sacharosa, 10 nM Na-fosfát a 1 nM PMSF <sup>(227)</sup>. Po uplynutí dvou minut po aplikaci reakčního činidla byly v dubletech vzorků měřeny absorbance při 595 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena pro hodnoty proteinu v rozmezí 4-10  $\mu$ g proteinu v reakční směsi.

## 4.6. Extrakce steroidů

Pro extrakci steroidů u radioaktivních i neradioaktivních vzorků byly použity kolony reverzní fáze C-18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA, USA). Po promytí kolony methanolem (5 ml) a vodou (5 ml) byl nanesen vzorek a následně byla kolonka opět promyta vodou (4 ml) a dále vysušena proudem vzduchu. Po extrakci steroidu 1,5 ml methanolu byl vzorek odpařen pod dusíkem při teplotě 45°C. Vzorky byly uskladněny při -20°C. Oba typy vzorků (radio i neradioaktivní) byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií – HPLC.

## 4.7. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

### 4.7.1. HPLC – NERADIOAKTIVNÍ METODA – TKÁŇOVÉ ŘEZY

Analýza vzorků kortikosteroidů byla provedena využitím metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie na přístroji Hewlett-Packard HP 1100 (Palo Alto, CA, USA). Jednotlivé vzorky byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l methanolu, z toho 20  $\mu$ l vzorku bylo aplikováno na kolonu LiChrospher 100 RP 18 (Merck, Darmstadt, Německo). Kolona o rozměrech 125 x 4 mm měla teplotu 46°C. Eluce probíhala při průtokové rychlosti 1 ml/min po dobu 25 minut, byl využit lineární gradient voda-metanol od 65:35 (v/v) do 38:62 (v/v). Následovalo pětiminutové izokratické promytí 100% methanolem při průtokové rychlosti 2 ml/min.

---

V průběhu dalších 8 minut byla kolona ekvilibrována směsí voda-methanol 65:35 při průtokové rychlosti 1,7 ml/min, poté při průtoku 1 ml/min. UV absorbance byla měřena při 254 nm. Kalibrace se pohybovala v intervalu 0,1-5 µg steroidů na jeden nástřik. Identifikace byla provedena srovnáním elučních časů. Kontrola složení jednotlivých produktů byla provedena hmotnostním detektorem dle dříve popsané metody <sup>(228)</sup>.

#### **4.7.2. HPLC – RADIOAKTIVNÍ METODA – TKÁŇOVÝ HOMOGENÁT**

Analýza kortikosteroidů značených radioaktivním tritiem byla realizována stejně jako u neradiaktivních vzorků na přístroji Hewlett-Packard HP 1100. Vzorky byly rozpuštěny v 50 µl methanolu, 20 µl vzorku bylo nanášeno na kolonu LiChrospher 100 RP 18 (125 x 4 mm Merck, Darmstadt, Německo). Eluce probíhala při průtokové rychlosti 1ml/min po dobu 15 minut za využití lineárního gradientu voda-methanol od 58:42 (v/v) do 38:62 (v/v), teplota kolony byla opět 46°C. Následovalo pětiminutové izokratické promytí kolony 100% methanolem při průtokové rychlosti 1,5 ml/min.

Poté následovala pětiminutová příprava pro nanášení dalšího vzorku, při které byly kolona promyta směsí voda-methanol 58:42 (v/v). Detekce β-záření byla provedena detektorem Beckman 171 (Beckman, Fullerton, CA, USA). Identifikace byla stanovena na základě porovnání elučních časů.

### **4.8. Použité chemikálie**

#### **4.8.1. ZVÍŘECÍ A LIDSKÉ KOLITIDY**

Dusík a pneumoxid (Technoplyn-Linde, Praha, ČR), trinitrobenzensulfonová kyselina /TNBS/ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), dextranulfát /DSS/ (MP Biomedicals, USA) RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA), β-hydroxybutyrát sodný, Coomassie Brilliant Blue, NAD<sup>+</sup>, hexadecyltrimethylammonium bromid (HETAB), NADP<sup>+</sup>, o-dianisidine dihydrochlorid, Gene Elute Mammalian Total RNA Kit a BSA (Sigma, St.Luis, MO, USA), kortikosteron (Serva, Heidelberg, Německo), oligo(dT) 12-18 primery (Gibco, BRL), oligo(dT) 12-18 primery (Invitrogen, Groningen, Nizozemí), Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) reverzní transkriptasa (Gibco, BRL), Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptasa (Invitrogen), RQ1-DNAsa (Sigma), Light-Cycler-DNA Master Sybre Green I mix (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK), FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), agarosa

---

a 6x koncentrovaný vkladací pufr na elektroforézu (Top Bio, Praha), 11-deoxykortikosteron (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), ostatní chemikálie (Lachema, Brno, ČR) v p.a. kvalitě

#### **4.8.2. STANOVENÍ AKTIVITY A EXPRESE MRNA 11BHSD V LIDSKÝCH TUMORECH A OKOLNÍ NENÁDOROVÉ TKÁNI**

Sacharosa, Natrium fosfát, Coomassie Brilliant Blue, pufr o složení TRIS-acetát-EDTA, NAD<sup>+</sup> a BSA (Sigma, St. Luis, MO, USA), 1,2,6,7[<sup>3</sup>H]-kortikosteron o specifické aktivitě ~79Ci/mmol (Amersham International, Aylesburg, Velká Británie), TRIZOL (Gibco BRL, Karlsruhe, Německo), oligo(dT) 12-18 přímery (Gibco, BRL), M-MLV reverzní transkriptasa (Gibco, BRL), PMSF, Fast Start DNA Master Sybre Green I kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo), 11βHSD1, 11βHSD2 a β-aktin primery (pGEM-T Easy Vector System, Promega, Madison), agarosa a 6x koncentrovaný vkladací pufr na elektroforézu (Top Bio, Praha)

### **4.9. Statistické metody**

#### **4.9.1. ZMĚNY EXPRESE A AKTIVITY OBOU TYPŮ ENZYMŮ 11BHSD VE VZORCÍCH STŘEVA ZVÍŘECÍCH MODELŮ ZÁNĚTLIVÝCH STŘEVNÍCH CHOROB**

Data byla vyjádřena jako aritmetický průměr ± střední chyba aritmetického průměru (SEM). Statistická významnost byla hodnocena nepárovým Studentovým testem a hladina významnosti byla volena 95 %. K porovnání regrese změn obou typů 11βHSD během zánětu byla použita regresní analýza.

#### **4.9.2. ZMĚNY EXPRESE OBOU TYPŮ ENZYMŮ 11BHSD V BIOPTICKÝCH VZORCÍCH ULCEROSNÍ KOLITIDY**

Data byla presentována jako medián a 25.-75. percentilové rozpětí. Statistická významnost rozdílu mezi kolitidou a kontrolní tkání byla testována Mann-Whitney *U*-testem. Hladina významnosti byla volena 95 %. Hodnocení bylo provedeno za pomoci programu Statistica v.6 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

---

#### **4.9.3. ZMĚNY AKTIVITY A EXPRESE OBOU TYPŮ ENZYMŮ 11 $\beta$ HSD VE VZORCÍCH LIDSKÝCH TUMORŮ STŘEVA A OKOLNÍ NENÁDOROVÉ TKÁNI**

Data byla vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  střední chyba aritmetického průměru (SEM). K porovnání aktivity 11 $\beta$ HSD a mRNA abundance 11 $\beta$ HSD v neoplastické a okolní netumorosní tkáni byl použit neparametrický Wilcoxonův test. Hladina významnosti byla stanovena 95 %.



## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. 11 $\beta$ HSD a zánětlivé střevní choroby

#### 5.1.1. 11 $\beta$ HSD A ZVÍŘECÍ MODELY ZÁNĚTLIVÝCH CHOROB STŘEVNÍCH

Všechna zvířata, která měla indukovanou TNBS nebo DSS kolitidu, demonstrovala ke konci léčby symptomy průjmu, krvácení z rektu a váhový úbytek.

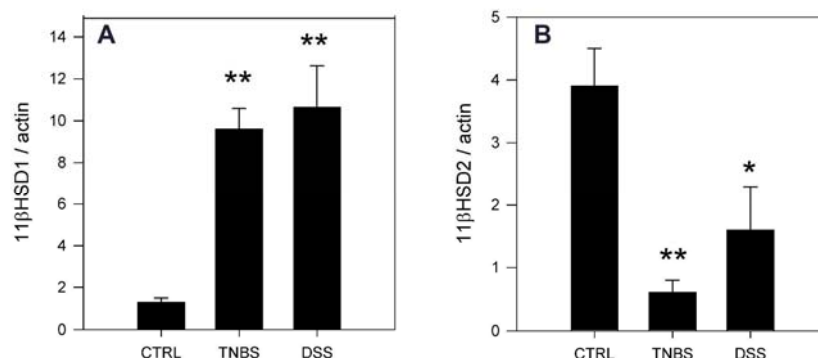
Tíže zánětu u obou modelů kolitid byl kvantifikován měřením aktivity enzymu myeloperoxidasy. U zvířat s indukovanou kolitidou bylo pozorováno zvýšení aktivity myeloperoxidasy v zaníceném kolon oproti zdravým kontrolám. Porovnání aktivit MPO sumarizuje tabulka 5.1.1.1.

Tab. 5.1.1.1. Aktivita myeloperoxidasy ve vzorcích kolon zvířecích kolitid a kontrol

Vzorek	CTRL	TNBS	DSS
Aktivita MPO	1.9 $\pm$ 0.3	23.2 $\pm$ 4.5	16.1 $\pm$ 3.2

*CTRL = kontroly; TNBS = kolitida indukovaná k.trinitrobenzensulfonovou; DSS = kolitida indukovaná dextransulfátem; aktivita MPO je vyjádřena v U/g tkáňe, 1U enzymové aktivity je definována jako množství enzymu schopné degradovat 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 1 minutu při teplotě 22 °C, P < 0.01. Data uvedena jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM*

Ke studiu změn obou typů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy modelů zvířecích kolitid byly použity metody kvantitativní RT-PCR a neradioaktivní stanovení aktivity 11 $\beta$ HSD v tkáňových řezech. Ve všech studovaných vzorcích byla měřena hladina mRNA obou typů enzymů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy a získané hodnoty byly vztaženy k  $\beta$ -aktinu jako internímu standardu. Obrázek 5.1.1.1A znázorňuje, že exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 byla signifikantně zvýšena v zánětlivě změněném kolon obou modelů zvířecích kolitid. Naproti tomu mRNA 11 $\beta$ HSD2 vykazovala vyšší expresi ve zdravé tkáni střeva kontrol oproti zánětlivě změněnému kolon modelů zvířecích kolitid, viz obrázek 5.1.1.1B.



Obr. 5.1.1.1. Hladiny mRNA 11 $\beta$ HSD1 (obr. A) a 11 $\beta$ HSD2 (obr. B) u kontrolních zvířat (CTRL) a zvířat s indukovanou kolitidou (TNBS nebo DSS). Hodnoty jsou vyjádřeny jako arbitrární jednotky vztažené k  $\beta$ -aktinu (aritmetický průměr  $\pm$  SEM; CTRL: n=12; TNBS: n=17; DSS: n=10). \*P < 0.05 nebo \*\*P < 0.01 v porovnání s kontrolními zvířaty

Tyto výsledky nasvědčují tomu, že v průběhu střevního zánětu dochází k zvýšení exprese 11 $\beta$ HSD1 mRNA a naopak omezení exprese 11 $\beta$ HSD2 mRNA.

Regresní analýza neprokázala signifikantní korelaci mezi množstvím mRNA 11 $\beta$ HSD1 a mRNA 11 $\beta$ HSD2 v zaníceném kolon. Tato data naznačují, že mezi zvýšenou expresí 11 $\beta$ HSD1 a tíží zánětu neexistuje jednoduchá korelace, pravděpodobně protože 11 $\beta$ HSD2 je exprimována pouze v kolonocytech.

K stanovení aktivity obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD byla použita metoda neradioaktivního stanovení v tkáňových řezech, neboť reduktasová aktivita 11 $\beta$ HSD1 není v homogenátu stabilní. Ve všech vzorcích byla nalezena jak reduktasová tak oxidasová aktivita 11 $\beta$ HSD, viz tabulka 5.1.1.2.

Tab. 5.1.1.2. Měření aktivity 11 $\beta$ HSD v tkáni střeva kontrol a modelů kolitid

	CTRL	TNBS	DSS
Oxidasová aktivita	59.8 $\pm$ 6.2 (23)	21.3 $\pm$ 2.0 (16)*	28.1 $\pm$ 3.4 (14)*
Reduktasová aktivita	7.8 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 2.1*	12.0 $\pm$ 2.0*
Výsledná aktivita	52.0 $\pm$ 6.3	7.0 $\pm$ 2.8*	16.0 $\pm$ 2.9*
Podíl aktivit	10.6 $\pm$ 2.6	2.5 $\pm$ 0.6*	3.1 $\pm$ 0.6*

*CTRL = kontroly; TNBS = kolitida indukovaná k. trinitrobenzensulfonovou; DSS = kolitida indukovaná dextranulfátem; hodnoty jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM; počet zvířat je uveden v kulatých závorkách. Aktivita enzymu je vyjádřena v nanogramech 11-dehydrokortikosteronu (11 $\beta$ -oxidace) nebo kortikosteronu (11-redukce) vzniklého za hodinu na mg sušiny. Výsledná aktivita je definována jako rozdíl oxidasové a reduktasové aktivity. \*P<0.01 v porovnání s kontrolními zvířaty*

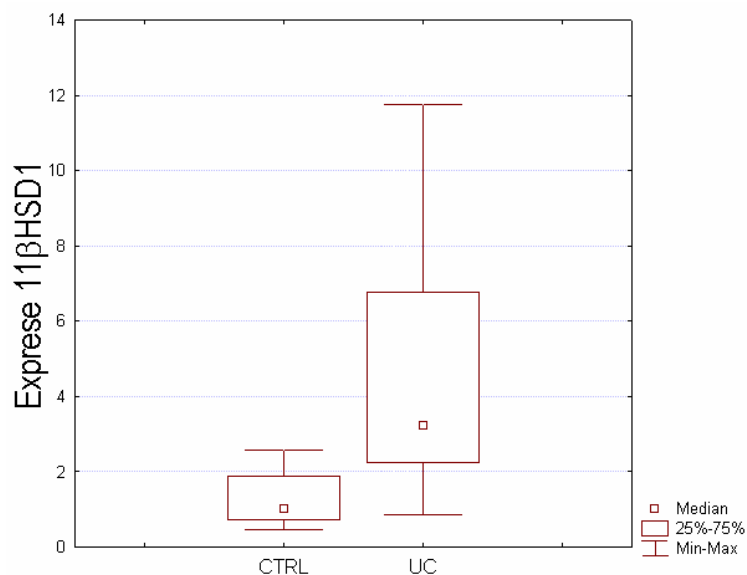
Z výsledků je patrné, že ve zdravém střevu převažuje oxidasová aktivita (konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron), která odráží aktivitu 11 $\beta$ HSD2. Redukce 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron, která vyjadřuje reduktasovou aktivitu 11 $\beta$ HSD1, tvořila pouze 10 % 11-dehydrogenasové aktivity.

Oproti tomu došlo u potkanů s indukovanou kolitidou (TNBS nebo DSS) k významnému poklesu oxidasové a zvýšení reduktasové aktivity, nicméně ve střevě přetrvávala oxidasová aktivita i v případě zvířat s kolitidou. Pokles poměru obou aktivit z hodnoty cca 10 o 70 – 75 % odráží snížení 11-oxidace doprovázené 11-redukci. Podobně jako u exprese mRNA nebyla pozorována korelace mezi oxidasovou a reduktasovou aktivitou 11 $\beta$ HSD v zánětlivě změněném kolon.

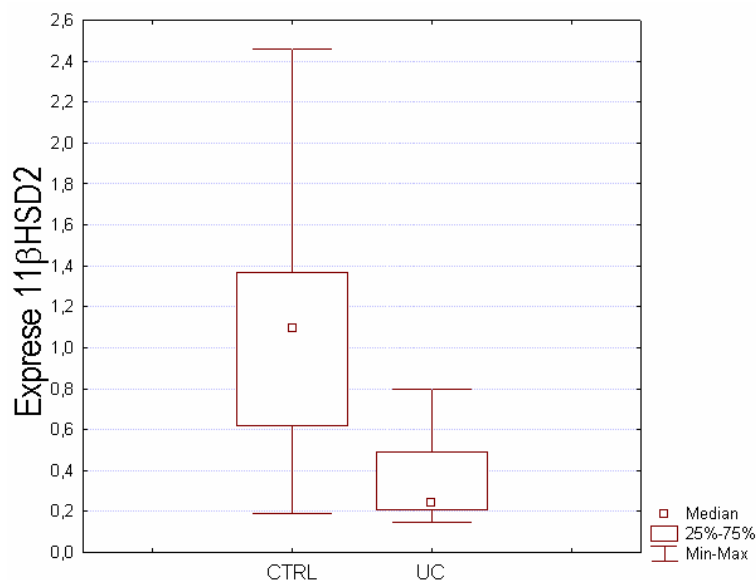
### 5.1.2. 11 $\beta$ HSD V LIDSKÝCH BIOPSIÍCH ULCEROSNÍ KOLITIDY

Skupinu vyšetřovaných vzorků tvořilo 14 vzorků s diagnosou ulcerosní kolitidy, zbylých 12 vzorků tvořilo kontrolní skupinu. Každý vzorek tvořil skupinu nejméně tří biopsií, v případě ulcerosní kolitidy odebraných ze zánětlivě změněného kolon, u kontrolních vzorků z makroskopicky zdravé tkáně.

Za použití specifických primerů pro lidskou 11 $\beta$ HSD1 (571 bp) a 11 $\beta$ HSD2 (477 bp) byla ve všech sledovaných bioptických vzorcích detekována exprese obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD. Hladina mRNA obou 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenas byla vztažena na „housekeeping“ gen  $\beta$ -aktin. Množství 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 transkriptu demonstruje obr. 5.1.2.1. a 5.1.2.2.



Obr. 5.1.2.1. Expresa mRNA 11 $\beta$ HSD1 (resp. poměr mRNA 11 $\beta$ HSD1 k mRNA  $\beta$ -aktinu) u zdravých kontrol (CTRL) a pacientů s ulcerózní kolitidou (UC). Statistická analýza provedená Mann-Whitney U-testem prokázala signifikantně vyšší expresi mRNA 11 $\beta$ HSD1 u pacientů s kolitidou ( $P < 0.001$ )



Obr. 5.1.2.2. Expresa mRNA 11 $\beta$ HSD2 (resp. poměr mRNA 11 $\beta$ HSD2 k mRNA  $\beta$ -aktinu) u zdravých kontrol (CTRL) a pacientů s ulcerózní kolitidou (UC). Statistická analýza provedená Mann-Whitney U-testem prokázala signifikantně nižší expresi mRNA 11 $\beta$ HSD2 u pacientů s kolitidou ( $P < 0.01$ )

Hladina mRNA 11 $\beta$ HSD1 u zdravých kontrol byla signifikantně nižší (medián 1.04, 25.-75. percentilové rozpětí 0.82-1.77) oproti pacientům s ulcerózní kolitidou (medián 3.48, 25.-75. percentilové rozpětí 2.96-6.78;  $P < 0.001$ ), naproti tomu mRNA 11 $\beta$ HSD2 vykazovala zvýšenou expresi ve zdravé tkáni střeva (medián 1.00, 25.-75. percentilové rozpětí 0.62-1.37) než v tkáni zaníceného kolon (medián 0.33, 25.-75. percentilové rozpětí 0.24-0.49;  $P < 0.01$ ). Hladiny mRNA 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 u pacientů s ulcerózní kolitidou, kteří byli léčeni prednisonem, se nacházely uvnitř intervalu skupiny naměřených hodnot a proto byly zahrnuty do hodnoceného souboru. Výsledky naznačují, že u ulcerózní kolitidy dochází k zvýšení exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 a snížení exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2.

V lidských biopsiích byla měřena i hladina mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  s IL-1 $\beta$ . Exprese mRNA prozánětlivých cytokinů byla u pacientů s ulcerózní kolitidou signifikantně zvýšena oproti kontrolním biopsickým vzorkům. Porovnání hladin mRNA prozánětlivých cytokinů u pacientů s ulcerózní kolitidou a v kontrolních biopsiích demonstruje tabulka 5.1.2.1.

Tab. 5.1.2.1. Hladiny mRNA TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  u zdravých kontrol a pacientů s ulcerózní kolitidou

	Hladina mRNA TNF- $\alpha$ u UC	Hladina mRNA TNF- $\alpha$ u CTRL	Hladina mRNA IL-1 $\beta$ u UC	Hladina mRNA IL-1 $\beta$ u CTRL
<b>Medián</b>	5.55	2.01	0.61	0.07
<b>25.-75.percentil</b>	2.53-11.71	1.00-2.78	0.51-0.75	0.04-0.11
<i>CTRL = kontrolní skupina zdravých pacientů; UC = pacienti s ulcerózní kolitidou; <math>P &lt; 0.001</math></i>				

K objasnění, zda exprese mRNA obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD v biopsických vzorcích pacientů s ulcerózní kolitidou odráží změny vzniklé zánětem a není ovlivněna léčbou, bylo provedeno stanovení exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 ve vzorcích kolon u zvířat s indukovanou chronickou DSS kolitidou. Zánět v kolon u DSS kolitidy byl kvantifikován aktivitou enzymu myeloperoxidasy. U zvířat s indukovanou chronickou DSS kolitidou byla prokázána signifikantně zvýšená aktivita MPO oproti zdravým kontrolám, viz tabulka 5.1.2.2.

Tab. 5.1.2.2. Aktivita myeloperoxidasy ve vzorcích kolon zvířecích kolitid a kontrol

	CTRL	DSS
<b>Medián</b>	1.1	5.1
<b>25.-75.percentil</b>	0.6-1.4	2.6-7.6
<i>CTRL = kontroly; DSS = kolitida indukovaná dextranulfátem; aktivita MPO je vyjádřena v U/g tkáně, 1U enzymové aktivity je definována jako množství enzymu schopné degradovat 1 <math>\mu</math>mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 1 minutu při teplotě 22 °C, <math>P &lt; 0.001</math></i>		

Zvýšená exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 a naopak snížená exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2 byla nalezena u zvířat s chronickou kolitidou v porovnání se zdravými kontrolami, viz tabulka 5.1.2.3. Obdobně redukce 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron vyjadřující aktivitu enzymu 11 $\beta$ HSD1 byla zvýšená u zvířat s kolitidou oproti zdravým kontrolám, oxidace kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron reprezentující především aktivitu enzymu 11 $\beta$ HSD2 byla snížena.

Tab. 5.1.2.3. **Expresse mRNA a enzymová aktivita obou typů enzymů 11βHSD u zvířat s kolitidou a kontrolních zvířat**

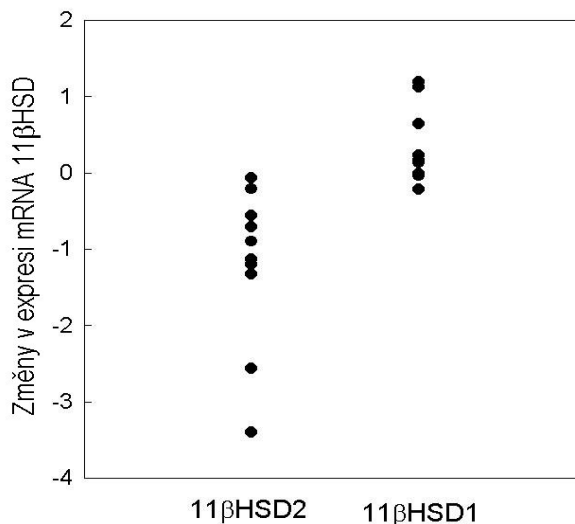
Parametr	CTRL	DSS	Hodnota P
<b>Expresse mRNA (poměr k mRNA β-aktinu)</b>			
11βHSD1	1.6 (1.3-1.8)	7.8 (4.8-13.1)	< 0.003
11βHSD2	4.7 (3.8-6.8)	1.7 (1.0-3.2)	< 0.003
<b>Enzymová aktivita (ng/h.mg)<sup>1</sup></b>			
11β-oxidace	34.8 (27.3-47.0)	21.2 (15.7-24.0)	< 0.003
11-redukce	6.8 (4.0-9.4)	16.4 (6.4-21.0)	< 0.03

*Hodnoty jsou uvedeny jako medián (25.-75.percentil), každou skupinu tvoří 7-10 zvířat*  
<sup>1</sup> Enzymová aktivita je uvedena v nanogramech 11-dehydrokortikosteronu (11β-oxidace) nebo kortikosteronu (11-redukce) vytvořeného za hodinu na miligram sušiny

## 5.2. 11βHSD a střevní tumory

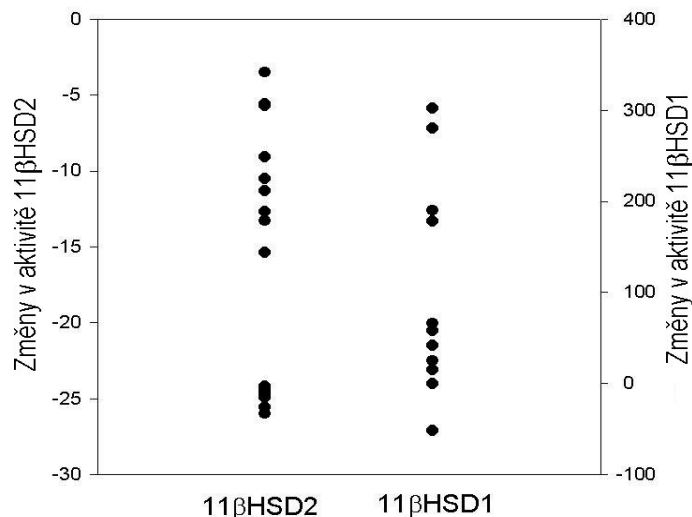
Stanovení aktivity a exprese obou typů enzymů 11βHSD bylo provedeno u 11 dospělých pacientů z operačních resektátů adenokarcinomu rekta a sigmatu a okolní nenádorové tkáni.

Expresse mRNA 11βHSD2 byla prokázána v tkáni adenokarcinomu i okolní nenádorové tkáni. 11βHSD2 byla signifikantně více exprimována v okolní nenádorové tkáni oproti tkáni adenokarcinomu. Expresse 11βHSD2 v tkáni adenokarcinomu tvořila  $41 \pm 6$  % exprese okolní nenádorové tkáně, viz obr. 5.2.1.



Obr. 5.2.1. Rozdíly v expresi 11βHSD1 a 11βHSD2 mRNA mezi neoplastickou a nenádorovou okolní tkáni střeva pacientů s kolorektálním karcinomem (n=10). Expresse 11βHSD2 mRNA byla signifikantně zvýšena v neoplastické tkáni oproti kontrolní nenádorové tkáni střeva (P=0.005). V abundanci 11βHSD1 mRNA nebyl signifikantní rozdíl.

Aktivita 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 (konverze kortisolu na kortison) byla měřena v tkáňovém homogenátu a byla prokázána ve všech vzorcích tumorů i v okolní nenádorové tkáni. Aktivita 11 $\beta$ HSD2 v tkáni tumoru tvořila  $59 \pm 4$  % aktivity okolní nenádorové tkáně, viz obr. 5.2.2



Obr. 5.2.2. Rozdíly aktivit 11 $\beta$ HSD1 11 $\beta$ HSD2 (v pmol/h.mg.prot.) mezi neoplastickou a nenádorovou tkání střeva u pacientů s kolorektálním karcinomem (n=11). Aktivita 11 $\beta$ HSD2 byla signifikantně nižší (P=0.012) a 11 $\beta$ HSD1 vyšší (P=0.028) v neoplastické tkáni oproti kontrolní nenádorové tkáni kolon.

Z daných výsledků je patrné, že se sníženou expresí 11 $\beta$ HSD2 mRNA v tkáni tumoru oproti okolní nenádorové tkáni korelovala i snížená aktivita tohoto typu enzymu. To znamená, že v tkáni tumoru dochází v porovnání s okolní nenádorovou tkání k omezenému odbourávání aktivního glukokortikoidu kortisolu.

Expresie 11 $\beta$ HSD1 mRNA byla detekována ve všech vzorcích nádorové i okolní nenádorové tkáně, a stejně jako u 11 $\beta$ HSD2 bylo množství naměřené mRNA vztaženo na „housekeeping gen“  $\beta$ -aktin. Zatímco expresie 11 $\beta$ HSD2 mRNA byla v nádorové tkáni všech vzorků redukována, expresie 11 $\beta$ HSD1 mRNA v nádorové tkáni se mezi pacienty lišila – v některých vzorcích byla zvýšená, v jiných snižená a nebo nezměněná oproti kontrolní, okolní nenádorové tkáni, viz obr. 5.2.1. 11 $\beta$ HSD1 mRNA v neoplastické tkáni byla průměrně zvýšena o  $398 \pm 176$  % oproti kontrolní tkáni. Aktivita 11 $\beta$ HSD1 byla v kontrolní, nenádorové tkáni nedekovatelná nebo velmi nízká, zatímco aktivita v některých vzorcích neoplastické tkáně byla jasně zvýšená, viz obr. 5.2.2.

---

## 6. DISKUZE

Glukokortikoidy mají nezastupitelné místo v léčbě nespecifických střevních zánětů, neboť ovlivňují četné molekuly, mediátory a buňky imunitního systému, které zasahují do průběhu zánětlivé reakce. Jejich podání v průběhu zánětlivé reakce mimo jiné ovlivňuje distribuci, množství a funkci buněk imunitního systému, redukuje expresi enzymu cyklooxygenasy a tvorbu jejích prozánětlivých produktů, snižuje expresi snad všech známých adhesních molekul a ovlivňují řadu různých transkripčních faktorů jako je např. NF- $\kappa$ B a AP-1, které modulují produkci prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů zánětu.

Aktivace glukokortikoidních receptorů spouští sled pochodů, které vyústí v jejich konečný protizánětlivý účinek. Glukokortikoidní receptory mohou být aktivovány pouze aktivní formou glukokortikoidů (kortisol, kortikosteron) a ne jejich oxo-deriváty jako jsou 11-dehydrokortikosteron a kortison. Alterace v lokálním metabolismu glukokortikoidů by tak mohla přispět k rozvoji různých zánětlivých chorob a zároveň ovlivnit průběh jejich terapie.

Klíčovou úlohu v lokálním metabolismu glukokortikoidů hraje enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa, jejíž význam v protizánětlivém působení glukokortikoidů přinesla práce s autoimunitním kmenem MRL lpr/lpr myši<sup>(181)</sup>. V této práci omezilo podání inhibitoru 11 $\beta$ HSD kyseliny glycyrrhetinové proteinurii a snížilo hladinu IgG v seru. Obdobně také nález 25-násobně vyšší suprese prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  v případě dexamethasonu oproti kortisolu<sup>(229)</sup> lze vysvětlit nejen jako důsledek změněné schopnosti aktivity koaktivátorů a korepresorů glukokortikoidních receptorů, ale také jako důsledek toho, že dexamethason uniká lokální kontrole enzymy 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2<sup>(230)</sup>.

Další práce potvrzující důležitost 11 $\beta$ HSD v patogenezi zánětu byla provedena na mesangiálních buňkách ledviny<sup>(163)</sup>. Působení prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  na glomerulární mesangiální buňky (GMC) zvýšilo expresi PLA2 a současně stimulovali reduktasové aktivity 11 $\beta$ HSD1. 11 $\beta$ HSD1 zpětnově inhibovala prozánětlivé působení TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  a zároveň inhibovala cytokiny indukovanou expresi PLA2 v těchto buňkách. S obdobnými nálezy jako u GMC se lze setkat i u ulcerózní kolitidy, kde je významně zvýšena hladina prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ <sup>(231,232)</sup> i PLA2<sup>(233)</sup>, avšak o roli 11 $\beta$ HSD v patofyziologii nespecifických střevních zánětů je známo velmi málo<sup>(215)</sup>.

Výsledky naší práce ukázaly, že v průběhu zánětu dochází v lidském kolon i kolon zviřecích modelů akutní (TNBS a DSS kolitida) i chronické kolitidy (DSS kolitida) k zvýšení exprese a aktivity 11 $\beta$ HSD1 a naopak snížení exprese a aktivity 11 $\beta$ HSD2. Vzhledem k tomu, že v mnoha tkáních funguje 11 $\beta$ HSD1 spíše jako reduktasa a 11 $\beta$ HSD2 pouze jako oxidasa, mohla by se takovým mechanismem zvýšit v zaníceném kolon intracelulární koncentrace aktivního kortikoidu. Za tento reciproční posun v aktivitě a expresi obou typů enzymů 11 $\beta$ HSD v tkáni zánětlivě změněného kolon jsou pravděpodob-

---

ně zodpovědné prozánětlivé cytokiny jako TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  <sup>(163,169)</sup>, které obdobným způsobem měnily aktivitu i expresi obou typů 11 $\beta$ HSD i v jiných tkáních <sup>(169,170)</sup>. Potkani s indukovanou TNBS kolitidou měli signifikantně zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů <sup>(234,235)</sup>. Tyto cytokiny zvyšují aktivitu i expresi 11 $\beta$ HSD1 v mnoha tkáních v závislosti na jejich koncentraci <sup>(124,170,236)</sup>.

Námi zjištěná snížená exprese i aktivita 11 $\beta$ HSD2 v bioptických vzorcích ulcerosní kolitidy není pro tuto chorobu specifickým nálezem, s obdobnými nálezy se lze setkat i u nespecifických ulcerosních lézí kolon, divertikulitidy a nebo u ischemické kolitidy. Redukovaná aktivita 11 $\beta$ HSD2 by tak mohla být spíše následek slizničního zánětu, který je v případě ulcerosní kolitidy spjat jak s regenerací tak fibrotizací tkáně kolon <sup>(215)</sup>.

Bylo prokázáno, že v průběhu maturace a diferenciaci kolon dochází k postupnému zvyšování exprese 11 $\beta$ HSD2 v epitelu kolonocytů, kdy maximální hodnoty exprese 11 $\beta$ HSD2 nalezneme v superficiálních buňkách krypt dospělých jedinců <sup>(77)</sup>. Pokud vezmeme v úvahu, že ve sliznici kolon pacientů s ulcerosní kolitidou byl dokumentován zvýšený obrat a inkompletní maturace kolonocytů <sup>(237,238)</sup>, může být tento fakt vysvětlením omezené exprese 11 $\beta$ HSD2. Nálezy snížené exprese 11 $\beta$ HSD2 pacientů s ulcerosní kolitidou by mohly vysvětlit poruchy absorpce vody a elektrolytů, které ulcerosní kolitidu doprovází.

Přestože u ulcerosní kolitidy dochází k zvýšení lokální koncentrace aktivního glukokortikoidu díky stimulaci exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 a naopak redukcii exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2, otázkou zůstává persistence tohoto chronického zánětu. Není vyloučeno, že výsledná koncentrace protizánětlivě působícího kortisolu je u pacientů s ulcerosní kolitidou nedostatečná díky omezeně suprimované aktivitě druhého typu enzymu – 11 $\beta$ HSD2, který kortisol zase odbourává. Tímto mechanismem by mohla 11 $\beta$ HSD přispívat k dalšímu vývoji a trvání zánětu. S obdobnými nálezy v expresi a aktivitě obou typů 11 $\beta$ HSD se lze setkat v práci na synoviálních buňkách pacientů s revmatoidní artritidou <sup>(239)</sup>.

Glukokortikoidy indukují expresi 11 $\beta$ -HSD1 v mnoha typech buněk zahrnující např. lidské osteoblasty <sup>(203)</sup>, primární kultury lidských preadipocytů <sup>(69)</sup> nebo primární kultury kožních fibroblastů <sup>(240)</sup>. Vzhledem k tomu, že tyto práce naznačují stimulační efekt glukokortikoidů na expresi 11 $\beta$ HSD1 <sup>(6)</sup> a u nespecifických střevních zánětů dochází k aktivaci HHA osy <sup>(241)</sup>, není vyloučen stimulační efekt glukokortikoidů na expresi střevní 11 $\beta$ HSD1.

V naší práci byly hladiny mRNA 11 $\beta$ HSD1 naměřené u pacientů s ulcerosní kolitidou léčených perorálními kortikoidy v mezích naměřených hodnot mRNA 11 $\beta$ HSD1 pacientů s ulcerosní kolitidou neléčených steroidy. S obdobnými závěry se lze setkat i v práci studující expresi obou typů 11 $\beta$ HSD u pacientů s diagnosou lepry I. typu. Počáteční zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD1 v kožních lézích těchto pacien-



---

tů se během terapie prednisonem neměnila, což koreluje s našimi výsledky. Na modulaci exprese 11 $\beta$ HSD1 by tak mohly mít významnější vliv prozánětlivé cytokiny oproti glukokortikoidům <sup>(242)</sup>. Naše výsledky tak nepodporují teorii o stimulačním působení kortikoidů na expresi mRNA 11 $\beta$ HSD1.

11 $\beta$ HSD1 se ve střevu nachází v nonepiteliálních buňkách lamina propria submukosy <sup>(71)</sup>, konkrétně v monocyto-makrofágovém systému a některých T-lymfocytech <sup>(162,243)</sup>. Na buněčné úrovni proto zvýšení 11 $\beta$ HSD1 v zánětlivě změněném kolon může odrážet změny v těchto imunokompetitivních buňkách lamina propria. Aktivita 11 $\beta$ HSD1 byla úměrná tvorbě Th1 cytokinů T-buňkami <sup>(243)</sup>.

Naproti tomu 11 $\beta$ HSD2 se ve střevu exprimuje pouze v epiteliích kolon <sup>(71)</sup>, a u pacientů s ulcerózní kolitidou zde nacházíme sníženou imunoreaktivitu 11 $\beta$ HSD2 <sup>(215)</sup>.

Naše výsledky podporují teorii, podle níž prozánětlivé cytokiny regulují působení biologicky aktivních glukokortikoidů nejen stimulací hypotalamo-hypofyzární osy, ale současně i skrze para a intrakrinní mechanismy, kterými ovlivňují prereceptorový metabolismus glukokortikoidů v cílové tkáni <sup>(124,169,170,244,245)</sup>.

Protože významnou část konzervativní terapie pacientů s nespecifickými střevními záněty tvoří léčba kortikoidy a anticytokinová terapie, je možné, že alterace v lokálním metabolismu glukokortikoidů cestou 11 $\beta$ HSD by mohla přispět k patogenezi těchto onemocnění. Zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD1 umožňuje buňkám zvýšit intracelulární koncentraci aktivního kortikoidu, reciproční inhibice exprese 11 $\beta$ HSD2 tento proces potencuje.

V tkáni střeva pacientů s ulcerózní kolitidou jsme našli zvýšenou expresi 11 $\beta$ HSD1 a snížení exprese 11 $\beta$ HSD2, což umožňuje potlačovat zánětlivou reakci produkcí aktivního glukokortikoidu přímo v místě zánětu.

Význam 11 $\beta$ HSD v patogenezi mnoha onemocnění se v současné době začíná prosazovat i ve farmakologickém průmyslu a to z hlediska možného terapeutického ovlivnění tohoto enzymu. Zájem farmaceutických firem obrací pozornost především na výzkum a syntézu specifických, nesteroidních inhibitorů 11 $\beta$ HSD1 jako jsou např. adamantylové, benzothiazolové nebo oxazolonové deriváty, které selektivně inhibují 11 $\beta$ HSD1 a tím snižují lokální koncentraci glukokortikoidu v dané tkáni. Je možné, že tyto látky najdou uplatnění v terapii lidských chorob jako je obezita, diabetes mellitus 2. typu nebo metabolický syndrom <sup>(246,247,248)</sup>. Je otázkou, jestli by naopak facilitace reduktasové aktivity 11 $\beta$ HSD1 s následným zvýšením intracelulární koncentrace aktivního glukokortikoidu nepřispěla k terapii zánětlivých onemocnění. Protože nedostatečné odklizení apoptických buněk tkáňovými makrofágy přispívá k chronicitě zánětu, mohla by být modulace aktivity 11-HSD1 těchto buněk obdobně účinná jako celkově podané kortikoidy <sup>(179)</sup>.

---

---

Jak bylo uvedeno výše, zvýšení koncentrace aktivního glukokortikoidu lze dosáhnout i inhibicí 11 $\beta$ HSD2, avšak v tomto případě se přidružují nepříjemné nežádoucí účinky syndromu AME, viz kap. 2.2.1.1.

Význam chronického zánětu jako predisponujícího faktoru v procesu nádorového bujení je dlouhodobě známým faktem. Jako příklad návaznosti chronického zánětu na tumorogenezi lze uvést chronický gastroesofageální reflux indukující karcinom jícnu, proliferující zánětlivou atrofii indukující karcinom prostaty a chronickou kolitidu spojenou se vznikem kolorektálního karcinomu <sup>(249)</sup>, zajímavá je spojitost zvýšeného počtu ovulací s rizikem karcinomu ovárií <sup>(167)</sup>.

Na průběhu zánětlivého procesu se účastní mnoho molekul a mediátorů zánětu, jako např. prozánětlivě působící prostaglandiny a COX-2, které současně potencují i tumorogenezi, aktivované makrofágy a lymfocyty jsou v zánětlivém ložisku zdrojem prozánětlivých cytokinů, růstových a angiogenetických faktorů, které přispívají k přechodu chronického zánětu v neoplastický proces <sup>(249-253)</sup>.

Glukokortikoidy mají schopnost potlačovat průběh zánětlivého i nádorového procesu na mnoha místech, což bylo dokumentováno v kapitolách 2.2.4. a 2.2.5., nicméně je třeba připomenout i to, že ovlivňují i mikroprostředí tumoru, které přispívá k progresi nádorového procesu tvorbou různých stromálních proteinů a faktorů angiogeneze.

Jak bylo již zmíněno, lokální metabolismus glukokortikoidů je v buňkách regulován enzymem 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasou. Exprese tohoto enzymu ovlivňuje i buněčnou proliferaci <sup>(47)</sup>, což naznačuje, že 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa by mohla sehrát roli i v procesu tumorogeneze <sup>(196)</sup>.

11 $\beta$ HSD1 v buňkách zvyšuje lokální koncentraci antiproliferačně působícího kortikoidu, naproti tomu 11 $\beta$ HSD2 má účinek opačný. Pokud vezmeme v úvahu, že v mnoha tumorech byla prokázána vysoká exprese 11 $\beta$ HSD2 a naopak snížená exprese 11 $\beta$ HSD1, podporují tato data hypotézu, která přisuzuje 11 $\beta$ HSD2 roli potencionálního „onkogenu“ <sup>(197-201)</sup>. Významnou podporu získala tato hypotéza na základě výsledků velké kohortní studie s lidskými tumory hypofýzy, kde byla významně zvýšena exprese 11 $\beta$ HSD2 (asi 10x) oproti 11 $\beta$ HSD1, která byla naopak značně redukována (asi 0,2x), navíc podání kyseliny glycyrrhetinové, inhibitoru 11 $\beta$ HSD2, významně omezilo proliferaci a potencovalo účinek kortisolu. Protože v práci nebyla prokázána žádná 11 $\beta$ HSD1 aktivita, ale značná 11 $\beta$ HSD2 aktivita, je evidentní, že tady GA blokovala 11 $\beta$ HSD2 aktivitu <sup>(201)</sup>. S podobnými nálezy se lze setkat i u některých adrenálních adenomů, kde byla zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2 zodpovědná za fenotypovou manifestaci adenomu <sup>(198)</sup>.

Ačkoliv byla zvýšená exprese 11 $\beta$ HSD2 dokumentována v mnoha tumorech, některé práce tato data nepotvrzují. V pracech s adrenálními a prsními tumory byla prokázána snížená exprese mRNA

---

11 $\beta$ HSD2 v nádorové tkáni <sup>(208-210)</sup> stejně jako v naší práci nebo imunostudii na střevním adenokarcinomu <sup>(77)</sup>.

Oproti snížení 11 $\beta$ HSD2 v nádorové tkáni byla hladina mRNA 11 $\beta$ HSD1 i její aktivita u některých pacientů zvýšena, stejně jak tomu bylo u některých adenomů produkujících kortisol nebo aldosteron <sup>(208,210)</sup>. Důvod této rozsáhlé variability v expresi 11 $\beta$ HSD1 mezi nádorovou a nenádorovou tkání těchto pacientů není znám. Jedním z vysvětlení mohou být i změny v nonepiteliálních buňkách stromatu nádoru. Je známo, že v kolon je 11 $\beta$ HSD2 lokalizována pouze v jeho epitelu, zatímco 11 $\beta$ HSD1 je v kolon exprimována v buňkách lamina propria a to v imunitních buňkách a fibroblastech <sup>(45,56,162)</sup>.

Svoji úlohu na široké variabilitě v expresi mRNA 11 $\beta$ HSD1 v nádorové tkáni může hrát i velikost vzorku, neboť vzorek neobsahoval čistě nádorovou tkáň, ale i okolní tkáň tumoru kolon. Jak bylo výše uvedeno, 11 $\beta$ HSD2 je ve zdravém střevu exprimována v jeho epitelu, stejně tak i v buněčných liniích karcinomu kolon jako jsou HT-29 a CaCo buňky byla prokázána exprese pouze tohoto typu enzymu 11 $\beta$ HSD. 11 $\beta$ HSD1 je v kolon lokalizována v buňkách lamina propria. Pokud vezmeme v úvahu fakt, že okolí tumoru provází in vivo zánětlivá reakce, může být důvodem rozdílné exprese mRNA 11 $\beta$ HSD1 mezi vzorky tumoru i rozdílná míra zánětlivé infiltrace v jeho okolí.

V okolní nenádorové tkáni byla u většiny vzorků prokázána velmi nízká aktivita 11 $\beta$ HSD1, což předpokládá nízkou aktivitu 11 $\beta$ HSD1 v kontrolní tkáni. Přítomnost 11 $\beta$ HSD1 ve většině vzorků nádorové tkáně naznačuje, že některé tumory jsou schopny produkovat glukokortikoidy, což by mohlo být předmětem dalších studií.

Význam 11 $\beta$ HSD1 během procesu buněčné diferenciaci byl prokázán na buněčné linii lidského osteoblastu SV-HFO. V těchto buňkách byla potvrzena přítomnost „molekulárního switche“, který kontroluje expresi a aktivitu 11 $\beta$ HSD1 a tak tvorbu prodiferenčně působícího kortisolu. Přítomnost exogenního, prodiferenčně působícího glukokortikoidu tlumí aktivitu 11 $\beta$ HSD1, zatímco absence exogenního glukokortikoidu indukovala expresi i aktivitu 11 $\beta$ HSD1. Jinak řečeno, 11 $\beta$ HSD1 usnadňuje diferenciaci a mineralizaci osteoblastů tím, že autokrinně ovlivňuje svojí reduktasovou aktivitu a tak tvorbu kortisolu v závislosti na stádiu diferenciaci buněk a lokální koncentraci glukokortikoidu <sup>(198)</sup>. Alterace tohoto mechanismu, který cestou 11 $\beta$ HSD1 významně ovlivňuje proces diferenciaci buněk, by tak mohl přispět k procesu tumorigeneze.

V mnoha tkáních jako jsou játra nebo plíce má 11 $\beta$ HSD1 pouze reduktasovou aktivitu, tedy zvyšuje koncentraci antiproliferačně působícího glukokortikoidu v buňkách, nicméně existují buňky, kde tomu tak není. Jako příklad lze uvést omentální preadipocyty, kde byla prokázána pouze dehydrogenasová aktivita, srovnatelná reduktasová i oxidasová aktivita byla nalezena např. v neuronálních buňkách,

---

Leydigových buňkách a v transfekovaných HEK buňkách <sup>(254-257)</sup>. Změna aktivity 11 $\beta$ HSD1 z dehydrogenasové na reduktasovou v průběhu vývoje omentálních preadipocytů na adipocyty je pravděpodobně autokrinním protektivním mechanismem, který díky změnám aktivity 11 $\beta$ HSD1 usnadňuje preadipocytům jejich proliferaci a následně pak zase maturaci. Změna reduktasové aktivity 11 $\beta$ HSD1 na dehydrogenasovou v průběhu maturace Leydigových buněk pravděpodobně brání inhibičnímu působení glukokortikoidů na produkci T-buněk.

Jak bylo výše uvedeno, srovnatelná oxidasová i reduktasová aktivita byla nalezena i v dalších buněčných systémech, avšak příčina tohoto posunu v aktivitě 11 $\beta$ HSD1 není známa. V úvahu přichází existence dalšího, třetího typu 11 $\beta$ HSD, avšak jeho existence v lidských tkáních dosud nebyla prokázána a studie na tkáňových kulturách tomu ani nenasvědčují <sup>(254)</sup>.

Vhodnějším vysvětlením se zdá dostupnost kofaktoru pro 11 $\beta$ HSD1. Poměr mezi mikrosomálním NADPH a NADP<sup>+</sup> je závislý na aktivitě enzymu hexosa-6-fosfát dehydrogenasy (H6PDH), která je stejně jako 11 $\beta$ HSD1 orientována do lumen endoplazmického retikula <sup>(30,258)</sup>. Vzájemná koexprese těchto enzymů tak zajišťuje dostatečné množství kofaktoru pro reduktasovou aktivitu 11 $\beta$ HSD1. Alterace dostupnosti kofaktoru cestou H6PDH by tak mohla přispět k převaze dehydrogenasové aktivity 11 $\beta$ HSD1 v buňkách a snížení lokální koncentrace antiproliferačně působícího glukokortikoidu, tedy mohla by být po 11 $\beta$ HSD2 dalším potencionálním „onkogenem“.

Dalším mechanismem, kterým by mohla 11 $\beta$ HSD1 ovlivnit proces tumorigeneze, je tvorba karboonylových derivátů, potencionálních karcinogenů, za které je zodpovědná reduktasová aktivita 11 $\beta$ HSD1 <sup>(212)</sup>. Nelze však opomenout, že 11 $\beta$ HSD1 patří k důležitým enzymům, které se uplatňují v procesu biotransformace mnoha látek zahrnující exogenní aldehydy, ketony a chinony. K alteraci detoxifikační kapacity 11 $\beta$ HSD1 vede řada faktorů zahrnující genetické faktory a faktory prostředí, interakce s exogenními a endogenními substráty nebo inhibitory jako jsou např. lékořice, karbenoxolon, dexamethason, furosemid nebo etanol. Mimo to provází deficitní aktivitu 11 $\beta$ HSD1 i řada chorob jako je např. hypertenze, chronické renální selhání, hypertyreóza nebo alkoholový excés. Alterace v aktivitě 11 $\beta$ HSD1 by tedy mohla vést k akumulaci pro organismus škodlivých látek. Např. chronická konzumace alkoholu usnadňuje karcinogenní působení NKK díky inhibičnímu působení etanolu na 11 $\beta$ HSD1 <sup>(259)</sup>.

Je otázkou, zda by 11 $\beta$ HSD1 nemohla ovlivnit neoplastický proces v tkáni kolon skrze PPAR $\gamma$  („peroxisome proliferator-activated receptors“). PPAR $\gamma$  jsou známy svými antiproliferativními, proapoptotickými a diferenciacními účinky, pro které jsou intenzivně studovány v rámci výzkumu protinádorové terapie. Exprese PPAR $\gamma$  je regulována i glukokortikoidy, jejichž účinek může modulovat 11 $\beta$ HSD1. Na tuko-

---

vých buňkách získaných z biopsií tukové tkáně diabetiků 2. typu bylo prokázáno, že exprese 11 $\beta$ HSD1 v tukové tkáni signifikantně korelovala s expresí PPAR $\gamma$  <sup>(260)</sup>.

Role PPAR $\gamma$  v neoplastickém procesu kolon je kontroverzní, neboť byl popsán jak supresní efekt PPAR $\gamma$  ligandu na střevní tumor <sup>(261)</sup>, tak stimulační působení PPAR $\gamma$  agonisty na proces kancerogeneze u karcinomu kolon <sup>(262)</sup>. Studie s agonistou PPAR $\gamma$  troglitazonem prokázala, že troglitazon indukoval střevní tumor nejen na kmenu myši s genetickou dispozicí k střevnímu karcinomu, ale zároveň i u myši bez genetické predispozice k nádorovému bujení <sup>(263)</sup>, což jasně prokazuje význam PPAR $\gamma$  v nádorovém procesu karcinomu kolon.

Lze shrnout, že změna aktivity 11 $\beta$ HSD1 a s tím související i koncentrace aktivního glukokortikoidu v tkáni by mohla ovlivňovat expresi PPAR $\gamma$  a následně i potencionální nádorový proces.

Ve vzorcích nádorové tkáně bylo prokázáno, že ve většině vzorků dochází k omezenému odbourávání kortikoidů a v některých tumorech k zvýšení tvorby kortisolu z jejich 11-keto derivátů, což znamená, že v nádorové tkáni je zvýšená lokální koncentrace aktivního kortikoidu oproti nenádorové tkáni. Tato data nepodporují hypotézu, v které je 11 $\beta$ HSD2 uváděna jako potencionální onkogen, naopak dokumentují možnou spojitost tumorogeneze s redukcí 11 $\beta$ HSD2 a zvýšením 11 $\beta$ HSD1 <sup>(208,209,210)</sup>.

Nelze vyloučit, že tyto změny v lokálním metabolismu glukokortikoidů přispívají k procesu tumorogeneze. Jak bylo výše uvedeno, mikroprostředí tumoru potencuje nádorový proces díky produkci četných stromálních proteinů a faktorů růstu a angiogeneze, a je známo, že některé z těchto proteinů jsou regulovány glukokortikoidy <sup>(264,264)</sup>.

Lze tedy shrnout, že kolorektální karcinom doprovází snížení 11 $\beta$ HSD2, tedy v nádorové tkáni dochází k sníženému odbourávání aktivního glukokortikoidu. Naproti tomu aktivita a exprese 11 $\beta$ HSD1 byla zvýšena pouze v některých vzorcích. Vzhledem k tomu, že tento typ enzymu je exprimován v nonepiteliálních buňkách stromatu, mohou zde vytvořené steroidy hrát roli při rozvoji nádoru.

---

## 7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo přispět k osvětlení problematiky prereceptorového metabolismu glukokortikoidů u zánětlivých chorob střevních a střevního karcinomu. Vzhledem k tomu, že glukokortikoidy hrají významnou úlohu v patogenezi a léčbě obou chorob, mohla by alterace lokálního metabolismu glukokortikoidů cestou 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy přispět k bližšímu objasnění patogeneze obou chorob a eventuelně i k jejich terapii. V práci byly řešeny tyto otázky:

### 1) Dochází u pacientů s ulcerosní kolitidou v postiženém kolon ke změnám v lokálním metabolismu kortikoidů a změnám exprese obou typů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy?

V bioptických vzorcích kolon pacientů s diagnosou ulcerosní kolitidy byla prokázána exprese obou typů enzymů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy. Exprese obou typů enzymů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy byla stejně tak prokázána i v biopsiích kontrolní skupiny vzorků obsahující zdravou tkáň kolon.

Expresce mRNA 11 $\beta$ HSD1 byla v zánětlivě změněném kolon pacientů s ulcerosní kolitidou signifikantně vyšší oproti expresi 11 $\beta$ HSD1 v kontrolní zdravé tkáni kolon. Naproti tomu exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2 byla vyšší v kontrolních vzorcích zdravého kolon než ve vzorcích pacientů s ulcerosní kolitidou. Hladiny mRNA 11 $\beta$ HSD1 a 11 $\beta$ HSD2 u pacientů s ulcerosní kolitidou, kteří byli léčeni prednisonem, se nacházely uvnitř intervalu skupiny naměřených hodnot získaných z bioptických vzorků pacientů s ulcerosní kolitidou neléčených kortikoidy.

Hodnoty exprese mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  byly signifikantně zvýšeny v tkáni kolon pacientů s ulcerosní kolitidou oproti tkáni kontrolní.

Lze shrnout, že ulcerosní kolitida je doprovázena zvýšením exprese 11 $\beta$ HSD1 a snížením exprese 11 $\beta$ HSD2 v tkáni zánětlivě změněného kolon.

### 2) Jsou změny v lokálním metabolismu kortikosteroidů u pacientů s ulcerosní kolitidou porovnatelné s modely experimentálních zvířecích kolitid?

Ke studiu nespecifických střevních zánětů byly vytvořeny dva modely experimentálních zvířecích kolitid, konkrétně model kolitidy s kyselinou trinitrobenzensulfonovou (TNBS) a model dextransulfátové kolitidy (DSS). Tyto dva modely byly zvoleny vzhledem k tomu, že každý z nich reprezentuje jeden z nespecifických střevních zánětů. TNBS kolitida simuluje některé znaky Crohnovy choroby, zatímco DSS kolitida ulcerosní kolitidy. U obou modelů došlo při indukci zánětu k signifikantnímu zvýšení aktivity enzymu myeloperoxidasy, který je ukazatelem tíže zánětu.

---

Expresí mRNA 11 $\beta$ HSD1 byla u obou modelů kolitid signifikantně vyšší oproti expresi mRNA 11 $\beta$ HSD1 v kontrolní tkáni, zatímco expresí mRNA 11 $\beta$ HSD2 byla zvýšena ve zdravé tkáni oproti zánětlivě změněnému kolon obou modelů kolitid. Regresní analýza neprokázala signifikantní korelaci mezi expresí mRNA 11 $\beta$ HSD1 a mRNA 11 $\beta$ HSD2 v zánětlivě změněném kolon. Tato data naznačují, že mezi zvýšenou expresí 11 $\beta$ HSD1 a sníženou expresí 11 $\beta$ HSD2 neexistuje jednoduchý vztah, pravděpodobně protože 11 $\beta$ HSD2 je exprimována pouze v kolonocytech.

Abychom zjistili, zda změny aktivity a exprese obou typů 11 $\beta$ HSD vytvořených modelů kolitid spolu korelují, byla aktivita 11 $\beta$ HSD měřena v tkáňových řezech. V obou modelech i zdravé tkáni byla nalezena oxidasová i reduktasová aktivita 11 $\beta$ HSD, avšak v zánětlivém kolon dominovala reduktasová, charakterizující aktivitu 11 $\beta$ HSD1, oproti zdravému kolon, kde byla zvýšena oxidasová aktivita, vyjadřující aktivitu 11 $\beta$ HSD2.

Stejně jako u exprese mRNA 11 $\beta$ HSD nebyla zaznamenána korelace mezi oxidasovou a reduktasovou aktivitou v zánětlivém kolon.

Lze shrnout, že oba modely jsou doprovázeny zvýšením aktivity i exprese 11 $\beta$ HSD1 a snížením aktivity a exprese 11 $\beta$ HSD2, což koreluje s nálezy u pacientů s ulcerózní kolitidou.

### **3) Dochází u pacientů se střevními tumory ke změnám v lokálním metabolismu kortikoidů a změnám exprese obou typů 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy oproti „zdravé“ tkáni?**

Aktivita i exprese obou typů 11 $\beta$ HSD byla měřena ve vzorcích tumoru a okolní nenádorové tkáni získaných z operačních resektátů pacientů s diagnosou adenokarcinomu kolon.

Expresí mRNA 11 $\beta$ HSD2 byla signifikantně vyšší v kontrolní tkáni oproti tkáni tumoru. Se změnami exprese mRNA 11 $\beta$ HSD2 korelovala i aktivita tohoto typu enzymu, která byla vyšší ve zdravé tkáni oproti tkáni nenádorové.

Expresí mRNA 11 $\beta$ HSD1 byla detekována ve všech vzorcích, nicméně tato expresí se mezi pacienty lišila. V porovnání s nenádorovou tkáni byla v nádorové tkáni expresí 11 $\beta$ HSD1 v některých vzorcích zvýšena, u jiných nezměněna nebo mírně snížena. Aktivita 11 $\beta$ HSD1 v kontrolní nenádorové tkáni byla nedetekovatelná nebo velmi nízká, zatímco v nádorové tkáni byla významně zvýšena v některých tumorosních vzorcích.

Lze shrnout, že v tkáni adenokarcinomu kolon dochází k významnému snížení aktivity i exprese 11 $\beta$ HSD2, zatímco expresí a aktivita 11 $\beta$ HSD1 je v některých vzorcích zjevně zvýšena.

---

## 8. LITERATURA

1. A. Munck, A. Naray-Fejes-Toth, The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1992; 90: C1-C4
2. K.E. Sheppard, Corticosteroid receptors, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the heart. *Vitamins and Hormones* 2003; 66: 77-112
3. K. Hierhorzer, H. Buhler, Metabolism of cortical steroid hormones and general mode of action. V:R. Greger, U. Windhorst (Eds.), *Comprehensive Human Physiology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996, 403-429
4. U. Oppermann, Type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase as Universal Drug Target in Metabolic Diseases?. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets* 2006; 6:259-269
5. A.J. Cleare, P.N. Prinz, S.L. Bailey, D.L. Woods, B. Shobitz, J.M. Reul, F. Holsboer, A. Peters, U. Schweiger, L. Pellerin, C. Hubold, K.M. Oltmanns, M. Conrad, B. Schultes, J. Born, H.L. Fehm, The Neuroendocrinology of Chronic Fatigue Syndrome. *Endocrine Reviews* 2003; 24: 236-252
6. J.W. Tomlinson, P.M. Stewart, Cortisol metabolism and role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 15: 61-78
7. P.M. Stewart, Z.S. Krozowski, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and hormones* 1999; 57:249-324
8. J.M. Joyner, L.J. Hutley, A.W. Bachmann, D.J. Torpy, J.B. Prins, Greater replication and differentiation of preadipocytes in inherited corticosteroid-binding globulin deficiency. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 2003; 284: E1049 - E1054.
9. P. Barat, M. Duclos, B. Gatta, P. Roger, P. Mormede, M.P. Moisan, Corticosteroid Binding Globulin Gene Polymorphism Influences Cortisol Driven Fat Distribution in Obese Women. *Obesity Research* 2005; 13: 1485-1490.
10. S. Silbernagl, A. Despopoulos, *Atlas fyziologie člověka*, 6. vydání, 2004, s.278
11. M.A. Carson-Jurica, W.T. Schrader, B.O. Malley, Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews* 1990; 11:201-220
12. J.P. Landers, T.C. Spelsberg, New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 1992; 2:19-63
13. M. Truss, M. Beato, Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors, *Endocrine Reviews* 1993; 14:459-479
14. D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, et al., The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995; 83: 835-839
15. T.H.J. Florin, Resistance to glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18:613
16. F. Labrie, V. Luu-The, S.X. Lin, J. Simard, C. Labrie, M. El-Alfy, G. Pelletier, A. Belanger, Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25:1-16
17. V. Lakshmi, C. Monder, Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta- dehydrogenase component of the rat liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology* 1988; 123: 2390 - 2398.
18. C.R.W. Edwards, D. Burt, M.A. McIntyre, E.R. De Kloet, P.M. Stewart, L. Brett, W.S. Sutanto, C. Monder, Localization of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase - tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988; 2:986-989



- 
19. H. Jornvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalezduarte, J. Jeffery, D. Ghosh, Short-chain dehydrogenases reductases (SDR). *Biochemistry* 1995; 34:6003-6013
  20. B. Persson, J. Hallborn, M. Walfridsson, B. Hahn-Hägerdal, S. Keränen, M. Penttilä, H. Jörnvall, Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. *FEBS Letters* 1993; 324:9-14
  21. U.C.T. Oppermann, Ch. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions* 2003 ; 143-144:247-253
  22. A.L. Albiston, V.R. Obeyesekere, R.E. Smith, Z.S. Krozowski, Cloning and tissue distribution of the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994; 105:R11-R17
  23. G. M. Tannin, A.K. Agarwal, C. Monder, M.I. New, P.C. White, The human gene for 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:16653-16658
  24. T.C. Sandeep, B.R. Walker, Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2001; 12:446-453
  25. J.W. Tomlinson, E.A. Walker, I.J. Bujalska, N. Draper, G.G. Lavery, M.S. Cooper, M. Hewison, P.M. Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1:A Tissue - Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews* 2004, 25: 831-866.
  26. P.M. Jamieson, K.E. Chapman, C.R. Edwards, J.R. Seckl, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 1995; 136: 4754 - 4761.
  27. E.A. Walker, A.M. Clark, M. Hewison, J.P. Ride, P.M. Stewart, Functional Expression, Characterization, and Purification of the Catalytic Domain of Human 11- Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 21343 – 21350
  28. Y. Kotelevtsev, M.C. Holmes, A. Burchell, P.M. Houston, D. Schnoll, P. Jamieson, R. Best, R. Brown, C.R. Edwards, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type –1 knockout mice show attenuated glucocorticoid –inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94:14924-14929
  29. R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi , Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB Journal* 1994; 8: 174-181.
  30. J. Ozols, Lumenal Orientation and Post-translational Modifications of the Liver Microsomal 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 2305 - 2312
  31. K. Kimura, H. Endou, J. Sudo, F. Sakai, Glucose dehydrogenase (hexose 6-phosphate dehydrogenase) and microsomal electron transport system. Evidence supporting their possible functional relationship. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 1979; 85:319-326
  32. P.J. Mason, D. Stevens, A. Diez, S.W. Knight, D.A. Scopes, T.J. Vulliamy, Human Hexose-6-phosphate Dehydrogenase (Glucose 1-Dehydrogenase) Encoded at 1p36: Coding Sequence and Expression. *Blood Cells Molecules and Diseases* 1999; 25:30-37
  33. J.P. Bonvalet, I. Doignon, M. Blot-Chabaud, P. Pradelles, N. Farman, Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rabbit nephron. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 86: 832–837
  34. E. Rusvai, A. Naray-Fejes-Toth, A new isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:10717-10720
  35. R.W. Brown, K.E. Chapman, C.R.W. Edwards, J.R. Seckl, Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase : Evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 1993; 132: 2614 - 2621.
-

- 
36. R.W. Brown, K.E. Chapman, P. Murad, Ch.R.W. Edwards, J. R. Seckl, Purification of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 from human placenta utilizing a novel affinity labelling technique. *Biochemical Journal* 1996; 313:997–1005
  37. A.K. Agarwal, F.M. Rogerson, T. Mune, P.C. White, Gene Structure and Chromosomal Localization of the Human HSD11K Gene Encoding the Kidney (Type 2) Isozyme of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Genomics* 1995; 29:195-199
  38. A. Náray-Fejes-Tóth, G. Fejes-Tóth, Subcellular Localization of the Type 2 11-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase. A green fluorescent protein study. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:15436-15442
  39. C.B. Whorwood, J.I. Mason, M.L. Ricketts, A.J. Howie, P.M. Stewart, Detection of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms using reverse-transcriptase-polymerase chain reaction and localization of the type 2 isoform to renal collecting ducts. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994; 105:R7-R12.
  40. Z.S. Krozowski, J.A. Maguire, A.N. Stein-Oakley, J. Dowling, R.E. Smith, R.K. Andrews, Immunohistochemical localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80:2203-2209.
  41. G. Hirasawa, H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima, T. Suzuki, N. Hiwatashi, T. Toyota, Z.S. Krozowski, H. Nagura, Colocalization of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type II and Mineralocorticoid Receptor in Human Epithelia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82:3859-3863.
  42. S. Teelucksingh, A.D.R. Mackie, D. Burt, C.R.W. Edwards, M.A. McIntyre, L. Brett, Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetic acid. *Lancet* 1990; 335:1060-1063
  43. R.E. Smith, P.J. Little, J.A. Maguire, A.N. Stein-Oakley, Z.S. Krozowski, Vascular localization of the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1996; 23:549-551
  44. B.R. Walker, A.A. Connacher, D.J. Webb, C.R. Edwards, Glucocorticoids and blood pressure: a role for the cortisol/cortisone shuttle in the control vascular tone in man. *Clinical Science* 1992; 83:171-178
  45. R.E. Smith, J.A. Maguire, A.N. Stein-Oakley, H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima, Z.S. Krozowski, Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3244-3248.
  46. A. Odermatt, P. Arnold, F.J. Frey, The Intracellular Localization of the Mineralocorticoid Receptor Is Regulated by 11-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:28484 - 28492
  47. E.H. Rabbitt, G.G. Lavery, E.A. Walker, M.S. Cooper, P.M. Stewart, M. Hewison, Prereceptor regulation of glucocorticoid action by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a novel determinant of cell proliferation. *FASEB Journal* 2002; 16:36-44
  48. C. Monder, V. Lakshmi, Evidence for kinetically distinct forms of corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase in rat liver microsomes. *Journal of Steroid Biochemistry* 1989; 32:77-83
  49. C.B. Whorwood, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, Licorice inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action. *Endocrinology* 1993; 132: 2287- 2292
  50. P.M. Stewart, B.A. Murry, J.I. Mason, Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79:480-484.
  51. Y.D. Zhang, B. Lorenzo, M.M. Reidenberg, Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase obtained from guinea pig kidney by furosemide, naringenin and some other compounds. *Journal of Steroid Biochemistry* 1994; 49:81-85
  52. H. Bühler, F.H. Perschel, R. Fitzner, K. Hierholzer, I. Lichtenstein, H. Siebe, Endogenous inhibitors of 11 $\beta$ -HSD: Existence and possible significance. *Steroids* 1994; 59:131-135
-

- 
53. P. Ferrari, R. E. Smith, J. W. Funder, Z.S. Krozowski, Substrate and inhibitor specificity of the cloned human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoform. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 1996; 270:E900- E904
  54. T.M. Penning, Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Human Reproduction Update* 2003; 9:193-205
  55. T. Barf, J. Vallgård, R. Emond, C. Häggström, G. Kurz, A. Nygren, V. Larwood, E. Mosialou, K. Axelsson, R. Olsson, L. Engblom, N. Edling, Y. Rönquist-Nii, B. Ohman, P. Alberts, Arylsulfonamido-thiazoles as a new class of potential antidiabetic drugs. Discovery of potent and selective inhibitors of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45:3813-5
  56. A. Hermanowski-Vosatka, J.M. Balkovec, K. Cheng, H.Y. Chen, M. Hernandez, G.C. Koo, Ch.B. Le Grand, Z. Li, J.M. Metzger, S.S. Mundt, H. Noonan, Ch.N. Nunes, S.H. Olson, B. Pikounis, N. Ren, N. Robertson, J.M. Schaeffer, K. Shah, M.S. Springer, A.M. Strack, M. Strowski, K.Wu, T. Wu, J. Xiao, B.B. Zhang, S.D. Wright, R. Thieringer, 11 $\beta$ -HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202:517-527.
  57. X. Gu, J. Dragovic, G.C. Koo, S.L. Koprak, Ch. Le Grand, S.S. Mundt, K. Shah, M.S. Springer, E.Y. Tan, R. Thieringer, Discovery of 4-heteroaryl bicyclo[2.2.2]octyl triazoles as potent and selective inhibitors of 11 $\beta$ -HSD1: Novel therapeutic agents for the treatment of metabolic syndrome. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15:5266- 5269
  58. C.B. Whorwood, J.A. Franklyn, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, Tissue localization of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1992; 41:21-28
  59. M.L. Ricketts, J.M. Verhaeg, I.J. Bujalska, A.J. Howie, W.E. Rainey, P.M. Stewart, Immunohistochemical Localization of Type 1 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83:1325-1335
  60. F.J. Frey, G. Escher, B.M. Frey, Pharmacology of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 1994; 54:74-79
  61. T.Y. Zhang, X. Ding, R.A. Daynes, The Expression of 11beta -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I by Lymphocytes Provides a Novel Means for Intracrine Regulation of Glucocorticoid Activities. *Journal of Immunology* 2005; 174:879-889.
  62. Z. Zhou, C.H. L. Shackleton, S. Pahwa, P.C. White, P.W. Speiser, Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 138:61-69
  63. L. Freeman, M. Hewison, S.V. Hughes, K.N. Evans, D. Hardie, T.K. Means, R. Chakraverty, Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood* 2005; 106 :2042-2049
  64. A.M. Nuotio-Antar, A.H. Hasty, W.J. Kovacs, Quantitation and cellular localization of 11 $\beta$ -HSD1 expression in murine thymus. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006; 99:93-99
  65. T. Ishii, H. Masuzaki, T. Tanaka, N. Arai, S. Yasue, N. Kobayashi, T. Tomita, M. Noguchi, J. Fujikura, K. Ebihara, Augmentation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages – Role of 11 $\beta$ -HSD1 in pro-inflammatory properties in macrophages. *FEBS Letters* 2007; 581:349-354
  66. C.B. Whorwood, P.C. Barber, J. Gregory, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in the rat colon. *American Journal of Physiology : Endocrinology and Metabolism* 1993; 264:E951- E957
  67. V. Lakshmi, N. Nath, O. Muneyyirci-Delale, Characterization of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: Evidence for the existence of two species of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1993; 45:391-397
  68. S. Hundertmark, H. Buhler, V. Ragosch, L. Dinkelborg, B. Arabin, H.K. Weitzel, Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in the fetal lung. *Endocrinology* 1995; 136: 2573 - 2578.
-

- 
69. I.J. Bujalska, S. Kumar, P.M. Stewart, Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 1997; 349:1210-1213
  70. I.J. Bujalska, S. Kumar, M. Hewison, P.M. Stewart, Differentiation of Adipose Stromal Cells: The Roles of Glucocorticoids and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology* 1999; 140: 3188 – 3196
  71. C.B. Whorwood, M.L. Ricketts, P.M. Stewart, Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon [published erratum appears in *Endocrinology* 1995; 136:1774]. *Endocrinology* 1994; 135:2533 - 2541.
  72. R. Levitan, F.J. Ingelfinger, Effect of *d*-Aldosterone on Salt and Water Absorption from the Intact Human Colon. *Journal of Clinical Investigation* 1965; 44:801- 808
  73. G.I. Sandle, H.J. Binder, Corticosteroids and intestinal ion transport. *Gastroenterology* 1987; 93:188-196
  74. K. Hierholzer, H. Siebe, M. Fromm, Inhibition of 11-hydroxysteroid dehydrogenase and its effect on epithelial sodium transport. *Kidney International* 1990; 38:673-678
  75. K. Mazancová, M. Kučka, I. Mikšík, J. Pácha, Glucocorticoid metabolism and Na<sup>+</sup> transport in chicken intestine. *Journal of Experimental Zoology Part A : Comparative Experimental Biology* 2005; 303:113-122
  76. J. Pácha, I. Mikšík, Distribution of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase along the rat intestine. *Life Science* 1994; 54:745-749
  77. K. Takahashi, H. Sasano, K. Fukushima, G. Hirashawa, H. Miura, I. Sasaki, S. Matsuno, Z.S. Krozowski, H. Nagura, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human colon: a new marker of fetal development and differentiation in neoplasms. *Anticancer Research* 1998; 18:3381-8
  78. R. Benediktsson, A.A. Calder, Ch.R.W. Edwards, J.R. Seckl, Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical Endocrinology* 1997; 46:161-166
  79. M. Shams, M.D. Kilby, D.A. Somerset, A..J. Howie, A. Gupta, P.J. Wood, M. Afnan, P.M. Stewart, 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Human Reproduction* 1998; 13: 799-804
  80. K.M. Kayes-Wandover, P.C. White, Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 2519-2525
  81. J.P. Bonvalet, N. Afaidy, N. Farman, M. Lombes, Aldosterone: Intracellular receptors in human heart. *European Heart Journal* 1995; 16, Suppl.N :92-97
  82. M. Lombès, N. Alfaidy, E. Eugene, A. Lessana, N. Farman, J.P. Bonvalet , Prerequisite for Cardiac Aldosterone Action : Mineralocorticoid Receptor and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Human Heart. *Circulation* 1995; 92:175-182
  83. S.H. Slight, V.K. Ganjam, C.E. Gómez-Sánchez, M.Y. Zhou, K.T. Weber, High Affinity NAD<sup>+</sup>-dependent 11 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase in the Human Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1996; 28:781-786
  84. S.H. Slight, J. Joseph, V.K. Ganjam, K.T. Weber, Extra-adrenal Mineralocorticoids and Cardiovascular Tissue. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999, 31:1175-1184
  85. M.J. Young, J.W. Funder, The renin-angiotensin-aldosterone system in experimental mineralocorticoid-salt-induced cardiac fibrosis. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 1996; 271: E883-8.
  86. E.P. Gomez-Sanchez, M.T. Venkataraman, D. Thwaites, C. Fort, ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 1990; 258: E649-653
  87. M.Young, M. Fullerton, R. Dilley, J. Funder, Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 2578-2583
  88. A.S. Brem, R.B. Bina, T.C. King, D.J. Morris , Localization of 2 11 $\beta$ -OH Steroid Dehydrogenase Isoforms in Aortic Endothelial Cells. *Hypertension* 1998; 31:459- 462
-

- 
89. B.R. Walker, J.L. Yau, L.P. Brett, J.R. Seckl, C. Monder, B.C. Williams, C.R. Edwards, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: implications for cardiovascular responses to glucocorticoids. *Endocrinology* 1991; 129: 3305-3312
  90. Y. Takeda, I. Miyamori, T. Yoneda, H. Hatakeyama, K. Iki, R. Takeda, Decreased activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive rats. *Life Science* 1994; 54:1343-1349
  91. F. Ruschitzka, T. Quaschnig, G. Noll, A. de Gottardi, M.F. Rossier, F. Enseleit, D. Hürlimann, T.F. Lüscher, S.G. Shaw, Endothelin 1 type a receptor antagonism prevents vascular dysfunction and hypertension induced by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition: role of nitric oxide. *Circulation* 2001; 103:3129-35
  92. M. Pirpiris, K. Sudhir, S. Yeung, G. Jennings, J.A. Whitworth, Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans. *Hypertension* 1992; 19, 567-574
  93. B.R. Walker, B.C. Williams, Corticosteroids and vascular tone: mapping the messenger maze. *Clinical Science* 1992; 82: 597–605
  94. M.Quinkler, P.M.Stewart, Hypertension and the Cortisol-Cortisone Shuttle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 88:2384-2392
  95. S. Ulick, L.S. Levine, P. Gunczler, G. Zanonato, L.C. Ramirez, W. Rauh, A. Rosler, H.L. Bradlow, M.I. New, A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1979; 49: 757-764.
  96. P. Ferrari, V.R. Obeyesekere, K. Li, R.C. Wilson, M.I. New, J.W. Funder, Z.S. Krozowski, Point mutations abolish 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II activity in three families with the congenital syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996; 119:21-24
  97. T. Mune, P.C. White, Apparent mineralocorticoid excess: genotype is correlated with biochemical phenotype. *Hypertension* 1996; 27:1193-1199
  98. S. Dave-Sharma, R.C. Wilson, M.D. Harbison, R. Newfield, M.R. Azar, Z.S. Krozowski, J.W. Funder, C.H.L. Shackleton, H.L. Bradlow, J.Q. Wei, J. Hertecant, A. Moran, R.E. Neiberger, J.W. Balfe, A. Fattah, D. Daneman, H.I. Akkurt, C. De Santis, M.I. New, Examination of Genotype and Phenotype Relationships in 14 Patients with Apparent Mineralocorticoid Excess. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2244 – 2254
  99. P.C. White, T. Mune, A.K. Agarwal, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and the Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess. *Endocrine Reviews* 1997; 18:135- 156.
  100. P. Ferrari, E. Lovati, F.J. Frey, The role of the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Journal of Hypertension* 2000; 18:241-248
  101. D.V. Milford, C.H. Shackleton, P.M.Stewart, Mineralocorticoid hypertension and congenital deficiency of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in family with syndrom of “apparent mineralocorticoid excess”. *Clinical Endocrinology* 1995; 43:241-246
  102. A. Moudgil, G. Rodich, S.C. Jordan, E.S. Kamil, Nephrocalcinosis and renal cysts associated with apparent mineralocorticoid excess syndrome. *Pediatric Nephrology* 2000; 15: 60-62
  103. P.M. Stewart, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: implications for clinical medicine. *Clinical Endocrinology* 1996; 44:493-499
  104. M.C. Riddle, P.A. McDaniel, Renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is enhanced by ramipril and captopril. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 78:830 - 834.
  105. M. Palermo, M. Cossu, C.H. Shackleton, Cure of apparent mineralocorticoid excess by kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* 1998; 339:1787-1788
  106. I.J. Bujalska, M. Shimojo, A. Howie, P.M. Stewart, Human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: Studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue. *Steroids* 1997; 62:77-82
-

- 
107. J.A. Molhuysen, J. Gerbrandy, L.A. De Vries, J.C. De Jong, J.B. Lenstra, K.P. Turner, A liquorice extract with deoxycortone-like action. *Lancet* 1950; 23: 381-386
  108. D. Armanini, I. Karbowski, J.W. Funder, Affinity of liquorice derivatives for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Clinical Endocrinology* 1983; 19:609-612
  109. C. Monder, P.M. Stewart, V. Lakshmi, R. Valentino, D. Burt, C.R.W. Edwards, Licorice inhibits corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 1989; 125:1046-53.
  110. Y. Kageyama, H. Suzuki, T. Saruta, Glycyrrhizin induces mineralocorticoid activity through alterations in cortisol metabolism in the human kidney. *Journal of Endocrinology* 1992; 135:147-152
  111. M. Bernardi, P.E. D'Intino, F. Trevisani, G. Cantelli-Forti, M.A. Raggi, E. Turchetto, G. Gasbarrini, Effects of prolonged ingestion of graded doses of licorice by healthy volunteers. *Life Sci* 1994; 55:863-872.
  112. M.T. Epstein, E.A. Espiner, R.A. Donald, H. Hughes, R.J. Cowles, S. Lun, Licorice raises urinary cortisol in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1978; 47:397-400
  113. M.A. MacKenzie, W.H. Hoefnagels, R.W. Jansen, T.J. Benraad, P.W. Kloppenborg, The influence of glycyrrhetic acid on plasma cortisol and cortisone in healthy young volunteers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 70:1637 – 1643
  114. P.M. Stewart, A.M. Wallace, R. Valentino, D. Burt, C.H. Shackleton, C.R.W. Edwards, Mineralocorticoid activity of liquorice: 11 beta-dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet* 1987; 2:821-824
  115. M. Quinkler, S. Johansen, C. Großmann, V. Bähr, M. Müller, W. Oelkers, S. Diederich, Progesterone Metabolism in the Human Kidney and Inhibition of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 by Progesterone and Its Metabolites. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84:4165 - 4171
  116. E. Schoof, M. Girstl, W. Frobenius, M. Kirschbaum, H.G. Dörr, W. Rascher, J. Dötsch, Decreased Gene Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase in Human Placenta of Patients with Preeclampsia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 1313 - 1317.
  117. P. Heilmann, E. Buchheim, J. Wacker, R. Ziegler, Alteration of the Activity of the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Pregnancy: Relevance for the Development of Pregnancy-Induced Hypertension?. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 5222- 5226
  118. R.S. Ahima, J.S. Flier, Leptin. *Annual Review Physiology* 2000; 62: 413 - 437
  119. A.J. Vidal - Puig, R.V. Considine, M. Jimenez-Liñan, A. Werman, W.J. Pories, J.F. Caro, J.S. Flier, Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 2416 – 2422
  120. M. Ottosson, K. Vikman-Adolfsson, S. Enerback, G. Olivecrona, P. Bjorntorp, The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79: 820 - 825.
  121. B.G. Slavin, J.M. Ong, P.A. Kern, Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *Journal of Lipid Research* 1994; 35:1535 - 1541.
  122. R. Fraser, M.C. Ingram, N.H. Anderson, C. Morrison, E. Davies, J.M.C. Connell, Cortisol Effects on Body Mass, Blood Pressure, and Cholesterol in the General Population. *Hypertension* 1999; 33:1364 -1368
  123. H. Masuzaki, J. Paterson, H. Shinyama, N.M. Morton, J.J. Mullins, J.R. Seckl, J.S. Flier, A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science* 2001; 294: 2166 - 2170
  124. J.W. Tomlinson, J. Moore, M.S. Cooper, I.J. Bujalska, M. Shahmanesh, C. Burt, A. Strain, M. Hewison, P.M. Stewart, Regulation of Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Adipose Tissue: Tissue-Specific Induction by Cytokines. *Endocrinology* 2001; 142: 1982 - 1989.
-

- 
125. B.R. Walker, A.A. Connacher, R.M. Lindsay, D.J. Webb, C.R. Edwards, Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80: 3155 - 3159.
  126. R.C. Andrews, O. Rooyackers, B.R. Walker, Effects of the 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibitor Carbenoxolone on Insulin Sensitivity in Men with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 285 - 291.
  127. N.M. Morton, M.C. Holmes, C. Fiévet, B. Staels, A. Tailleux, J.J. Mullins, J.R. Seckl, Improved Lipid and Lipoprotein Profile, Hepatic Insulin Sensitivity, and Glucose Tolerance in 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Null Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 41293-41300
  128. J. Berger, M. Tanen, A. Elbrecht, A. Hermanowski-Vosatka, D.E. Moller, S.D. Wright, R. Thieringer, Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Ligands Inhibit Adipocyte 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression and Activity. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 12629-12635
  129. R.A. Daynes, D.C. Jones, Emerging roles of PPARs receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 748 – 759
  130. N.F. Taylor, W.A. Barlett, D.J. Davson, Cortisone reductase deficit: evidence for a new inborn error in metabolism of adrenal steroids. *Journal of Endocrinology* 1984; 102S: 89
  131. M.W. Savage, R.N. Barton, T.L. Dornan, A.J. Robins, N.F. Taylor, Increased metabolic clearance of cortisone to cortisol. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1985; 22: 435 - 436
  132. G. Phillipov, M. Palermo, C.H.L. Shackleton, Apparent cortisone reductase deficiency: a unique form of hypercortisolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 3855-3860
  133. A. Biason-Lauber, S.L. Suter, C.H.L. Shackleton, M. Zachmann, Apparent Cortisone Reductase Deficiency: A Rare Cause of Hyperandrogenemia and Hypercortisolism. *Hormone Research* 2000; 53: 260 - 266
  134. A. Jamieson, A.M. Wallace, R. Andrew, B.S. Nunez, B.R. Walker, R. Fraser, P.C. White, J.M.C. Connell, Apparent Cortisone Reductase Deficiency: A Functional Defect in 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 3570 - 3574.
  135. N. Draper, P.M. Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *Journal of Endocrinology* 2005; 186: 251 – 271
  136. H. Nikkila, G.M. Tannin, M.I. New, N.F. Taylor, G. Kalaitzoglou, C. Monder, P.C. White, Defect in the 11HSD11 gene encoding 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase are not found in patients with apparent mineralocorticoid excess or 11-oxoreductase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 77:687 – 691
  137. A. Nordenström, C. Marcus, M. Axelson, A.Wedell, E.M. Ritzén, Failure of Cortisone Acetate Treatment in Congenital Adrenal Hyperplasia because of Defective 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Reductase Activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 1210 - 1213.
  138. T. Wilckens, Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences* 1995; 16:193-7
  139. T. Wilckens, R. De Rijk, Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunology Today* 1997; 18:418-24
  140. B.S. McEwen, Ch.A. Biron, K.W. Brunson, K. Bulloch, W.H. Chambers, F.S. Dhabhar, R.H. Goldfarb, R.P. Kitson, A.H. Miller, R.L. Spencer, The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews* 1997; 23:79-133
  141. P.J. Barnes, Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 1998; 94:557-572
  142. A.E. Barber, S.M. Coyle, M.A. Marano, E. Fischer, S.E. Calvano, Y. Fong, L.L. Moldawer, S.F. Lowry, Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *Journal of Immunology* 1993; 150: 1999 - 2006.
  143. G.P. Chrousos, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England Journal of Medicine* 1995; 332: 1351- 62
-

- 
144. T. Rhen, J.A. Cidlowski, Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* 2005; 353:1711-23
  145. G.J. Wieggers, G. Croiset, J.M. Reul, F. Holsboer, E. R. de Kloet, Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 1993; 265: E825 - E830
  146. K.E. Chapman, J.S. Gilmour, A.E. Coutinho, J.S. Savill, J.R. Seckl, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 - A role in inflammation? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 248: 3-8
  147. M.P. Yeager, P.M. Guyre, A.U. Munck, Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2004; 48:799-813
  148. A. Rot, Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunology Today* 1992; 13:291-4
  149. F.F. Davidson, E.A. Dennis, Biological relevance of lipocortins and related proteins as inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemical Pharmacology* 1998; 38:3645-3651
  150. D.K. Sorenson, T.M. Kelly, D.K. Murray, D.H. Nelson, Corticosteroids stimulate an increase in phospholipase A2 inhibitor in human serum. *Journal of Steroid Biochemistry* 1998; 29: 271-3
  151. C. Haslett, Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 160: S5-S11
  152. M. Botto, Ch. Dell' Agnola, A.E. Bygrave, E.M. Thompson, H.T. Cook, F. Petry, M. Loos, P.P. Pandolfi, M. J. Walport, Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nature Genetics* 1998; 19:56-59
  153. V.A. Fadok, D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, P.M. Henson, Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 890-898
  154. L.C. Meagher, J.S. Savill, A.Baker, R.W. Fuller, C. Haslett, Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B<sub>2</sub>. *Journal of Leukocyte Biology* 1992; 52:269-273
  155. J. Savill, I. Dransfield, Ch. Gregory, Ch. Haslett, A blast from the past:clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 965-975
  156. P.R. Taylor, A.Carugati, V.A. Fadok, H.T. Cook, M. Andrews, M.C. Carroll, J.S. Savill, P.M. Henson, M. Botto, M.J. Walport, A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells In Vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192: 359-366
  157. Y. Liu, J.M. Cousin, J. Hughes, J.Van Damme, J.R. Seckl, Ch. Haslett, I. Dransfield, J. Savill, A.G. Rossi, Glucocorticoids Promote Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *Journal of Immunology* 1999; 162:3639- 3646.
  158. E.M. Sternberg, G.P. Chrousos, R.L. Wilder, P.W. Gold, The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Annals of Internal Medicine* 1992; 117: 854-866
  159. E.M. Sternberg, Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *Journal of Endocrinology* 2001; 169: 429 - 435
  160. T.H. Finkel, R.T. Kubo, J.C. Cambier, T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunology Today* 1991; 12: 79-85
  161. N. Shanks, R.J. Windle, P.A. Perks, M.S. Harbuz, D.S. Jessop, C.D. Ingram, S.L. Lightman, Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 5645-50.
  162. R. Thieringer, Ch.B. Le Grand, L. Carbin, T.Q. Cai, B.Wong, S.D. Wright, A. Hermanowski-Vosatka, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is Induced in Human Monocytes upon Differentiation to Macrophages. *Journal of Immunology* 2001; 167:30- 35
  163. G. Escher, I. Galli, B.S. Vishwanath, B.M. Frey, F.J. Frey, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin 1 $\beta$  Enhance the Cortisone/Cortisol Shuttle. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186:189-198.
-



- 
164. G. Charriere, B. Cousin, E. Arnaud, M. Andre, F. Bacou, L. Penicaud, L. Casteilla, Preadipocyte conversion on macrophage. Evidence of plasticity. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 9850-9855
  165. M. Tetsuka, L.C. Haines, M. Milne, G.E. Simpson, S.G. Hillier, Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression by LH and interleukin-1 $\beta$  in cultured rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology* 1999; 163: 417-423
  166. P.Y.K. Yong, CH. Harlow, K.J. Thong, S.G. Hillier, Regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1. *Human Reproduction* 2002 ; 17: 2300-2306
  167. M.T. Rae, D. Niven, H.O.D. Critchley, Ch.R. Harlow, S.G. Hillier, Antiinflammatory Steroid Action in Human Ovarian Surface Epithelial Cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 4538 – 4544
  168. O. Gubbay, W. Guo, M.T. Rae, D. Niven, A.F. Howie, A.S. McNeilly, L. Xu, S.G. Hillier, Anti-inflammatory and proliferative responses in human and ovine ovarian surface epithelial cells. *Reproduction* 2004; 128: 607-614
  169. M.S. Cooper, I.J. Bujalska, E. Rabbitt, E.A. Walker, R. Bland, M.C. Sheppard, M. Hewison, P.M. Stewart, Modulation of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isozymes by Proinflammatory Cytokines in Osteoblasts: An Autocrine Switch from Glucocorticoid Inactivation to Activation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001; 16:1037-1044.
  170. T.Q. Cai, B. Wong, S.S. Mundt, R. Thieringer, S.D. Wright, A. Hermanowski-Vosatka, Induction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 77:117-122
  171. S. Suzuki, H. Tsubochi, H. Ishibashi, Y. Matsuda, T. Suzuki, Z.S. Krozowski, H. Sasano, T. Kondo, Inflammatory Mediators Down-Regulate 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in a Human Lung Epithelial Cell Line BEAS-2B and the Rat Lung. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2005; 207: 293-301
  172. I. Kossintseva, S. Wong, E. Johnstone, L. Guilbert, D.M. Olson, B.F. Mitchell, Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca<sup>2+</sup> and cAMP pathways. *American Journal of Physiology and Metabolism* 2006; 290: E282-E288
  173. A. H. Wyllie, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556
  174. H. Horigome, M. Homma, T. Hirano, K. Oka, T. Nitsuma, T. Hayashi, Magnolol from *Magnolia officinalis* inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase without increases of corticosterone and thymocyte apoptosis in mice. *Planta Medica* 2001; 67:33-37
  175. J.J. Cohen, R.C. Duke, V.A. Fadok, K.S. Sellins, Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. *Annual Review of Immunology* 1992; 10: 267-293
  176. D.G. Brown, X.M. Sun, G.M. Cohen, Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 3037 - 3039
  177. J.A. Cidlowski, K.L. King, R.B. Evans-Storms, J.W. Montague, C.D. Bortner, F.M. Hughes, The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 457-90
  178. H. Horihome, M. Homma, T. Hirano, K. Oka, Glycyrrhetic Acid Induced Apoptosis in Murine Splenocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2001; 24: 54-58
  179. J.S. Gilmour, A.E. Coutinho, J.F. Cailhier, T.Y. Man, M. Clay, G. Thomas, H.J. Harris, J.J. Mullins, J.R. Seckl, J.S. Savill, K.E. Chapman, Local Amplification of Glucocorticoids by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Promotes Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *Journal of Immunology* 2006; 176: 7605 – 7611
-

- 
180. J.D. Hennebold, R.A. Daynes, Inhibition of skin 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo potentiates the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Archives of Dermatological Research* 1998; 290: 413-419
  181. H. Horigome, T. Hirano, K. Oka, Therapeutic effect of glycyrrhetic acid in MRL lpr/lpr mice: Implications of alteration of corticosteroid metabolism. *Life Science* 2001; 69: 2429-2438
  182. I. Sanchez, L. Goya, A.K. Vallerga, G.L. Firestone, Glucocorticoids reversibly arrest rat hepatoma cell growth by inducing an early G1 block in cell cycle progression. *Cell Growth and Differentiation* 1993; 4: 215-225
  183. I. Rogatsky, J.M. Trowbridge, M.J. Garabedian, Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 1997; 17:3181-3193
  184. J. Kato, M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massague, Ch.J. Sherr, Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79: 487-496
  185. M.K.R. Samuelsson, A. Pazirandeh, B. Davani, S. Okret, p57<sup>Kip2</sup>, a Glucocorticoid-Induced Inhibitor of Cell Cycle Progression in HeLa Cells. *Molecular Endocrinology* 1999; 13:1811-1822
  186. M.L. Fero, M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C.E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L.H. Tsai, V. Broudy, R.M. Perlmutter, A Syndrome of Multiorgan Hyperplasia with Features of Gigantism, Tumorigenesis, and Female Sterility in p27<sup>Kip1</sup>-Deficient Mice. *Cell* 1996; 85:733-744
  187. H. Kiyokawa, R.D. Kineman, K.O. Manova-Todorova, V.C. Soares, E.S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A.C. Hayday, L.A. Frohman, A. Koff, Enhanced Growth of Mice Lacking the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Function of p27<sup>Kip1</sup>. *Cell* 1996; 85:721-732
  188. K. Nakayama, N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D.Y. Loh, K. Nakayama, Mice Lacking p27<sup>Kip1</sup> Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors. *Cell* 1996; 85:707-720
  189. D.S. Franklin, V.L. Godfrey, H. Lee, G.I. Kovalev, R. Schoonhoven, S. Chen-Kiang, L. Su, Y. Xiong, CDK inhibitors p18<sup>INK4c</sup> and p27<sup>Kip1</sup> mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes and Development* 1998; 12:2899-2911
  190. L.I. McKay, J.A. Cidlowski, Molecular Control of Immune/Inflammatory Responses: Interactions Between Nuclear Factor- $\kappa$ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways. *Endocrine Review* 1999; 20:435-459.
  191. L.I. McKay, J.A. Cidlowski, Cross-Talk between Nuclear Factor- $\kappa$ B and the Steroid Hormone Receptors: Mechanisms of Mutual Antagonism. *Molecular Endocrinology* 1998; 12: 45-56.
  192. H. König, H. Ponta, H.J. Rahmsdorf, P. Herrlich, Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO Journal Online* 1992; 11:2241-2246
  193. D.J. Chang, Ch. Ji, K.K. Kim, S. Casinghino, T.L. McCarthy, M. Centrella, Reduction in Transforming Growth Factor beta Receptor I Expression and Transcription Factor CBFa1 on Bone Cells by Glucocorticoid. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:4892 - 4896
  194. M. Eijken, M. Hewison, M.S. Cooper, F.H. de Jong, H. Chiba, P.M. Stewart, A.G. Uitterlinden, H.A.P. Pols, J.P.T.M. van Leeuwen, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression and Glucocorticoid Synthesis Are Directed by a Molecular Switch during Osteoblast Differentiation. *Molecular Endocrinology* 2005; 19:621-631
  195. E.A. Walker, P.M. Stewart, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14:334-339
  196. S. Hundertmark, H. Buhler, M. Rudolf, H.K. Weitzel, V. Ragosch, Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells. *Journal of Endocrinology* 1997; 155:171-180
  197. R. Bland, C.A. Worker, B.S. Noble, L.J. Eyre, I.J. Bujalska, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, M. Hewison, Characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines. *Journal of Endocrinology* 1999; 161:455-464
-

- 
198. T. Mune, H. Morita, T. Suzuki, Y. Takahashi, Y. Isomura, T. Tanahashi, H. Daido, N. Yamakita, T. Deguchi, H. Sasano, P.C. White, K. Yasuda, Role of Local 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Determining the Phenotype of Adrenal Adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 864 - 870
  199. C.L. Coulter, R.E. Smith, M. Stowasser, H. Sasano, Z.S. Krozowski, R.D. Gordon, Expression of 11 $\beta$ HSD-2 in human adrenal cortical carcinoma and adenoma. *Endocrine Research* 1998; 24:875-6
  200. S. Suzuki, T. Suzuki, H. Tsubochi, K. Koike, H. Tateno, Z.S. Krozowski, H. Sasano, Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in primary lung carcinomas. *Anticancer Research* 2000; 20:323-8.
  201. E.H. Rabbitt, J. Ayuk, K. Boelaert, M.C. Sheppard, M. Hewison, P.M. Stewart, N.J.L. Gittoes, Abnormal expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation. *Oncogene* 2003; 22:1663-1667
  202. J. Condon, Ch. Gosden, D. Gardener, P. Nickson, M. Hewison, A.J. Howie, P.M. Stewart, Expression of Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Corticosteroid Hormone Receptors in Early Human Fetal Life. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 4490 - 4497
  203. M.S. Cooper, E. Rabbitt, P.E. Goddard, W.A. Bartlett, M. Hewison, P.M. Stewart, Osteoblastic 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity Increases With Age and Glucocorticoid Exposure. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17: 979 - 986
  204. H.E. Soriano, D.C. Kang, M.J. Finegold, M.J. Hicks, N.D. Wang, W. Harrison, G.J. Darlington, Lack of C/EBP  $\alpha$  gene expression results in increased DNA synthesis and an increased frequency of immortalization of freshly isolated mice hepatocytes. *Hepatology* 1998; 27:392- 401
  205. A.F. Gombart, W.K. Hofmann, S. Kawano, S. Takeuchi, U. Krug, S.H. Kwok, R.J. Larsen, H. Asou, C.W. Miller, D. Hoelzer, H.P. Koeffler, Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 2002; 99: 1332-1340
  206. L. Xu, L. Hui, S. Wang, J. Gong, Y. Jin, Y. Wang, Y. Ji, X. Wu, Z. Han, G. Hu, Expression Profiling Suggested a Regulatory Role of Liver - enriched Transcription Factors in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 2001; 61:3176 - 3181
  207. A.P. Heaney, M. Fernando, W.H. Yong, S. Melmed, Functional PPAR- $\gamma$  receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nature Medicine* 2002; 8:1281 - 1287
  208. G. Mazzocchi, L.K. Malendowicz, F. Aragona, C. Tortorella, L. Gottardo, G.G. Nussdorfer, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 are up- and downregulated in cortisol-secreting adrenal adenomas. *Journal of Investigative Medicine* 2002; 50:288-92.
  209. H. Sasano, A.R. Frost, R. Saitoh, G. Matsunaga, H. Nagura, Z.S. Krozowski, S.G. Silverberg, Localization of mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II in human breast and its disorders. *Anticancer Research* 1997; 17: 2001- 2008
  210. G. Albertin, C. Tortorella, L.A. Malendowicz, F. Aragona, G. Neri, G.G. Nussdorfer, Human adrenal cortex and aldosterone secreting adenomas express both 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 genes. *Internal Journal of Molecular Medicine* 2002
  211. M. Soldan, G. Nagel, M. Losekam, M. Ernst, E. Maser, Interindividual variability in the expression and NNK carbonyl reductase activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human lung. *Cancer letters* 1999; 145: 49-56
  212. E. Maser, The protective role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase /carbonyl reductase against tobacco-smoke related lung cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1999; 463: 379-387
  213. Z. Motoo, N. Sawabu, Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Letters* 1994; 86:91-95
  214. H.Yano, A. Mizoguchi, K. Fukuda, M. Haramaki, S. Ogasawara, S. Momosaki, M. Kojiro, The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer lines by inducing apoptosis and arrest at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. *Cancer Research* 1994; 54: 448-454
-

- 
215. K.I. Takahashi, K. Fukushima, H. Sasano, I. Sasaki, S. Matsuno, Z.S. Krozowski, H. Nagura, Type II 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression in Human Colonic Epithelial Cells of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Disease and Science* 1999; 44: 2516 – 2522
216. G.P. Morris, P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk, J.L. Wallace, Hapten- induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96:795-803
217. I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, R. Nakaya, A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702
218. K.W. Schroeder, W.J. Tremaine, D.M. Ilstrup, Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 1987; 317:1625-9
219. C.E. Dukes, The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1932; 35: 322-323
220. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159
221. J.J. Hermans, M.A. Fischer, P.M. Schiffers, H.A. Struijker-Boudier, High dietary potassium chlorid intake augments rat renal mineralocorticoid receptor selectivity via 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1472: 537-549
222. I.H. Jonsdottir, P. Schjerling, K. Ostrowski, S. Asp, E.A. Richter, B.K. Pedersen, Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *Journal of Physiology*; 528:157-163
223. J. Pácha, I. Mikšík, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *Journal of Endocrinology* 1996; 148: 561-566
224. M. Vylitová, I. Mikšík, J. Pácha, Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *Generale and Comparative Endocrinology* 1998; 109: 315-324
225. M.N. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254
226. P.P. Bradley, D.A. Priebe, R.D. Christensen, G. Rothstein, Measurement of cutaneous inflammation : estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 1982; 78: 206-9
227. E.P. Gomez-Sanchez, V. Ganjam, Y.J. Chen, D.L. Cox, M.Y. Zhou, S. Thanigaraj, C.E. Gomez-Sanchez, The sheep kidney contains a novel unidirectional, high affinity NADP+-dependent 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase (11 $\beta$ HSD-3) *Steroids* 1997; 62: 444-450
228. I. Mikšík, M. Vylitová, J. Pácha, Z. Deyl, Separation and identification of corticosterone metabolites by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* 1999; 726: 59-69
229. A.Waage, G. Slupphaug, R. Shalaby, Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *European Journal of Immunology* 1990; 20: 2439-43.
230. A.G. Rebuffat, S. Tam, A.R. Nawrocki, M.E. Baker, B.M. Frey, F.J. Frey, A.Odermatt, The 11-ketosteroid 11-ketodexamethasone is a glucocorticoid receptor agonist. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 214:27-37
231. R.P. McCabe, H. Secrist, M. Botney, M. Egan, M.G. Peters, Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1993; 16: 144-50
232. C.M. Fenoglio-Preiser, ed. *Gastrointestinal Pathology. An Atlas and Text*. New York: Lipincott-Raven, 1999
233. T. Minami, H. Tojo, Y. Shinomura, Y. Matsuzawa, M. Okamoto, Increased group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1994; 35: 1593–1598
234. S.M. Collins, K. McHugh, K. Jacobson, I. Khan, R. Riddell, K. Murase, H.P. Weingarten, Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology* 1996; 111:1509-1515
-

- 
235. A.L. Colón, L.A. Menchén, O. Hurtado, J. De Cristóbal, I. Lizasoain, J.C. Leza, P. Lorenzo, M.A. Moro, Implication of TNF- $\alpha$  convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis; *Cytokine* 2001;16: 220-226
236. K. Handoko, K. Yang, B. Strutt, W. Khalil, D. Killinger, Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 72:163-168
237. A. Allan, J.B. Bristol, R.C.N. Williamson, Crypt cell production in ulcerative proctocolitis: Differential increments in remission and relapse. *Gut* 1985; 26: 999-1003
238. G.L. Eastwood, J.S. trier, Epithelial cell renewal in cultured rectal biopsies in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1973; 64: 383-390
239. M. Schmidt, C. Weidler, H. Naumann, S. Anders, J. Scholmerich, R.H. Straub, Reduced capacity for the reactivation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells: possible role of the sympathetic nervous system? *Arthritis and Rheumatism* 2005; 52:1711-1720
240. M.M. Hammami, P.K. Siiteri, Regulation of 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: Enzymatic modulation of glucocorticoid action. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 73:326-334
241. P.A. Anton, F. Shanahan, Neuroimmunomodulation in Inflammatory Bowel Disease: How Far from "Bench" to "Bedside"? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 840: 723-734
242. A.K. Andersson, S.E. Atkinson, S. Khanolkar-Young, M.V. Chaduvula, S. Jain, L. Suneetha, S. Suneetha, D.N.J. Lockwood, Alteration of the cortisol-cortisone shuttle in leprosy type 1 reactions in leprosy patients in Hyderabad, India. *Immunology Letters* 2007; 109: 72-75
243. J.D. Hennebold, S.Y. Ryu, H.H. Mu, A. Galbraith, R.A. Daynes, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1996; 270: R1296-R1306
244. M. Friedberg, E. Zoumakis, N. Hiroi, T. Bader, G.P. Chrousos, Z'ev Hochberg, Modulation of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Mature Human Subcutaneous Adipocytes by Hypothalamic Messengers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 385 - 393
245. Ch.D. Heiniger, M.K. Rochat, F.J. Frey, B.M. Frey, TNF- $\alpha$  enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Letters* 2001; 507: 351-356
246. S. Olson, S.D. Aster, K. Brown, L. Carbin, D.W. Graham, A. Hermanowski-Vosatka, Ch.B. LeGrand, S.S. Mundt, M.A. Robbins, J.M. Schaeffer, Adamantyl triazoles as selective inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15: 4359-4362
247. J. Xiang, M. Ipek, V. Suri, M. Tam, Y. Xing, N. Huang, Y. Zhang, J. Tobin, T.S. Mansour, J. Mc Kew, Beta-keto sulfones as inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and the mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 15: 4396-405
248. L. Sutin, S. Andersson, L. Bergquist, V.M. Castro, E. Danielsson, S. James, M. Henriksson, L. Johansson, Ch. Kaiser, K. Flyrén, Oxazolones as potent inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 4837-4840
249. H.F. Dvorak, Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine* 1986; 315: 1650-1659.
250. C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-75
251. F. Balkwill, Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 540-550
252. H. Ohshima, H. Bartsch, Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research* 1994; 305: 253-264.
253. K.J. O'Byrne, A.G. Dalglish, Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 473-483.
-

- 
254. I.J. Bujalska, E.A. Walker, M. Hewison, P.M. Stewart, A Switch in Dehydrogenase to Reductase Activity of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 upon Differentiation of Human Omental Adipose Stromal Cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 1205 - 1210.
255. P.H. Jellinck, C. Pavlides, R.R. Sakai, B.S. McEwen, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase functions reversibly as an oxidoreductase in the rat hippocampus in vivo. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999; 71: 139-144
256. G.M. Wang, R.S. Ge, S.A. Latif, D.J. Morris, M.P. Hardy, Expression of 11 $\beta$ -Hydroxylase in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 2002; 143: 621 - 626.
257. A.G. Atanasov, L.G. Nashev, R.A.S. Schweizer, Ch. Frick, A. Odermatt, Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Letters* 2004; 571: 129-133
258. J. Ozols, Isolation and the complete amino acid sequence of luminal endoplasmic reticulum glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90:5302–5306
259. R. Valentino, A.P. Tommaselli, S. Savastano, P.M. Stewart, M.R. Ghiggi, F. Galletti, P. Mariniello, G. Lombardi, C.R. Edwards, Alcohol inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat kidney and liver. *Hormone Research* 1995; 43: 176-180
260. I. Bogacka, H. Xie, G.A. Bray, S.R. Smith, The Effect of Pioglitazone on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Target Genes Related to Lipid Storage In Vivo. *Diabetes Care* 2004; 27: 1660-1667
261. E. Osawa, A. Nakajima, K. Wada, S. Ishimine, N. Fujisawa, T. Kawamori, N. Matsushashi, T. Kadowaki, M. Ochiai, H. Sekihara, H. Nakagama. Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 361-7.
262. A.M. Lefebvre, I. Chen, P. Desreumaux, J. Najib, J.C. Fruchart, K. Geboes, M. Briggs, R. Heyman, J. Auwerx. Activation of the peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APC<sup>Min</sup> /+ mice. *Nature Medicine* 1998; 4: 1053-7
263. K. Yang, K.H. Fan, S.A. Lamprecht, W. Edelmann, L. Kopelovich, R. Kucherlapati, M. Lipkin, Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist troglitazone induces colon tumors in normal C57BL/6J mice and enhances colonic carcinogenesis in *Apc*<sup>1638 N/+</sup> *Mlh1*<sup>+/-</sup> double mutant mice. *International Journal of Cancer* 2005; 116:495-9
264. L.J. Mc.Cawley, L.M. Matrisian, Tumor progression: Defining the soil round the tumor seed. *Current Biology* 2001; 11:R25-27
265. W. Eberhardt, M. Schulze, Ch. Engels, E. Klasmeier, J. Pfeilschifter, Glucocorticoid-Mediated Suppression of Cytokine-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Rat Mesangial Cells: Involvement of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Ets Transcription Factors. *Molecular Endocrinology* 2002; 16: 1752-66
-

---

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>11<math>\beta</math>HSD</b>	11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa
<b>11<math>\beta</math>HSD1</b>	11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 1
<b>11<math>\beta</math>HSD2</b>	11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa 2
<b>ACEI</b>	inhibitor angiotensin-konvertujícího enzymu
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropní hormon
<b>ALDO</b>	aldosteron
<b>AME</b>	syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů (apparent mineralocorticoid excess )
<b>ASC</b>	preadipocyty (adipose stroma cell)
<b>BEAS-2B</b>	buněčná linie lidských bronchiálních epitelů
<b>BSA</b>	hovězí serový albumin
<b>CBG</b>	kortisol vazebný globulin
<b>CDK</b>	cyklin dependentní kinasa
<b>CDI</b>	cyklin dependentní inhibitor
<b>cDNA</b>	komplementární DNA
<b>C/EBP</b>	CCAAT/enhancer vazebný protein
<b>CNS</b>	centrální nervový systém
<b>COX-2</b>	cyklooxygenasa-2
<b>CRD</b>	deficit redukce kortisonu
<b>CRH</b>	kortisol releasing hormon
<b>DHEAS</b>	dehydroandrosteron
<b>dATP</b>	deoxyadenosin-5'-trifosfát
<b>dCTP</b>	deoxycytidin-5'-trifosfát
<b>dGTP</b>	deoxyguanosin-5'-trifosfát
<b>dNTP</b>	směs nukleotidů dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<b>dTTP</b>	deoxythymidin-5'-trifosfát
<b>DNAasa</b>	deoxyribonukleasa
<b>DSS</b>	dextranulfát
<b>E</b>	kortison
<b>EEG</b>	elektroencefalogram
<b>EKG</b>	elektrokardiogram
<b>F</b>	kortisol
<b>FSH</b>	folikulostimulační hormon
<b>GA</b>	kyselina glycyrrhetinová
<b>GMC</b>	glomerulární mesangiální buňky
<b>GR</b>	glukokortikoidní receptor
<b>GRE</b>	„glucocorticoid response element“

---

<b>G6PDH</b>	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
<b>HHA</b>	osa hypotalamus-hypofýza- nadledviny
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>HSP</b>	„heat shock proteins“ - proteiny teplotního šoku
<b>H6PDH</b>	hexosa-6-fosfát-dehydrogenasa
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukin-1 $\beta$
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	interferon- $\gamma$
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelisova konstanta
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MCP-1a</b>	monocytový chemotaktický protein
<b>MLR Ipr/Ipr</b>	spontánně autoimunitní kmen myši
<b>MMIF</b>	faktor inhibující migraci makrofágů
<b>M-MLV</b>	Moloney virus myši leukémie
<b>MPO</b>	enzym myeloperoxidasa
<b>MR</b>	mineralokortikoidní receptor
<b>MRNA</b>	mediátorová RNA
<b>n</b>	počet vzorků
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nikotinamidadeninukleotid
<b>NADP(H)<sup>+</sup></b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát a jeho redukována forma
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	jaderný faktor kappa B
<b>OSE</b>	povrchový epitel vaječníku
<b>PCR</b>	polymerasová řetězová reakce
<b>PLA2</b>	fosfolipasa 2
<b>PMN</b>	polymorfonukleáry
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	„peroxisome proliferator-activated receptor“
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>SIM</b>	selektivní intrakrinní modulátory
<b>TAE</b>	tris-acetát-EDTA pufr
<b>THE</b>	tetrahydrokortison
<b>THF</b>	tetrahydrokortisol
<b>TNBS</b>	trinitrobenzensulfonová kyselina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	„tumor necrosis factor“
<b>TSH</b>	thyreostimulační hormon

---



---

## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ

**Žbáňková Š., Bryndová J., Leden P., Kment M., Švec A., Pácha J.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **22(7)**,1019-23, 2007

**Žbáňková Š., Bryndová J., Kment M., Pácha J.** Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in colorectal cancer. *Cancer Letters*, **210(1)**, 95-100, 2004 IF = **2,938(04)**

**Bryndová J., Žbáňková Š., Kment M., Pácha J.** Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **39(6)**, 549-553, 2004 IF = **1,824(04)**

**Žbáňková Š., Kment M., Pácha J.** Experimentální zvířecí modely nespecifických střevních zánětů (IBD). *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*, **6**:230–239.

### CENY:

2005: **Cena České gastroenterologické společnosti** za článek: Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in colorectal cancer

11/2005: 3.místo v soutěži „**Cena dr. Barese**“ za článek Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue.