

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Pavel Leden

Záněť a periferní metabolismus glukokortikoidů

Inflammation and peripheral metabolism of glucocorticoids

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Milan Kment, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

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

V Praze, 7. 6. 2012

MUDr. Pavel Leden

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji tímto všem, kdo mi pomohli při návrhu a realizaci této práce. Jmenovitě děkuji

Doc. MUDr. Milanovi Kmentovi, CSc. za vedení dizertační práce;

Prof. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc. a celému kolektivu Oddělení funkce epitelu FgÚ AV ČR v.v.i. v Praze za vedení v práci, cenné rady, obětavou a laskavou pomoc při řešení předkládané práce jmenovitě pak Ing. Peteru Ergangovi;

MUDr. Zuzaně Velenskéé, za pomoc se zpracováním a vyhodnocením histologických vzorků.

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

1. Glucocorticoid availability in colonic inflammation of rat.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBSAH

1. SOUHRN	8
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1. Glukokortikoidy	12
2.1.1. Syntéza glukokortikoidů.....	12
2.1.2. Metabolismus glukokortikoidů.....	13
2.1.3. Mechanismus účinku	16
2.1.4. Glukokortikoidní receptor	16
2.1.5. Intracelulární přenos glukokortikoidního signálu	18
2.1.6. Glukokortikoidy a modulace zánětlivého procesu	19
2.1.7. Protizánětlivé regulační účinky glukokortikoidů	19
2.2. Periferní metabolismus glukokortikoidů	20
2.2.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa.....	20
2.2.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1.....	22
2.2.2.1. „Set-point“ 11HSD1.....	22
2.2.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2.....	23
2.2.4. Tkáňová distribuce a orgánově specifické funkce 11HSD.....	24
2.2.4.1. tuková tkáň	24
2.2.4.2. kostní tkáň	25
2.2.4.3. Oko.....	26
2.2.4.4. Ledviny	26
2.2.4.5. Játra	27
2.2.4.6. Placenta	27
2.2.4.7. Kardiovaskulární systém.....	28
2.2.4.8. Syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů.....	28
2.2.4.9. 11HSD a malignity.....	29
2.2.4.10. 11HSD a imunitní systém	30
2.2.4.11. 11HSD a gastrointestinální trakt	32
3. CÍLE	34
3.1. Otázka 1	34
3.2. Otázka 2	34
3.3. Otázka 3	35
3.4. Otázka 4	35
4. MATERIÁLY A METODY	36
4.1. 11HSD a experimentální TNBS kolitida	36
4.1.1. Použitá zvířata	36
4.1.2. Použité chemikálie.....	37
4.1.3. Izolace intraepiteliálních lymfocytů	37
4.1.4. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech	38
4.1.5. Extrakce steroidů	39
4.1.6. HPLC	39
4.1.7. Stanovení proteinu.....	39
4.1.8. Měření hladiny mRNA 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , Il-1 β , COX-2 a MUC-2 ..	40
4.1.8.1. Kvantitativní real time RT PCR.....	40

4.1.9.	Stanovení aktivity enzymu myeloperoxidázy v colon.....	42
4.2.	11HSD a ulcerosní kolitida.....	43
4.2.1.	Pacienti	43
4.2.2.	Použité chemikálie.....	43
4.2.3.	Měření hladin mRNA	44
4.3.	11HSD a experimentální DSS kolitida	45
4.3.1.	Použitá zvířata	45
4.3.2.	Použité chemikálie.....	45
4.3.3.	Stanovení aktivity 11HSD ve vzorcích DSS kolitidy.....	46
4.3.4.	Extrakce steroidů	46
4.3.5.	Měření mRNA pro 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , IL-1 β	47
4.3.6.	Stanovení aktivity MPO	49
4.4.	11HSD a adjuvantní artritida	49
4.4.1.	Použitá zvířata	49
4.4.2.	Indukce a hodnocení adjuvantní artritidy	50
4.4.3.	Použité chemikálie.....	51
4.4.4.	Měření hladiny mRNA 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , COX-2, osteopontinu, glukokortikoidního receptoru a S100A4	52
4.4.4.1.	Kvantitativní real time RT PCR.....	52
4.4.5.	Izolace synoviocytů	53
4.4.6.	Izolace buněk z lymfatických uzlin	53
4.4.7.	Stanovení aktivity 11 β -HSD.....	54
4.4.8.	Stanovení proteinu.....	55
4.5.	Statistické metody.....	55
4.5.1.	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a experimentální TNBS kolitida	55
4.5.2.	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a ulcerosní kolitida.....	56
4.5.3.	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a experimentální DSS kolitida	56
4.5.4.	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a adjuvantní artritida	56
5.	VÝSLEDKY	57
5.1.	11HSD a experimentální TNBS kolitida	57
5.2.	Ulcerosní kolitida a 11HSD.....	65
5.3.	11HSD a experimentální DSS kolitida	67
5.4.	11HSD a adjuvantní artritida	70
6.	DISKUZE	80
6.1.	11HSD a experimentální model TNBS kolitidy	80
6.2.	11HSD a ulcerosní kolitida.....	83
6.3.	11HSD a DSS kolitida	84
6.4.	11HSD a adjuvantní artritida	85
7.	ZÁVĚR.....	89
7.1.	Odpověď na otázku 1	89
7.2.	Odpověď na otázku 2.....	89
7.3.	Odpověď na otázku 3	90
7.4.	Odpověď na otázku 4.....	90

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
9. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK; VYSVĚTLIVKY	112

1. SOUHRN

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

(1) V průběhu experimentální TNBS kolitidy byly nalezeny změny periferního metabolismu glukokortikoidů ve smyslu vzestupu reduktázové aktivity 11HSD a poklesu aktivity oxidázové. Zároveň dochází k vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Podávání neselektivního inhibitoru karbenoxolonu vedlo k poklesu oxidázové aktivity téměř o 50% a nemělo žádný vliv na expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL1- β , ani na míru infiltrace střevní tkáně buňkami imunitního systému.

(2) Bylo zjištěno, že průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi

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

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

(4) V průběhu adjuvantní artritidy dochází k signifikantnímu vzestupu hladin mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou a tento vzestup exprese koreluje s nárůstem reduktázové aktivity enzymu. Tyto změny jsou pozorovány jak v synoviální tkáni, tak ve spádových lymfatických uzlinách. Podávání inhibitoru karbenoxolonu signifikantně zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a OPN mRNA, avšak neovlivňují plazmatické hladiny kortikosteronu. Zdá se tedy, že ačkoliv v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a aktivitě jak v synoviocytech, tak ve spádových lymfatických uzlinách, zřejmě pouze v synoviální tkáni je enzym dostatečně aktivní k tomu, aby reguloval zánětlivý proces na úrovni organismu.

SUMMARY

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

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

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

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

(3) DSS colitis significantly up-regulated expression of 11HSD1 and down-regulated expression 11HSD2. In accordance with these changes we found increased 11-

reductase activity and decreased 11-oxidase activity compared with control group. These findings fully reflected findings in ulcerative colitis.

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

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Glukokortikoidy

Kůra nadledvin syntetizuje řadu různých steroidních molekul. Avšak pouze malá část z nich vykazuje biologickou účinnost. Steroidy s biologickou účinností je možno rozdělit do tří skupin na glukokortikoidy, mineralokortikoidy a androgeny. Glukokortikoidy jsou základní složkou adaptace organismu na stres, ovlivňují intermediální metabolismus, účastní se celé řady fyziologických dějů včetně prenatalního i postnatalního vývoje, udržování krevního tlaku a ovlivnění imunitních reakcí [1]. Mineralokortikoidy, jejichž neúčinnějším přirozeným představitelem je aldosteron hrají klíčovou úlohu v udržování rovnováhy Na^+ a K^+ prostřednictvím regulace epiteliálního transportu natria. Hlavním glukokortikoidem je u člověka kortizol. Glukokortikoidy jsou tvořeny v relativně velkém množství. Denní produkce kortizolu u dospělého jedince představuje cca 15 mg [2, 3]. Endogenní glukokortikoidy jsou z převážné části syntetizovány v zona fasciculata kůry nadledvin. Byla ovšem prokázána také syntéza glukokortikoidů de novo z jejich prekurzorů (především cholesterolu) některými druhy tkání. Ve srovnání s celkovou denní produkcí se však jedná o zanedbatelné množství, které s největší pravděpodobností zprostředkovává jenom autokrinní a parakrinní účinky [4]. Více než 90% vyprodukovaného kortizolu se v krvi nachází v biologicky neaktivní formě reverzibilně navázané na transportní protein, corticosteroid binding globulin (CBG). Volný kortizol, který je biologicky aktivní formou, představuje přibližně pouze 1% z celkového vyprodukovaného množství. Biologický poločas cirkulujícího kortizolu se pohybuje v rozmezí přibližně 70-120 minut.

2.1.1. Syntéza glukokortikoidů

Všechny savčí steroidní hormony se tvoří z cholesterolu. Buňky kůry nadledvin se proto vyznačují vysokým množstvím receptorů pro lipoproteiny s nízkou hustotou. Menší část cholesterolu se tvoří z acetátu, většina je však vychytávaná z lipoproteinů s nízkou hustotou cirkulujících krví. Cholesterol je transportován prostřednictvím transportního proteinu do mitochondrií, kde je za pomoci enzymu cholesterol desmolasy přeměněn na pregnenolon. Vzniklý pregnenolon je následně transportován do hladkého endoplazmatického retikula, kde je oxidován na progesteron pomocí enzymu 3β -hydroxysteroiddehydrogenázy. Ke vzniku kortizolu je nutná 17-hydroxylace pregnenolonu

nebo progesteronu pomocí 17α -hydroxylasy. Následně v endoplazmatickém retikulu dochází k hydroxylaci progesteronu na 11-deoxykortikosteron a 17α -hydroxyprogesteronu na 11-deoxykortizol prostřednictvím enzymu 21β -hydroxylázy. Ke vzniku kortizolu Vzniklý 11-deoxykortikosteron a 11-deoxykortizol jsou následně přemístěny zpět do mitochondrií, kde prostřednictvím enzymu 11β -hydroxylázy dochází ke vzniku kortizolu a kortikosteronu. Poměr mezi vytvořeným kortizolem a kortikosteronem je druhově specifický. Zatímco u hlodavců je téměř výlučně tvořen kortikosteron, u člověka jak již bylo uvedeno, je hlavním glukokortikoidním hormonem kortizol, avšak v malém množství je tvořen také kortikosteron. Poměr tvorby kortizolu a kortikosteronu je u člověka přibližně 7:1. Buňky nadledvin uvolňují hormony hned poté, co jsou hormony vytvořeny. Skladování těchto hormonů v buňkách je velmi malé až žádné.

2.1.2. Metabolismus glukokortikoidů

Existuje několik variant metabolismu glukokortikoidů (obr 2.1). Odbourání glukokortikoidů probíhá především v játrech a vzniklé metabolity jsou následně vylučovány převážně močí. Enzymatická přeměna glukokortikoidů však nemá pouze funkci degradační a exkreční, ale je také důležitou součástí modifikace glukokortikoidního signálu.

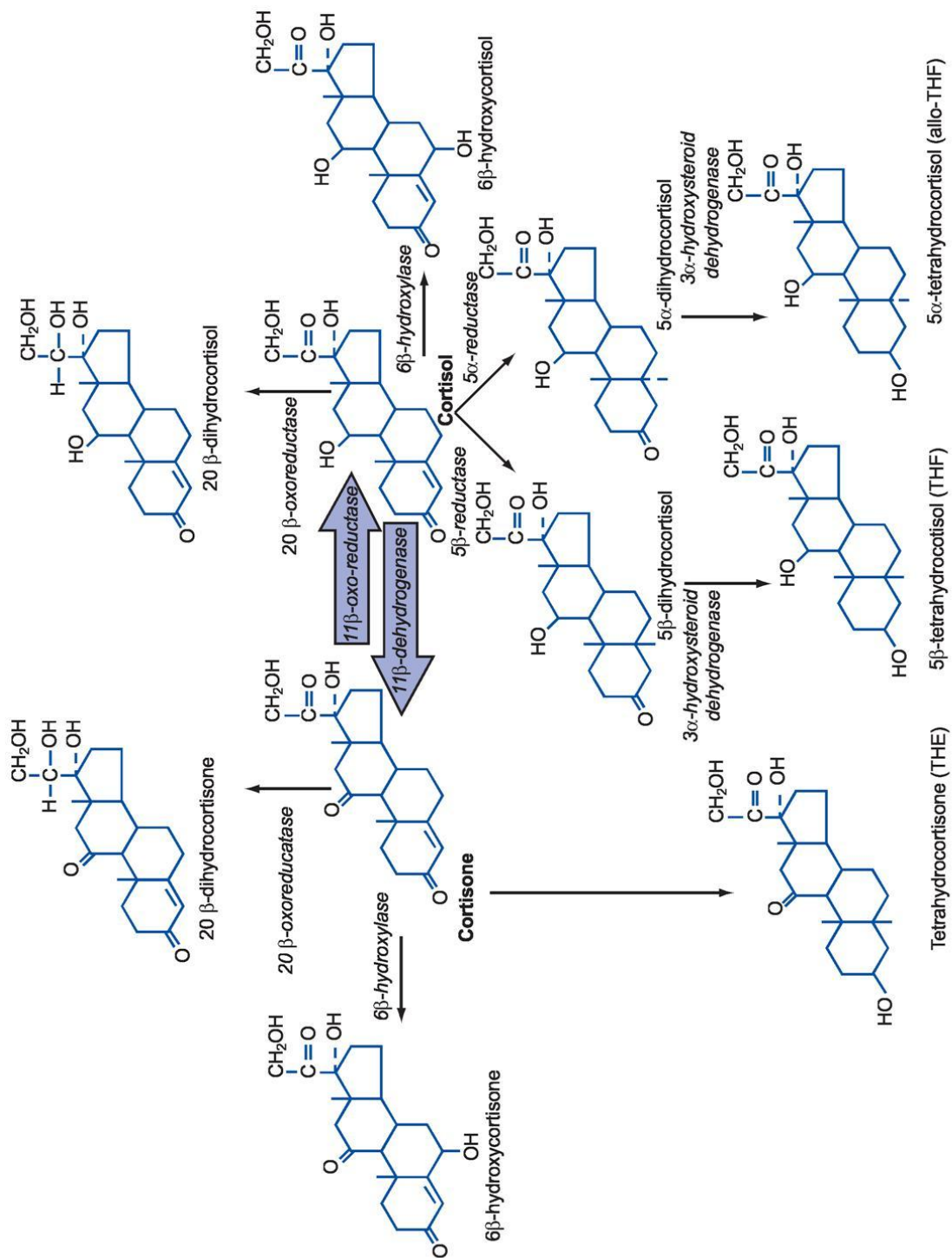
První variantou je konverze 11-hydroxy skupiny na 11-oxo skupinu prostřednictvím enzymu 11β -hydroxysteroiddehydrogenáza (11HSD). Tato enzymatická přeměna probíhá kromě jater v celé řadě tkání. Tento enzym je klíčovým enzymem periferního metabolismu glukokortikoidů, který je schopen ovlivňovat hladinu biologicky aktivních glukokortikoidů přímo v tkáni. Lze tak říci, že každá tkáň, ve které je exprimována 11HSD má schopnost měnit lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů. Studium funkce tohoto enzymu je klíčovou součástí této práce. Struktura a funkce tohoto enzymu jsou podrobně popsány v kapitole 1.2.

Další variantou degradace glukokortikoidů je redukce dvojné vazby mezi C4 a C5 enzymem 5α - či 5β -reduktasou. Enzymatickou přeměnou dochází k tvorbě dihydrokortizonu eventuelně dihydrokortizolu s následnou redukcí 3-oxo skupiny prostřednictvím enzymu 3α -hydroxysteroiddehydrogenasy na tetrahydrokortizol (THF), či tetrahydrokortizon (THE). THF a THE jsou rychle konjugovány s kyselinou glukuronovou a následně vyloučeny močí. Tyto hormony působí především v hepatocytech a snižují hladinu téměř všech steroidních hormonů, které obsahují Δ^4 -3-ketoskupinu. Za

fyziologických podmínkách převažuje reductázová 5β aktivita nad aktivitou 5α a to přibližně v poměru 2:1. Hlavní funkcí tohoto enzymu je ochrana organismu před nadměrnými hladinami cirkulujících steroidních hormonů. Kromě této funkce mohou mít tyto enzymy specifickou funkci i v jiných tkáních, např. v mozkové tkáni konvertuje 5α -reduktasa testosteron na více účinný androgen 5α -dihydrotestosteron [5]

Dalším způsobem metabolismu glukokortikoidů je redukce 20-oxo skupiny prostřednictvím 20α -/ 20β -hydroxysteroiddehydrogenasy ($20\alpha/\beta$ HSD), čímž dochází k tvorbě kortolů a kortolonů. Oba enzymy kromě degradační přeměny steroidů v játrech mají i celou řadu fyziologických funkcí v dalších tkáních. Mimo jiné byla jejich exprese prokázána v celé řadě tkání, jako např. ve střevu [6], nadledvině [7], vaječniku [8], placentě [9] či varleti [10]. Jejich funkcí je také degradace progesteronu na neaktivní 20α - či 20β hydroxyprogesteron. Vzhledem ke skutečnosti, že progesteron je prekurzorem biologicky aktivních steroidů, jako jsou androgeny, estrogeny a kortikosteroidy, je pravděpodobné, že se $20\alpha/\beta$ HSD může podílet na regulaci biosyntézy těchto hormonů. Vzniklé kortoly a kortolony mohou být dále metabolizovány oxidací na pozici C21 prostřednictvím enzymu 21-oxidasy, čímž dochází ke vzniku extrémně polárního metabolitu kyseliny kortolové či kortolonové.

Jinou alternativu degradace steroidů představuje hydroxylace na pozici C6 prostřednictvím enzymu 6β -hydroxylasy za vzniku 6β -hydroxykortizolu, či 6β -hydroxykortizonu. Zkoumáním významu jednotlivých enzymů na degradaci kortizolu, bylo zjištěno, že přibližně 50% kortizolu je vyloučeno močí ve formě 5β -tetrahydrokortizolu, 5α -tetrahydrokortizolu a tetrahydrokortizonu, 25% ve formě kortolů či kortolonů, 10 % ve formě C19 steroidů a 10 % jako kyselina kortolová či kortolonová. Zbýlých 5% tvoří nekonjugované steroidy.



Obr. 2.1 Schéma metabolismu glukokortikoidných hormonů. Převzato z [11]

2.1.3. Mechanismus účinku

V regulaci tvorby endogenních glukokortikoidů hraje klíčovou roli osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny (HPA). Tato osa představuje základní neuroendokrinní systém podílející se na homeostáze a je klíčovým prvkem adaptace organismu na stres. Skládá se ze tří hlavních částí, první část představují neuroendokrinní neurony paraventriculárního jádra hypotalamu, druhou částí jsou kortikotropní buňky adenohypofýzy a poslední částí jsou bazofilní buňky kůry nadledvin. V hypotalamu, na úrovni paraventriculárního jádra, dochází na podkladě stimulace jednotlivými neurálními, endokrinními a cytokinovými signály k uvolňování corticotropin releasing hormonu (CRH) z neuroendokrinních neuronů. Axony těchto neuronů končí v oblasti cév portálního hypotalamo-hypofyzárního řečiště. Efektorovou tkání CRH jsou bazofilní buňky adenohypofýzy, kde stimuluje tvorbu a sekreci hormonu adrenokortikotropinu (ACTH) jeho syntézou z prekurzorové molekuly proopiomelanokortinu. Adrenokortikotropin následně stimuluje syntézu a sekreci kortizolu v zona fasciculata kůry nadledvin. Vlastní glukokortikoidní účinek je zprostředkován pomocí glukokortikoidního receptoru (GR).

2.1.4. Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní receptor patří do skupiny nukleárních receptorů podrodiny 3 a je exprimován prakticky ve všech tkáních. V nepřítomnosti ligandu se nachází v cytosolu buňky v komplexu s chaperonovými proteiny hsp90, hsp70 a hsp90-vázajícími imunofiliny. Díky vazbě s těmito proteiny jsou „překryty“ oblasti GR nutné pro přestup jadernou membránou. GR vykazuje vysokou afinitu ke kortizolu a po jeho navázání na receptor dochází k disociaci výše uvedených molekulárních chaperonů. Lidský gen pro glukokortikoidní receptor je lokalizován na jednom lokusu na chromozomu 5q 31-32. Gen pro lidský GR se skládá z devíti exonů, jejichž alternativní sestřih vede ke vzniku různých izoform. Za vznik izoform jsou odpovědné exony jedna a devět. Exony dva až osm jsou neměnné. Fyziologicky nejvýznamnější jsou dvě možné izoformy vznikající alternativním sestřihem exonu 9. Izoformy jsou běžně nazývané jako GR- α a GR- β . Obě varianty mají shodnou strukturu od amino konce až k pozici 727, dále se struktura obou izoform liší. Izoforma GR- α obsahuje na svém karboxylovém konci sekvenci 50 aminokyselin, izoforma GR- β obsahuje na svém karboxylovém konci zcela odlišnou sekvenci 15aminokyselin. Izoforma α glukokortikoidního receptoru váže s vysokou afinitou kortizol, DNA a další transkripční faktory, po jejich navázání přechází rychle do

buněčného jádra, kde se váže na specifické oblasti DNA a ovlivňuje tak přímo transkripci cílových genů. Je možné, že GR- α se podílí i na negenomických účincích glukokortikoidů. Izoforma glukokortikoidního receptoru β nemá schopnost vázat glukokortikoidy a nepodílí se tak na přímých genomických účincích glukokortikoidů. Protein izoformy β je schopen tvořit heterodimery s izoformou α a tím zasahovat do její funkce. Relativní hladiny obou izoform jsou tkáňově i individuálně odlišné, všeobecně lze říci, že převažuje izoforma α nad izoformou β . Poměr obou izoform je pravděpodobně spoluodpovědný za senzitivitu cílových buněk ke glukokortikoidům, kdy zvýšená relativní hladina GR- β pravděpodobně vede ke glukokortikoidní rezistenci [12]. Dále bylo prokázáno, že zánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1 β mohou selektivně zvyšovat relativní hladiny GR- β , což má za následek snížení glukokortikoidního účinku a představuje tedy regulační mechanismus zánětlivého procesu [13, 14]. Exon 1 dává možnost vzniku 3 izoform 1A, 1B a 1C které jsou pravděpodobně funkčně odlišné, jelikož bylo prokázáno, že u linie T lymfoblastů aplikace dexametasonu zvyšuje produkci všech tří izoform stejnou měrou, zatímco u linie B lymfoblastů podávání dexametasonu snižuje tvorbu izoform v různém poměru [15, 16]. Skutečnost, že translace na exonu 2 může být zahájena na různých pozicích má za následek vznik dalších izoform GR. Translací od prvního kodonu methioninu v GR mRNA vznikají proteiny složené ze 777 aminokyselin v případě GR- α (GR α -A) a 742 aminokyselin v případě GR- β (GR β -A). Translací od druhého kodonu metioninu vznikají proteiny se 751 aminokyselinami (GR α -B) a 716 aminokyselinami (GR β -B). Jak bylo prokázáno v in vitro studiích, je mezi těmito izoformami významný funkční rozdíl. V těchto studiích má GR α -B přibližně dvojnásobnou biologickou aktivitu ve srovnání s GR α -A(26). Obě izoformy jsou v různých typech buněk exprimovány rozdílně, což svědčí o jejich odlišné funkci in vivo [17]. Vzhledem k tomu, že translace může být zahájena také na dalších interních kodonech, může kromě uvedených izoform vzniknout ještě šest dalších (C1, C2, C3, D1, D2, D3). Funkční odlišnosti těchto jednotlivých izoform, nejsou doposud detailně popsány.

GR jsou předmětem posttranslačních modifikací, které následně mohou měnit transkripční aktivitu vlastního glukokortikoidního receptoru. Tato modifikace probíhá prostřednictvím fosforylace serinových reziduí, které jsou fosforylovány za různých okolností enzymy cyklin-dependentní kinasou, nebo mitogenem aktivovanou protein kinasou [18]. Lidský GR má nejméně pět serinových reziduí (S113, S141, S203, S211, S226) Některé seriny jsou fosforylované pouze v případě navázání ligandu na GR, jiné

jsou fosforylovány bez závislosti na navázání ligandu. Specifické kombinace fosforylovaných serinů ovlivňují transkripční aktivitu GR. Dále bylo prokázáno, že sumoylace (navázání malých ubiquitin asociovaných proteinů) glukokortikoidního receptoru zvyšuje jeho transkripční aktivitu [19, 20].

2.1.5. Intracelulární přenos glukokortikoidního signálu

Existují nejméně tři způsoby intracelulárního přenosu glukokortikoidního signálu. V případě první tzv. genomické cesty dochází po navázání ligandu na GR k translokaci komplexu ligand/receptor do buněčného jádra, kde se ve formě homodimeru GR/GR váže do specifických sekvencí v promotorové oblasti DNA nazývané Glucocorticoid Responsive Element (GRE). Tím dochází k ovlivnění koaktivátorových či korepresorových proteinů, které mění strukturu chromatinu a tím facilitují (např. IL-10) nebo inhibují (např. osteokalcin) stavbu základního transkripčního pochodu a zahájení transkripce RNA polymerázou II. V případě inhibice transkripce navázáním komplexu GR/ligand bývá tato oblast DNA ozančována jako negativní GRE (nGRE). Po odeznění signálu je GR exportován zpět do cytosolu, kde je následně proteaso-ubikvitinovým systémem degradován.

Druhou možností intracelulárního přenosu glukokortikoidního signálu je interakce komplexu GR/ligand s jinými transkripčními faktory navázanými na patřičných úsecích DNA. Důsledek této interakce na transkripci cílových genů může být jak synergistický (β -kasein), kdy dochází ke zrychlení transkripčního procesu, tak supresivní. V případě supresivního účinku byly popsány dva mechanismy. První, kdy komplex receptor/ligand uvolní transkripční faktor od DNA a tím je zastavena transkripce (IL-8), druhý, kdy navázání komplexu GR/ligand na transkripční faktor vede k zastavení transkripce, bez uvolnění vlastního transkripčního faktoru z DNA.

Třetím způsobem přenosu glukokortikoidního signálu je přenos prostřednictvím membránových receptorů a s nimi spřažených sekundárních posílů [21]. Tento způsob bývá nazýván jako nengenomický mechanismus účinku glukokortikoidů. Specifikum tohoto způsobu přenosu signálu ve srovnání ostatními spočívá ve vysoké rychlosti odezvy, která je v řádu vteřin až minut.

2.1.6. Glukokortikoidy a modulace zánětlivého procesu

Glukokortikoidy představují jeden z klíčových modulačních mechanismů v regulaci zánětlivého procesu a imunitní reakce, neboť představují efektorový prvek osy hypotalamus, hypofýza, nadledviny, která je prostředníkem mezi centrálním nervovým systémem a součástími vrozeného a získaného imunitního systému. Regulační účinek glukokortikoidů v zánětlivém procesu je velmi komplexní. Je například známo, že některé prozánětlivé cytokiny mají schopnost aktivovat periferní nociceptory a aktivace těchto nociceptorů má za následek přenos signálu cestou nervových drah bolesti do centrálního nervového systému, což má za následek aktivaci osy hypotalamus, hypofýza nadledviny. Na konci této osy se nachází zvýšená hladina glukokortikoidů, které svým účinkem inhibují tvorbu cytokinů a mediátorů zánětu a tím představují negativní zpětnou vazbu. Je všeobecně známo, že porucha funkce osy hypotalamus, hypofýza, nadledviny jak ve smyslu hypoaktivity, tak ve smyslu hyperaktivity má za následek závažné změny v zánětlivé odpovědi a imunitní reakci [22, 23]. Neadekvátní hyperaktivace této osy jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti zánětlivého procesu (bolest, emoční trauma, kalorická restrikce), má za následek neadekvátní reakci imunitního systému ve smyslu imunosuprese a vyšší náchylnost k infekcím [24]. Naopak, neadekvátně nízká aktivita této osy významným způsobem zhoršuje průběh zánětlivého procesu. Je například známo, že pacienti s Addisonovo chorobou vyžadují v průběhu těžkých zánětlivých onemocnění substituci glukokortikoidních hormonů, mimo jiné jako prevenci cytokinové toxické reakce [25]. V terapeuticky užívaných dávkách mají glukokortikoidy výrazný protizánětlivý účinek. Naproti tomu hladiny endogenních glukokortikoidů mají účinky spíše imunomodulační, než čistě imunosupresivní. V závislosti na dávce a načasování mohou mít jak imunosupresivní, tak imunostimulační účinky. Hladina endogenních glukokortikoidů je závislá právě na ose hypotalamus, hypofýza, nadledviny.

2.1.7. Protizánětlivé regulační účinky glukokortikoidů

Glukokortikoidy mohou významným způsobem ovlivňovat celou řadu zánětlivých drah. Glukokortikoidy mohou například inhibovat tvorbu prostaglandinů třemi na sobě nezávislými mechanismy. Prvním mechanismem je indukce a aktivace proteinu annexinu I. Annexin I, nazývaný také jako lipocortin-1 je protizánětlivý protein, který působí přímo na cytosolovou fosfolipázu A2 α (cPLA2 α). Po fosforylaci a tím aktivaci tohoto proteinu dochází k jeho přesunu z cytosolu do perinukleární membrány, kde hydrolyzuje fosfolipidy

obsahující arachidonovou kyselinu. Arachidonová kyselina je následně konvertována na prostaglandiny, tromboxany, prostacykliny a leukotrieny. Glukokortikoidy indukovaný annexin I inhibuje cPLA2 α , a blokuje tak uvolňování arachidonové kyseliny. Geneticky upravený kmen myši s chybějícím genem pro annexin I, má zvýšenou hladinu cPLA2 α , zvýšenou zánětlivou odpověď a částečnou rezistenci k protizánětlivým účinkům glukokortikoidů [26-28]. Dalším protizánětlivým účinkem spojeným s glukokortikoidy je MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkinasa) fosfatáza 1. Tento enzym, který může být indukován a aktivován glukokortikoidy, defosforyluje a inaktivuje Jun-N terminální kinázy, a všechny enzymy ze skupiny MAPK, čímž sekundárně dochází také k inhibici cPLA2 α . Komplex GR/ligand také přímo ovlivňuje funkci transkripčního nukleárního faktoru κ B (NF- κ B) tím, že blokuje jeho transkripční aktivitu [29, 30]. V neaktivní podobě se NF- κ B nachází v buněčné cytoplazmě v komplexu s inhibičním proteinem I κ B. Celá řada podnětů včetně prozánětlivých cytokinů má za následek spuštění kaskády, na jejímž konci je fosforylace I κ B následkem čehož dojde k její ubiquitinizaci a degradaci. Tím dojde k aktivaci proteinu NF- κ B a jeho přestupu do buněčného jádra. V jádře se NF- κ B váže na sekvence DNA nazývané NF- κ B elements, čímž dochází ke stimulaci transkripce celé řady prozánětlivých cytokinů, chemokinů, adhezivních molekul, faktorů komplementu a receptorů pro tyto molekuly. NF- κ B také indukuje transkripci enzymu cyklooxygenasy-2, který je klíčový pro tvorbu prostaglandinů [31]. Inhibice cyklooxygenasy-2 je dalším z významných mechanismů protizánětlivého účinku glukokortikoidů. Kromě inhibice NF- κ B, glukokortikoidy významným způsobem ovlivňují celou řadu dalších prozánětlivých transkripčních faktorů. V posledních letech přibývá důkazů o ovlivnění zánětlivého procesu glukokortikoidy negenomickou cestou. Nejvíce prozkoumaným mechanismem je aktivace indukibilní NO synthasy (iNOS). V lidských endotelových buňkách glukokortikoidy stimulují aktivitu enzymu fosfatidylinositol-3-hydroxykinasy (PI3K) způsobem, který je nezávislý na transkripci. Aktivace PI3K vede k fosforylaci protein kinasy B, která následně aktivuje NOS.

2.2. Periferní metabolismus glukokortikoidů

2.2.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (EC 1.1.1.146, 11 β -hydroxysteroid: NAD(P)⁺-11-oxidoreduktasa, 11HSD) je klíčovým enzymem prereceptorového metabolismu glukokortikoidů. Jedná se o mikrosomální enzym, který katalyzuje vzájemnou přeměnu

biologicky aktivních glukokortikoidů (kortizol u člověka, kortikosteron u hlodavců) na jejich neaktivní 11-oxo deriváty (kortizon u člověka, 11-dehydrokortikosteron u hlodavců). 11-oxidázová aktivita tedy snižuje lokální koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů a 11-reduktázová aktivita ji naopak zvyšuje. 11HSD se vyskytuje ve dvou zcela odlišných formách vykazujících pouze 14ti procentní identitu [32] a lišících se fyziologickou rolí, regulací a tkáňovou distribucí. 11HSD2 je nejvíce podobná 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáze, se kterou je identická ze 45 procent [33]. 11HSD a její oxidační účinek na kortizol a kortikosteron byl poprvé popsán v padesátých letech minulého století v hepatocytech [34], avšak v této době byla tomuto enzymu přisuzována pouze role při odbourávání glukokortikoidů. V následujících letech byl tento enzym popsán také v dalších tkáních, např. v placentě [35], ledvinách [36, 37], plicích a varlatech [36]. Na konci šedesátých let byla popsána reduktázová aktivita enzymu v játrech [38]. Na počátku 70. let bylo objeveno, že ke konverzi kortizolu na kortizon dochází ve značné míře také v ledvinách [39]. V osmdesátých letech minulého století byla purifikována 11HSD z krysích hepatocytů a byla popsána její oxo-reduktázová funkce [40]. Na konci osmdesátých let dvě skupiny nezávisle na sobě určily fyziologickou roli 11HSD2 [41, 42], čímž byl vyřešen tzv. paradox mineralokortikoidních receptorů. Podstatou tohoto paradoxu bylo, že in vitro vyčištěný mineralokortikoidní receptor váže s podobnou afinitou jak aldosteron, tak i kortizol a kortikosteron, ale in vivo váže selektivně pouze aldosteron a to i přes to, že hladiny glukokortikoidů několikanásobně převyšují hladiny aldosteronu. Obě dvě práce dokázaly, že za tento jev není odpovědná specifita mineralokortikoidního receptoru, jak se do té doby mylně předpokládalo, ale právě činnost 11HSD. Její 11-oxidázová aktivita má za následek přeměnu kortizolu a kortikosteronu na kortizon a 11-dehydrokortikosteron, jejichž afinita k mineralokortikoidnímu receptoru je výrazně nižší než afinita aldosteronu, který nemůže sloužit jako substrát pro 11HSD jelikož obsahuje 11,18-hemiacetalovou vazbu. V roce 1989 byla vyizolována a podrobně popsána forma 11HSD1 [43]. Již v této době se začaly objevovat teorie o existenci druhé izoformy tohoto enzymu [44]. 11HSD2 byla poprvé naklonována a podrobně popsána v roce 1994 [33]. V následujícím období byla podrobně zkoumána tkáňová distribuce obou forem 11HSD.

2.2.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

Forma 11HSD1 se vyskytuje ve většině tkání, jedná se o glykoprotein s jednonásobnou membránovou doménou a jeho molekulová hmotnost je 34kDa. 11HSD1 vykazuje jak reduktázovou, tak oxidázovou aktivitu. Její K_m in vitro je více než o řád vyšší než u 11HSD2 a jako kofaktor preferuje $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Většina prací in vivo ukazuje, že 11HSD1 pracuje převážně jako reduktáza, tj. ve tkáních lokálně zvyšuje koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů redukcí jejich 11-oxo derivátů obsažených v plazmě. Tato skutečnost byla prokázána například na buněčných kulturách hepatocytů [45], adipocytů [46] a řadě dalších buněčných kultur. Dehydrogenázová aktivita byla naproti tomu prokázána in vitro v bezbuněčném prostředí [47] a na buněčných homogenátech, tedy v případech, kdy došlo k porušení integrity buněk. Gen pro lidskou HSD1 se nachází na prvním chromozomu (1q32-41), skládá se z 6 exonů a délka celé její cDNA je 1,4kb. Role 11HSD1 byla zkoumána u řady zánětlivých onemocnění. Většina prací však byla koncipována jako studie in vitro na tkáňových kulturách, fyziologicky významnějších studií in vivo bylo provedeno velmi málo a jejich výsledky nejsou zdaleka tak jednoznačné jako u studií in vitro na tkáňových kulturách.

2.2.2.1. „Set-point“ 11HSD1

Jako bylo uvedeno výše, 11HSD1 vykazuje jak reduktázovou, tak dehydrogenázovou aktivitu. Regulace „set-pointu“ glukokortikoidního metabolismu prostřednictvím 11HSD1 (oxidace vs. redukce), byla donedávna nejasná. Již od počátku 90. let byla možná role v této regulaci přisuzována dostupnosti kofaktoru [48], eventuelně vzájemnému poměru $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. In vitro studie s rekombinantní glukóza-6-fosfátdehydrogenázou prokázaly, že se změnou tohoto poměru ve prospěch NADPH dochází k signifikantnímu nárůstu reduktázové aktivity a naopak [48, 49]. Mezikáňové rozdíly ve funkci 11HSD1 by tedy mohly být vysvětleny rozdílnou dostupností NADPH, eventuelně poměrem $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Tato oblast byla v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu.

Hlavním zdrojem NADPH v buňce za fyziologických podmínek je enzym pentózového cyklu, glukóza-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH), která oxiduje glukóza-6-fosfát na 6-fosfoglukonát, přičemž zároveň redukuje NADP^+ na NADPH. Nabízí se proto teorie, že G6PDH by mohla hrát významnou úlohu v regulaci „set-pointu“ 11HSD1. Tato teorie byla ovšem hned zpočátku vyvrácena [50]. Hlavním důvodem, proč NADPH

produkovaný G6PDH nemůže být využit pro činnost 11HSD1, je jeho lokalizace. G6PDH je cytosolární enzym, kdežto 11HSD1 enzym mikrosomální a NADPH není schopen přecházet přes membránu endoplazmatického retikula. Pozornost tak byla obrácena na jiný enzym a sice, mikrosomální enzym hexosa-6-fosfát-dehydrogenáza (H6PDH). Ten je odpovědný za první dvě reakce endoluminálního pentózového cyklu, přičemž podobně jako G6PDH produkuje NADPH z NADP^+ . H6PDH byl nalezen ve většině lidských tkání, mimo jiné v játrech, placentě, ledvinách, thymu, pankreatu, plicích, kosterním svalu, v bílých krvinkách a mnoha dalších [51-54]. V současné době existuje celá řada prací, prokazujících, že H6PDH je nezbytná pro reduktázovou aktivitu 11HSD1 a že významným způsobem ovlivňuje „set-point“ 11HSD. Tato skutečnost byla prokázána jak ve studiích in vitro provedených na intaktních adipocytech a hepatocytech [55], tak také in vivo. Veliký přínos pro výzkum této oblasti měla studie provedená na pacientech se syndromem nedostatku redukce kortizonu [56]. Za příčinu tohoto stavu byla původně považována mutace genu pro 11HSD1. Jak se však v této práci ukázalo, u některých pacientů trpících touto poruchou byla syntetizována taková forma 11HSD1, která se nachází i u zdravých jedinců. Podrobnějším genetickým vyšetřením těchto pacientů byla u všech zjištěna mutace v genu pro H6PDH. Jedním z posledních důkazů je také studie provedená na „knock-out“ myši s nefunkčním genem pro H6PDH [57]. U tohoto zvířete nedochází ke konverzi 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron a naopak dochází ke vzestupu koncentrace 11-dehydrokortikosteronu. Je tedy zřejmé, že mezi funkcí 11HSD1 a pentózovým cyklem resp. H6PDH je úzká souvislost, a že dostupnost kofaktoru hraje klíčovou roli pro směr reakce 11HSD1.

2.2.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2

11HSD2 se v organismu vyskytuje především v mineralokortikoidních cílových tkáních [33] a v placentě [58, 59]. Tato izoforma vykazuje řádově nižší K_m pro glukokortikoidní substrát, jako kofaktor využívá NAD^+ a pracuje pouze jako dehydrogenáza, tj. snižuje ve tkáních lokální koncentraci glukokortikoidů. Díky této své vlastnosti brání 11HSD2 navázání biologicky účinných glukokortikoidů (kortizol) na mineralokortikoidní receptory (MR). To má velký fyziologický význam, neboť MR vykazují téměř stejnou afinitu ke kortizolu (kortikosteronu) i aldosteronu [60]. Gen pro lidskou 11HSD2 je umístěn na chromozomu 16, obsahuje 5 exonů a celý protein se skládá ze 405 aminokyselin.

Orgánová distribuce 11HSD2 je v současnosti podrobně známá. Tato izoforma byla nalezena například v ledvinných sběrných kanálcích a distálních tubulech [61], epitelových buňkách tračníku [62], v epitelových buňkách slinných žláz [63], placentě [58, 59] a některých typech nádorových buněk [64-66].

2.2.4. Tkáňová distribuce a orgánově specifické funkce 11HSD

2.2.4.1. *tuková tkáň*

V tukové tkáni je exprimována 11HSD1 a to převážně preadipocyty a buňkami stromatu a její aktivita je schopna měnit tkáňovou hladinu biologicky aktivních glukokortikoidů [46, 67]. Již dlouhou dobu je známo, že glukokortikoidy mají významný vliv na diferenciaci, distribuci a funkci tukové tkáně a jsou schopny regulovat expresi mnoha různých genů například leptinu [68], lipoproteinové lipasy [69], hormon-senzitivní lipasy [70], PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) [71] a tím přispívají k regulaci uvolňování volných mastných kyselin do krevního řečiště.

Bylo prokázáno, že nadbytek glukokortikoidů způsobuje obezitu centrálního typu. Tento typ obezity významně zvyšuje kardiovaskulární riziko a je často spojen s předčasnou smrtí. Je prokázáno, že obezita centrálního typu (resp. zvýšené množství omentálního tuku) výrazně zvyšuje pravděpodobnost snížené glukózové tolerance a inzulínové rezistence [72]. Centrální typ obezity se vyskytuje u pacientů s Cushingovým syndromem a je také jedním z typických příznaků metabolického syndromu. Vzhledem k této skutečnosti se nabízí souvislost mezi prereceptorovým metabolismem glukokortikoidů a tukovou tkání. Bylo zjištěno, že kortizol indukuje přeměnu preadipocytů na adipocyty [73]. Jedním z mechanismů rozvoje tukové tkáně je právě tato diferenciacie. Na základě výše uvedených poznatků byla měřena aktivita 11HSD1 v omentální a subkutánní tukové tkáni. Toto srovnání ukázalo významně zvýšenou aktivitu 11HSD1 v omentální tukové tkáni oproti tkáni subkutánní [46]. Tato aktivita se ještě zvýšila při aplikaci kortizolu. V tomto procesu diferenciacie hraje klíčovou roli právě 11HSD1, což bylo prokázáno podáním inhibitoru 11HSD, které způsobilo zastavení této diferenciacie a naopak i podání neaktivního kortizonu vedlo ke stejnému nárůstu diferenciacie preadipocytů v adipocyty jako při podání stejného množství kortizolu [50]. Tuto teorii potvrzují také práce provedené na geneticky modifikovaných zvířatech. U transgenní myši s nadměrnou expresí 11HSD1 v tukové tkáni dochází k rozvoji obezity centrálního typu, rozvoji inzulínové rezistence, glukózové intolerance, dyslipidemie a hypertenze [74]. Naopak u zvířat s „knock-out“ genem pro

11HSD1 v tukové tkáni, nedochází k rozvoji obezity viscerálního typu ani při dietě s vysokým obsahem tuků a nedochází k rozvoji inzulínové rezistence [75]. Další práce provedená na myši s nadměrnou expresí 11HSD1 v játrech, ukázala, že u těchto zvířat dochází k rozvoji inzulínové rezistence a zvýšení arteriálního krevního tlaku, ovšem bez rozvoje obezity [76]. U myši se zvýšenou expresí 11HSD2 v tukové tkáni nedochází k rozvoji obezity ani na vysokoenergetické dietě s vysokým obsahem tuků a navíc dochází ke zvýšení inzulínové senzitivity a glukózové tolerance [77]. Výše uvedené poznatky napovídají, že periferní metabolismus glukokortikoidů hraje významnou roli při rozvoji centrálního typu obezity a metabolického syndromu a jeho ovlivnění by mohlo být terapeuticky využito. Při použití specifického inhibitoru 11HSD1 u myši s metabolickým syndromem vyvolaným dietou, dochází ke snížení tělesné hmotnosti, snížení příjmu potravy, snížení plazmatické hladiny glukózy, triglyceridů a cholesterolu, ke snížení inzulínové rezistence a ke zpomalení procesu aterogeneze [78]. Podávání stejného inhibitoru myši s diabetem druhého typu zvyšuje glukózovou toleranci a snižuje plazmatickou hladinu glukózy a triglyceridů.

2.2.4.2.kostní tkáň

Je dokázáno, že podávání vysokých dávek glukokortikoidů způsobuje osteoporózu [79]. Glukokortikoidy vyvolaná osteoporóza byla u pacientů s nadbytkem glukokortikoidů poprvé popsána již ve 30. letech minulého století samotným H. Cushingem [80] a v dalších desetiletích byl účinek nadbytku glukokortikoidů na kostní tkáň podrobně prozkoumán a popsán [81]. Již dlouhou dobu je znám účinek glukokortikoidů na proliferaci a diferenciaci jak osteoblastů, tak osteoklastů. Na základě výše uvedených faktů, byl podrobně studován periferní metabolismus glukokortikoidů v kostní tkáni. Exprese 11HSD1 byla prokázána v buněčných kulturách osteoblastů [82] a v buňkách zdravé dospělé kosti, tedy v osteoblastech a osteoklastech [83]. Exprese 11HSD2 byla prokázána v lidských a potkaních buněčných liniích osteosarkomu [82, 84, 85]. Dále bylo zjištěno, že stimulace prozánětlivými cytokiny, konkrétně interleukinem-1 β (IL-1 β) a tumor-nekrotickým faktorem α (TNF- α), vede ke zvýšení aktivity 11HSD1 a k inhibici 11HSD2 [86]. Předpokládá se, že tento mechanismus by mohl hrát klíčovou úlohu při vzniku zánětlivé periartikulární osteoporózy u dětí. Dále bylo prokázáno, že podávání glukokortikoidů způsobuje nárůst aktivity a exprese 11HSD1 v závislosti na dávce a délce podávání [87]. Ve stejné práci bylo pomocí primárních kultur zjištěno, že aktivita 11HSD1 stoupá

s věkem. Je tedy pravděpodobné, že 11HSD1 hraje zásadní roli při rozvoji stařecké a glukokortikoidy indukované osteoporózy.

2.2.4.3. *Oko*

Je známo, že nadbytek glukokortikoidů způsobuje zvýšení nitroočního tlaku a periferní metabolismus glukokortikoidů tak může hrát významnou roli v patogenezi a léčbě glaukomu. Forma 11HSD1 byla prokázána v různých částech lidského oka, mimo jiné, také v ciliárních buňkách [88, 89]. Dále bylo zjištěno, že poměr kortizol/kortizon je několikanásobně vyšší v nitrooční tekutině, než v plazmě. Při lokálním podání nescifického inhibitoru 11HSD zdravým dobrovolníkům došlo po sedmi dnech k poklesu nitroočního tlaku o cca 20 procent [90]. Dá se tedy předpokládat, že lokální podávání specifického inhibitoru 11HSD1, by mohlo být v budoucnosti velikým přínosem při léčbě glaukomu.

2.2.4.4. *Ledviny*

Expres 11HSD v ledvinných buňkách je druhově rozdílná. U potkana byla technikou in situ hybridizace 11HSD1 prokázána v proximálních tubulech kůry ledviny a v intersticiálních buňkách dřeně [91, 92]. Expres 11HSD1 nebyla naopak prokázána v distálních tubulech, sběrných kanálcích a aldosteron senzitivních buňkách [93-95]. Expres izoformy 11HSD2 byla naopak prokázána ve sběrném kanálku ledviny a také v distálních tubulech, tedy v oblastech které jsou bohaté na mineralokortikoidní receptory a funguje zde tedy jako ochrana těchto receptorů před nadměrnou stimulací glukokortikoidy. Bylo prokázáno, že aktivita 11HSD v ledvině se mění v průběhu postnatálního vývoje, kdy aktivita enzymu stoupá s postnatálním věkem [96]. Isoforma 11HSD2 hraje důležitou fyziologickou roli již v prenatálním období [97, 98].

Obě izoformy 11HSD jsou regulovány celou řadou mechanismů. A tato regulace je zřejmě součástí celé řady fyziologických regulačních procesů. In vitro bylo například prokázáno, že aktivace enzymu adenylátcyklasy vede k zvýšení exprese mRNA 11HSD2, zvýšené hladině proteinu samotného enzymu a tento účinek je inhibován v přítomnosti aktivátoru proteinkiny C tetradekanoylphorbolacetatu. [99].

Podávání estradiolu potkanům po gonadektomii mělo za následek zvýšení dehydrogenázové aktivity a vzestupu exprese 11HSD1 a poklesu exprese 11HSD2 v ledvinách [100].

2.2.4.5. Játra

Expres 11HSD1 byla prokázána v jaterní tkáni u člověka i hlodavců. Pro tuto izoformu je charakteristická centripetální lokalizace s maximem v oblasti okolo centrální žíly [101]. 11HSD1 má významnou roli v regulaci glukoneogeneze prostřednictvím enzymů glukosa-6-fosfatasy a fosfoenolpyruvát-karboxykinasy, což bylo prokázáno pomocí experimentu na myším kmene s „knock-out“ genem pro 11HSD1. Zatímco u kmene s expresí 11HSD1 vedla restrikce potravy k vzestupu glukoneogeneze, u kmene s „knock-out“ genem 11HSD1 zůstala glukoneogeneze beze změn. Zároveň bylo zjištěno, že nadměrná exprese 11HSD1 v myších hepatocytech má za následek mírnou inzulínovou rezistenci, dyslipidémii a arteriální hypertenzi. Tato nadměrná exprese v hepatocytech však nevede k rozvoji obezity, čímž se odlišuje od klasického metabolického syndromu [102]. Dále bylo prokázáno, že chronické jaterní selhání je spojeno se změnami v metabolismu glukokortikoidů. Při chronické jaterní insuficienci dochází k vzestupu poměru 5β -tetrahydrokortizol, 5α -tetrahydrokortizol/tetrahydrokortizon, což svědčí pro relativní pokles oxidázové a vzestup reduktázové aktivity [103].

2.2.4.6. Placenta

Glukokortikoidy hrají velmi významnou roli při vývoji plodu v celém období prenatalního života, především pak v období organogeneze a při vyzrání endokrinní osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny [104-106]. Hladina aktivních glukokortikoidů je přitom v mateřské krvi výrazně vyšší, než v krvi fetální. Za tento rozdíl je odpovědná především placentární bariéra, která omezuje přestup kortizolu z mateřské krve do krve fetální. Je zřejmé, že touto bariérou je aktivita 11HSD2 [107-109]. Kapacita 11HSD2 v placentě je velmi vysoká (placenta je orgánem s nejvyšší hustotou 11HSD2 přepočtené na gram tkáně) a exprese 11HSD2 postupně narůstá s blížícím se termínem porodu [108, 110]. Význam této bariéry byl ilustrován některými experimenty na zvířecích modelech, kdy zvýšená koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů ve fetální krvi vedla ke snížení porodní váhy a k poruchám chování u mláďat, ale také výskytem pozdních důsledků, kdy se v dospělosti u těchto zvířat rozvíjí hypertenze, hyperinzulinemie a poruchy chování [111-113]

2.2.4.7.Kardiovaskulární systém

Kortikosteroidní hormony významně ovlivňují některé fyziologické funkce kardiovaskulárního systému a to prostřednictvím glukokortikoidních a mineralokortikoidních receptorů. Jak je všeobecně známo, velmi významnou roli v regulaci kardiovaskulárního systému má mineralokortikoid aldosteron. Ten podstatným způsobem přispívá k regulaci cirkulujícího krevního objemu a k regulaci arteriálního krevního tlaku prostřednictvím ledvinného jednosměrného transepiteliálního transportu sodných iontů. Novější práce ukazují, že hladina aldosteronu v plazmě pozitivně koreluje s hypertrofií levé komory [114], výskytem srdečního selhání, mortalitou [115] a s rozvojem srdeční fibrózy. Tuto skutečnost potvrzují jak práce experimentální [116, 117], tak i klinické studie. V těchto klinických studiích, provedených na pacientech se srdečním selháním, vedlo podávání jak selektivního (eplerenon) tak neselektivního (spironolakton) antagonisty aldosteronu k výraznému poklesu morbidity a mortality [118, 119]. Tyto skutečnosti vedly k podrobnému výzkumu úlohy 11HSD2 ve vztahu ke kardiovaskulárnímu systému. Na experimentálních modelech bylo zjištěno, že při hypertenzi dochází ke zvýšené expresi genu pro mineralokortikoidní receptor a genu pro 11HSD2 [120, 121]. Dále se ukázalo, že zatímco v epitelové tkáni glukokortikoidy navázané na mineralokortikoidní receptor působí jako mineralokortikoidní agonista [122] a aktivita 11HSD2 „ochraňuje“ mineralokortikoidní receptor před jeho aktivací endogenními glukokortikoidy, ve tkáni srdečního svalu pravděpodobně působí glukokortikoidy jako mineralokortikoidní antagonist [123-125]. Zvýšená aktivita 11HSD2 v srdečním svalu tedy zvyšuje mineralokortikoidní účinek a naopak. Tato skutečnost byla potvrzena prací na transgenní myši s nadměrnou expresí 11HSD2 v kardiomyocytech [126]. U těchto zvířat dochází ve zvýšené míře k rozvoji srdeční fibrózy, srdeční hypertrofie a srdečnímu selhání, bez rozvoje arteriální hypertenze. Podání selektivního antagonisty aldosteronu (eplerenon) vedlo ke zmírnění těchto projevů. Výsledky klinických studií potvrzují, že podávání blokátorů aldosteronu přináší terapeutický zisk a snížení mortality u pacientů se srdečním selháním.

2.2.4.8.Syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů

Defekt v prereceptorové konverzi biologicky aktivních glukokortikoidů na jejich neaktivní formy vede ke stavu nazývanému jako syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů (Apparent mineralocorticoid excess – AME). Za příčinu tohoto stavu je

považována mutace genu pro 11HSD2, jejímž důsledkem je žádná nebo nedostatečná aktivita 11HSD2. Poprvé byla tato teorie vyslovena na konci 70. let [127]. Patofyziologickým podkladem tohoto onemocnění je nedostatečná ochrana mineralokortikoidního receptoru před glukokortikoidy (viz výše). AME je charakterizován těžkou hypertenzí a hypokalemií, při současně nízkých plazmatických hladinách reninu a aldosteronu [128, 129]. Mezi další klinické příznaky tohoto syndromu patří nedostatečný intrauterinní vývoj, špatné postnatální prospívání, malá postava a polyurie. Léčba tohoto onemocnění spočívá především v celoživotní suplementaci kalia, v podávání antagonisty mineralokortikoidního receptoru spironolaktonu a v podávání kalium šetřících diuretik.

2.2.4.9.11HSD a malignity

Glukokortikoidy obecně inhibují buněčnou proliferaci a stimulují buněčnou diferenciaci a to i u nádorových buněk. Tudíž v regulaci proliferace a diferenciaci nádorových buněk může periferní metabolismus glukokortikoidů hrát fyziologicky významnou roli. Nejpravděpodobnějším mechanismem je regulace přísunu biologicky aktivních glukokortikoidů ke glukokortikoidnímu receptoru prostřednictvím aktivity obou izoform 11HSD, respektive porušení rovnováhy antiproliferačního efektu 11HSD1 a proliferačního efektu 11HSD2. Význam periferního metabolismu glukokortikoidů v oblasti tumorigeneze ještě není zcela objasněn, nicméně dosud publikované práce tuto teorii potvrzují. V některých typech nádorových buněk byla nalezena výrazně zvýšená aktivita 11HSD2, oproti zdravým buňkám [130]. 11HSD2 je tak považován za možný onkogen, který významně ovlivňuje buněčnou proliferaci. Nadprodukce 11HSD1 buněčnou proliferaci naopak snižuje. Tuto teorii potvrzují i práce provedené na vzorcích lidských buněk získaných z adenomů hypofýzy, kde byl zjištěn výrazný nárůst exprese 11HSD2 a pokles exprese 11HSD1 a kdy podání specifického inhibitoru 11HSD2 k těmto nádorovým buňkám vedlo k poklesu buněčné proliferace o cca 30 procent [131]. Další důkaz o významu 11HSD v procesu tumorigeneze přinesla in vitro studie provedená na buněčných kulturách izolovaných z karcinomu prsu, kdy antiproliferační efekt glukokortikoidů byl inhibován nárůstem aktivity 11HSD2 [132]. Tento nárůst koreloval s dávkou dodávaného glukokortikoidu. Zdá se tedy, že obě formy 11HSD hrají důležitou roli v procesu tumorigeneze a že cílené ovlivnění prereceptorového metabolismu glukokortikoidů by se v budoucnu mohlo stát novým cílem protinádorové terapie.

2.2.4.10. 11HSD a imunitní systém

Glukokortikoidy jsou již po dlouhou dobu známy svým imunosupresivním účinkem a jsou proto používány u celé řady zánětlivých onemocnění. V poslední době ovšem přibývají důkazy, že účinek glukokortikoidů na imunitní systém je mnohem komplexnější a složitější, než se doposud předpokládalo.

Jak se ukazuje, glukokortikoidy hrají významnou roli při vývoji imunitního systému a také ovlivňují jeho efektorové funkce, jako je například chemotaxe, nebo diapedeza imunitních buněk a mají nejen účinek imunosupresivní, ale i imunomodulační. Například protizánětlivý IL-4 je blokován prozánětlivým IL-12 a tvorba IL-12 a exprese jeho receptorů je tlumena glukokortikoidy [133].

Jak se ukazuje v posledních letech, účinek glukokortikoidů na imunitní systém je součástí komplexního regulačního mechanismu mezi centrálním nervovým systémem, neuroendokrinním systémem a systémem imunitním [134]. Regulace účinku glukokortikoidů na imunitní systém je zprostředkována především osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Tuto skutečnost potvrzují práce provedené na zvířecím modelu se změněnou aktivitou této osy. Zatímco zvířata se sníženou aktivitou osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (Lewis/N) vykazují relativně vyšší citlivost k autoimunitním chorobám a rozvoji zánětlivých procesů, u zvířat se zvýšenou aktivitou této osy (Fisher344/N) je tomu naopak [134, 135].

Dalším místem regulace účinků glukokortikoidů na imunitní systém je glukokortikoidní receptor. Glukokortikoidní receptory jsou přítomny ve většině tkání a účastní se celé řady fyziologických procesů. Mutace genu pro glukokortikoidní receptor způsobující jejich defekt vede k závažným poruchám vrozené i získané imunity [136].

Dalším mechanismem modulace imunitního systému glukokortikoidy je indukce apoptózy granulocytů [137, 138], v jejímž důsledku dochází ke zrychlení procesu fagocytózy těchto buněk makrofágy a následné prezentaci antigenu antigen prezentujícími buňkami.

Ačkoli je význam a mechanismus účinku glukokortikoidů v modulaci funkce imunitního systému poměrně detailně prozkoumán, oblast periferního metabolismu glukokortikoidů u buněk imunitního systému je prozkoumána mnohem méně. Existuje několik možných způsobů, jak může periferní metabolismus glukokortikoidů ovlivňovat imunitní systém. Prvním z nich je autokrinní ovlivnění, pomocí produkce 11HSD přímo buňkami imunitního systému. Exprese 11HSD1 byla prokázána v některých buňkách

imunitního systému jako například v CD4, CD8 a B220 lymfocytech a CD11c dendritických buňkách [139]. Dalším způsobem zásahu periferního metabolismu glukokortikoidů buňkami imunitního systému je parakrinní regulace aktivity tkáňové 11HSD produkcí cytokinů. Toto parakrinní ovlivnění periferního metabolismu glukokortikoidů bylo prokázáno u celé řady buněk. Na osteoblastech a v buňkách cévního hladkého svalu bylo prokázáno, že prozánětlivé cytokiny interleukin-1 β a tumornekrotický faktor α moduluji lokální metabolismus glukokortikoidů tím, že potlačují odbourávání kortizolu na kortizon (potlačení 11HSD2) zatímco zároveň stimuluji tvorbu kortizolu z neaktivního kortizonu (aktivace 11HSD1) [86, 140]. Zvýšená koncentrace IL-1 β , IL-6 a TNF- α způsobuje inhibici placentární 11HSD2 [141]. Pozitivní indukce 11HSD1 prozánětlivými cytokiny byla popsána také v případě dalších buněk jako jsou adipocyty a fibroblasty [142, 143]. Dále bylo prokázáno, že aktivita 11HSD1 u CD4 lymfocytů se zvyšuje při jejich aktivaci a bylo prokázáno, že biologicky aktivní glukokortikoidy vzniklé v důsledku tohoto nárůstu aktivity 11HSD1 mohou vést k aktivaci glukokortikoidního receptoru [139]. Uvážíme-li, že 11HSD1 reguluje přístup 11-hydroxy glukokortikoidů a 11-keto glukokortikoidů ke glukokortikoidním receptorům, může stimulace tohoto enzymu cytokiny IL-1 β a TNF- α představovat negativní zpětnou vazbu působící proti jejich vlastnímu prozánětlivému efektu [144]. Periferní metabolismus glukokortikoidů hraje důležitou roli také v maturaci a diferenciaci některých typů imunitních buněk, jako jsou například makrofágy, dendritické buňky a lymfocyty [145-147]. 11HSD1 hraje významnou úlohu také ve výše zmiňované glukokortikoidy stimulované apoptóze imunitních buněk [148].

Jednou z prvních prací ukazujících na možné terapeutické využití modulace periferního metabolismu glukokortikoidů, je studie zkoumající efekt inhibitorů 11HSD1 při kožním zánětu. Tato práce ukázala, že lokální podání kortizolu sice zmírňuje kožní zánět, avšak při podání kortizolu společně s inhibitorem 11HSD1 (glycyrrhetinová kyselina) vedlo ke snížení zánětlivého procesu o více než 70% [149]. Periferní metabolismus glukokortikoidů by také mohl v budoucnu pravděpodobně sehrát významnou roli v terapii autoimunitních onemocnění, jak naznačuje práce provedená na myším kmenu se spontánním výskytem autoimunitních onemocnění. Podávání inhibitoru 11HSD1 těmto zvířatům vedlo k výraznému oddálení nástupu autoimunitního zánětu [150].

Přestože výzkum periferního metabolismu glukokortikoidů ve vztahu k imunitnímu

systemu je teprve v počátcích, již nyní se zdá jako velmi pravděpodobné, že periferní metabolismus glukokortikoidů se stane novým terapeutickým cílem při léčbě zánětlivých a autoimunitních onemocnění.

2.2.4.11. 11HSD a gastrointestinální trakt

Jelikož steroidní hormony mohou ovlivňovat některé funkce gastrointestinálního traktu (GIT), byla věnována pozornost výzkumu periferního metabolismu ve vztahu k fyziologii a patofyziologii GIT. 11HSD byla prokázána v různých úsecích trávicího traktu, především pak v žaludku a střevu [62, 151]. V lidském žaludku byla nalezena 11HSD2 spolu s mineralokortikoidním receptorem v parietálních buňkách v oblasti žaludečního fundu, avšak nebyla nalezena v oblasti žaludečního antra [152]. Jelikož aldosteron se podílí na regulaci funkcí žaludečních parietálních buněk včetně regulace sekrece žaludečních šťáv, dá se předpokládat, že 11HSD2 hraje v žaludku stejnou roli, jako v ostatních mineralokortikoidních cílových tkáních, tedy „ochraňuje“ mineralokortikoidní receptory před glukokortikoidy. Poruchy žaludeční sekrece vzniklé na podkladě poruchy 11HSD však nebyly doposud popsány.

Již v 80. letech minulého století se začaly objevovat první domněnky o existenci 11HSD ve střevu. V polovině 90. byl prokázán výskyt obou izoform 11HSD ve střevu, včetně určení buněčných typů exprimujících 11HSD. Bylo tak zjištěno, že izoforma 11HSD1 je lokalizována ve vazivových a imunitních buňkách střevní lamina propria a izoforma 11HSD2 v epitelových buňkách střevní mukózy [62, 153]. Bylo zjištěno, že v průběhu jednotlivých částí střeva má aktivita 11HSD2 vzestupnou tendenci ve směru proximálně-distálním. Nejnižší (téměř neměřitelnou) aktivitu 11HSD2 nacházíme v duodenu a nejvyšší v distálním úseku tlustého střeva [154, 155] a že je v buňkách kolokalizována s mineralokortikoidními receptory [156]. Izoformě 11HSD2 se ve střevu, stejně jako ve všech ostatních mineralokortikoidních cílových tkáních, přisuzuje funkce ochrany mineralokortikoidního receptoru před glukokortikoidy. Již dlouhou dobu je známo, že aldosteron je ve střevní tkáni nezbytný pro absorpci sodíkových iontů buňkami střevního epitelu a že jeho navázání na mineralokortikoidní receptor zvyšuje absorpci Na^+ iontů [157, 158]. Zatímco v nepřítomnosti inhibitoru 11HSD2 karbenoxolonu je efekt kortikosteronu na stimulaci sodíkové absorpce zanedbatelný, je v přítomnosti karbenoxolonu srovnatelný s účinkem aldosteronu [159, 160]. Bylo také zjištěno, že expresi a aktivitu 11HSD2 je možné ovlivnit dieteticky. Podávání potravy s nízkým

obsahem soli vede ke zvýšení exprese 11HSD2 v distální části tlustého střeva [161] a naopak dieta s vysokým obsahem soli snižuje aktivitu 11HSD2 v distálním úseku tlustého střeva [162]. Na základě výše uvedených faktů, je velmi pravděpodobné, že 11HSD2 ve střevu hraje klíčovou úlohu v regulaci příjmu Na^+ z potravy.

Izoformě 11HSD1 se ve střevu přisuzuje funkce především v regulaci glukokortikoidního signálu, která je zvláště významná v průběhu vývoje a maturace střeva a to jak v období prenatálním, tak postnatálním [163]. Práce z poslední doby ukazují, že 11HSD1 pravděpodobně hraje také významnou úlohu v regulaci střevních zánětlivých onemocnění a to včetně nespecifických střevních zánětů (IBD). Vzhledem k tomu, že glukokortikoidy jsou v současné době používány jako jeden z hlavních prostředků v terapii IBD je zřejmé, že detailní prozkoumání periferního metabolismu glukokortikoidů při střevním zánětu by mohlo přispět k odhalení nových poznatků v oblasti patofyziologie a terapie těchto onemocnění. Práce provedené a opublikované na experimentálních modelech IBD odhalily, že v průběhu zánětlivého střevního procesu dochází ke změnám v expresi a aktivitě obou izoform 11HSD ve střevní tkáni. Konkrétně v průběhu těchto procesů dochází k poklesu exprese a aktivity 11HSD2 a naopak k nárůstu aktivity a exprese 11HSD1 [164]. Změny v expresi a aktivitě 11HSD byly v průběhu zánětlivých střevních procesů popsány také v buňkách střevního imunitního systému [165]. Uvedená fakta svědčí o komplexním účinku prereceptorového metabolismu glukokortikoidů v regulaci střevního zánětlivého procesu. Problematika 11HSD a střevních zánětlivých onemocnění je jednou z hlavních zkoumaných tezí této dizertační práce.

3. CÍLE

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

3.1. Otázka 1

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

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

3.2. Otázka 2

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

Výsledky našich prací i prací jiných autorů na experimentálním modelu zánětlivých střevních onemocnění ukázaly změny v expresi a aktivitě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy. Chtěli jsme ověřit, zda k obdobným změnám v lidské

střevní tkáni dochází i v průběhu idiopatického střevního zánětu. Zkoumali jsme proto expresi 11HSD a zánětlivých cytokinů ve vzorcích střevní tkáně získaných od pacientů s ulcerosní kolitidou a porovnávali je se vzorky střevní tkáně od pacientů, u kterých byl zánětlivý střevní proces histologicky vyloučen.

3.3. Otázka 3

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

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

3.4. Otázka 4

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

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

4. MATERIÁLY A METODY

4.1.11HSD a experimentální TNBS kolitida

4.1.1. Použitá zvířata

Veškerá zvířata k experimentům byla získána ze standardního chovu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v.v.i. K pokusům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar vážící 250 až 300 gramů. Zvířata byla chována při stálé teplotě 22°C a konstantní fotoperiodě 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Zvířata měla volný přístup k vodě a standardní dietě pro laboratorní zvířata. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin, skupiny experimentální a skupiny kontrolní. Experimentální kolitida byla indukována pomocí enterální aplikace 2,4,6 trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) metodou opublikovanou dříve [166]. K experimentu byla použita jednorázová dávka TNBS v množství 30 mg rozpuštěná ve 100 μ l 50% ethanolu, která byla aplikována rektálně do tlustého střeva v hloubce 8 cm. U některých experimentů byla dávka TNBS redukována na 8mg nebo 16 mg, aby indukované zánětlivé změny byly mírnějšího stupně. Kontrolní skupině zvířat bylo stejným způsobem aplikováno 100 μ l 0.9% roztoku NaCl. Experimentální skupina zvířat byla 24 hodin po aplikaci TNBS náhodně rozdělena na čtyři podskupiny. Každé podskupině zvířat byly v následujících 5 dnech rektálně aplikovány látky, které různým způsobem modulují glukokortikoidní metabolismus. První podskupině, která sloužila jako kontrolní, byl rektálně aplikován roztok 0,9% NaCl. Druhé skupině byl aplikován neselektivní inhibitor 11 β HSD karbenoxolon v dávce 4 mg. Třetí skupině zvířat byla podávána kombinace karbenoxolonu v dávce 4 mg a antagonisty glukokortikoidních receptorů mifepristonu (RU-486). Čtvrté skupině byl aplikován syntetický glukokortikoid budesonid v dávce 200 μ g. Budesonid byl použit vzhledem k předpokladu, že není metabolizován 11HSD [167]. Aplikace jednotlivých dávek všem podskupinám probíhala v intervalu 24 hodin. Sedmý den experimentu byla zvířata usmrcena dekapitací. Ihned po dekapitaci bylo odebráno tlusté střevo k analýze. Nejdříve bylo střevo opláchnuto v 0.9% roztoku NaCl a podélně rozstříženo. Podélný pás byl odebrán do 7 % formaldehydu k histologickému zpracování. Část tkáně byla odebrána pro měření enzymové aktivity a ihned zpracována. Další část tkáně střeva určená pro kvantitativní analýzu mRNA byla šokově zmrazena v tekutém dusíku a v něm následně ve zmraženém stavu uchovávána k dalšímu zpracování. Zbytek střevní tkáně byl zpracován k izolaci intraepiteliálních lymfocytů.

4.1.2. Použité chemikálie

K experimentům byly použity následující chemikálie: Od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Carbenoxolone, Percoll, Mifepriston, 11-deoxykortikosteron; od firmy Biochrome AG (Berlín Německo): fetální bovinní sérum, RPMI-1640; od firmy Roche (Mannheim, Německo) Fast Start DNA Master Sybr Green I; od firmy Invitrogen (Lofer, Rakousko) RNaseOUT, M-MLV reverzní transkriptasa, Random Primers; od firmy Top-Bio (Praha, Česká republika): RNA Blue, TAE elektroforetický pufr pro agarosové gely, PCR Ethidium Bromid; od firmy VBC-Genomics (Wien, Rakousko) byly pořízeny specifické primery pro 11HSD1 (5'→3'; GAGTTCAGACCAGAAATGCTCC- forward, TGTGTGATGTGATTGAGAATGAGC- reverse), 11HSD2 (5'→3'; GATGTTCCCCTCGCCTGAA- forward, ATGAGCAGTGCAATAGCTGCCTTG- reverse; pro β-aktin (5'→3'; CCGTAAAGACCTCTATGCCA- forward, AAGAAAGGGTGTAACGCA- reverse); od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA): TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpEraseUNG, TaqMan Gene Expression Assays pro COX-2 (kat.č. Rn00568225 -m1), 11β-HSD1 (kat.č. Rn00567167-m1), TNF-α (kat.č. Rn00562055-m1), IL-1β (kat.č. Rn015-14151-m1), MUC-2 (kat.č. Rn01498195-m1) a TaqMan Endogenous Control Rat GAPDH (kat.č. 4352338); od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA) Strata-X C₁₈ Polymeric Solid Phase extraction Kit; od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko): 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid solution; od firmy Penta chemicals (Praha, Česká Republika) Methanol p. a. kvalita; od firmy AstraZeneca (Londýn, Velká Británie): Budesonid a 11-dehydrokortikosteron vlastní výroby.

4.1.3. Izolace intraepiteliálních lymfocytů

Intraepiteliální lymfocyty byly izolovány mírně upravenou metodou dle Lyscoma a Bruetona [168]. Tlusté střevo bylo nejdříve propláchnuto 40 ml 0.9% roztoku NaCl o teplotě 4°C a tak důkladně očištěno od zbytků střevního obsahu a hlenu. Následně bylo střevo očištěno od zbytků tukové a pojivové tkáně jemnou preparací a rozřezáno na kousky o rozměru přibližně 5x5 mm. Tyto kousky byly vloženy do 50 ml Erlenmeyerových baněk společně se 40 ml media RPMI-1640 obohaceného fetálním bovinním sérem o koncentraci 12,5% a 10 mM Na₂-EDTA. V tomto mediu byly kousky tkáně inkubovány po dobu 20 minut při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂ při 200 rpm. Poté byl obsah baněk přefiltrován přes nylonové sítko o průměru 0,45 μm. Filtrát byl přelit do čistých erlenmeyerových baněk a uložen na ledu. Obsah sítko byl smíchán s 20 ml RPMI-1640

obohaceného fetálním bovinním sérem o koncentraci 12,5% a směs byla opět důkladně promíchávána po dobu 15 vteřin a následně přefiltrována přes nylonové sítko. Filtrát byl opět uložen na ledu a celý krok byl ještě jednou opakován. Filtráty ze všech tří cyklů inkubace byly následně smíchány a centrifugovány při 700x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující intraepiteliální lymfocyty a buňky střevní sliznice byla resuspendována v 5 ml RPMI 1640 o teplotě 4°C a uchovávána na ledu. Tento roztok byl přefiltrován přes nylonové sítko a opět centrifugován při 700x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 44% Percollu pokojové teploty o objemu 24 ml. Do předem připravených centrifugačních zkumavek bylo odměřeno do každé 5 ml 67% Percollu a na který bylo opatrně navrstveno 8 ml směsi buněčné suspenze v 44% Percollu popsané výše. Následovala centrifugace při 700x g po dobu 20 minut při pokojové teplotě bez aktivního brzdění. Po centrifugaci byla odstraněna horní polovina gradientu a následně pasturovou pipetou sebrány buňky na rozhraní gradientů. Takto odebraná suspenze buněk byla naředěna v poměru 1:3 s RPMI-1640 o teplotě 4°C a centrifugována při 700x g při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující frakci intraepiteliálních lymfocytů byla rozředěna v RPMI-1640 a použita k dalšímu zpracování.

4.1.4. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech

Oxidázová a reduktázová aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy byla měřena v čerstvých tkáňových řezech pomocí dříve publikované metody [162]. Vzorky střevní tkáně byly rozřezány pomocí žiletky na kousky o velikosti přibližně 1-2mm a vloženy do erlenmeyerových baněk společně s 10 ml inkubačního pufru v poměru 250 mg tkáně na 10 ml pufru. Inkubační pufr měl následující složení: NaCl 119,0 mM; CaCl₂ 1,2 mM; MgCl₂ 1,2 mM; NaHCO₃ 21,0 mM; K₂HPO₄ 2,4 mM; KH₂PO₄ 0,6 mM; glukosa 10,0 mM; glutamin 2,5 mM; β -hydroxybutyrát sodný 0,5 mM; manitol 10,0 mM. Inkubační pufr byl probubláván pneumoxidem (95 % O₂, 5 % CO₂), pH 7,4. Vzorky tkáně spolu s inkubačním pufrem byly nejdříve preinkubovány po dobu 20 minut při teplotě 37°C v neprodyšné uzavřené baňce. Následně byl přidán [³H]kortikosteron (1,45 \times 10⁻⁶ M) nebo [³H]11-dehydrokortikosteron (1,45 \times 10⁻⁶ M) a tím zahájena vlastní enzymatická reakce. Po přidání kortikosteronu nebo 11-dehydrokortikosteronu byly nádoby opět neprodyšně uzavřeny. Poté následovala inkubace po dobu 80 minut. Po ukončení inkubace byl jako interní standard a kvůli snížení adsorpce na stěny přidán 11-deoxykortikosteron (1,45 \times 10⁻⁶ M).

Vzniklý roztok byl promíchán, vložen do ledové tříště na dobu 10 minut a následně centrifugován 1600× g po dobu 10 min při 4°C. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy pomocí Strata-X C₁₈ Polymeric Solid Phase extraction Kit a ty pak následně zanalyzovány pomocí HPLC Agilent 1100. Vzniklá peleta po centrifugaci byla použita ke stanovení sušiny. Výsledky byly vyjádřeny v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu nebo kortikosteronu vztaženého na mg suché váhy a hodinu. Množství tkáně a doba inkubace byla zvolena na základě předchozích experimentů.

4.1.5. Extrakce steroidů

Extrakce steroidů byla prováděna metodou extrakce na pevné fázi (SPE) pomocí kolonek reverzní fáze C₁₈ Strata-X C₁₈ na vakuové aparatuře. Kolonky byly nejdříve aktivované 1ml methanolu a po té ekvilibrovány 1 ml vody. Po nanesení vzorku o objemu 2 ml byla kolonka propláchnuta 1 ml 5% methanolu a následně byly steroidy vyextrahovány pomocí 2x 500 µl methanolu. Vzorky vyextrahovaných steroidů byly do sucha odpařeny pod atmosférou dusíku při teplotě 45°C, následně uskladněny při teplotě -20°C a zanalyzovány pomocí HPLC, jak je podrobně popsáno v kapitole 4.1.6.

4.1.6. HPLC

Tritiem značené kortikosteroidy byly analyzovány pomocí přístroje Agilent 1100 od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Vzorky byly rozpuštěny v 50 µl methanolu a 20 µl bylo aplikováno na kolonu Merck C18 reverse phase. Eluce byla provedena pomocí lineárního gradientu voda-methanol od 58:42 (v/v) do 38:62 (v/v) po dobu 15 minut při průtokové rychlosti 1 ml/minutu, při teplotě kolony 46°C. Následně byla kolona izokraticky promývána po dobu 5 min 100 % methanolem průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Po ukončení eluce, před aplikací dalšího vzorku byla kolona promývána směsí methanol-voda 42:58 (v/v) po dobu 5 minut. Pro detekci β-záření v reálném byl použit detektor Beckman 171 citlivý na β-záření (Beckman, Fullerton, CA, USA). Identifikace byla provedena na základě srovnání retenčních časů.

4.1.7. Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno Bradfordovo metodou. Nejdříve bylo následujícím způsobem připraveno reakční činidlo: 25 mg Coomassie Brilliant Blue bylo rozpuštěno v 12,5 ml 96% ethanolu, poté bylo přidáno 25 ml 85 % kyseliny fosforečné a

vzniklá směs byla doplněna vodou na celkový objem 250 ml a přefiltrována. Vlastní reakční směs o celkovém objemu 1100 μ l byla složena ze vzorku, 10 - 100 μ l 0,15 M NaCl a 1000 μ l reakčního činidla. Po přidání reakčního činidla byla směs inkubována po dobu 20 minut a následně měřena absorbance při 595 nm. Kalibrační závislost byla sestrojena pomocí vzorků obsahujících známé množství hovězího sérového albuminu v rozsahu od 4 do 10 μ g.

4.1.8. Měření hladiny mRNA 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , IL-1 β , COX-2 a MUC-2

Celková RNA byla vyizolována ze vzorků zánětlivě postižené tkáně zamražené v tekutém dusíku pomocí přípravku RNA Blue (Top-Bio) dle návodu výrobce. Vlastní izolace byla prováděna ze 100mg střevní tkáně. Vzorek tkáně byl vložen do 1 ml RNA blue a poté zhomogenizován pomocí homogenizátoru Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při rychlosti 13000 otáček za minutu. Homogenát byl inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 0,2 ml chloroformu, směs byla důkladně protřepána a opět inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následně byl vzorek zcentrifugován při 12000x g po dobu 10 min při teplotě 4°C. Vodní fáze vzniklá centrifugací obsahující RNA byla odebrána pomocí automatické pipety do nové zkumavky a následně precipitována přidáním 0,5 ml isopropylalkoholu. Precipitace probíhala po dobu 10 minut při teplotě -20°C. Poté byla směs zcentrifugována při 12000x g po dobu 10 min při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn, k peletě do zkumavky byl přidán 1 ml 75% ethanolu a vzniklá směs byla důkladně protřepána a poté zcentrifugována. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a vzorek vysušen na vzduchu po dobu 10 minut. Následně byla vyizolovaná RNA rozpuštěna v 20 μ l vody pro PCR.

4.1.8.1. *Kvantitativní real time RT PCR*

Vzorky RNA byly přepsány do cDNA pomocí reverzní transkripce za pomoci Moloney murine leukemia virus reverzní transkriptázy (M-MLV). Celkový objem reakční směsi činil 20 μ l. Nejdříve byla smíchána přepisovaná mRNA se 100 ng Random primers, 1 μ l 10 mM dNTP mix a 12 μ l PCR H₂O. Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut při teplotě 75°C a následně prudce ochlazená. Po ochlazení bylo přidáno: 4 μ l reakčního pufu (5x), 2 μ l 0,1 M DTT a 1 μ l (40 jednotek) rekombinantního ribonukleosového inhibitoru RNase OUT. Po té následovala inkubace při teplotě 37°C po dobu 2 minut. Po inkubaci byl

přidán 1 μ l (200 jednotek) M-MLV RT. Po té následovaly dva kroky inkubace, nejdříve po dobu 10 minut při 25°C a následně 50 minut při teplotě 37°C. Reakce byla zastavena zahřátím směsi na 70°C po dobu 15 minut. Vzniklé vzorky s cDNA byly 10 \times naředěny ve vodě pro PCR a uskladněny při teplotě -20°C.

Pro kvantifikaci získané cDNA ze střevní tkáně byl v případě analýzy genů pro 11HSD-1 a 11HSD-2 použit přístroj LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) a jako „housekeeping“ gen byl použit β -aktin. Při kvantitativní analýze cDNA ze vzorků střevní tkáně pro geny TNF- α , IL1- β , COX-2 a MUC-2 a pro stanovení 11HSD1 z intraepiteliálních lymfocytů byl použit přístroj Abi-Prism 7000 Sequence Detection System instrument od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Jako „housekeeping“ gen byl u těchto experimentů použit glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenasa (GAPDH).

Při měření pomocí přístroje LightCycler byl použit firemní kit Fast Start DNA Master Sybr Green I. Celkový objem reakční směsi činil 20 μ l a byl složen z reakčního pufru LightCycler-DNA Master Sybr Green I mix, 1 μ l 10 \times naředěné cDNA; MgCl₂ 3 mM (11HSD1), 4 mM (11HSD2) nebo 5 mM (β -aktin); Každý z páru primerů 0,5 μ M; K analýze vzorků byl použit následující program: počáteční preinkubace a denaturace při teplotě 95°C po dobu 10 min; následná amplifikace, nejdříve při teplotě 95°C po dobu 15 vteřin, dále 55°C po dobu 10 vteřin (11HSD1, β -aktin) nebo 60°C po dobu 5 vteřin (11HSD2) a následně při teplotě 72°C po dobu 15 vteřin (11HSD1, β -aktin) nebo 20 vteřin (11HSD2). Proces amplifikace byl opakován 40x. Rychlost teplotní změny byla nastavena na 20°C za vteřinu. Fluorescence byla měřena na konci každé elongace. Pro ověření, zda byl amplifikován pouze požadovaný fragment, byla po ukončení amplifikace provedena rozpouštěcí analýza: 72°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny teploty 20°C za vteřinu) a 97°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny 0,1°C za vteřinu). Při rozpouštěcí analýze byla měřena fluorescence kontinuálně. V každé prováděné analýze byl se vzorky analyzován i jeden konstantní vzorek jako interní standard umožňující následnou korekci výsledků mezi jednotlivými analýzami. Po rozpouštěcí analýze byly z každého cyklu měření náhodně vybrány vzorky, které byly následně vyšetřeny pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu pro stanovení délky nasyntetizovaných fragmentů. Z hodnot získaných z real time RT-PCR byla následně vypočítána hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestaveny pro každý zkoumaný gen. Jako standardní cDNA

byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně (rozsah ředění 5×-1000× pro 11HSD1, 5×-10000× pro 11HSD2 a 5×-10000× pro β-aktin). Výsledky byly vypočítány jako poměr koncentrací 11HSD1/β-aktin a 11HSD2/β-aktin. Jednotlivé vzorky byly analyzovány v duplikátech nebo triplikátech. Jednotlivé primery, koncentrace MgCl₂ a vlastní program amplifikace byl stanoven na základě předchozích experimentů prováděných v naší laboratoři [169].

Při analýze pomocí přístroje Abi-Prism 7,000 Sequence Detection System instrument bylo celkové množství reakční směsi 20 μl. Směs se skládala z 1 μl 10x naředěné cDNA získané reverzní transkripcí, 10 μl reakčního pufru TaqMan Universal PCR Master Mix s AmpEraseUNG, a 1,5 μl firemně vyrobeného TaqMan Gene Expression Assay pro jednotlivé konkrétní geny. K vlastní analýze byl použit následující program: nejdříve aktivace Uracyl-N-Glykosylasy při teplotě 50°C po dobu 2 minut, po té zahřátí „hotstart“ polymerázy při teplotě 95°C po dobu 10 minut a následně 40 cyklů sestávajících z 15 vteřin trvající denaturace, nasedání primerů a extenze při 60°C po dobu 1 minuty. Ze získaných hodnot „crossing-pointů“ byla následně vypočtena hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen. Jako standard byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně naředěná v rozsahu 1-10000×. Výsledky byly vypočítány jako poměr relativních koncentrací zkoumaných genů a „housekeeping“ genů.

4.1.9. Stanovení aktivity enzymu myeloperoxidázy v colon

Aktivita myeloperoxidázy byla stanovena jako index infiltrace tkáně neutrofilními leukocyty pomocí dříve opublikované metody [170]. Aktivita byla stanovena na celém vzorku střeva zamraženém při odběru v -70°C. Vzorky tkáně o hmotnosti 250 μg byly vloženy do 2,5 ml pufru vychlazeného na teplotu 4°C, který byl připraven z KH₂PO₄ (50 mm, pH 6.0) a hexadecyltrimethylammonium bromidu v množství odpovídajícím koncentraci 0,5% ve výsledném roztoku. Následovala homogenizace pomocí přístroje Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při 13000 otáčkách za minutu. Vzniklý homogenát byl zcetrifugován při 41000x g po dobu 10 minut při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 2,5 ml pufru obohaceného 10 mM EDTA. Myeloperoxidázová aktivita byla stanovena H₂O₂ dependentní oxidací o-dianizidinu.2HCl pomocí absorbance při vlnové délce 460 nm při teplotě 37°C. Jedna jednotka enzymové aktivity byla definována jako množství enzymu v gramu tkáně, které způsobí změnu absorbance o 1 jednotku za jednu minutu.

4.2.1 11HSD a ulcerosní kolitida

4.2.1. Pacienti

Do studie bylo zařazeno celkem 26 pacientů, kteří podstoupili rutinní endoskopické vyšetření tlustého střeva (koloskopii). Protokol studie byl předem schválen etickou komisí 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všichni pacienti zařazení do studie měli podepsán informovaný souhlas. Čtrnáct pacientů bylo zařazeno do skupiny s kolitidou a 12 pacientů bylo zařazeno do skupiny kontrolní. Podmínkou pro zařazení do skupiny s kolitidou byla diagnóza ulcerosní kolitidy se středně těžkým až těžkým průběhem dle Mayo skóre [171]. Veškeré odebrané bioptické vzorky byly odebrány ze zánětlivě postižené sliznice a z každé oblasti bylo odebráno více bioptických vzorků, přičemž část byla zpracována pro histopatologické vyšetření v rámci diagnosticko-terapeutického procesu a část byla zpracována pro účely této práce. Popis přípravy vzorků pro histopatologické vyšetření není součástí této práce. Do kontrolní skupiny byli zařazení pacienti, kteří netrpěli žádným zánětlivým střevním onemocněním a kteří podstupovali koloskopické vyšetření z indikace dyspeptických obtíží, anebo v rámci prevence nádorového onemocnění tlustého střeva s negativním nálezem. Bioptické vzorky byly odebrány z oblastí makroskopicky fyziologicky vypadajících oblastí střevní sliznice. Bioptické vzorky byly odebrány do 2 ml roztoku RNA-later a uskladněny při teplotě 4°C.

4.2.2. Použité chemikálie

K experimentům byly použity následující chemikálie: Od firmy Ambion (Grand Island, NY, USA): RNA-later; od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): GenElute Mammalian Total RNA Kit; od firmy Roche (Mannheim, Německo) Fast Start DNA Master Sybr Green I; od firmy Invitrogen (Lofer, Rakousko) RNaseOUT, M-MLV reverzní transkriptasa, Oligo dT Primers, dNTP mix od firmy VBC-Genomics (Wien, Rakousko) byly pořízeny specifické primery pro 11HSD1 (5'→3'; CTCGAGTCGGATGGCTTTTTATG- forward, ACTTGCTTGCAGAATAGG-reverse), 11HSD2 (5'→3'; ACCGTATTGGAGTTGAACAGC- forward, TCACTGACTCTGTCTTGAAGC-reverse), pro β-aktin (5'→3'; AGCCTCGCCTTTGCCGA- forward, CTGGTGCCTGGGGCG- reverse), pro humánní Il-1β (5'→3'; CAGGCCGCGTCAGTTGTTGT- forward, TTATATCCTGGCCGCCTTTGGTC- reverse), pro humánní TNF-α (5'→3';

AGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTT- forward, ACGGCGATGCGGCTGATGGT-
reverse);

4.2.3. Měření hladin mRNA

Humánní bioptické vzorky byly zpracovány pomocí produktu Gene elute mammalian Total RNA kit dle návodu k výrobku, jak je podrobně popsáno v kapitole 4.4.4. Vlastní kvantifikace byla provedena pomocí přístroje LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) za použití firemního kitu Fast Start DNA Master Sybr Green I. Objem reakční směsi činil 10 μ l a obsahoval reakční pufr LightCycler-DNA Master Sybr Green I mix, 1 μ l 10x naředěné cDNA; $MgCl_2$ 3 mM (11HSD1), 4 mM (11HSD2) nebo 5 mM (β -aktin, TNF- α , IL-1 β); každý z páru primerů 0,5 μ M; Jako „housekeeping“ gen byl pro všechny zkoumané geny zvolen β -aktin. Programy pro jednotlivé konkrétní geny se od sebe vzájemně lišily. K analýze vzorků pro obě izoformy 11HSD použit následující program: počáteční aktivace a denaturace při teplotě 95°C po dobu 10 min; následovalo 45 cyklů amplifikace o následujícím průběhu: nejdříve při teplotě 95°C po dobu 15 vteřin, dále 60°C po dobu 10 vteřin a následně při teplotě 72°C po dobu 25 vteřin. Program pro TNF- α a IL-1 β měl následující průběh: 5 minut aktivace polymerasy při teplotě 95°C a následně 45 cyklů amplifikace tohoto průběhu: 10 vteřin při teplotě 95°C, 10 vteřin při teplotě 64°C a 20 vteřin při teplotě 72°C v případě TNF- α , nebo 24 vteřin při teplotě 72°C pro gen IL-1 β . Program měření β -aktinu v humánních bioptických vzorcích byl následující: počáteční preinkubace a denaturace při teplotě 95°C po dobu 10 min, následná amplifikace nejdříve při teplotě 95°C po dobu 15 vteřin, dále 54°C po dobu 10 vteřin a následně při teplotě 72°C po dobu 7 vteřin. Amplifikace byla opakována celkem 45x. Rychlost teplotní změny byla u všech popsáných programů nastavena na 20°C za vteřinu. Fluorescence byla měřena na konci každé elongace. Pro ověření, zda byl amplifikován pouze požadovaný fragment, byla po ukončení amplifikace provedena rozpouštěcí analýza: 72°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny teploty 20°C/sec) a 97°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny 0,1°C/sec). Při rozpouštěcí analýze byla měřena fluorescence kontinuálně. V každé prováděné analýze byl se vzorky analyzován i jeden konstantní vzorek jako interní standard umožňující následnou korekci výsledků mezi jednotlivými analýzami. Ze získaných hodnot „crossing-pointů“ pro jednotlivé geny byla následně pomocí kalibračních křivek vypočítána hladina mRNA. Kalibrační křivky byly sestaveny pro každý zkoumaný gen a jako standardní cDNA byla použita cDNA ze zdravé stěvné tkáně (rozsah ředění

5×-1000×). Výsledky byly vypočítány jako poměr 11HSD1/ β -aktin, 11HSD2/ β -aktin, TNF- α / β -aktin a IL-1 β / β -aktin. Jednotlivé vzorky byly analyzovány v duplikátech nebo triplikátech. Sekvence jednotlivých primerů, koncentrace MgCl₂ a vlastní program amplifikace byli stanoveny na základě optimalizace.

4.3.11HSD a experimentální DSS kolitida

4.3.1. Použitá zvířata

Veškerá zvířata k experimentům byla zakoupena ze standardního chovu firmy Velaz. K pokusům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar vážící 200 až 250 gramů a to jak pro skupinu experimentální, tak pro skupinu kontrolní. Zvířata byla chována při stálé teplotě 22°C a konstantní fotoperiodě 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Zvířata měla volný přístup ke standardní dietě pro laboratorní zvířata. K indukci kolitidy byl použit dříve popsáný model indukce zánětlivých změn aplikací sodné soli dextransulfátu o molekulové hmotnosti 20-80 tisíc [172]. Indukce střevního zánětu touto látkou je pravděpodobně způsobena na podkladě aktivace makrofágů a dalších imunitních buněk vyvolané porušením bariérové funkce střevních epitelálních buněk. Histopatologické změny střevní tkáně jsou u tohoto modelu velmi podobné mikroskopickým změnám, které se typicky vyskytují při postižení ulcerózní kolitidou. Dextransulfát byl rozpuštěn v pitné vodě o výsledné koncentraci 3%. Zvířata měla přístup k takto obohacené vodě ad libidum po dobu 5 dní, poté následovalo období 20 dní, kdy zvířata měla volný přístup k čisté pitné vodě. Tento cyklus byl zopakován celkově 7x. Po skončení třetího cyklu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací, bylo odebráno tlusté střevo a to dále zpracováno. Odebrané střevo bylo podélně rozstříženo a důkladně promyto ve fyziologickém roztoku. Část tkáně pak byla okamžitě použita ke stanovení enzymatické aktivity 11HSD a zbytek střeva byl šokově zamražen v tekutém dusíku a v něm i následně uskladněn pro další zpracování, konkrétně ke stanovení hladin mRNA a aktivity enzymu myeloperoxidázy.

4.3.2. Použité chemikálie

K experimentům byly použity následující chemikálie: Od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Dextran sulfat sodium salt, Kortikosteron, 11-deoxykortikosteron, od firmy Roche (Mannheim, Německo) Fast Start DNA Master Sybr Green I; od firmy Invitrogen (Lofer, Rakousko) RNaseOUT, M-MLV reverzní transkriptasa, Oligo dT Primers, dNTP mix, AMP-D1-deoxyribonukleasa, Taq DNA polymerasa; od firmy Top-

Bio (Praha, Česká republika): PCR H₂O, PCR vkladací pufr pro elektroforézu, PCR Ethidium Bromid; od firmy VBC-Genomics (Wien, Rakousko) byly pořízeny specifické primery pro 11HSD1 (5'→3'; GAGTTCAGACCAGAAATGCTCC- forward, TGTGTGATGTGATTGAGAATGAGC- reverse), pro 11HSD2 (5'→3'; GATGTTCCCCTCGCCTGAA- forward, ATGAGCAGTGCAATAGCTGCCTTG- reverse), pro β-aktin (5'→3'; CCGTAAAGACCTCTATGCCA- forward, AAGAAAGGGTGTAACGCA- reverse).

4.3.3. Stanovení aktivity 11HSD ve vzorcích DSS kolitidy

Aktivita 11HSD byla měřena obdobným způsobem podrobně popsáným v kapitole 4.1.4. Vzorky střevní tkáně o hmotnosti 250 mg byly nařezány a následně inkubovány v inkubačním pufru Krebs-Ringer. Jako substrát pro enzymatickou reakci byl v případě měření oxidázové reakce použit [³H]kortikosteron ($1,45 \times 10^{-6}$ M) a v případě měření aktivity reduktázové reakce byl použit [³H]11-dehydrokortikosteron ($1,45 \times 10^{-6}$ M). Po inkubaci v uzavřených nádobách po dobu 80 minut byla reakce zastavena prudkým ochlazením v ledové tříšti. Jako interní standard byl použit 11-deoxykortikosteron ($1,45 \times 10^{-6}$ M). Po zastavení reakce byla směs zcentrifugována. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy způsobem popsáným v kapitole 4.3.4 a peleta byla využita ke stanovení proteinu. Vlastní analýza steroidů byla provedena pomocí HPLC jak je podrobně popsáno v kapitole 4.1.6. a výsledky byly vyjádřeny v nanogramech vzniklého produktu vztaheného na gram suché váhy a hodinu.

4.3.4. Extrakce steroidů

Extrakce steroidů byla prováděna pomocí kolonek reverzní fáze C-18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA, USA). Kolonky byly nejdříve aktivovány 5ml methanolu a po té promyty 5ml vody. Následně byly nanášeny vzorky a kolonky propláchnuty 4 ml vody. Steroidy byly vyextrahovány pomocí 1,5 ml methanolu. Vzorky byly následně do sucha odpařeny pod atmosférou dusíku při teplotě 45°C a uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Vlastní analýza byla provedena pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 4.1.6.

4.3.5. Měření mRNA pro 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , IL-1 β

RNA ze zvířecích vzorků byla vyizolována dříve opublikovanou metodou [121]. Vzorky byly nejdříve vloženy do lyzačního roztoku (4 M guanidiniothiokyanát; 25 mM citrát sodný, pH 7,0; 0,1 M β -merkaptoethanol; 0,5 % sarkosyl) o teplotě 4°C v poměru 70-100 mg střevní tkáně na 1 ml roztoku. Následovala homogenizace pomocí přístroje Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při rychlosti 13000 ot/min. Ke vzniklému homogenátu bylo přidáno (na 1 ml použitého lyzačního roztoku) 0,1 ml 2 M acetátu sodného, 1 ml vodou saturovaného fenolu a 0,2 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (v poměru 49:1). Směs byla důkladně protřepána po dobu 15 vteřin a inkubována po dobu 15 minut při teplotě 4°C. Po skončení inkubace byly vzorky zcentrifugovány při 10000 \times g po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Centrifugací vzniklý supernatant byl přenesen do čistých skleněných zkumavek a smíchán s isopropylalkoholem v poměru 1:1. Následovala 30 minutová inkubace při teplotě -20°C. Poté byl vzorek zcentrifugován při 10000 \times g, po dobu 20 min při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta rozpuštěna v 0,4 ml denaturačního roztoku a 0,1 ml isopropylalkoholu. Následovala inkubace po dobu 30 minut při teplotě -20°C, po které byly vzorky opět zcentrifugovány při 10000 \times g po dobu 10 min při teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn, peleta promyta 75% ethanolem a následně byly vzorky opět zcentrifugovány. Získaná peleta byla vysušena na vzduchu v termomixeru při teplotě 45°C, rozpuštěna ve sterilní ve vodě pro PCR a ošetřena AMP-D1-deoxyribonukleasou dle návodu dodaného k výrobku. Následně byla ke vzorkům přidána směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu ve vzájemném poměru 25:24:1. Následovala centrifugace při 10000 \times g po dobu 10 minut při teplotě 4°C. Centrifugací vzniklá horní vodná fáze obsahující RNA byla přenesena do nových čistých zkumavek, do kterých byl poté přidán 3 M octan sodný a 96% ethanol v poměru 1:0,1:4 (vzorek:octan:ethanol). Vzniklá směs byla přes noc uložena při teplotě -20°C. Druhý den byly vzorky zcentrifugovány při 10000 \times g po dobu 20 min při teplotě 4°C, supernatant byl odstraněn a peleta omyta v 75% ethanolu a opět zcentrifugována. Vzniklá peleta byla vysušena a následně rozpuštěna ve vodě pro PCR a uskladněna při teplotě -70°C. S odstupem bylo pomocí PCR ověřeno, zda vzorek po ošetření RQ1-deoxyribonukleasou obsahuje zbytkovou DNA či nikoliv. PCR reakce byla provedena na přístroji PCR cycler (Eppendorf, Hamburg, Německo). Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahovala Taq DNA-polymerasu, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTPmix (0,1 mM každý nukleotid dATP,

dTTP, dGTP, dCTP), 0,25 μ M každého z páru primerů pro β -aktin. Reakce byla opakována celkem 35x a měla následující průběh: 95°C po dobu 2 minut, 95°C po dobu 40 vteřin, 60°C po dobu 30 vteřin a 72°C po dobu 50 vteřin. Poslední cyklus reakce byl zakončen denaturací při teplotě 72°C po dobu 5 minut. Po ochlazení byly vzorky inkubovány při pokojové teplotě společně s ribonukleasou-A po dobu 20 minut. Poté bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l 6 \times koncentrovaného vkládacího pufru na elektroforézu a vzorky byly nanесeny na 2 % agarosový gel a následovala elektroforéza v TAE pufru s ethidium bromidem (0,1 μ g/ml) při 100 V po dobu 40 minut. Po skončení elektroforézy byly její výsledky vyhodnoceny v UV světle pomocí přístroje Illumina (San Diego, CA, USA). V případě přetrvávající kontaminace DNA byly vzorky ošetřeny AMP-D1-deoxyribonukleasou stejným způsobem jak je uvedeno výše.

RNA získaná ze vzorků výše uvedeným způsobem byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA za pomoci M-MLV reverzní transkriptázy. Vlastní reakční směs o celkovém objemu 20 μ l se skládala z 0,5 μ g oligo-dT primeru, reakčního pufru (1x), 0,01 M DTT, 0,5 mM dNTP mix, 40 jednotek RNaseOUT a 200 jednotek M-MLV. Nejdříve bylo smícháno 5 μ g RNA s 0,5 μ g oligo-dT primeru a směs byla inkubována při 70°C po dobu 10 minut, po skončení inkubace ihned schlazena v ledové tříšti, poté byly přidány zbývající komponenty a vzniklá reakční směs byla inkubována při teplotě 37°C po dobu 60 minut. Po uplynutí inkubačního času byla směs zahřáta na teplotu 95°C, která byla udržována po dobu 5 min. Vzorky byly následně naředěny pomocí vody pro PCR a uskladněny při -20°C. Kvantifikace exprese jednotlivých genů byla provedena přístrojem LightCycler 1.0 (Roche, Mannheim, Německo) za použití firemního kitu Fast Start DNA Master Sybr Green I. Objem reakční směsi činil 10 μ l a obsahoval reakční pufr LightCycler-DNA Master Sybr Green I mix, 1 μ l 10x naředěné cDNA; MgCl₂ 3 mM (11HSD1), 4 mM (11HSD2) nebo 5 mM (β -aktin), každý z páru primerů 0,5 μ M. Jako „housekeeping“ gen byl pro všechny zkoumané geny zvolen β -aktin. K analýze byl použit následující program: preinkubace a denaturace při teplotě 95°C po dobu 10 min; následně 45 cyklů amplifikace, nejdříve při teplotě 95°C po dobu 15 vteřin, dále 55°C po dobu 10 vteřin (11HSD1, β -aktin) nebo 60°C po dobu 5 vteřin (11HSD2) a následně při teplotě 72°C po dobu 15 vteřin (11HSD1, β -aktin) nebo 20 vteřin (11HSD2).

Rychlost teplotní změny byla u všech popsaných programů nastavena na 20°C za vteřinu. Fluorescence byla měřena na konci každé elongace. Pro ověření, zda byl

amplifikován pouze požadovaný fragment, byla po ukončení amplifikace provedena rozpouštěcí analýza: 72°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny teploty 20°C za vteřinu) a 97°C po dobu 10 vteřin (rychlost změny 0,1°C za vteřinu). Při rozpouštěcí analýze byla měřena fluorescence kontinuálně. V každé prováděné analýze byl se vzorky analyzován i jeden konstantní vzorek jako interní standard umožňující následnou korekci výsledků mezi jednotlivými analýzami. Ze získaných hodnot „crossing-pointů“ pro jednotlivé geny byla následně pomocí kalibračních křivek vypočítána hladina mRNA. Kalibrační křivky byly sestrojeny pro každý zkoumaný gen a jako standardní cDNA byla použita cDNA ze zdravé střevní tkáně (rozsah ředění 5× - 1000×). Výsledky byly vypočítány jako poměr 11HSD1/β-aktin, 11HSD2/β-aktin. Jednotlivé vzorky byly analyzovány v duplikátech nebo triplikátech. Sekvence jednotlivých primerů, koncentrace MgCl₂ a vlastní program amplifikace byl stanoven na podkladě předchozích publikací.

4.3.6. Stanovení aktivity MPO

Aktivita enzymu myeloperoxidázy byla stanovena ve zmražených vzorcích střevní tkáně metodou podrobně popsanou v kapitole 4.1.8.

4.4. 11HSD a adjuvantní artritida

4.4.1. Použitá zvířata

Všechna zvířata k experimentům pocházela ze standardního chovu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v.v.i. K pokusům byli použiti dospělí samci potkanů kmene Lewis ve stáří 7-9 týdnů a to jak ve skupině experimentální, tak ve skupině kontrolní. Zvířata byla chována při stálé teplotě 22°C a konstantní fotoperiodě 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Po celou dobu experimentu měla zvířata volný přístup k vodě a standardní dietě pro laboratorní zvířata. Adjuvantní artritida byla indukována pomocí dříve popsané metody [173] za pomoci suspenze tepelně usmrcených bakterií *Mycobacterium butyricum* rozpuštěných v inkompletním Freundovo adjuvans. To bylo vpraveno zvířatům subkutánní injekcí do proximální části ocasu. Kontrolní skupině zvířat byl obdobným způsobem aplikován 0,9% roztok NaCl. Experiment proběhl ve dvou nezávislých částech. V první části byly porovnávány změny mezi skupinou artritickou a skupinou kontrolní. Ve druhé části experimentu byla artritická skupina 8. den po aplikaci Freundova adjuvans rozdělena do 5 podskupin a každé podskupině byla v následujících sedmi dnech aplikována látka modulující zánět, nebo metabolismus glukokortikoidů. První skupině byl aplikován

rekombinantní kompetitivní inhibitor receptoru pro TNF- α etanercept ve formě subkutánní injekce. Denní aplikovaná dávka byla určena na základě dřívějších publikací a činila 4 mg etanerceptu (rozpuštěného v 0,9% roztoku NaCl) na kilogram živé váhy. Druhé skupině byl aplikován kompetitivní antagonist receptoru pro IL-1 β anakinra prostřednictvím subkutánně implantované osmotické minipumpy Alzet 2ML1 od firmy Alzet (Cupertino, CA, USA). Anakinra byla dávkována kontinuálně minipumpou rychlostí 5mg na kilogram živé váhy za hodinu. Třetí skupině byl aplikován neselektivní inhibitor 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy karbenoxolon v množství 12,5mg na kilogram živé váhy ve formě subkutánní injekce za použití 0,9% roztoku NaCl jako rozpouštědla. Čtvrté skupině byl aplikován antagonist glukokortikoidních receptorů mifepriston formou intraperitoneální injekce v množství 30 mg mifepristonu na kilogram živé váhy, který byl rozpuštěn v 0,9% roztoku NaCl. Tato dávka byla aplikována v intervalu 24 hodin. Poslední páté skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok formou subkutánní injekce. Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací 16. (v prvním experimentu) nebo 18. (v druhém experimentu) den po indukci artritidy. Ze zvířat byly ihned po usmrcení odebrány inguinální, lumbální a kaudální lymfatické uzliny, které byly ihned po odběru šokově zmrazeny v tekutém dusíku, ve kterém byly následně uskladněny. Ze zvířat byly dále odebrány kolenní klouby, z nichž byla následně vypreparována synoviální tkáň a z té vyizolovány vlastní synoviocyty. Hodnocení artritických změn bylo převzato z dříve opublikované práce [174].

4.4.2. Indukce a hodnocení adjuvantní artritidy

Adjuvantní artritida byla indukována pomocí dříve popsané metody [173] za pomoci suspenze tepelně usmrcených bakterií *Mycobacterium butyricum* rozpuštěných v inkompletním Freundovo adjuvans. Použitý model představuje autoimunitní artritidu zprostředkovanou T lymfocyty a vyvolané zánětlivé změny jsou podobné změnám při revmatoidní artritidě a jiných zánětlivých artritidách. Indukční směs byla připravena následujícím způsobem: nejdříve bylo v třecí misce důkladně rozdrceno 100 mg tepelně inaktivovaných sušených bakterií *Mycobacterium butyricum*. K rozdrceným mykobakteriím byly přidány 3 ml inkompletního Freundovo adjuvans (parafinový olej, fyziologický roztok, Tween 80 v poměru 1:0.67:0.17) a směs byla dále třena po dobu 2 minut. Vzniklý produkt byl vložen do 15 ml skleněné zkumavky. Do třecí misky obsahující zbytek směsi byly přidány další 3 ml inkompletního Freundovo adjuvans a

následně byla vzniklá směs třena po dobu 30 vteřin. Po té byla vzniklá směs přidána do skleněné zkumavky k materiálu získanému v předchozím kroku. Takto získaná indukční směs byla uložena v tmavém prostředí při teplotě 4°C.

Vlastní indukce adjuvantní artritidy byla provedena v etherové anestezii jednorázovou aplikací 100µl suspenze subkutánní injekcí do proximální části ocasu ve vzdálenosti 2 centimetry od kořene. Suspenze byla před aplikací důkladně promíchána. Pro možnost sledování rozvoje artritidy byla denně měřena hmotnost zvířat a edém postižených končetin. Měření probíhalo na dvou místech, v oblasti hlezenního kloubu a v oblasti poloviny hlezenní kosti. Vlastní měření bylo prováděno pomocí přesného posuvného měřítka ve dvou rovinách na sebe vzájemně kolmých v předozadním a bočním směru. Na základě získaných dat byla vypočtena plocha elipsy kloubu podle vzorce: Plocha elipsy = $\pi \times a \times b$ kde a představuje rozměr v bočním směru a b rozměr ve směru předozadním.

4.4.3. Použité chemikálie

K experimentům byly použity následující chemikálie: Od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Genelute mammalian total RNA kit, Carbenoxolone, Mifepriston, Albumin; od firmy Biochrome AG (Berlín Německo): fetální bovinní sérum, RPMI-1640, Kolagenasa IV; od firmy Invitrogen (Lofer, Rakousko) RNaseOUT, M-MLV reverzní transkriptasa, Random Primers; od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA): TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpEraseUNG, TaqMan Gene Expression Assays pro 11HSD1 (kat.č. Rn 00567167-m1), 11HSD2 (kat.č. Rn 00492539-m1), TNF- α (kat.č. Rn 99999017-m1), COX-2 (kat.č. Rn 00568225-m1), OPN (kat.č. Rn 01449972-m1), GR (kat.č. Rn 00561369-m1), S100A4 (kat.č. Rn 01451938-m1) a TaqMan Endogenous Control Rat GAPDH (VIC/MGB) (kat.č. 4352338); od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA) Strata-X C₁₈ Polymeric Solid Phase extraction Kit; od firmy Penta chemicals (Praha, Česká Republika) Methanol p. a. kvalita; Od firmy Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) heat-killed dry Mycobacterium butyricum, inkompletní Freundovo adjuvans; od firmy MP biomedicals (Solon, OH, USA): MP Biomedicals Corticosterone RIA 3H kit

4.4.4. Měření hladiny mRNA 11HSD1, 11HSD2, TNF- α , COX-2, osteopontinu, glukokortikoidního receptoru a S100A4

Ze zpracovávaných vzorků byla vyextrahována RNA prostřednictvím produktu Genelute mammalian total RNA kit. Vlastní lýza buněk byla provedena smícháním suspenze buněk s roztokem „Lysis solution“, který byl obohacen 2-merkptoethanolem v množství 10 μ l/1ml. Roztok obsahující lyzované buňky byl přenesen do filtrační kolonky a zcentrifugován při 14000x g po dobu dvou minut při teplotě 4°C. Po ukončení centrifugace byl filtrát smíchán s 250 μ l 70% ethanolu. Vzniklý roztok byl důkladně protřepán a následně přenes do vázací kolonky. Následovala centrifugace při 14000x g po dobu 15 vteřin při teplotě 4°C . Po té byla kolonka opět za pomoci centrifugace promyta 500 μ l roztoku „Wash solution 1“ a následně 500 μ l roztoku „Wash solution 2“. Po promytí následovala centrifugace vázací kolonky s 500 μ l roztoku „Wash solution 2“ při 14000x g po dobu dvou minut při teplotě 4°C. V poslední fázi bylo do kolonky přidáno 50 μ l roztoku „Elute solution“ a následovala centrifugace při 14000x g po dobu jedné minuty při teplotě 4°C. Získaná RNA byla uskladněna při teplotě -70°C.

4.4.4.1. *Kvantitativní real time RT PCR*

Vzorky RNA byly transkribovány do cDNA pomocí reverzní transkripce za pomoci M-MLV reverzní transkriptázy. Celkový objem reakční směsi činil 20 μ l. Nejdříve byla smíchána přepisovaná mRNA se 100 ng Random primers, 1 μ l 10 mM dNTP mix a 12 μ l PCR H₂O. Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut při teplotě 65°C a následně prudce zchlazena. Následně bylo přidáno: 4 μ l reakčního pufru (5x), 2 μ l 0,1 M DTT a 1 μ l (40 jednotek) rekombinantního ribonukleasového inhibitoru RNase OUT. Po té následovala inkubace při teplotě 37°C po dobu 2 minut. Poté byl přidán 1 μ l (200 jednotek) M-MLV reverzní transkriptázy. Poté následovaly dva kroky inkubace nejdříve po dobu 10 minut při teplotě 25°C a následně 50 minut při teplotě 37°C. Reakce byla zastavena zahřátím směsi na 70°C po dobu 15 minut. Vzniklé vzorky s cDNA byly 10 \times naředěny a uskladněny při teplotě -20°C.

Kvantitativní real time PCR byla provedena pomocí přístroje Abi-Prism 7,000 Sequence Detection System instrument od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Užity byly firemně vyráběné FAM/TAMRA značené proby pro jednotlivé geny a jako „housekeeping“ gen byl použit GAPDH. Měření probíhalo obdobně, jako je podrobně popsáno v kapitole 4.1.7.1. Reakční směs o celkovém objemu 20 μ l obsahovala 1 μ l

10x naředěné cDNA získané reverzní transkripcí, 10 µl reakčního pufru TaqMan Universal PCR Master Mix s AmpEraseUNG, a 1 µl firemně vyrobeného TaqMan Gene Expression Assay pro jednotlivé geny. K vlastní analýze byl použit program sestávající z aktivace Uracyl-N-Glykosylasy při teplotě 50°C po dobu 2 minut, po té zahřátí „hotstart“ polymerázy při teplotě 95°C po dobu 10 minut a následně 40 cyklů sestávajících z 15 vteřin trvající denaturace, nasedání primerů a extenze při 60°C po dobu 1 minuty. Ze získaných hodnot „crossing-pointů“ byla stanovena hladina mRNA pomocí kalibračních křivek, které byly sestaveny pro každý zkoumaný transkript. Výsledky byly vypočítány jako poměr relativních koncentrací jednotlivých genů.

4.4.5. Izolace synoviocytů

Synoviální buňky byly vyizolovány z čerstvých kolenních kloubů pomocí enzymatického procesu metodou opublikovanou dříve [175], která byla mírně pozměněna. Veškeré kroky vlastní izolace synoviocytů probíhaly za sterilních podmínek. Kolenní klouby byly nejdříve důkladně očištěny pomocí jemné preparace od veškeré svalové a tukové tkáně, následně bylo otevřeno kloubní pouzdro a z něj mechanicky odebrány synoviální membrány. Ty byly následně rozmělněny na malé kousky pomocí skalpelu a po té vloženy do roztoku RPMI-1640 obohaceného kolagenasou typu IV. v poměru 1mg enzymu na 1 ml roztoku. Následovala inkubace při teplotě 37°C po dobu 60 minut v atmosféře obsahující 5% CO₂. Směs byla po ukončení inkubace přefiltrována přes nylonové sítko o průměru 20 µm. Následovala centrifugace při 700 x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Následně byla peleta obsahující synoviocyty rozpuštěna a promyta v RPMI-1640 a ještě jednou zcentrifugována za stejných podmínek jako v předešlém kroku. V případě vzorků zpracovávaných pro stanovení mRNA byla peleta rozpuštěna 250 µl Lysis solution z kitu genalute mammalian total RNA a následně zpracována postupem podrobně popsáním v kapitole 4.4.4. V případě vzorků, které byly zpracovány ke stanovení enzymové aktivity byla peleta rozpuštěna v roztoku RPMI-1640 obohaceném fetálním bovinním sérem o koncentraci 10% a směsí antibiotik (streptomycin, gentamycin, penicilin) o koncentraci 0,1%.

4.4.6. Izolace buněk z lymfatických uzlin

Lymfatické buňky byly získány ze směsi inguinálních, lumbálních a kaudálních lymfatických uzlin. Jednotlivé lymfatické uzliny byly nejdříve za sterilních podmínek

důkladně mechanicky očištěny od veškeré tukové tkáně a následně rozmělněny pomocí skalpelu a rozdrčeny v petriho misce za pomoci pístu jednorázové plastové injekční stříkačky. Vzniklý homogenát byl propasírován přes nylonové sítko o průměru 20 μm , čímž došlo k rozdělení mobilní a pevné fáze zpracovávaných lymfatických uzlin. Mobilní část, která prošla nylonovým sítkem, obsahovala mobilní lymfatické buňky a pevná část, která zůstala na sítku, obsahovala stromální buňky lymfatických uzlin. Obě fáze byly dále zpracovávány odděleně. Další zpracování se lišilo podle určení vzorků. U vzorků určených ke stanovení mRNA byla mobilní i pevná část zpracována stejným způsobem. Jednotlivé vzorky tkání byly rozpuštěny ve 250 μl roztoku Lysis solution (součást Genelute mammalian total RNA kitu) a dále zpracovány jak je popsáno v kapitole 4.4.4. Při zpracování vzorků, ve kterých byla stanovována aktivita 11HSD byl zvolen odlišný postup při zpracování mobilní a pevné fáze lymfatických uzlin. Mobilní fáze byla nejdříve rozpuštěna v roztoku RPMI-1640 a následně zcentrifugována při 700 x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Peleta byla následně opět rozpuštěna v roztoku RPMI-1640 a opakovaně zcentrifugována za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Následně byla peleta rozpuštěna v roztoku: RPMI-1640, fetálního bovinního séra v množství odpovídající 10% koncentraci ve finálním roztoku a kombinací antibiotik (streptomycin, gentamycin, penicilin) v množství odpovídajícím 0,1% finálního roztoku. Pevná fáze lymfatických uzlin byla nejdříve inkubována v roztoku RPMI-1640 obohaceném o kolagenasu typu IV v množství 1 miligram na mililitr při teplotě 37°C po dobu 50 minut v atmosféře obsahující 5% CO₂. Následně byla suspenze zcentrifugována při 700x g po dobu 5 minut při teplotě 4°C. Následovalo rozpuštění pelety v roztoku RPMI-1640 a opakovaní centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Po centrifugaci byla peleta rozpuštěna v roztoku RPMI-1640, fetálního bovinního séra a směsi antibiotik který měl stejné složení jako v případě mobilní fáze. Vlastní měření aktivity enzymu bylo provedeno způsobem popsáním v kapitole 4.4.7.

4.4.7. Stanovení aktivity 11 β -HSD

Jednotlivé vzorky synoviocytů a buněk mobilní a pevné fáze rozpuštěné v růstovém roztoku RPMI 1640, fetálního bovinního séra a směsi antibiotik získaných postupem popsáním výše byly rozpipetovány do sterilních plastových kultivačních šestijamkových destiček v objemu 1 ml na jamku a preinkubovány po dobu 60 minut v kultivačním boxu při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Po preinkubaci byl ke vzorkům přidán

radioaktivně značený substrát v množství odpovídajícím finální koncentraci 21nmol/l. V případě měření 11 β -reduktázové aktivity byl radioaktivním substrátem [³H]11-dehydrokortikosteron. V případě měření 11 β -oxidázové aktivity byl jako radioaktivně značený substrát použit [³H]kortikosteron. Po přidání radioaktivně značeného substrátu následovala inkubace po dobu 24 hodin při teplotě 37°C v atmosféře obsahující 5% CO₂. Po skončení inkubace byly ze vzorků vyextrahovány steroidy obdobnou metodou podrobně popsanou v kapitole 4.1.5 za použití kolonek reverzní fáze Strata-X C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Vyextrahované steroidy byly následně do sucha odpařeny a uskladněny při teplotě -20°C a zanalyzovány pomocí HPLC jak je popsáno v kapitole 4.1.6.

4.4.8. Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno metodou podle Lowryho. Před vlastním měřením byl nejdříve připraven Lowryho mix o následujícím složení: 9,6 ml Lowryho roztoku (2% Na₂CO₃ + 0,4% NaOH), 0,2 ml 1% roztoku vinanu-sodno-draselného, 0,2 ml 0,5% roztoku CuSO₄. Reakční směs byla připravena smícháním 1000 μ l Lowryho mixu se 100 μ l vzorku. Následovala inkubace po dobu 15 minut při pokojové teplotě, po té bylo přidáno 100 μ l folinového reagens (směs s H₂O v poměru 1:1). Po 30 minutách od přidání folinového reagens následovalo měření absorbance při 700 nm. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí vzorků se známým obsahem proteinu (hovězího sérového albuminu) v reakční směsi v rozsahu od 0 do 100 μ g.

4.5. Statistické metody

4.5.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a experimentální TNBS kolitida

Hodnoty jsou udány jako aritmetický průměr \pm střední chyba aritmetického průměru. Změny mezi skupinami při podávání látek ovlivňujících glukokortikoidní metabolismus byly hodnoceny jednoduchou analýzou rozptylu. Pokud ANOVA vyšla signifikantní, byly rozdíly pro jednotlivé skupiny hodnoceny Newman-Keulsovým testem. V případě vyhodnocování exprese mRNA 11HSD1 v intraepiteliálních lymfocytech byl k porovnání obou skupin použit Studentův t-test. Hladina významnosti byla zvolena 5 %.

4.5.2. 11 β -hydroxysteroidhydrogenasa a ulcerózní kolitida

Hodnoty jsou uvedeny jako medián a 25. A 75. percentil. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení pravděpodobností byl k porovnání dat mezi skupinami použit Mann-Whitney U test. Hladina významnosti byla zvolena 5 %.

4.5.3. 11 β -hydroxysteroidhydrogenasa a experimentální DSS kolitida

Hodnoty jsou uvedeny jako medián a 25. A 75. percentil. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení pravděpodobností byl k porovnání dat mezi skupinami použit Mann-Whitney U test. Hladina významnosti byla zvolena 5 %.

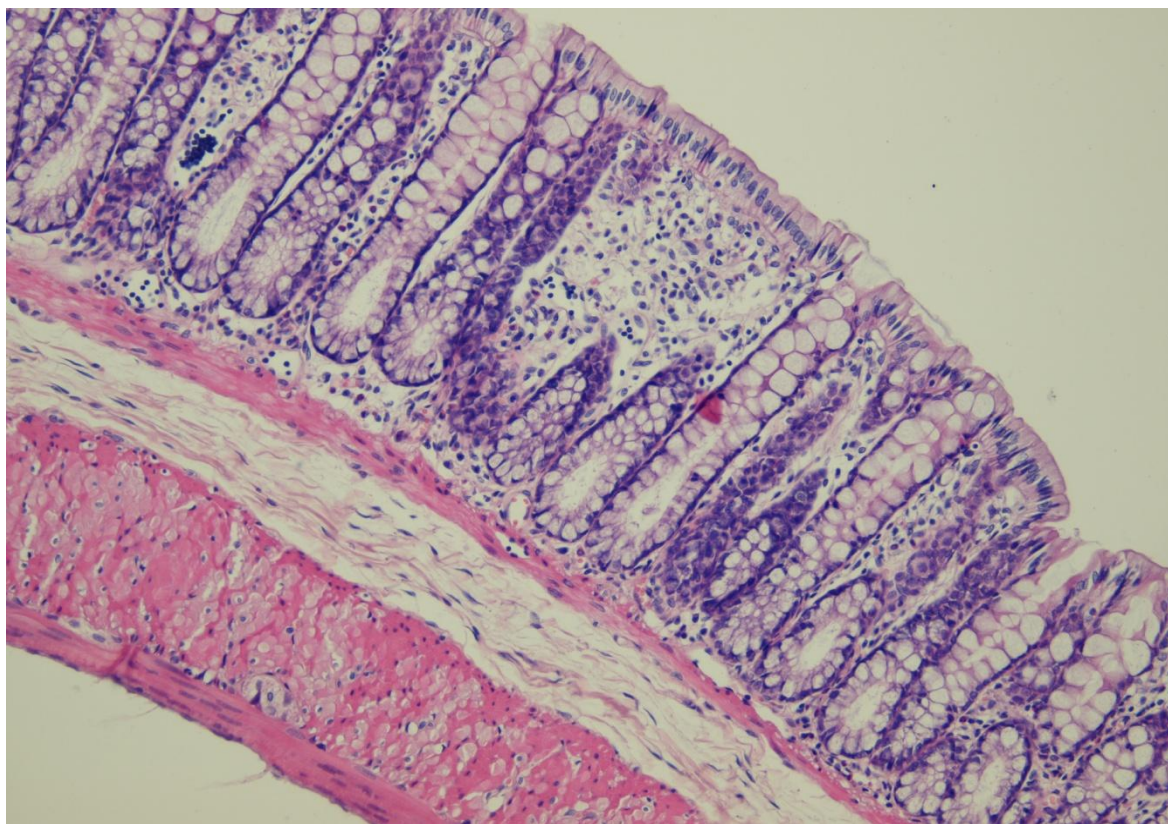
4.5.4. 11 β -hydroxysteroidhydrogenasa a adjuvantní artritida

Hodnoty jsou udány jako aritmetický průměr \pm střední chyba aritmetického průměru. Rozdíly mezi skupinou kontrolní a artritickou byly hodnoceny pomocí Studentovo t-testu. Porovnání skupin při podávání látek ovlivňujících zánět a glukokortikoidní metabolismus bylo provedeno pomocí jednoduché analýzy rozptylu. Pokud ANOVA vyšla signifikantní, byly rozdíly pro jednotlivé skupiny hodnoceny pomocí Fisherovy LSD metody mnohonásobného porovnávání. Hladina významnosti byla zvolena 5 %.

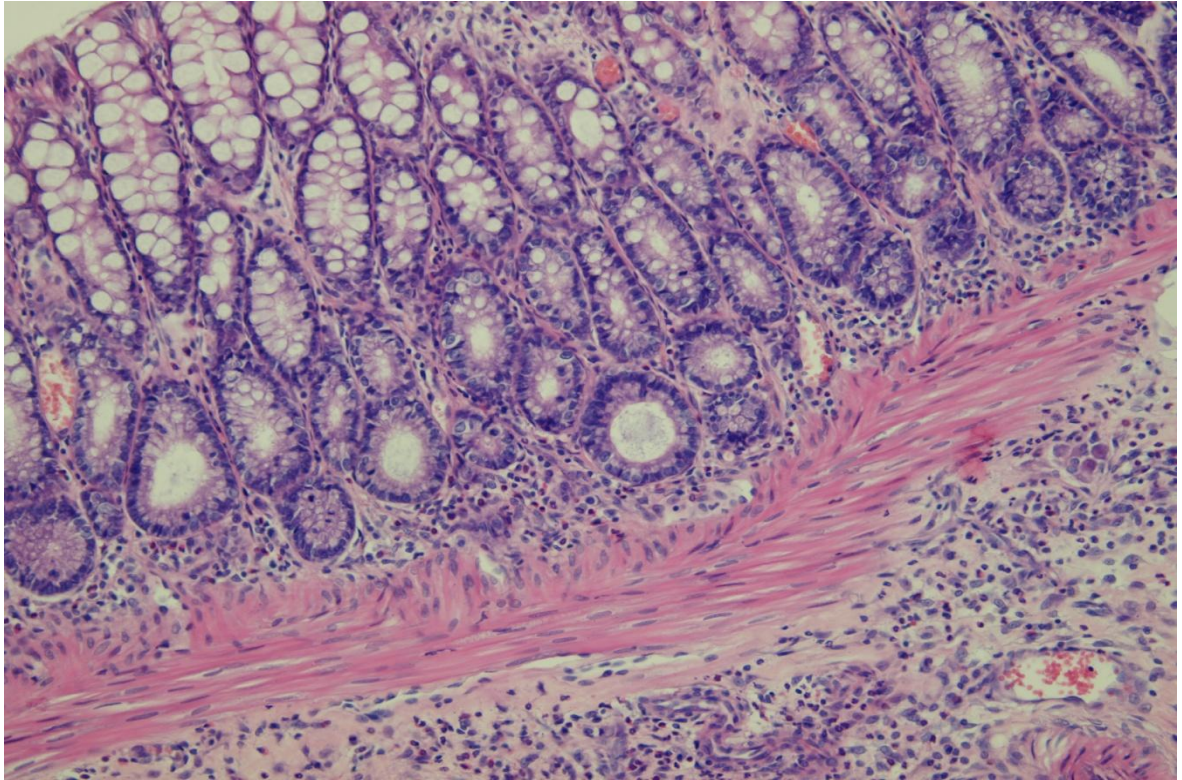
5. VÝSLEDKY

5.1.11HSD a experimentální TNBS kolitida

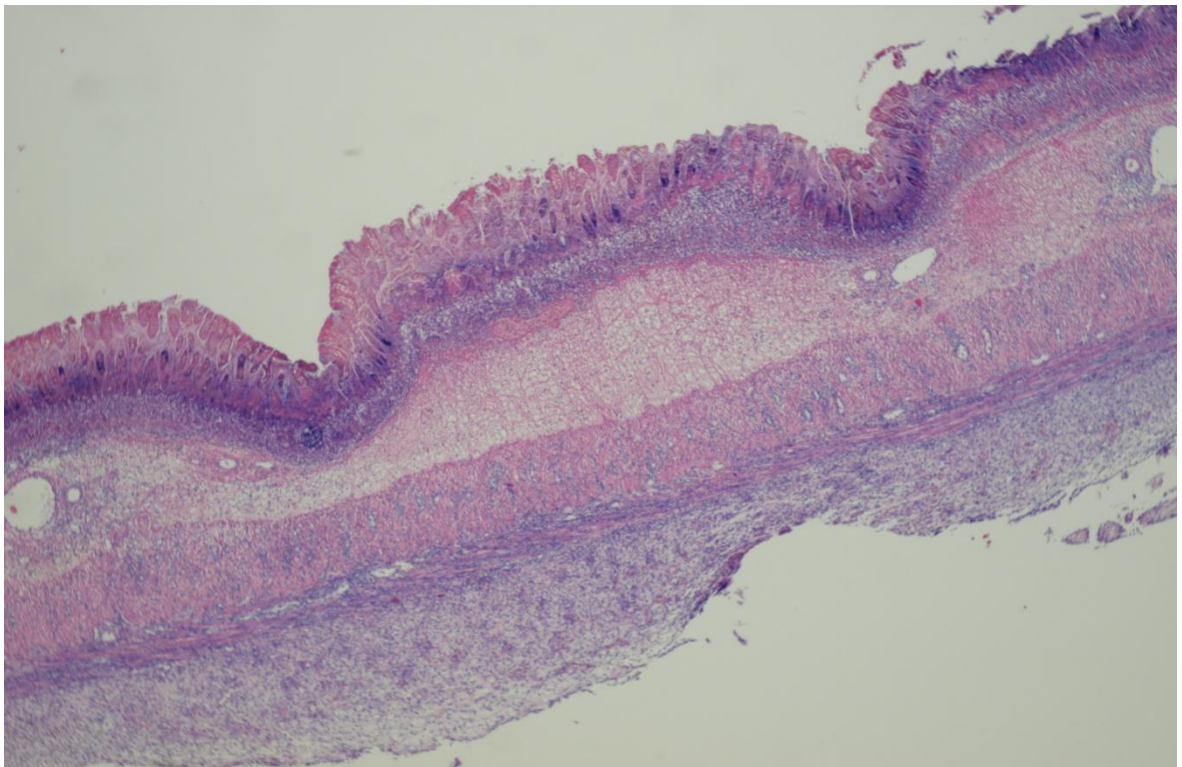
Enterální aplikace směsi trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) a etanolu vyvolala zánětlivé změny v celém postiženém úseku tlustého střeva. Rozsah a míra zánětlivých změn byla úměrná aplikované dávce. Při indukci kolitidy dávkou 8 mg TNBS převládaly u všech zvířat zánětlivé změny odpovídající středně těžké zánětlivé reakci. Při mikroskopickém vyšetření vzorků tkáně tlustého střeva byl nacházen nálezní mírně porušené architektiky, zánětlivé celulizace s leukocyty v submukoze a atrofickou, fibrotisovanou sliznicí (obr. 5.1, 5.2). Ve vzorcích získaných ze skupiny, které bylo aplikováno 30mg TNBS byly nacházeny těžké až velmi těžké zánětlivé změny. Při mikroskopickém vyšetření byl typickým nálezem obraz těžké poruchy architektury, rozsáhlých ulcerací, s leukocytárním demarkačním lemem na jejich spodině, flegmonózním zánětem v celé stěně, místy kryptovité abscesy, fibroproduktivními změnami na seroze a nekrotickou sliznicí (obr. 5.3, 5.4).



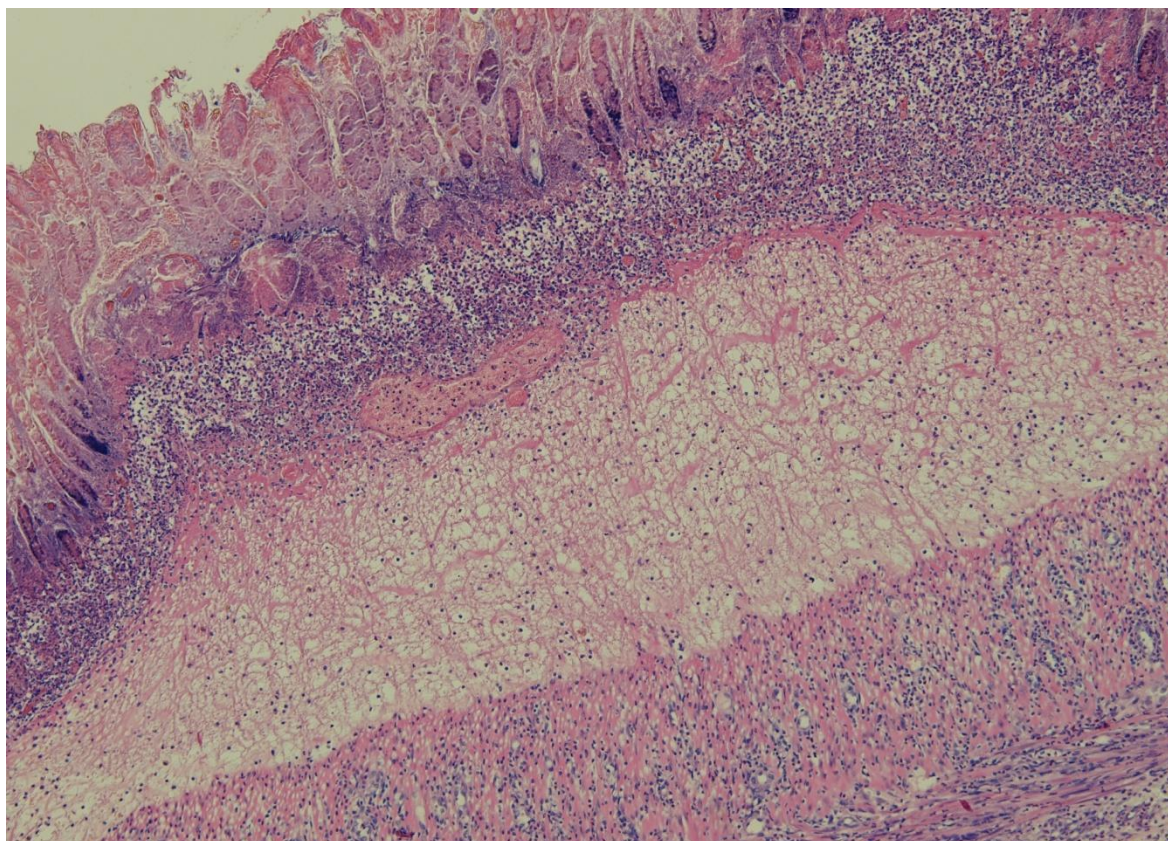
Obrázek 5.1. Mikroskopický obraz kolitidy po aplikované dávce 8 mg TNBS (zvětšeno 100x)



Obrázek 5.2 Mikroskopický obraz kolitidy po aplikované dávce 8 mg TNBS (zvětšeno 100x)

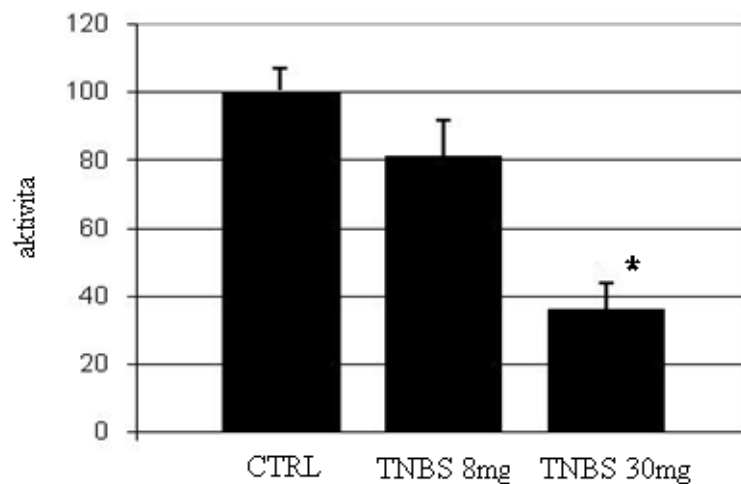


Obrázek 5.3 Mikroskopický obraz kolitidy po aplikované dávce 30 mg TNBS (zvětšeno 40x)

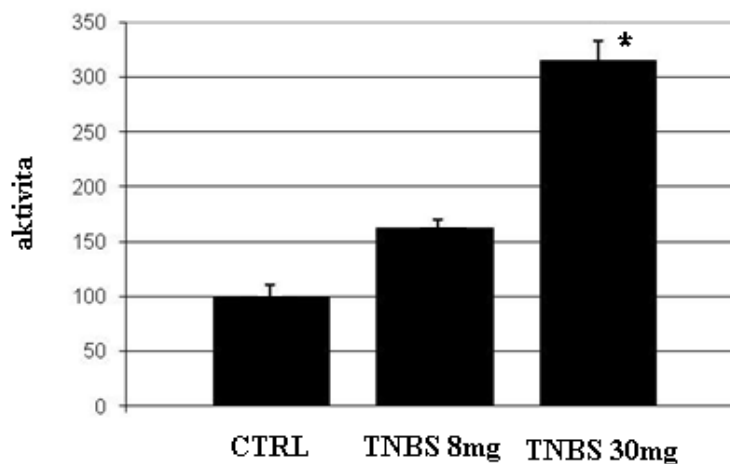


Obrázek 5.4 Mikroskopický obraz kolitidy po aplikované dávce 30 mg TNBS (zvětšeno 100x)

Indukce TNBS kolitidy signifikantním způsobem ovlivnila aktivitu 11HSD v čerstvě zmražených tkáňových řezech z tlustého střeva. Aktivita 11HSD v tkáňových řezech byla měřena jako konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron a obráceně. Vyjádřena byla v ng vzniklého kortikosteronu nebo 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg sušiny. U kontrolních zvířat, kterým nebyla podána TNBS byla naměřena oxidázová aktivita $51,4 \pm 5,6$ ng/h.mg sušiny a reduktázou aktivita $2,7 \pm 0,4$ ng/h.mg sušiny. Oxidázová aktivita byla snížena ve vzorcích zvířat kterým byla aplikována TNBS a toto snížení aktivity korelovalo s podanou dávkou TNBS (obr. 5.5). Reduktázová aktivita byla naopak výrazně zvýšena ve vzorcích s TNBS a toto zvýšení také korelovalo s podanou dávkou (obrázek 5.6). Vzhledem k tomu, že u všech tří sledovaných skupin byla absolutní hodnota oxidázové aktivity vyšší než aktivity reduktázové, byla celková aktivita 11HSD ve prospěch oxidace (Tab. I).



Obr. 5.5 Konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron (oxidace) v tkáňových řezech tlustého střeva s indukovanou TNBS kolitidou a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena % kontrolní skupiny * ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou



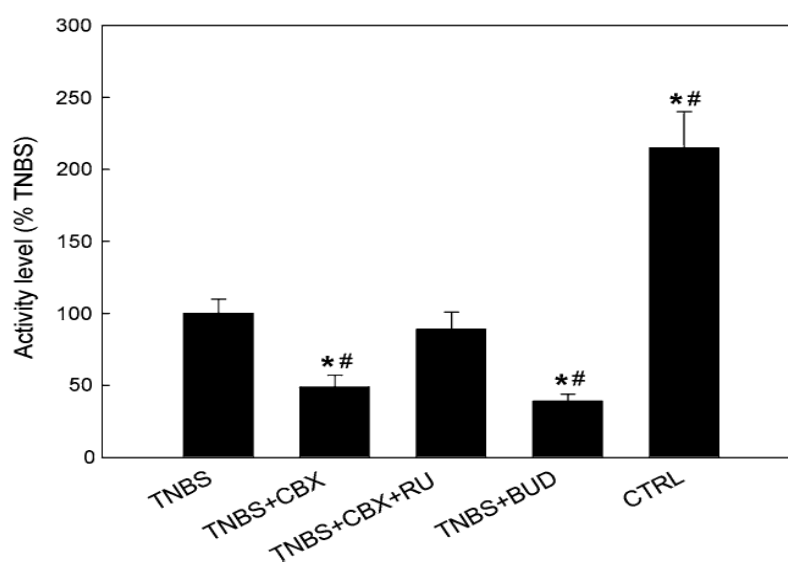
Obr. 5.6 Konverze 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron (redukce) v tkáňových řezech tlustého střeva s indukovanou TNBS kolitidou a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena % kontrolní skupiny * ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

Tab. I Rozdíl aktivit 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (oxidázová mínus reduktasová) v tkáňových řezech tlustého střeva u potkanů s indukovanou TNBS kolitidou a u kontrolní skupiny

	<i>rozdíl aktivit</i>
kontrola	48,7 \pm 6,3
TNBS 8mg	37,2 \pm 3,7
TNBS 30mg	10 \pm 2

Rozdíl aktivit je uveden v nmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg sušiny.

Při experimentu kdy byla indukována kolitida dávkou 30 mg TNBS a následně byly na zánětlivě poškozenou střevní sliznici topicky aplikovány jednotlivé látky různým způsobem ovlivňující glukokortikoidní metabolismus, došlo k signifikantním změnám v aktivitě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (obr 5.7). Při topické aplikaci neselektivního inhibitoru 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy karbenoxolonu došlo k poklesu oxidázové aktivity o téměř 50 %. Velmi podobný účinek na oxidázovou aktivitu 11HSD jako aplikace karbenoxolonu mělo topické podávání budesonidu. Topická aplikace karbenoxolonu společně s antagonistou glukokortikoidních receptorů mifepristonem (RU-486), vedlo k oslabení efektu samotného karbenoxolonu

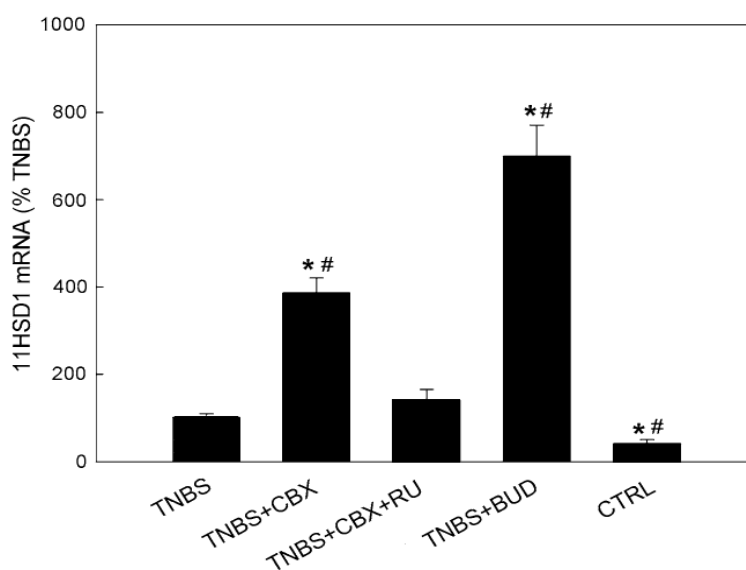


Obr. 5.7. Konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron v tkáňových řezech tlustého střeva s indukovanou TNBS kolitidou, s topickou aplikací karbenoxolonu (CBX), mifepristonu (RU), budesonidu (BUD) a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena % aktivity TNBS skupiny

* ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s TNBS skupinou; # ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou TNBS + CBX + RU

Převzato z Ergang P, Leden P et al., Dig Dis Sci. 2008 Aug;53:2160-7

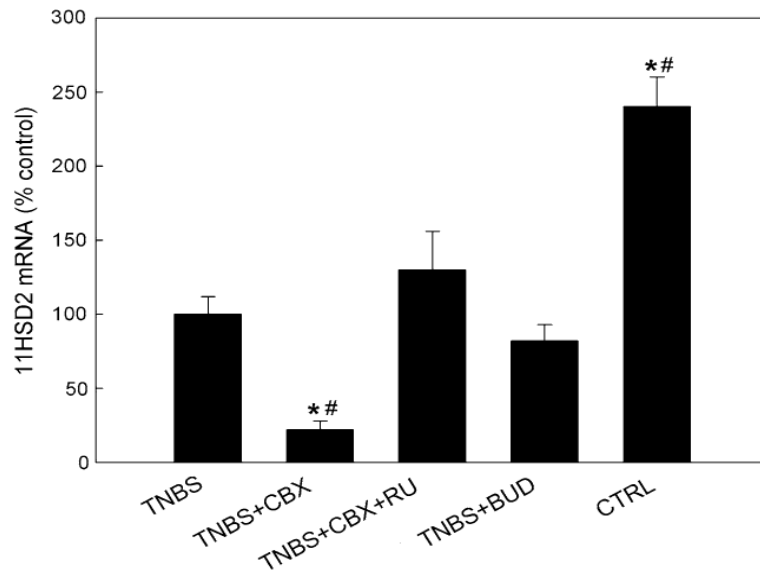
Při experimentu byla kromě aktivity 11HSD také sledována, pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase exprese mRNA genů obou izoform 11HSD a jejich množství bylo vztaženo na „housekeeping“ gen β -aktin. Jak je patrné z obrázku 5.8, topická aplikace neselektivního inhibitoru 11HSD karbenoxolonu několikanásobně zvyšovala hladinu 11HSD1 mRNA. Aplikace mifepristonu společně s karbenoxolonem vedla k inhibici tohoto vzestupu. Signifikantní vzestup 11HSD1 mRNA byl pozorován také po topickém podávání budesonidu. V případě 11HSD2 mRNA byla situace odlišná (obr 5.9). Podávání karbenoxolonu vedlo k významnému snížení exprese 11HSD2 mRNA, zatímco aplikace karbenoxolonu v kombinaci s mifepristonem, ani podávání budesonidu nevedlo k signifikantním změnám ve srovnání s kontrolní skupinou.



Obr. 5.8 Exprese mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 ve vzorcích tlustého střeva. Ze skupin zvířat s TNBS kolitidou (TNBS), s TNBS kolitidou a aplikací karbenoxolonu (TNBS + CBX), TNBS kolitidou a aplikací karbenoxolonu a mifepristonu (TNBS + CBX + RU), TNBS kolitidou a aplikací budesonidu (TNBS + BUD) a v kontrolní skupině (CTRL). Exprese je vyjádřena v % TNBS skupiny.

* ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s TNBS skupinou; # ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou TNBS + CBX + RU

Převzato z Ergang P, Leden P et al., Dig Dis Sci. 2008 Aug;53:2160-7



Obr. 5.9 Expres mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 ve vzorcích tlustého střeva. Ve skupinách zvířat s TNBS kolitidou (TNBS), s TNBS a aplikací karbenoxolonu (TNBS + CBX), TNBS a aplikací karbenoxolonu a mifepristonu (TNBS + CBX + RU), TNBS a aplikací budesonidu (TNBS + BUD) a v kontrolní skupině (CTRL). Expres je vyjádřena v % TNBS skupiny. * ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s TNBS skupinou; # ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou TNBS + CBX + RU
Převzato z Ergang P, Leden P et al., Dig Dis Sci. 2008 Aug;53:2160-7

Pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase byly měřeny také hladiny mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α , a IL-1 β , enzymu zánětlivé reakce COX-2 a proteinu MUC-2. Jejich množství bylo vztaženo na „housekeeping“ gen GAPDH. Z výsledků shrnutých v tabulce II vyplývá, že podávání karbenoxolonu významně neovlivňuje hladiny mRNA genů pro TNF- α , IL-1 β , COX-2. Při podávání karbenoxolonu však dochází k významnému vzestupu hladiny mRNA genu pro MUC2 a to jak při aplikaci karbenoxolonu samotného, tak při jeho současném podávání s mifepristonem. Lokální podávání budesonidu má za následek snížení hladin mRNA pro TNF- α , IL-1 β a COX-2. Signifikantní vliv na hladinu MUC-2 mRNA lokální podávání budosenidu nemá. Podávání mifepristonu vedlo k významnému zvýšení hladin mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β a nemělo žádný prokazatelný vliv na hladiny mRNA COX-2, MUC-2.

Tab. II Hladiny mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β , enzymu COX-2 a proteinu MUC-2, při TNBS kolitidě a topickém podávání látek ovlivňujících glukokortikoidní metabolismus.

	<i>TNBS</i>	<i>TNBS + karbenoxolon</i>	<i>TNBS + karbenoxolon +RU</i>	<i>TNBS + budesonid</i>	<i>kontrola</i>
TNF- α	1.0 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	2.1 \pm 0.5*	0.3 \pm 0.1*,#	0.5 \pm 0.1*,#
IL-1 β	0.8 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1*,#	0.4 \pm 0.2#
COX-2	3.5 \pm 0.5	3.3 \pm 0.5	3.1 \pm 0.6	0.6 \pm 0.1*,#	0.4 \pm 0.1*,#
MUC-2	1.1 \pm 0.4#	3.0 \pm 0.4*	3.3 \pm 0.4*	1.3 \pm 0.3#	0.9 \pm 0.2#

Uvedené hladiny vztaženy na mRNA „housekeeping“ genu GAPD.

* ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s TNBS skupinou; # ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou TNBS + CBX + RU

Podle Ergang P, Leden P et al., Dig Dis Sci. 2008 Aug;53:2160-7

K posouzení míry zánětlivé infiltrace zkoumaných vzorků byla stanovena aktivita enzymu myeloperoxidázy. Ta byla použita jako index infiltrace tkáně tlustého střeva neutrofilními leukocyty. U vzorků ze zvířat, kterým byla aplikována TNBS došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity myeloperoxidázy oproti vzorkům kontrolní skupiny. Zatímco topické podávání karbenoxolonu nemělo za následek významnou změnu aktivity MPO, aplikace CBX + RU486 vedlo k signifikantnímu vzestupu aktivity oproti skupině TNBS. Lokální podávání budesonidu vedlo k poklesu aktivity MPO ve srovnání s TNBS skupinou (tab. III)

Tab. III aktivita myeloperoxidázy ve vzorcích tlustého střeva u potkanů s indukovanou TNBS kolitidou a u kontrolní skupiny

	<i>rozdíl aktivit</i>
kontrola	1,9 \pm 0,3*,#
TNBS	4.5 \pm 0.5#
TNBS +CBX	4.2 \pm 0.6#
TNBS + CBX + RU	7.1 \pm 0.7*
TNBS + BUD	2.2 \pm 0.4*,#

Aktivita je uvedena v jednotkách enzymové aktivity na gram tkáně, přičemž jedna jednotka enzymové aktivity byla definována jako množství enzymu v gramu tkáně, které způsobí změnu absorbance o 1 jednotku za jednu minutu.

* ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s TNBS skupinou; # ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou TNBS + CBX + RU

Pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase byly měřeny hladiny mRNA 11HSD1 ve vyzolovaných intraepiteliálních lymfocytech tlustého střeva. Jak je zřejmé z tabulky IV, hladina 11HSD 1 mRNA byla významně zvýšena ve skupině s TNBS oproti skupině kontrolní.

Tab. IV Hladina mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v izolovaných intraepiteliálních lymfocytech. Hodnoty jsou udány jako poměr 11HSD/GAPD

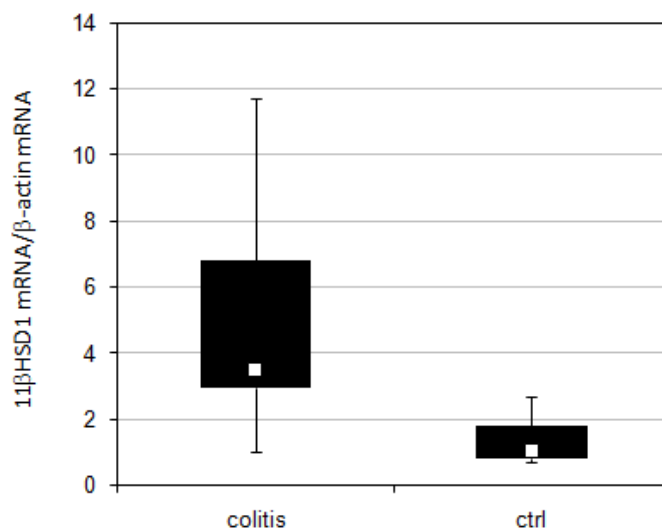
	<i>11HSD/GAPD</i>
kontrola	0,05 \pm 0,01
TNBS	0,37 \pm 0,13*

* ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

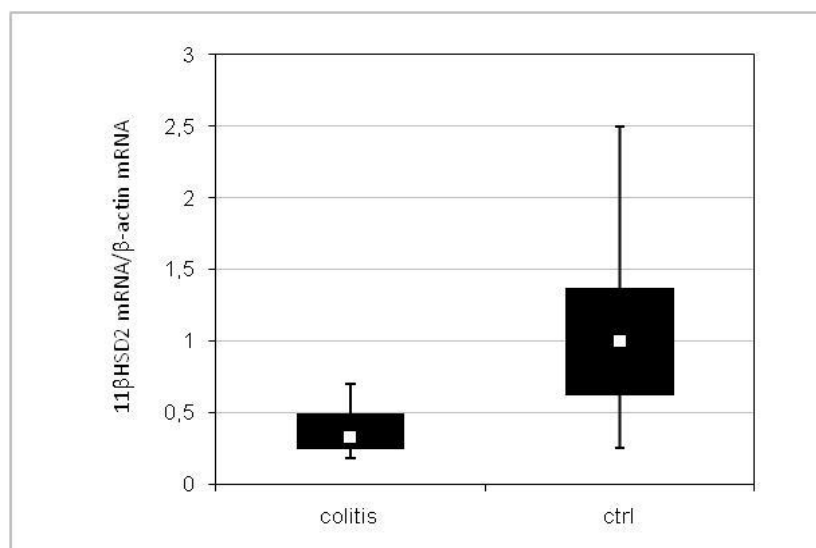
5.2. Ulcerosní kolitida a 11HSD

V bioptických vzorcích tlustého střeva získaných od pacientů s ulcerosní kolitidou a pacientů kontrolní skupiny (u kterých bylo histologicky vyloučeno zánětlivé střevní onemocnění) byla pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase měřena hladina mRNA obou 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas (11HSD1, 11HSD2) a jejich hladina byla vztažena na „housekeeping“ gen β -aktin. Měřením bylo zjištěno, že ve vzorcích od pacientů s ulcerosní kolitidou je významně vyšší hladina mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou (obr 5.10).

Při měření hladin mRNA 11HSD2 bylo zjištěno, že ve skupině vzorků od pacientů s ulcerosní kolitidou dochází k opačným změnám nežli v případě mRNA 11HSD1, tedy k poklesu hladin ve srovnání se vzorky kontrolní skupiny (obr 5.11). Zjištěné výsledky napovídají, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází k vzestupu exprese genu 11HSD1 a poklesu exprese genu 11HSD2.



Obr. 5.10 Box-Whiskers graf znázorňující expresi mRNA 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy 1 ve vzorcích od pacientů s ulcerosní kolitidou (colitis) a kontrolní skupině (ctrl). Hodnoty vyjadřují poměr 11HSD/β-aktin. Signifikantní rozdíl mezi skupinami pomocí Mann-Whitney *U*-test ($p < 0,001$) Převzato z Zbáňková S, Bryndová J, Leden P et al. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Jul;22:1019-23



Obr. 5.11 Box-Whiskers graf znázorňující expresi mRNA 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy 2 ve vzorcích od pacientů s ulcerosní kolitidou (colitis) a kontrolní skupině (ctrl). Hodnoty vyjadřují poměr 11HSD/β-aktin. Signifikantní rozdíl mezi skupinami pomocí Mann-Whitney *U*-test ($p < 0,01$) Převzato z Zbáňková S, Bryndová J, Leden P et al. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Jul;22:1019-23

Při měření hladin mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β pomocí jednokrokové RT PCR v reálném čase byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi vzorky získanými od pacientů s ulcerosní kolitidou a pacientů z kontrolní skupiny. Jak v případě mRNA TNF- α , tak v případě mRNA IL-1 β byly zjištěny významně vyšší hladiny ve vzorcích ulcerosní kolitidy ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. V). Lze tedy konstatovat, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi těchto prozánětlivých cytokinů střevní tkáně.

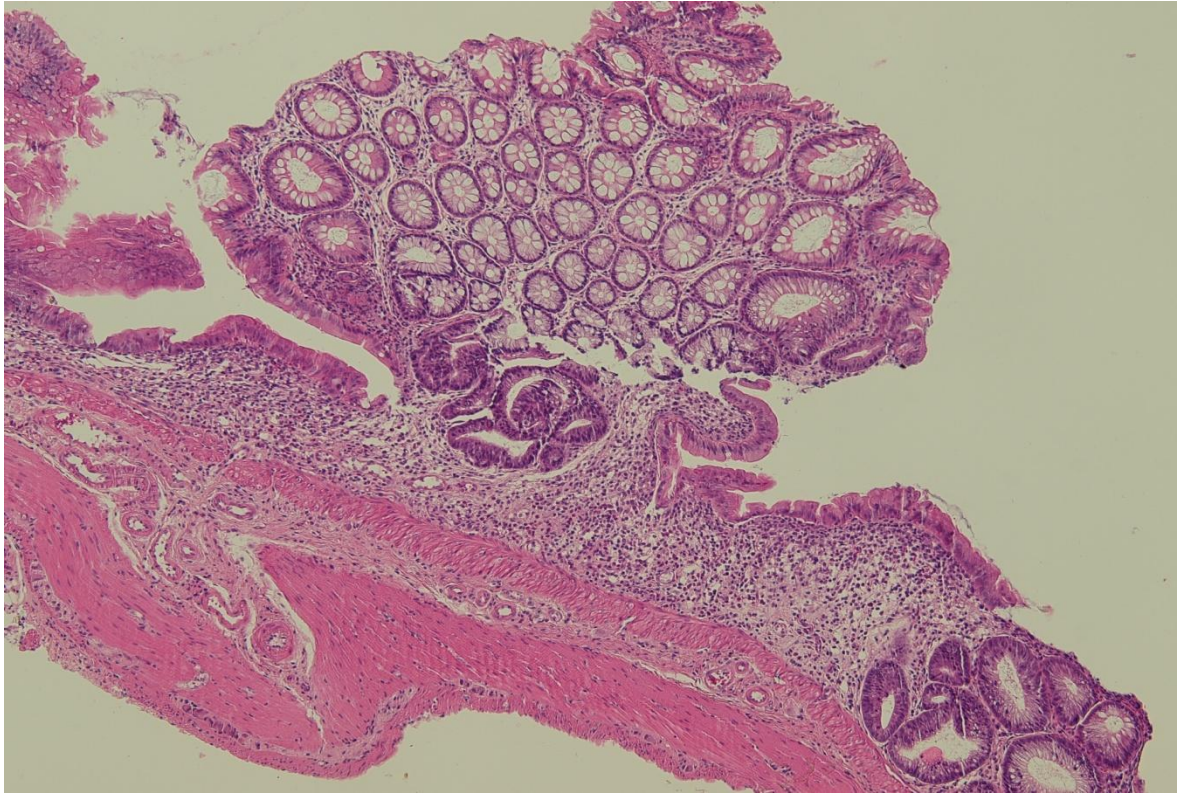
Tab. V Expese TNF- α mRNA a IL-1 β mRNA ve vzorcích tlustého střeva u pacientů s ulcerosní kolitidou a u pacientů kontrolní skupiny

	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1β</i>
Kontrola	2.01 (1.00-2.78)	0.07 (0.04-0.11)
Ulcerosní kolitida	5.55 (2.53-11.71)	0.61 (0.51-0.75)

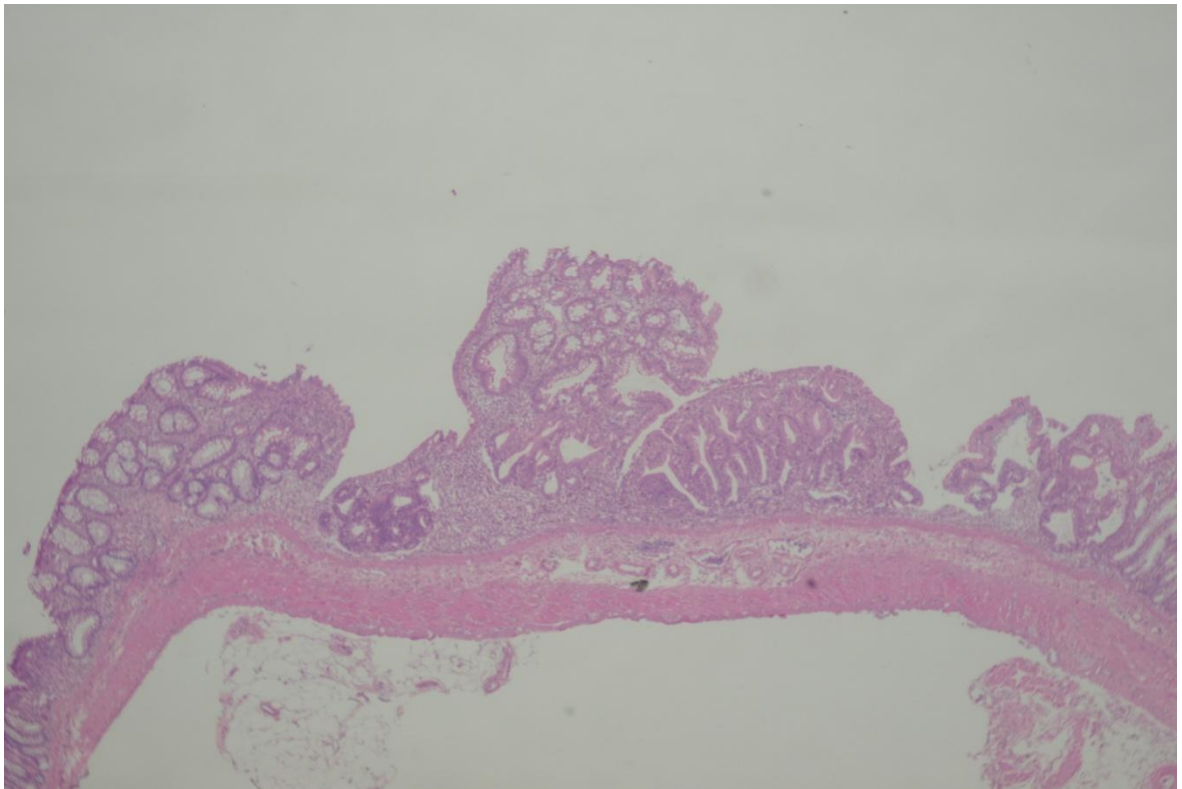
Expese je uvedena jako medián (25.-75. percentil) poměru hladin mRNA TNF- α (IL-1 β)/ β -aktin.

5.3.11 HSD a experimentální DSS kolitida

V experimentální skupině zvířat vedlo podávání 3% vodného roztoku dextransulfátu po dobu 10 dnů s následným časovým odstupem 20 dnů k rozvoji zánětlivého procesu v tlustém střevu. Při mikroskopickém vyšetření vzorků tkáně tlustého střeva byl nacházen obraz fokálně porušené architektiky sliznice, větvené krypty s iritovaným epitelem, místy atrofie se zcela chybějícími kryptami, zánětlivá celulizace s eosinofily i leukocyty, místy hyperplazie lymfatické tkáně (obr 5.15, 5.16). Dle hodnocení patologa, nalezené změny korelovali se změnami nalézanými ve vzorcích pacientů v chronickém stadiu ulcerosní kolitidy.



Obr. 5.15 Mikroskopický obraz kolitidy po 10 denní aplikaci 3% vodného roztoku DSS, s následnou 20 denní inkubací. (zvětšeno 40x)



Obr. 5.16 Mikroskopický obraz kolitidy po 10 denní aplikaci 3% vodného roztoku DSS, s následnou 20 denní inkubací. (zvětšeno 40x)

Ve vzorcích tlustého střeva získaných od experimentálních zvířat skupiny s DSS kolitidou a kontrolní skupiny byla stanovena jak oxidázová, tak reduktázová aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy. Oxidázová aktivita byla stanovena jako konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron a reduktázové aktivity jako konverze opačným směrem. Vyjádřena následně byla v ng vzniklého kortikosteronu nebo 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg sušiny. Medián 11-oxidázové aktivity byl významně nižší ve vzorcích s DSS kolitidou oproti vzorkům kontrolní skupiny. Naproti tomu, 11-reduktázová aktivita byla ve srovnání s kontrolní skupinou významně zvýšena ve vzorcích skupiny s DSS kolitidou. Vzhledem k tomu, že v obou sledovaných skupinách byla absolutní hodnota oxidázové aktivity vyšší než aktivity reduktázové, byla celková aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy ve prospěch oxidace (tab. VI).

Tab. VI Aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy ve vzorcích tlustého střeva u potkanů s indukovanou DSS kolitidou a u kontrolní skupiny

	<i>11β-oxidace</i>	<i>11β-redukce</i>
kontrola	34,8 (27,3-47,0)	6,8 (4,0-9,4)
DSS	21,2 (15,7-24,0)	16,4 (6,4-21,0)

Aktivita je uvedena jako medián (25.-75. percentil), v ng vzniklého 11-dehydrokortikosteronu (11 β -oxidace) nebo kortikosteronu (11 β -redukce) za hod na mg sušiny.

Kromě aktivity 11HSD byla ve zkoumaných vzorcích také stanovena hladina mRNA pro obě izoformy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy metodou jedнокrokové RT PCR v reálném čase. Tímto bylo zjištěno, že ve vzorcích ze skupiny zvířat s DSS kolitidou dochází, ve srovnání s kontrolní skupinou, k signifikantním změnám v hladinách mRNA obou izoform 11HSD. Konkrétně k vzestupu mRNA 11HSD1 a poklesu mRNA 11HSD2 (tab. VII).

Tab. VII Exprese 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy ve vzorcích tlustého střeva u potkanů s indukovanou DSS kolitidou a u kontrolní skupiny

	<i>11HSD1</i>	<i>11HSD2</i>
Kontrola	1.6 (1.3–1.8)	4.7 (3.8–6.8)
DSS	7.8 (4.8–13.1)	1.7 (1.0–3.2)

Expres je uvedena jako medián (25.-75. Percentil) poměru hladin mRNA 11HSD1/ β -aktin.

5.4. 11HSD a adjuvantní artritida

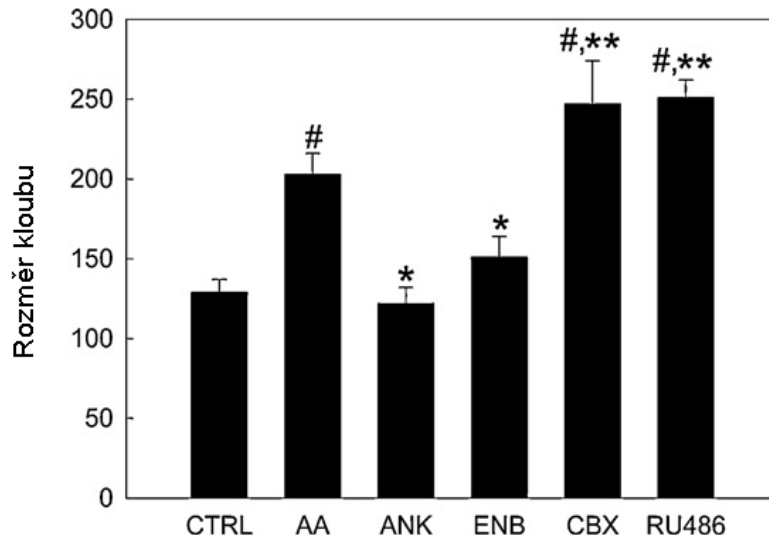
Ve skupině zvířat, u kterých byla indukována adjuvantní artritida došlo k významnému otoku kloubů zadních končetin oproti skupině kontrolní. Zatímco před indukcí adjuvantní artritidy nebyl žádný rozdíl mezi skupinami, již desátý den po podání adjuvans došlo k signifikantnímu nárůstu rozměrů hlezenních kloubů (tab. VIII). Až do ukončení experimentu tento nárůst dále progredoval.

Tab. VIII relativní rozměr hlezenních kloubů potkanů s adjuvantní artritidou a potkanů kontrolní skupiny 10. a 18. den po indukcii

	<i>10. den</i>	<i>18. den</i>
kontrola	111 \pm 5	125 \pm 7
artritida	145 \pm 10	211 \pm 16

Hodnoty jsou uvedeny v % rozměru před indukcí adjuvantní artritidy.

Ke změnám ve velikosti hlezenních kloubů, docházelo i ve skupinách zvířat, kterým byly podávány látky o kterých je známo, že ovlivňují zánětlivý proces. Konkrétně se jednalo o neselektivní inhibitor 11HSD karbenoxolon, inhibitor glukokortikoidních receptorů mifepriston (RU486), antagonistu receptoru TNF- α etanercept a antagonistu receptoru IL1- β anakinra. Podávání karbenoxolonu, stejně jako mifepristonu vedlo k významnému zvětšení otoku hlezenních kloubů ve srovnání jak se skupinou kontrolní, tak se skupinou s adjuvantní artritidou. Naproti tomu podávání etanerceptu i anakinry vedlo k významnému snížení otoků hlezenních kloubů ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou (obr 5.17).



Obr. 5.17 Relativní velikost hlezenních kloubů u kontrolní skupiny (CTRL), skupiny s adjuvantní artritidou (AA), adjuvantní artritidou a aplikací anakinry (ANK), adjuvantní artritidou a aplikací enbrelu (ENB), adjuvantní artritidou a aplikací karbenoxolonu (CBX), adjuvantní artritidou a aplikací mifepristonu. Data jsou vztažena na relativní velikost před indukcí artritidy.

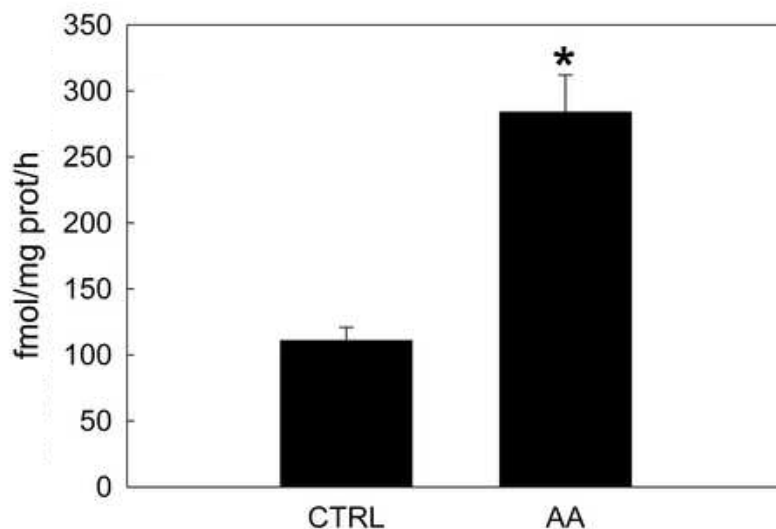
($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou; * ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou;

** ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou

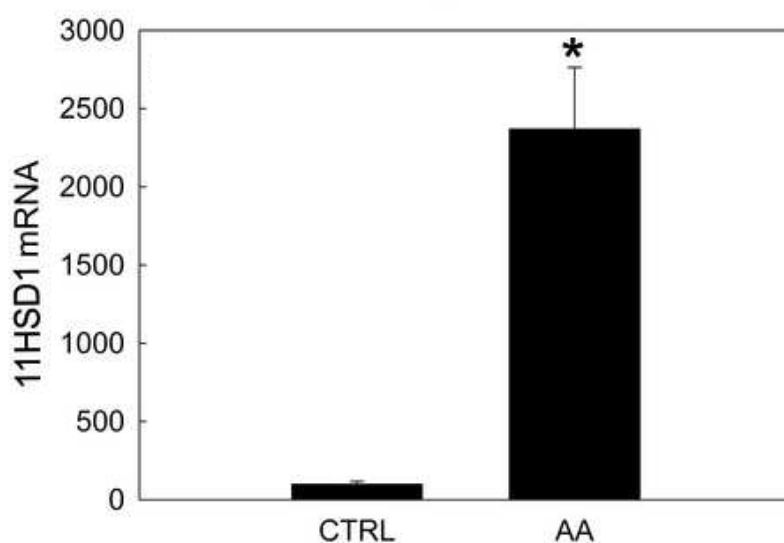
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

K objasnění změn v glukokortikoidním metabolismu zánětlivě postižených kloubů, byla měřena aktivita 11HSD v synoviocytech vyizolovaných z kolenních kloubů. Bylo zjištěno, že adjuvantní artritida významně zvyšuje reductázovou aktivitu 11HSD ve srovnání s kontrolní skupinou (obr. 5.18).

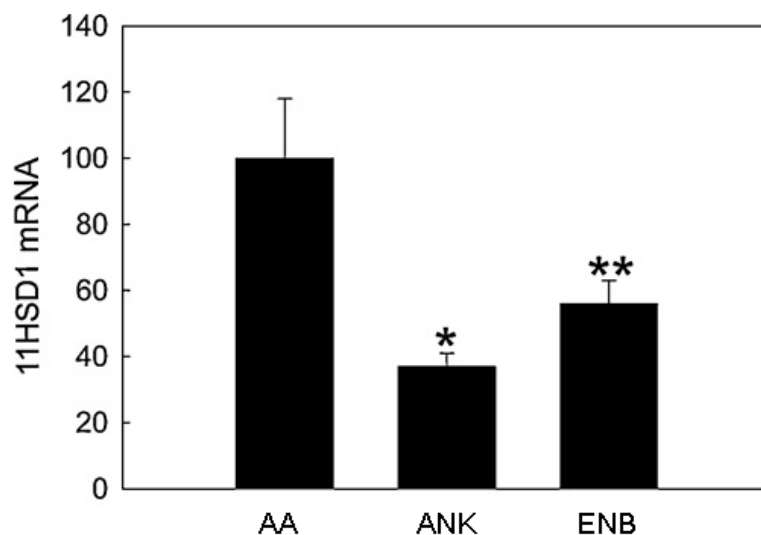
V izolovaných synoviocytech byla také stanovena pomocí jedнокrokové RT PCR v reálném čase mRNA obou izoform 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy. V případě izoformy 1, byl zaznamenán signifikantní nárůst ve skupině s adjuvantní artritidou při porovnání s kontrolní skupinou (obr 5.19). V případě měření exprese izoformy 2 11HSD nebyla mRNA tohoto genu detekována a to ani ve skupině s artritidou, ani ve skupině kontrolní.



Obr. 5.18 Konverze 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron v izolovoných synoviocytech kolenních kloubů u zvířat s adjuvantní artritidou (AA) a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena v fmol na mg proteinu a hodinu * ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60



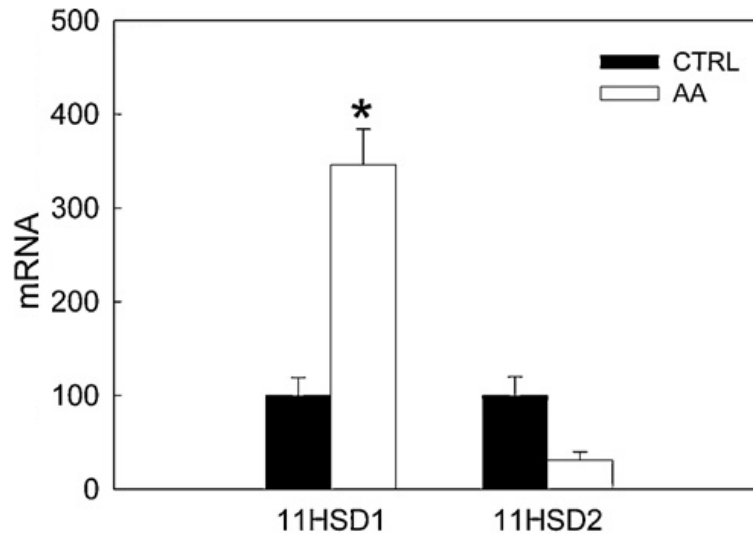
Obr. 5.19 Expres mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v izolovaných synoviocytech ze skupin zvířat s adjuvantní artritidou (AA) a v kontrolní skupině (CTRL). Expres je vyjádřena v % kontrolní skupiny.
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60



Obr. 5.20 Expres mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v izolovaných synoviocytech ze skupin zvířat s adjuvantní artritidou (AA), adjuvantní artritidou a aplikací anakinry (ANK), adjuvantní artritidou a aplikací etanerceptu (ENB). Expres je vyjádřena v % skupiny AA. * ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou; ** ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

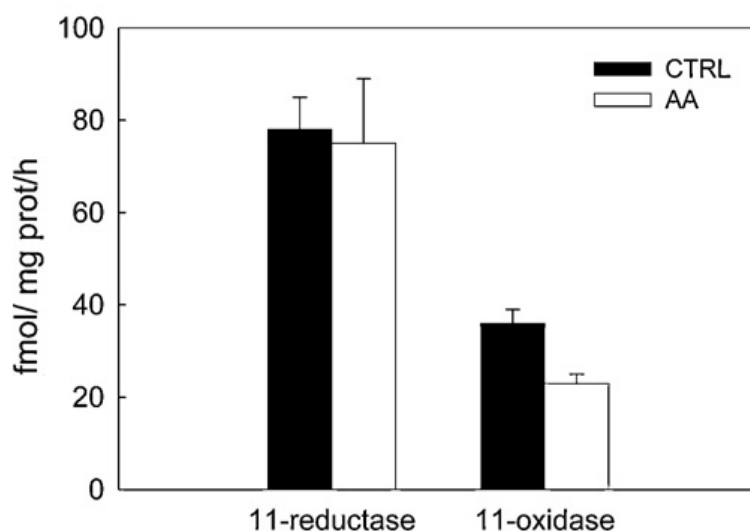
Expres mRNA 11HSD1 byla významně ovlivněna ve skupinách s adjuvantní artritidou, kterým byl podáván antagonist receptoru TNF- α etanercept a nebo antagonist receptoru IL1- β anakinra. Aplikace těchto látek vedla k významnému poklesu hladin mRNA 11HSD1 v porovnání se skupinou s artritidou (obr 5.20).

Hladiny mRNA 11HSD při adjuvantní artritidě byly měřeny také ve spádových lymfatických uzlinách zánětlivě postižených kloubů. Bylo zjištěno, že tyto lymfatické uzliny exprimují obě izoformy 11HSD. Ve skupině s adjuvantní artritidou byl zjištěn významný vzestup hladiny mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou. V případě mRNA 11HSD2 nebyl rozdíl mezi skupinou s adjuvantní artritidou a skupinou kontrolní statisticky významný (obr 5.21).



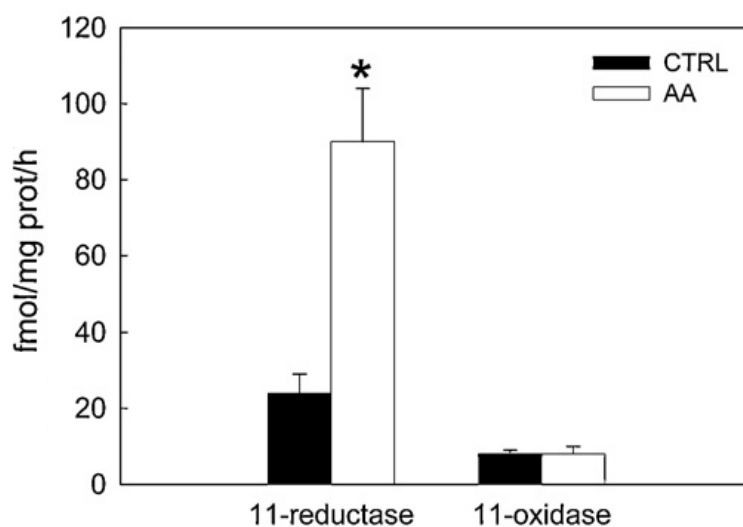
Obr. 5.21 Expres mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 ve spádových lymfatických uzlinách ze skupin zvířat s adjuvantní artritidou (AA) a v kontrolní skupině (CTRL). Expres je vyjádřena v % kontrolní skupiny.
* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

Ve spádových lymfatických uzlinách byla měřena také aktivita 11HSD. Aktivita byla stanovena separátně ve stromální a mobilní části spádových lymfatických uzlin. Bylo zjištěno, že ve stromální části není prakticky žádný rozdíl ani v oxidázové, ani v reduktázové aktivitě 11HSD mezi skupinou s adjuvantní artritidou a skupinou kontrolní (obr. 5.22). V mobilní části spádových lymfatických uzlin byla zjištěna signifikantně vyšší reduktázová aktivita ve skupině s adjuvantní artritidou oproti skupině kontrolní a mezi těmito skupinami nebyl zjištěn žádný rozdíl v aktivitě reduktázové (obr. 5.23).



Obr. 5.22 oxidázová a reduktázová aktivita 11HSD ve stromální části spádových lymfatických uzlin ve skupině s adjuvantní artritidou (AA) a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena v fmol na mg proteinu a hodinu.

Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

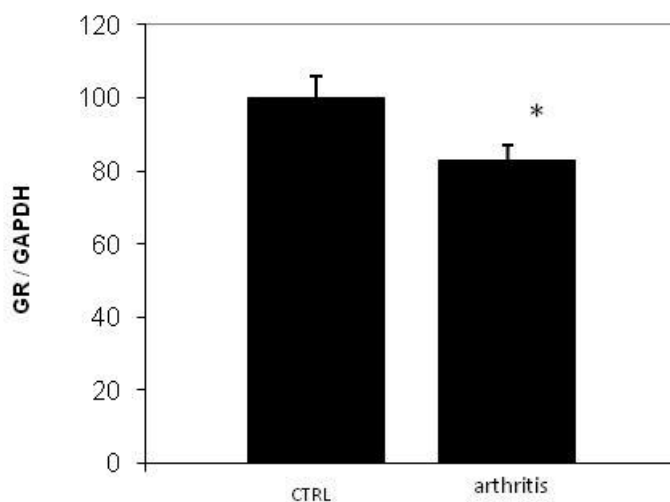


Obr. 5.23 oxidázová a reduktázová aktivita 11HSD v mobilní části spádových lymfatických uzlin ve skupině s adjuvantní artritidou (AA) a kontrolní skupině (CTRL). Aktivita je uvedena v fmol na mg proteinu a hodinu.

* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

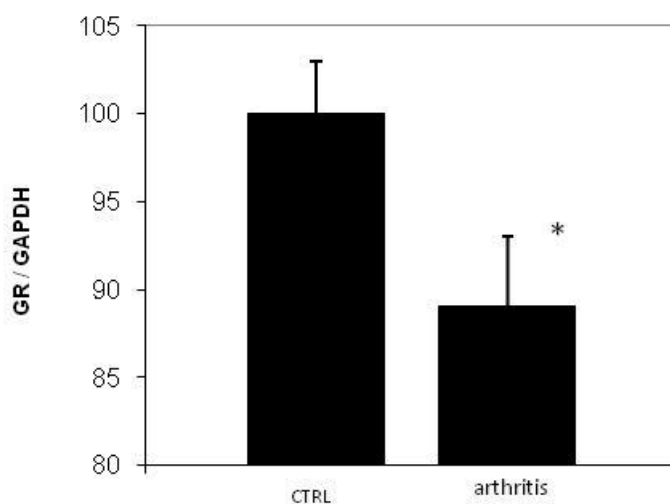
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

V synoviocytech a spádových lymfatických uzlinách byla měřena exprese mRNA glukokortikoidního receptoru. Bylo zjištěno, že v obou zkoumaných tkáních dochází v průběhu adjuvantní artritidy k významnému poklesu exprese GR mRNA (obr. 5.24, 5.25).



Obr. 5.24 Expese glukokortikoidního receptoru v synoviocytech ve skupině s artritidou (arthritis) a kontrolní skupině (CTRL). Expese je vyjádřena jako % kontrolní skupiny.

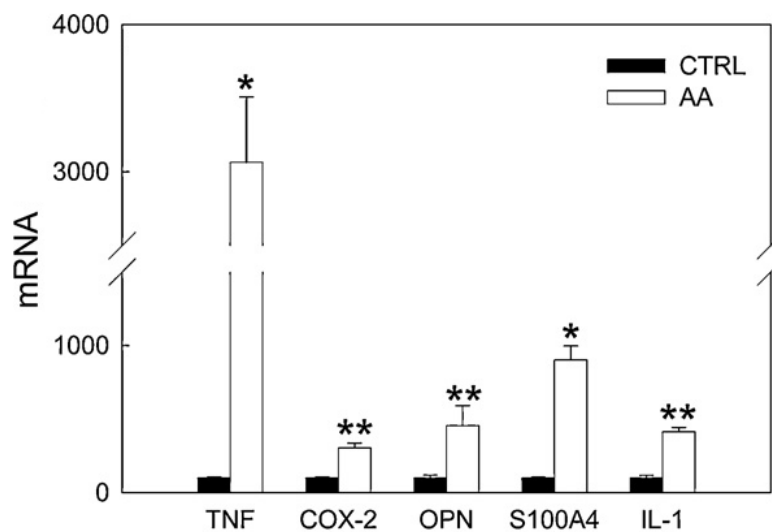
* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou



Obr. 5.25 Expese glukokortikoidního receptoru ve spádových lymfatických uzlinách ve skupině s artritidou (arthritis) a kontrolní skupině (CTRL). Expese je vyjádřena jako % kontrolní skupiny.

* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

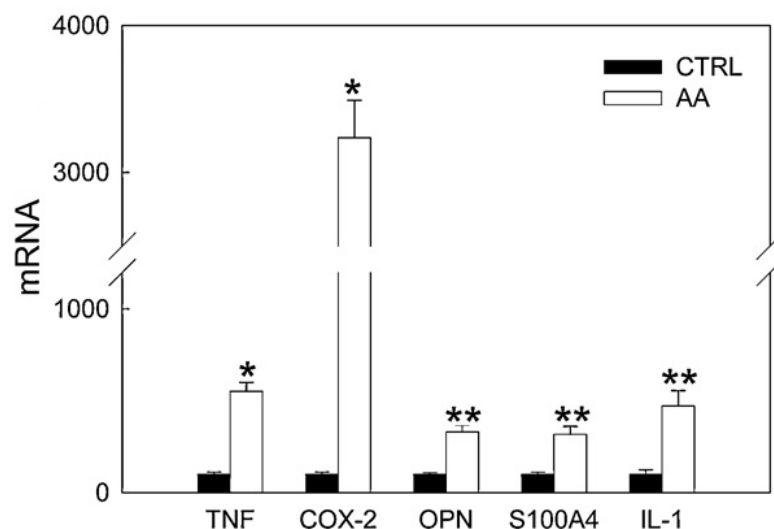
V izolovaných synoviocytech a spádových lymfatických uzlinách byla také měřena hladina mRNA prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL1- β , enzymu zánětlivé kaskády COX-2, proteinu OPN a proteinu S100A4. Bylo zjištěno, že v izolovaných synoviocytech v průběhu adjuvantní artritidy dochází k signifikantnímu vzestupu mRNA všech sledovaných genů (obr. 5.26). Také ve spádových lymfatických uzlinách bylo zjištěno signifikantní zvýšení hladin mRNA všech sledovaných genů ve skupině s adjuvantní artritidou v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 5.27).



Obr. 5.26 Expres mRNA TNF- α , COX-2, OPN, S100A4 a IL1- β v izolovaných synoviocytech ve skupině zvířat s adjuvantní artritidou (AA) a v kontrolní skupině (CTRL). Expres je vyjádřena v % kontrolní skupiny.

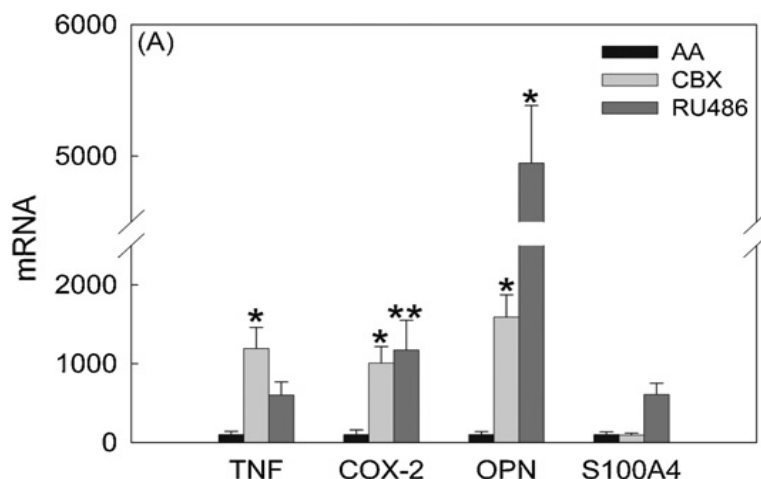
* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou; **($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60



Obr. 5.27 Expresa mRNA TNF- α , COX-2, OPN, S100A4 a IL1- β ve spádových lymfatických uzlinách ve skupině zvířat s adjuvantní artritidou (AA) a v kontrolní skupině (CTRL). Expresa je vyjádřena v % kontrolní skupiny. * ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou; ** ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

Hladina mRNA jednotlivých sledovaných zánětlivých mediátorů, byla v izolovaných synoviocytech významně ovlivněna podáváním inhibitorů karbenoxolonu i mifepristonu. Podávání karbenoxolonu mělo za následek významný vzestup mRNA TNF- α , COX-2 a OPN. Naproti tomu podávání mifepristonu vedlo k signifikantnímu zvýšení pouze mRNA COX-2 a OPN (obr. 5.28).



Obr. 5.28 Expres mRNA TNF- α , COX-2, OPN, v izolovaných synoviocytech ve skupině zvířat s adjuvantní artritidou (AA), skupině s adjuvantní artritidou a aplikací karbenoxolonu (CBX), skupině s adjuvantní artritidou a aplikací mifepristonu (RU486). Expres je vyjádřena v % kontrolní skupiny.* ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou; **($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání se skupinou s adjuvantní artritidou
Převzato z Ergang P, Leden P et al. Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 29;323:155-60

Odlišná situace byla zjištěna ve spádových lymfatických uzlinách, kde podávání karbenoxolonu vedlo k významné změně hladiny mRNA OPN a nemělo žádný efekt na mRNA ostatních sledovaných genů. Podávání mifepristonu, nevedlo ke změně hladiny mRNA u žádného ze sledovaných genů.

Měřením plasmatické hladiny kortikosteronu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v souvislosti s podáváním karbenoxolonu (Tab.IX)

Tab. IX Plasmatické hladiny kortikosteronu ve skupině s adjuvantní artritidou (AA), adjuvantní artritidou a aplikací karbenoxolonu (AA + CBX) a skupině kontrolní

	<i>rozdíl aktivit</i>
AA	$307 \pm 38^*$
AA + CBX	$338 \pm 41^*$
kontrola	190 ± 29

Hladiny jsou uvedeny ng kortikosteronu na 1 ml plazmy. * ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s kontrolní skupinou

6. DISKUZE

6.1. 11HSD a experimentální model TNBS kolitidy

Experimentální kolitida indukovaná lokální aplikací trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBS) je dobře popsáný zvířecí model zánětu, který je využíván především pro podobnost zánětlivých změn se změnami nalézány při Crohnově nemoci [166]. V našem experimentu byl charakter a závažnost indukovaných změn ověřen pomocí histologického vyšetření. Je všeobecně známo, že regulace zánětlivého procesu je komplexní a průběh tohoto procesu je dán kombinací prozánětlivých a protizánětlivých faktorů. Mezi nejdůležitější prozánětlivé faktory patří prozánětlivé cytokiny a systém enzymu inducibilní NO syntázy (iNOS), jejíž jednou z důležitých fyziologických funkcí je aktivace klíčového prozánětlivého transkripčního faktoru NF- κ B [176-178]. Jedním z vedlejších efektů aktivace zánětlivé reakce ve střevní tkáni je zvýšená tvorba glykoproteinů ze skupiny mucinů buňkami střevního epitelu, což je modulováno právě prozánětlivými cytokiny a prostaglandiny [179]. Je všeobecně známo, že glukokortikoidy mají schopnost potlačovat zánětlivý proces v celé řadě tkání, včetně tlustého střeva a to právě prostřednictvím změn v transkripci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů, prostaglandinů [180] a také interferencí se systémem transkripčního faktoru NF- κ B. Jak již bylo uvedeno, enzym 11HSD má schopnost měnit lokální koncentrace glukokortikoidů na tkáňové a buněčné úrovni. Několik autorů pak prokázalo, že *in vitro* prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1 β zvyšují syntézu a aktivitu 11HSD1 a snižují syntézu a aktivitu 11HSD2 [86, 144, 181-184], čímž dochází ke změnám koncentrace glukokortikoidů v zánětlivé tkáni. Tento mechanismus by mohl představovat důležitý mechanismus negativní zpětné vazby v regulaci zánětlivého procesu. Na podkladě znalosti o snížené expresi 11HSD2 v průběhu zánětlivého procesu [169, 185], jsme vytvořili hypotézu, že lokální metabolismus glukokortikoidů může ovlivňovat expresi genů regulujících zánětlivý proces. K ověření této hypotézy, jsme použili zmiňovaný TNBS model kolitidy, kdy skupině experimentálních zvířat byl topicky aplikován neselektivní inhibitor 11HSD karbenoxolon a následně byl zkoumán jeho vliv na průběh zánětlivého procesu. Konkrétně byla sledována míra infiltrace střevní tkáně leukocytárními buňkami prostřednictvím měření enzymu myeloperoxidázy, oxidázová i reduktázová aktivita 11HSD a exprese 11HSD1 mRNA, 11HSD2 mRNA, exprese prozánětlivých markerů TNF- α mRNA, IL-1 β mRNA, COX-2 a nejvýznamnějšího střevního mucinu MUC-2 mRNA. Bylo prokázáno, že

izoforma 11HSD2 je ve střevní tkáni exprimována pouze enterocyty, zatímco izoforma 11HSD1 je exprimována také buňkami lamina propria a buňkami imunitního systému [62, 139, 146]. Lze se tedy říci, že zatímco inhibice izoformy 11HSD1 vede ke snížené tvorbě biologicky aktivních glukokortikoidů z jejich neaktivních metabolitů a tím vlastně snižuje biologicky aktivní signál, inhibicí izoformy 11HSD2 v průběhu zánětlivého procesu dochází k usnadnění přístupu biologicky aktivních glukokortikoidů k jejich receptorům ve vybraných buňkách zánětlivě postižené tkáně. Výsledky našich měření ukázaly, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k poklesu oxidázové aktivity a vzestupu reduktázové aktivity. Tyto změny korelují se stupněm zánětlivého procesu. Podávání neselektivního inhibitoru 11HSD karbenoxolonu do oblasti zánětlivě postiženého tlustého střeva má za následek významné snížení 11 β -dehydrogenázové aktivity v tkáni střeva a pokles této aktivity je doprovázen zvýšenou expresí 11HSD1 mRNA a sníženou expresí 11HSD2 mRNA. Snížený metabolismus kortikosteronu v zánětlivé tkáni však pravděpodobně není přímým následkem efektu karbenoxolonu, ale s největší pravděpodobností následkem zvýšené lokální aktivity 11HSD1 a snížené aktivity 11HSD2. Na základě těchto našich poznatků, můžeme konstatovat, že podávání karbenoxolonu mění lokální koncentraci kortikosteronu na podkladě zvýšené exprese 11HSD1 a snížené exprese 11HSD2. Nález snížené exprese 11HSD2 po podání karbenoxolonu je mírně překvapivý. Účinek karbenoxolonu na pokles exprese 11HSD2 mRNA nemůže být totiž dostatečně vysvětlen jako následek autoregulace tohoto enzymu cestou substrátu a produktu, neboť existují důkazy, že glukokortikoidy expresi 11HSD2 mRNA zvyšují [186, 187]. Je tedy pravděpodobné, že na regulaci se podílí vliv dalších faktorů. Jako nejjednodušší vysvětlení se zdá, podíl derivátů kyseliny arachidonové na regulaci exprese 11HSD2 mRNA ve střevní tkáni. In vitro bylo totiž prokázáno, že produkce prostaglandinů na tkáňové úrovni může snižovat aktivitu 11HSD2 [188]. Zároveň bylo prokázáno, že glukokortikoidy snižují aktivitu 15-hydroxyprostaglandindehydrogenasy, což je klíčový enzym odbourávání prostaglandinů [189] a bylo také prokázáno, že aktivita tohoto enzymu je inhibována karbenoxolonem [190].

Podávání syntetického glukokortikoidu budesonidu vedlo k výraznému vzestupu exprese 11HSD1 mRNA a k nesignifikantnímu poklesu 11HSD2 mRNA. Nález zvýšené 11HSD1 mRNA je v souladu s našimi předpoklady, jelikož ve studiích in vitro bylo prokázáno, že podávání glukokortikoidů vede u některých typů buněk ke zvýšení exprese 11HSD1 [191].

Je všeobecně známo, že glukokortikoidy jsou prostřednictvím glukokortikoidních receptorů schopné snižovat aktivitu zánětlivého procesu prostřednictvím snižování produkce prozánětlivých cytokinů [179] a prostřednictvím inhibice enzymů zánětlivé kaskády fosfolipasy A2 a cyklooxygenasy 2 [192]. Zajímalo nás proto, k jakým změnám v průběhu experimentu dojde v expresi genů TNF- α , IL1- β , COX-2, MUC2. Dle předpokladů se prokázalo, že v průběhu zánětlivého procesu dochází k vzestupu exprese těchto genů, které hrají důležitou roli v regulaci zánětlivého procesu. Lokální podávání budesonidu vedlo k signifikantnímu poklesu exprese TNF- α mRNA, IL1- β mRNA, COX-2 mRNA, což bylo plně v souladu s předpoklady a dříve opublikovanou prací [193]. V rozporu s našimi předpoklady však byl efekt podávání karbenoxolonu. Předpokládali jsme, že vzhledem ke skutečnosti, že podávání karbenoxolonu ovlivňuje lokální koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů, mělo by dojít ke změnám v expresi podobně jako při podávání budesonidu. Ve skutečnosti však žádné signifikantní změny v expresi TNF- α mRNA, IL1- β mRNA, COX-2 mRNA zaznamenány nebyly. Pro tento rozpor nemáme zcela jasné vysvětlení. S největší pravděpodobností se lokální metabolismus glukokortikoidů v průběhu experimentální kolitidy nepodílí významným způsobem na expresi těchto prozánětlivých cytokinů. Pro tuto skutečnost napovídají i výsledky lokální aplikace mifepristonu, které ukazují, že systémová hladina kortikosteronu hraje pravděpodobně důležitější roli v regulaci exprese některých cytokinů než lokální hladiny kortikosteronu. Této teorii nasvědčuje i výsledek měření aktivity enzymu myeloperoxidasy. Aktivita tohoto enzymu koreluje s mírou infiltrace a aktivace granulocytů v zánětlivě postižené střešní stěně [194]. Zatímco při lokálním podávání budesonidu došlo k signifikantnímu poklesu aktivity a tím k poklesu zánětlivé infiltrace, podávání carbenoxolonu nemělo na aktivitu MPO žádný vliv. Pokud uvažíme skutečnost, že glukokortikoidy snižují aktivitu MPO [193] a snižují přísun granulocytů do tlustého střeva postiženého TNBS kolitidou [195], je zřejmé že lokální metabolismus glukokortikoidů a s ním spojené lokální změny v koncentraci kortikosteronu nemají schopnost modulovat migraci a aktivaci granulocytů.

V rozporu s předpoklady byly také výsledky měření exprese genu MUC-2. Jelikož je známo, že exprese tohoto genu se mění v závislosti na aktivitě zánětlivého střešního onemocnění [196] a že in vitro podávání glukokortikoidů či prozánětlivých cytokinů vede ke změnám v expresi tohoto genu, předpokládali jsme změny v jeho expresi v souvislosti se změnami v lokální koncentraci glukokortikoidů. Překvapivě však, ani podávání

karbenoxolonu, ani podávání budesonidu nevedlo k poklesu exprese MUC-2 mRNA.

Výsledky experimentu s podáváním mifepristonu potvrzují výše popsanou teorii, že regulaci prozánětlivých cytokinů a infiltraci střevní stěny buňkami imunitního systému ovlivňuje systémová hladina kortikosteronu a pravděpodobně nijak neovlivňuje lokální metabolismus glukokortikoidů.

Je tedy možné konstatovat, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k vzestupu exprese 11HSD1 a tento vzestup je závislý na tíži zánětlivého procesu. Změny v expresi obou izoform 11HSD mají za následek sníženou schopnost zánětlivé tkáně oxidovat biologicky aktivní glukokortikoidy na jejich neaktivní 11-oxo deriváty. Vzhledem k tomu, že exprese 11HSD1 byla prokázána ve střevní lamina propria i spádových lymfatických tkáních [62] a že v průběhu TNBS kolitidy dochází k masivní infiltraci střevní stěny imunitními buňkami které také exprimují 11HSD1 [139, 197], lze předpokládat, že vzestup reductázové aktivity 11HSD a vzestup hladin exprese 11HSD1 mRNA může být následkem kombinace infiltrace zánětlivě postižené střevní tkáně těmito buňkami a také stimulace 11HSD1 prozánětlivými cytokiny. Naše výsledky jsou ve shodě s dřívějšími pracemi které ukázaly, že v průběhu TNBS kolitidy dochází k vzestupu exprese prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β [198] a že tyto cytokiny in vitro stimulují expresi 11HSD1 [86, 144, 181, 182]. Je tedy zřejmé, že prozánětlivé cytokiny se účastní regulace glukokortikoidního účinku v zánětlivě postižené střevní tkáni. Účinek karbenoxolonu a jeho inhibice přidáním mifepristonu ukazuje na autoregulační mechanismus hladin kortikosteronu na expresi 11HSD1. Na druhou stranu, z výsledků naší práce je zřejmé, že periferní metabolismus glukokortikoidů se nepodílí na regulaci glukokortikoidního signálu v průběhu plně rozvinutého zánětlivého procesu. Toto zjištění je v rozporu s dříve publikovanými in vitro experimenty [86, 192], které předpokládaly, že periferní metabolismus glukokortikoidů hraje roli negativní zpětné vazby ve vztahu k prozánětlivým cytokinům. Otevřenou otázkou zůstává regulační funkce periferního metabolismu glukokortikoidů iniciálních fázích střevního zánětu.

6.2.11HSD a ulcerosní kolitida

Glukokortikoidy jsou dlouhou dobu užívány v terapii idiopatických střevních zánětů pro svůj protizánětlivý účinek. Jak již bylo zmíněno, tento protizánětlivý účinek je dán interferencí komplexu glukokortikoid/glukokortikoidní receptor s produkcí prozánětlivých cytokinů a se systémem transkripčního faktoru NF- κ B. Úloha periferního

metabolismu glukokortikoidů v regulaci střevního zánětlivého procesu byla zkoumána doposud pouze in vitro a na zvířecích experimentálních modelech, nikoliv však ve vzorcích tkáně od pacientů s nespecifickým střevním zánětem. Je všeobecně známo, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů [199] a také enzymu fosfolipasy A2 [200]. Naše měření ukázala, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází k signifikantnímu zvýšení exprese 11HSD1 mRNA a poklesu 11HSD2 mRNA. Vzhledem k předpokladu, že in vivo se 11HSD1 chová převážně jako reductáza, lze předpokládat, že ve střevní tkáni v průběhu ulcerosní kolitidy dochází k vzestupu lokální koncentrace biologicky aktivních glukokortikoidů. V souladu s předpoklady bylo zjištěno, že v průběhu ulcerosní kolitidy stoupá exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF- α střevní tkáni. Na základě naší práce není možné jednoznačně stanovit, které faktory se podílejí na změnách exprese 11HSD mRNA. Jistě je nutno vzít v úvahu stimulační účinek prozánětlivých cytokinů, vliv infiltrovaných buněk imunitního systému které mají schopnost exprese 11HSD a zvýšené hladiny aktivních glukokortikoidů. Bylo prokázáno, že v průběhu idiopatických střevních zánětů dochází ke zvýšení aktivity osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny [201]. Následkem této hyperaktivity pravděpodobně dochází k vzestupu systémových hladin glukokortikoidů. Tato zvýšená aktivita se jistě může podílet na stimulaci 11HSD1. Zde se však nabízí otázka, jakým mechanismem dochází ke snížení exprese 11HSD2 mRNA, když bylo in vitro prokázáno, že glukokortikoidy expresi 11HSD2 zvyšují. Vysvětlení může pravděpodobně spočívat ve skutečnosti, že 11HSD2 je ve střevní tkáni exprimována pouze v epitelálních buňkách [62]. V průběhu ulcerosní kolitidy dochází k poškození funkcí střevního epitelu a je také snížena jeho imunoreaktivita [202].

V souhrnu lze konstatovat, že v průběhu ulcerosní kolitidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a poklesu exprese 11HSD2 mRNA. Nakolik se na regulaci glukokortikoidního signálu v průběhu ulcerosní kolitidy podílí systémová hladina biologicky aktivních glukokortikoidů a na kolik jejich periferní metabolismus nejsme schopni v tuto chvíli říci.

6.3.11HSD a DSS kolitida

Podávání dextransulfátu vedlo k rozvoji kolitidy, při které byly histologicky pozorovány změny, které se charakteristicky nacházejí v chronickém stadiu ulcerosní

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

Výsledky studie podporují závěr, že prozánětlivé cytokiny ovlivňují tvorbu biologicky aktivních glukokortikoidů několika způsoby. Cestou hypothalamo- hypofyzární osy, zvýšenou systémovou hladinou glukokortikoidů a také interakcí mezi enzymy metabolismu glukokortikoidů a cytokiny [86, 140, 181, 182, 203].

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

6.4.11HSD a adjuvantní artritida

Glukokortikoidy jsou po dlouhá léta využívány v terapii celé řady zánětlivých onemocnění kloubů a například v terapii revmatoidní artritidy je jejich role prakticky nezastupitelná. Bylo prokázáno, že podávání glukokortikoidů v průběhu revmatoidní i zánětlivé artritidy vede k významnému snížení rychlosti destrukce a přestavby postižených kloubů a zpomaluje progresi onemocnění [204, 205]. Vzhledem k tomu, že enzym 11 β hydroxysteroiddehydrogenáza je klíčovým prvkem regulujícím tkáňovou koncentraci biologicky aktivních glukokortikoidů, byl tento enzym zkoumán i v kostní a kloubní tkáni. Studie na tuto problematiku prokázaly přítomnost obou izoform 11HSD v lidských osteoblastech a synoviálních buňkách [83, 206]. Exprese a aktivita 11HSD2 byla v citovaných pracích velmi nízká prakticky až na hranici detekovatelnosti a jejich původ pocházel nejspíše z kloubních makrofágů. Při našich měřeních na modelu adjuvantní artritidy jsme však prokázali expresi pouze izoformy 11HSD1 a izoformu

11HSD2 se nám nepodařilo v synoviocytech prokázat ani v artritické ani v kontrolní skupině. Příčina této skutečnosti není úplně zřejmá. V první řadě se nabízí vysvětlení mezidruhovou živočišnou variabilitou. Zatímco výše uvedené práce prokázaly expresi 11HSD2 v lidských buňkách, naše měření byla provedena na potkanech kmene Lewis. Zvířata tohoto kmene mají sníženou aktivitu osy hypotalamus - hypofýza – nadledviny a vykazují relativně vyšší citlivost k autoimunitním chorobám a rozvoji zánětlivých procesů ve srovnání s kmeny s normální funkcí této osy [207]. Lze předpokládat, že za touto zvýšenou náchylností k rozvoji zánětlivého procesu u tohoto kmene je spoluodpovědný nízký imunosupresivní účinek glukokortikoidů cestou hypothalamo-hypofyzární osy [208]. Nelze tedy bezvýhradně zobecňovat nálezy u tohoto kmene na další živočišné druhy. Na základě publikovaných prací však lze předpokládat, že citlivost cílových tkání ke glukokortikoidům není funkcí osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny mezi jednotlivými kmeny potkanů [209]. Měření hladin mRNA 11HSD1 ukázalo více než dvacetinásobný vzestup ve skupině s adjuvantní artritidou ve srovnání se skupinou kontrolní. Vzestup exprese mRNA 11HSD1 koreloval se zjištěným nárůstem reduktázové aktivity enzymu, která se zvýšila téměř trojnásobně. Toto navýšení je plně v souladu s předchozími experimenty popsány v této práci, i s publikacemi jiných autorů [148, 210, 211].

Všeobecně se předpokládá, že průběh artritického procesu je řízen celou řadou prozánětlivých a protizánětlivých faktorů [212]. Převaha prozánětlivých faktorů vede k proliferaci synoviocytů, tvorbě zánětlivé granulomatózní tkáň z kloubní synovie a aktivací osteoklastů, což má za následek patologickou přestavbu kostní a kloubní tkáň. Za nejvýznamnější prozánětlivé faktory v průběhu artritického procesu jsou považovány TNF- α , IL-1 β [213], jejichž exprese v průběhu zánětlivého procesu stoupá. V souladu s touto skutečností jsou i naše měření, kdy ve skupině s adjuvantní artritidou došlo k významnému vzestupu hladin mRNA jak TNF- α , IL-1 β v synoviální tkáni ve srovnání s kontrolní skupinou. In vitro bylo opakovaně prokázáno, že prozánětlivé cytokiny jsou mocným induktorem 11HSD1 v různých tkáních, včetně synoviocytů [86, 144, 181, 214]. Zároveň bylo prokázáno, že inhibice TNF- α nebo IL-1 β významným způsobem snižuje míru zánětlivé reakce jak u revmatoidní artritidy [215-217], tak u celé řady experimentálních modelů artritidy [218-220]. Na základě těchto skutečností jsme chtěli odpovědět na otázku, zda vzestup TNF- α nebo IL-1 β zvyšuje expresi 11HSD in vivo, a zda jejich množství koreluje s expresí 11HSD1. K získání odpovědi jsme experimentálním

zvířatům s adjuvantní artritidou podávali antagonistu IL-1 β anakinru, nebo etanercept, antagonistu receptorů pro TNF- α . V minulosti bylo prokázáno, že obě látky u potkanů s indukovanou juvenilní artritidou snižují patologickou angiogenezi, otoky a ovlivňují tepelnou mechanickou hyperalgezi [221-224]. Naše měření ukázala, že obě látky nejenže zlepšují klinický obraz a otok postižených kloubů, ale také snižují expresi 11HSD1. Dalo by se předpokládat, že terapie pomocí blokátorů prozánětlivých cytokinů ovlivňuje periferní metabolismus glukokortikoidů nejen na úrovni buněk synoviální membrány, ale také ovlivněním migrace buněk imunitního systému do oblasti zánětlivě postiženého kloubu. Je všeobecně známo, že přenos glukokortikoidního signálu je zprostředkován pomocí glukokortikoidních receptorů. Naše měření ukázala, že v průběhu adjuvantní artritidy dochází k významnému snížení exprese genu pro glukokortikoidní receptor. Toto zjištění je v souladu s nálezy v celé řadě tkání v průběhu zánětlivého procesu [225], včetně synoviální tkáně při kolagen indukované artritidě u potkana [226]. Na základě výše uvedených skutečností, jsme se snažili najít odpověď na otázku, zda změny v aktivitě a expresi 11HSD nějakým způsobem moduluji průběh zánětlivého procesu v průběhu adjuvantní artritidy. V minulosti bylo prokázáno, že podávání neselektivního inhibitoru karbenoxolonu má za následek pokles aktivity i exprese 11HSD1 [227-229], že biologicky aktivní glukokortikoidy snižují expresi mRNA genů pro TNF- α a COX-2 [208] a že prozánětlivé cytokiny zvyšují expresi mRNA OPN [230]. Snažili jsme se tedy najít odpověď na otázku, zda v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke změnám v expresi prozánětlivých cytokinů a markerů kloubního zánětu u zvířat kterým byl podáván karbenoxolon ve srovnání s artritickou skupinou bez aplikace karbenoxolonu. Naše měření ukázala, že podávání karbenoxolonu signifikantně zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a OPN mRNA, avšak nedochází k žádným změnám v plazmatické hladině kortikosteronu. Vzhledem k této skutečnosti a také faktu, že podávání karbenoxolonu vedlo ke zhoršení makroskopických projevů zánětu je pravděpodobné, že za tyto změny jsou odpovědné změny v aktivitě 11HSD1 na úrovni synoviálních kloubů a že se tedy nejedná o změnu glukokortikoidní aktivity na úrovni celého organismu. Vzhledem ke skutečnosti, že karbenoxolon je nescifickým inhibitorem se nabízí otázka, zda za výše popsané změny není odpovědný jiný mechanismus než lokální aktivita 11HSD. Je například známo, že karbenoxolon je účinným inhibitorem konexinů, proteinů účastnících se těsných buněčných spojů. Proti této teorii se však staví skutečnost, že k ovlivnění těsných buněčných spojů jsou zapotřebí

minimálně mikromolární koncentrace karbenoxolonu [231, 232]. Avšak na základě publikací jiných autorů bylo prokázáno, že podávání karbenoxolonu v obdobných dávkách jako v našem experimentu vede k nanomolárním koncentracím karbenoxolonu v intersticiální tekutině [233]. Z této skutečnosti plyne, že plazmatická koncentrace karbenoxolonu v našich experimentech nedosahovala takových hladin, aby mohla účinně ovlivnit proteiny těsných buněčných spojů. V našem experimentu bylo zjištěno, že podávání karbenoxolonu žádným způsobem nemění expresi ani TNF- α , ani COX-2, ani mRNA S100A4, ačkoliv byla přítomna aktivita 11HSD1. Tento nálezn je odlišný od nálezu v synoviální tkáni. Nález zvýšené aktivity 11HSD1 a absence jakéhokoliv efektu podávání karbenoxolonu a mifepristonu zřejmě svědčí o rezistenci buněk lymfatických uzlin ke glukokortikoidům, nebo o farmakodynamických rozdílech mezi synoviální tkání a tkání lymfatických uzlin.

Na rozdíl od TNF- α mRNA a COX-2 mRNA exprese OPN mRNA byla signifikantně zvýšena v lymfatických uzlinách artritických potkanů léčených karbenoxolonem. Vysvětlení tohoto rozdílného chování OPN mRNA v porovnání s TNF- α mRNA a COX-2 mRNA není zcela zřejmé, nabízí se však vysvětlení v odlišné regulaci genů pro jednotlivé proteiny. Bylo totiž prokázáno, že regulace exprese genu OPN je komplexní a tkáňově specifická [230]. Zdá se tedy, že ačkoliv v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a aktivitě jak synoviocytech, tak ve spádových lymfatických uzlinách, zřejmě pouze v synoviální tkáni je enzym dostatečně aktivní k tomu aby reguloval zánětlivý proces.

7. ZÁVĚR

Na námi položené otázky lze odpovědět následovně:

7.1. Odpověď na otázku 1

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

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

7.2. Odpověď na otázku 2

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

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

7.3.Odpověď na otázku 3

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

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

7.4.Odpověď na otázku 4

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

Odpověď: V průběhu adjuvantní artritidy dochází k signifikantnímu vzestupu hladin mRNA 11HSD1 ve srovnání s kontrolní skupinou a tento vzestup exprese koreluje s nárůstem reduktázové aktivity enzymu. Tyto změny jsou pozorovány jak v synoviální tkáni, tak ve spádových lymfatických uzlinách. Podávání inhibitoru karbenoxolonu signifikantně zvyšuje makroskopické projevy zánětu a zvyšuje expresi TNF- α mRNA, COX-2 mRNA a OPN mRNA, avšak neovlivňují plazmatické hladiny kortikosteronu. Zdá se tedy, že ačkoliv v průběhu adjuvantní artritidy dochází ke zvýšené expresi 11HSD1 mRNA a aktivitě jak synoviocytech, tak ve spádových lymfatických uzlinách, zřejmě pouze v synoviální tkáni je enzym je dostatečně aktivní k tomu aby reguloval zánětlivý proces a nemá pravděpodobně vliv na úrovni organismu.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Munck A, Naray-Fejes-Toth A. The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Mol Cell Endocrinol* 1992;90:C1-4.
2. Cope CL, Black E. The production rate of cortisol in man. *Br Med J* 1958;1:1020-4.
3. Esteban NV, Loughlin T, Yergey AL, et al. Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:39-45.
4. Sheppard KE. Corticosteroid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and the heart. *Vitam Horm* 2003;66:77-112.
5. Penning TM, Ma H, Jez JM. Engineering steroid hormone specificity into aldo-keto reductases. *Chem Biol Interact* 2001;130-132:659-71.
6. Vylitova M, Miksik I, Pacha J. Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine. *Gen Comp Endocrinol* 1998;109:315-24.
7. Matthijssen C, Mandel JE, Seiden PT. Separation of a Purified Adrenal 20-Alpha-Hydroxy-Steroid Dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1964;89:363-4.
8. Pongsawasdi P, Anderson BM. Kinetic studies of rat ovarian 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1984;799:51-8.
9. Strickler RC, Tobias B, Covey DF. Human placental 17 beta-estradiol dehydrogenase and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Two activities at a single enzyme active site. *J Biol Chem* 1981;256:316-21.
10. Sato F, Takagi Y, Shikita M. 20 -hydroxysteroid dehydrogenase of porcine testes. *J Biol Chem* 1972;247:815-23.
11. Tomlinson JW, Stewart PM. Cortisol metabolism and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:61-78.
12. Pujols L, Mullol J, Perez M, et al. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:49-57.
13. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6865-70.

14. Torregro A, Pujols L, Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Picado C. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:420-5.
15. Zhang T, Haws P, Wu Q. Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Res* 2004;14:79-89.
16. Pedersen KB, Vedeckis WV. Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. *Biochemistry* 2003;42:10978-90.
17. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005;18:331-42.
18. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:86-101.
19. Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 2002;143:3482-9.
20. Holmstrom S, Van Antwerp ME, Iniguez-Lluhi JA. Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15758-63.
21. Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 2002;2002:re9.
22. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125-63.
23. Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:761-88.
24. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet* 2003;362:1828-38.
25. Kapcala LP, Chautard T, Eskay RL. The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:419-37.
26. Roviezzo F, Getting SJ, Paul-Clark MJ, et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:541-53.

27. Lim LH, Solito E, Russo-Marie F, Flower RJ, Perretti M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14535-9.
28. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:108-18.
29. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-59.
30. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 2003;24:488-522.
31. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:95-114.
32. Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999;57:249-324.
33. Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS. Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 1994;105:R11-7.
34. Amelung D, Hubener H, Rocka L, Meyerheim G. Conversion of cortisone to compound F. *J Clin Endocrinol Metab* 1953;13:1125-6.
35. Osinski PA. Steroid 11beta-ol dehydrogenase in human placenta. *Nature* 1960;187.
36. Koerner DR. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of lung and testis. *Endocrinology* 1966;79:935-8.
37. Jenkins JS. The metabolism of cortisol by human extra-hepatic tissues. *J Endocrinol* 1966;34:51-6.
38. Bush IE, Hunter SA, Meigs RA. Metabolism of 11-oxygenated steroids. Metabolism in vitro by preparations of liver. *Biochemical Journal* 1968;107:239-58.
39. Srivastava LS, Werk EEJ, Thrasher K, et al. Plasma cortisone concentration as measured by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36:937-43.
40. Lakshmi V, Monder C. Extraction of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from rat liver microsomes by detergents. *J Steroid Biochem* 1985;22:331-40.

41. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988;2:986-9.
42. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988;242:583-5.
43. Agarwal AK, Monder C, Eckstein B, White PC. Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta-dehydrogenase. *J Biol Chem* 1989;264:18939-43.
44. Krozowski Z, Stuchbery S, White P, Monder C, Funder JW. Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression: identification of multiple unique forms of messenger ribonucleic acid in the rat kidney. *Endocrinology* 1990;127:3009-13.
45. Jamieson PM, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 1995;136:4754-61.
46. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 1997;349:1210-3.
47. Ozols J. Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1995;270:10360.
48. Agarwal AK, Tusie-Luna MT, Monder C, White PC. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus. *Mol Endocrinol* 1990;4:1827-32.
49. Walker EA, Clark AM, Hewison M, Ride JP, Stewart PM. Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11-beta - hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Biol Chem* 2001;276:21343-50.
50. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1999;140:3188-96.
51. Barash V, Erlich T, Bashan N. Microsomal hexose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in extrahepatic tissues: human placenta and pig kidney cortex. *Biochem Int* 1990;20:267-74.

52. Mason PJ, Stevens D, Diez A, Knight SW, Scopes DA, Vulliamy TJ. Human hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase) encoded at 1p36: coding sequence and expression. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:30–7.
53. Blume KG, Schmidt GM, Heissmeier HH, Lohr GW. Hexose-6-phosphate dehydrogenase from human tissues: an electrophoretic study in health and disease. *Experientia* 1975;31:496–8.
54. King J, Cook PJ. Glucose dehydrogenase polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 1981;45:129–34.
55. McCormick KL, Wang X, Mick GJ. Evidence that the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD1) is regulated by pentose pathway flux. Studies in rat adipocytes and microsomes. *J Biol Chem* 2006;281:341-7.
56. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, et al. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 2003;34:434-9.
57. Lavery GG, Walker EA, Draper N, et al. Hexose-6-phosphate Dehydrogenase Knock-out Mice Lack 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-mediated Glucocorticoid Generation. *J Biol Chem* 2006;281:6546-51.
58. Brown RW, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. Human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 1993;132:2614-21.
59. Lakshmi V, Nath N, Muneyyirci-Delale O. Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: evidence for the existence of two species of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45:391-7.
60. Krozowski ZS, Funder JW. Renal Mineralocorticoid Receptors and Hippocampal Corticosterone-Binding Species Have Identical Intrinsic Steroid Specificity. *PNAS* 1983;80:6056-60.
61. Agarwal AK, Mune T, Monder C, White PC. NAD(+)-dependent isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *J Biol Chem* 1994;269:25959-62.
62. Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM. Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon. *Endocrinology* 1994;135:2533-41.

63. Roland BL, Funder JW. Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: in situ studies. *Endocrinology* 1996;137:1123-8.
64. Coulter CL, Smith RE, Stowasser M, Sasano H, Krozowski ZS, Gordon RD. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11beta-HSD2) in the developing human adrenal gland and human adrenal cortical carcinoma and adenoma. *Mol Cell Endocrinol* 1999;154:71-7.
65. Suzuki S, Suzuki T, Tsubochi H, et al. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in primary lung carcinomas. *Anticancer Res* 2000;20:323-8.
66. Zbankova S, Bryndova J, Kment M, Pacha J. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004;210:95-100.
67. Stewart PM, Tomlinson JW. Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:94-6.
68. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
69. Ottosson M, Vikman-Adolfsson K, Enerback S, Olivecrona G, Bjorntorp P. The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:820-5.
70. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 1994;35:1535-41.
71. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416-22.
72. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 1987;36:54-9.
73. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:832-5.
74. Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, et al. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest* 2003;112:83-90.

75. Morton NM, Paterson JM, Masuzaki H, et al. Novel Adipose Tissue-Mediated Resistance to Diet-Induced Visceral Obesity in 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-Deficient Mice. *Diabetes* 2004;53:931-8.
76. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *PNAS* 2004;101:7088-93.
77. Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS. Adipocyte-Specific Glucocorticoid Inactivation Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 2005;54:1023-31.
78. Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, et al. 11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2005;202:517-27.
79. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3441-7.
80. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hosp* 1932;50:137-95.
81. Chiodini I, Carnevale V, Torlontano M, et al. Alterations of Bone Turnover and Bone Mass at Different Skeletal Sites due to Pure Glucocorticoid Excess: Study in Eumenorrheic Patients with Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1863-7.
82. Bland R, Worker CA, Noble BS, et al. Characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines. *J Endocrinol* 1999;161:455-64.
83. Cooper MS, Walker EA, Bland R, Fraser WD, Hewison M, Stewart PM. Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone* 2000;27:375-81.
84. Walker EA, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:334-9.
85. Eyre LJ, Rabbitt EH, Bland R, et al. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat osteoblastic cells: pre-receptor regulation of glucocorticoid responses in bone. *J Cell Biochem* 2001;81:453-62.
86. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine

- switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001;16:1037-44.
87. Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Barlett WA, Hewison M, Stewart PM. Osteoblastic 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity Increases With Age and Glucocorticoid Exposure. *J Bone Miner Res* 2002;17:979-86.
 88. Stokes J, Noble J, Brett L, et al. Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human and rat ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1629-38.
 89. Suzuki T, Sasano H, Kaneko C, Ogawa S, Darnel AD, Krozowski ZS. Immunohistochemical distribution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human eye. *Mol Cell Endocrinol* 2001;173:121-5.
 90. Rauz S, Walker EA, Shackleton CH, Hewison M, Murray PI, Stewart PM. Expression and putative role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes within the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2037-42.
 91. Stewart PM, Whorwood CB, Barber P, et al. Localization of renal 11 beta-dehydrogenase by in situ hybridization: autocrine not paracrine protector of the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 1991;128:2129-35.
 92. Yau JL, Van Haarst AD, Moisan MP, Fleming S, Edwards CR, Seckl JR. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol* 1991;260:F764-7.
 93. Castello R, Schwarting R, Muller C, Hierholzer K. Immunohistochemical localization of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in rat kidney with monoclonal antibody. *Ren Physiol Biochem* 1989;12:320-7.
 94. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 1988;2:986-9.
 95. Rundle SE, Funder JW, Lakshmi V, Monder C. The intrarenal localization of mineralocorticoid receptors and 11 beta-dehydrogenase: immunocytochemical studies. *Endocrinology* 1989;125:1700-4.
 96. Brem AS, Bina B, Matheson KL, Barnes JL, Morris DJ. Developmental changes in rat renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Kidney Int* 1994;45:679-83.

97. Hirasawa G, Sasano H, Suzuki T, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1453-8.
98. Thompson A, Han VK, Yang K. Differential expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 mRNA and glucocorticoid receptor protein during mouse embryonic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;88:367-75.
99. Lecybyl R, Rubis B, Krozowski Z, Trzeciak WH. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II expression in the renal epithelial cells. *Endocr Res* 2003;29:211-6.
100. Leckie C, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR. LLC-PK1 cells model 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 regulation of glucocorticoid access to renal mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 1995;136:5561-9.
101. Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999;57:249-324.
102. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *PNAS* 2004;101:7088-93.
103. Stewart PM, Burra P, Shackleton CH, Sheppard MC, Elias E. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:748-51.
104. Seckl JR. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:61-71.
105. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res* 2000;47:291-300.
106. Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, et al. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:135-44.
107. Yang K. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Rev Reprod* 1997;2:129-32.
108. Burton PJ, Waddell BJ. Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod* 1999;60:234-40.

109. Staud F, Mazancova K, Miksik I, Pavek P, Fendrich Z, Pacha J. Corticosterone Transfer and Metabolism in the Dually Perfused Rat Placenta: Effect of 11beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *Placenta* 2006;27:171-80.
110. Shams M, Kilby MD, Somerset DA, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum Reprod* 1998;13:799-804.
111. Langley-Evans SC. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet. *Clin Sci (Lond)* 1997;93:423-9.
112. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 1996;39:1299-305.
113. Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci* 2000;12:1047-54.
114. Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, et al. Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71:17A-20A.
115. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990;82:1730-6.
116. Gomez-Sanchez E. Intracerebroventricular infusion of aldosterone induces hypertension in rats. *Endocrinology* 1986;118:819-23.
117. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893-901.
118. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
119. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.

120. Konishi A, Tazawa C, Miki Y, et al. The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:439-42.
121. Mazancova K, Kopecky M, Miksik I, Pacha J. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the heart of normotensive and hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:273-7.
122. Funder JW, Pearce PT, Myles K, Roy LP. Apparent mineralocorticoid excess, pseudohypoaldosteronism, and urinary electrolyte excretion: toward a redefinition of mineralocorticoid action. *FASEB J* 1990;4:3234-8.
123. Gomez-Sanchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D, Fort C. ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1990;258:E649-53.
124. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994;93:2578-83.
125. Young MJ, Funder JW. The renin-angiotensin-aldosterone system in experimental mineralocorticoid-salt-induced cardiac fibrosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996;271:E883-8.
126. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, et al. Transgenic Model of Aldosterone-Driven Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Res* 2003;93:69-76.
127. Ulick S, Levine L, Gunczler P, et al. A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:757-64.
128. White PC, Mune T, Rogerson FM, Kayes KM, Agarwal AK. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Pediatr Res* 1997;41:25-9.
129. White PC, Mune T, Rogerson FM, Kayes KM, Agarwal AK. Molecular analysis of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Steroids* 1997;62:83-8.
130. Coulter CL, Smith RE, Stowasser M, Sasano H, Krozowski ZS, Gordon RD. Expression of 11beta-HSD2 in human adrenal cortical carcinoma and adenoma. *Endocr Res* 1998;24:875-6.

131. Rabbitt EH, Ayuk J, Boelaert K, et al. Abnormal expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation. *Oncogene* 2003;22:1663-7.
132. Hundertmark S, Buhler H, Rudolf M, Weitzel HK, Ragosch V. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells. *J Endocrinol* 1997;155:171-80.
133. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:359-68.
134. Webster JI, Tonelli L, Sternbergx EM. Neuroendocrine Regulation of Immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125-63.
135. Million M, Tache Y, Anton P. Susceptibility of Lewis and Fischer rats to stress-induced worsening of TNB-colitis: protective role of brain CRF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999;276:G1027-36.
136. Kellendonk C, Tronche F, Reichardt HM, Schutz G. Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:253-9.
137. Heasman S, Giles K, Ward C, Rossi A, Haslett C, Dransfield I. Glucocorticoid-mediated regulation of granulocyte apoptosis and macrophage phagocytosis of apoptotic cells: implications for the resolution of inflammation. *J Endocrinol* 2003;178:29-36.
138. Meagher L, Cousin J, Seckl J, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 1996;156:4422-8.
139. Zhang TY, Ding X, Daynes RA. The Expression of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I by Lymphocytes Provides a Novel Means for Intracrine Regulation of Glucocorticoid Activities. *J Immunol* 2005;174:879-89.
140. Cai TQ, Wong B, Mundt SS, Thieringer R, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A. Induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;77:117-22.
141. Kossintseva I, Wong S, Johnstone E, Guilbert L, Olson DM, Mitchell BF. Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase type 2 activity through Ca²⁺ and cAMP pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E282-8.
142. Tomlinson JW, Bujalska I, Stewart PM, Cooper MS. The role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in central obesity and osteoporosis. *Endocr Res* 2000;26:711-22.
 143. Sun K, Myatt L. Enhancement of Glucocorticoid-Induced 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression by Proinflammatory Cytokines in Cultured Human Amnion Fibroblasts. *Endocrinology* 2003;144:5568-77.
 144. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* 1997;186:189-98.
 145. Freeman L, Hewison M, Hughes SV, et al. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood* 2005;106:2042-9.
 146. Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, et al. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol* 2001;167:30-5.
 147. Nuotio-Antar AM, Hasty AH, Kovacs WJ. Quantitation and cellular localization of 11beta-HSD1 expression in murine thymus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;99:93-9.
 148. Gilmour JS, Coutinho AE, Cailhier J-F, et al. Local Amplification of Glucocorticoids by 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Promotes Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes. *J Immunol* 2006;176:7605-11.
 149. Hennebold JD, Daynes RA. Inhibition of skin 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo potentiates the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Arch Dermatol Res* 1998;290:413-9.
 150. Horigome H, Hirano T, Oka K. Therapeutic effect of glycyrrhetic acid in MRL lpr/lpr mice: implications of alteration of corticosteroid metabolism. *Life Sci* 2001;69:2429-38.
 151. Brereton PS, van Driel RR, Suhaimi FbH, Koyama K, Dilley R, Krozowski Z. Light and Electron Microscopy Localization of the 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I Enzyme in the Rat. *Endocrinology* 2001;142:1644-51.

152. Kato K, Sasano H, Ohara S, et al. Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in human gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2568-73.
153. Smith RE, Maguire JA, Stein-Oakley AN, et al. Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3244-8.
154. Pacha J, Miksik I. Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rat intestine. *Life Sci* 1994;54:745-9.
155. Claus R, Raab S, Lacorn M. Activities of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in different regions of the intestinal tract of pigs. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:374-7.
156. Sheppard KE, Li KX, Autelitano DJ. Corticosteroid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in rat intestinal epithelia. *Am J Physiol* 1999;277:G541-7.
157. Levitan R, Ingelfinger FJ. Effect of d-aldosterone on salt and water absorption from the intact human colon. *J Clin Invest* 1965;44:801-8.
158. Sandle GI, Binder HJ. Corticosteroids and intestinal ion transport. *Gastroenterology* 1987;93:188-96.
159. Hierholzer K, Siebe H, Fromm M. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its effect on epithelial sodium transport. *Kidney Int* 1990;38:673-8.
160. Mazancova K, Kucka M, Miksik I, Pacha J. Glucocorticoid metabolism and Na⁺ transport in chicken intestine. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2005;303:113-22.
161. Norregaard R, Uhrenholt TR, Bistrup C, Skott O, Jensen BL. Stimulation of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat colon but not in kidney by low dietary NaCl intake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F348-58.
162. Pacha J, Miksik I. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine. *J Endocrinol* 1996;148:561-6.
163. Pacha J, Vagnerova R, Bryndova J. Carbenoxolone accelerates maturation of rat intestine. *Pediatr Res* 2003;53:808-13.
164. Bryndova J, Zbankova S, Kment M, Pacha J. Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:549-53.

165. Vagnerova K, Kverka M, Klusonova P, et al. Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut. *Journal of Endocrinology* 2006;191:497-503.
166. Morris G, Beck P, Herridge M, Depew W, Szewczuk M, Wallace J. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
167. Edsbacker S, Andersson P, Lindberg C, Paulson J, Ryrfeldt A, Thalen A. Liver metabolism of budesonide in rat, mouse, and man. Comparative aspects. *Drug Metab Dispos* 1987;15:403-11.
168. Lyscom N, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 1982;45:775-83.
169. Bryndova J, Zbankova S, Kment M, Pacha J. Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:549-53.
170. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206-9.
171. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625-9.
172. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
173. Calvino B, Maillet S, Pradelles P, Besson JM, Couraud JY. Variation of substance P-like immunoreactivity in plasma and cerebrospinal fluid in the course of arthritis induced by Freund adjuvant in rats, a model for the study of chronic pain. *C R Acad Sci III* 1991;312:427-32.
174. Earp JC, Dubois DC, Molano DS, et al. Modeling corticosteroid effects in a rat model of rheumatoid arthritis I: mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:532-45.

175. Firestein GS, Zvaifler NJ. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum* 1987;30:864-71.
176. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998;43:856-60.
177. Reed KL, Fruin AB, Gower AC, et al. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2005;50:2366-78.
178. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989;97:326-37.
179. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:189-222.
180. van der Velden VH. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm* 1998;7:229-37.
181. Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, et al. Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology* 2001;142:1982-9.
182. Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ, Frey BM. TNF-alpha enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Lett* 2001;507:351-6.
183. Yong PY, Harlow C, Thong KJ, Hillier SG. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1. *Hum Reprod* 2002;17:2300-6.
184. Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, et al. Inflammatory mediators down-regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a human lung epithelial cell line BEAS-2B and the rat lung. *Tohoku J Exp Med* 2005;207:293-301.
185. Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 2006;71:240-8.

186. Suzuki S, Koyama K, Darnel A, et al. Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1244-9.
187. Pacha J, Miksik I, Lisa V, Pohlova I. Hormonal regulation of intestinal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Life Sci* 1997;61:2391-6.
188. Hardy DB, Pereria LE, Yang K. Prostaglandins and leukotriene B4 are potent inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biol Reprod* 1999;61:40-5.
189. Patel FA, Clifton VL, Chwalisz K, Challis JR. Steroid regulation of prostaglandin dehydrogenase activity and expression in human term placenta and chorio-decidua in relation to labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:291-9.
190. Peskar BM, Holland A, Peskar BA. Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesis and degradation. *J Pharm Pharmacol* 1976;28:146-8.
191. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 2004;25:831-66.
192. Goppelt-Struebe M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1389-95.
193. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, et al. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1122-8.
194. Smith JW, Castro GA. Relation of peroxidase activity in gut mucosa to inflammation. *Am J Physiol* 1978;234:R72-9.
195. Palmén MJ, Dieleman LA, Soesatyo M, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Effects of local budesonide treatment on the cell-mediated immune response in acute and relapsing colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1998;43:2518-25.
196. Hoebler C, Gaudier E, De Coppet P, Rival M, Cherbut C. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig Dis Sci* 2006;51:381-9.
197. Yoshimitsu M, Hayamizu K, Egi H, et al. The neutrophil/Th1 lymphocyte balance and the therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor in TNBS-induced colitis of rat strains. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:291-300.

198. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, et al. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G187-95.
199. McCabe RP, Secrist H, Botney M, Egan M, Peters MG. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;66:52-8.
200. Minami T, Tojo H, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Okamoto M. Increased group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1994;35:1593-8.
201. Anton PA, Shanahan F. Neuroimmunomodulation in inflammatory bowel disease. How far from "bench" to "bedside"? *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:723-34.
202. Takahashi KI, Fukushima K, Sasano H, et al. Type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human colonic epithelial cells of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1999;44:2516-22.
203. Friedberg M, Zoumakis E, Hiroi N, Bader T, Chrousos GP, Hochberg Z. Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:385-93.
204. Makrygiannakis D, af Klint E, Catrina SB, et al. Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1463-72.
205. Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:142-6.
206. Hardy R, Rabbitt EH, Filer A, et al. Local and systemic glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1204-10.
207. Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *PNAS* 1989;86:2374-8.
208. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. In: *Annu Rev Immunol*; 2002:125-63.
209. Karalis K, Crofford L, Wilder RL, Chrousos GP. Glucocorticoid and/or glucocorticoid antagonist effects in inflammatory disease-susceptible Lewis rats and inflammatory disease-resistant Fischer rats. *Endocrinology* 1995;136:3107-12.

210. Zbankova S, Bryndova J, Leden P, Kment M, Svec A, Pacha J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1019-23.
211. Vagnerova K, Kverka M, Klusonova P, et al. Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut. *J Endocrinol* 2006;191:497-503.
212. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-15.
213. Brennan FM, Field M, Chu CQ, Feldmann M, Maini RN. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1991;30 Suppl 1:76-80.
214. Hardy RS, Filer A, Cooper MS, et al. Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R108.
215. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552-63.
216. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998;41:2196-204.
217. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999;130:478-86.
218. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9784-8.
219. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 1996;39:797-809.
220. Kuiper S, Joosten LA, Bendele AM, et al. Different roles of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis. *Cytokine* 1998;10:690-702.

221. Coxon A, Bolon B, Estrada J, et al. Inhibition of interleukin-1 but not tumor necrosis factor suppresses neovascularization in rat models of corneal angiogenesis and adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2604-12.
222. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004;50:277-90.
223. Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd BL. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R807-16.
224. Boettger MK, Hensellek S, Richter F, et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008;58:2368-78.
225. Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, et al. Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea pig lungs using methylprednisolone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L998-L1006.
226. Miller SC, Rapier SH, Holtsclaw LI, Turner BB. Effects of psychological stress on joint inflammation and adrenal function during induction of arthritis in the Lewis rat. *Neuroimmunomodulation* 1995;2:329-38.
227. Hu GX, Lin H, Sottas CM, Morris DJ, Hardy MP, Ge RS. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymatic activities by glycyrrhetic acid in vivo supports direct glucocorticoid-mediated suppression of steroidogenesis in Leydig cells. *J Androl* 2008;29:345-51.
228. Whorwood CB, Barber PC, Gregory J, Sheppard MC, Stewart PM. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in the rat colon. *Am J Physiol* 1993;264:E951-7.
229. Liu Y, Nakagawa Y, Wang Y, et al. Reduction of hepatic glucocorticoid receptor and hexose-6-phosphate dehydrogenase expression ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *J Mol Endocrinol* 2008;41:53-64.
230. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:333-45.

231. Davidson JS, Baumgarten IM. Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246:1104-7.
232. Matemba SF, Lie A, Ransjo M. Regulation of osteoclastogenesis by gap junction communication. *J Cell Biochem* 2006;99:528-37.
233. Tomlinson JW, Sherlock M, Hughes B, et al. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:857-64.

9. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK; VYSVĚTLIVKY

Δ	delece
11 α HP	11 α -hydroxyprogesteron
11HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
11HSD1	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa isoenzym 1
11HSD2	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa isoenzym 2
20 α / β HSD	20 α -/20 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
AA	adjuvatní artritida
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AME	apparent mineralocorticoid excess
ANK	anakinra, antagonist receptoru IL1- β
AV ČR	Akademie věd České republiky
BSA	hovězí sérový albumin
BUD	budesonid
BW	hmotnost potkana
CBG	corticosteroid binding globulin
CBX	karbenoxolon
C-číslo	uhlík steroidní látky daného čísla
cDNA	komplementární DNA
COX-2	cyklooxygenasa - 2
cPLA2 α	cytosolova fosfolipáza A2 α
CRH	kortikotropin releasing hormonu
CTRL	kontrolní skupina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAsa	deoxyribonukleasa
dNTP	směs nukleotidů dATP, dTTP, dGTP a dCTP
DSS	dextranulfát sodný
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENB	etanercept inhibitor TNF- α
iNOS	inducibilní NO synthasa
G6PDH	glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa

GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GIT	gastrointestinální trakt
Gly	glycin
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	glucocorticoid responsive element
H6PD	hexóza-6- fosfát dehydrogenasa
HPA	osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
IBD	nespecifický střevní zánět
IL	interleukin
I κ -B	inhibiční faktor
K _d	disociační konstanta
K _M	Michaelisova konstanta
Kolon	tračník, tlusté střevo
LEW	kmen potkanů; Lewis
Lys	lysin
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	mediátorová RNA
MUC-2	mucin - 2
N	počet měření
NaCl 0,9%	fyziologický roztok
NAD ⁺ , NADH	nikotinamidadenindinukleotid a jeho redukováná forma
NADP ⁺ , NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát a jeho redukováná forma
NF- κ B	nukleární faktor κ B
nGRE	negativní GRE
NOS	NO synthasa
Nt	nukleotid
OPN	osteopontin
P	pravděpodobnost
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K	enzym phosphatidylinositol-3-hydroxykináza

PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI-1640	fetální bovinní sérum
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí
RU-486	Mifepriston, antagonist glukokortikoidního receptoru
SDS	v souvislosti s enzymovou „rodinou“
SPE	metoda extrakce na pevné fázi
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TG	triglyceridy
THE	tetrahydrokortizon
THF	tetrahydrokortizol
TNBS	trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF	tumor necrosis factor
Tyr	tyrosin
W	potkan Wistar (Velaz, ČR)
X	(v souvislosti s proteinovou sekvencí) aminokyselina