

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**Periferní metabolismus glukokortikoidů
u hypertenzních potkanů**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE
v oboru biochemie a patobiochemie**

Praha 2005

Ing. Karla Vagnerová

PODĚKOVÁNÍ

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

prof. RNDr. Václavu Pelouchovi, CSc. za vedení dizertační práce;

RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc. a celému kolektivu Oddělení funkce epitelu FgÚ AV ČR v Praze ze vedení v práci, cenné rady, obětavou a laskavou pomoc při řešení předkládané práce;

RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. a kolektivu Oddělení experimentální hypertenze FgÚ AV ČR za pomoc při řešení mnoha dílčích úkolů včetně měření krevních tlaků a za poskytnutí některých laboratorních potkanů.

doc. ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc. z Oddělení analýzy fyziologicky aktivních látek FgÚ AV ČR za pomoc a cenné rady v oblasti analytické chemie;

a ing. Ludmile Kazdové, CSc. z Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze za poskytnutí části potkanů k pokusům týkající se metabolického syndromu a za změření jejich plazmatické hladiny triglyceridů.

OBSAH

1. SOUHRN.....	5
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	8
2.1. KORTIKOSTEROIDNÍ HORMONY	8
2.2. ENZYMY KORTIKOSTEROIDNÍHO METABOLISMU.....	9
2.3. 3 α -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA	11
2.4. 5 α -/5 β -REDUKTASA	11
2.5. 20 α -/20 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA	11
2.6. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA	12
2.6.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1.....	14
2.6.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2.....	15
2.6.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 3.....	18
2.6.4. <i>Exprese, regulace a inhibice 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy</i>	18
2.6.4.1. Ledvina.....	18
2.6.4.2. Trávicí systém	20
2.6.4.2.1. Žaludek	20
2.6.4.2.2. Střevo.....	21
2.6.4.3. Játra	22
2.6.4.4. Imunitní systém.....	23
2.6.4.5. Nadledviny	24
2.6.4.6. Centrální nervový systém.....	25
2.6.4.7. Reprodukční systém.....	26
2.6.4.7.1. Samčí reprodukční systém.....	26
2.6.4.7.2. Samičí reprodukční systém.....	27
2.6.4.7.2.1. Vaječník	27
2.6.4.7.2.2. Děloha.....	28
2.6.4.7.2.3. Placenta.....	28
2.6.4.7.2.4. Mléčná žláza	30
2.6.4.8. Oko	30
2.6.4.9. Plíce.....	31
2.6.4.10. Kost	31
2.6.4.11. Pankreas	32
2.6.4.12. Tuková tkáň.....	32
2.6.4.13. Kůže	33
2.6.4.14. Kardiovaskulární systém.....	33
2.6.4.14.1. Cévy	33
2.6.4.14.2. Srdce	34
2.6.5. <i>Vybrané patologické stavy</i>	36
2.6.5.1. Obezita, metabolický syndrom.....	36
2.6.5.2. Hypertenze, zdánlivý mineralokortikoidní nadbytek	37
2.6.5.3. Hypertenze, pohlavní rozdíly	39
2.6.5.4. Srdeční hypertrofie a fibróza.....	40
2.6.5.5. Vliv prenatální poruchy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v placentě ..	40
3. CÍLE.....	42

4. MATERIÁLY A METODY	44
4.1. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A POHLAVNÍ ROZDÍLY	44
4.1.1. Použitá zvířata	44
4.1.2. Použité chemikálie	44
4.1.3. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech	44
4.1.4. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu	45
4.2. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V PLACENTĚ	46
4.2.1. Použitá zvířata	46
4.2.2. Použité chemikálie	46
4.2.3. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech	47
4.2.4. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu	48
4.2.5. Měření hladiny mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2	48
4.2.5.1. Izolace RNA-příprava vzorku	48
4.2.5.2. Kvantitativní dvoukroková RT-PCR- měření vývojových změn	49
4.2.5.3. Kvantitativní jedнокroková RT-PCR- patogeneze hypertenze	50
4.2.6. Kvantifikace proteinu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2	51
4.2.6.1. Příprava vzorku	51
4.2.6.2. Separace bílkovin a „western blotting“	52
4.2.7. Lokalizace 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 pomocí imunohistochemie	53
4.3. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V SRDCI	54
4.3.1. Použitá zvířata	54
4.3.2. Použité chemikálie	55
4.3.3. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu	55
4.3.4. Měření hladiny mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2	55
4.3.4.1. Izolace RNA-příprava vzorku	55
4.3.4.2. Kvantitativní dvoukroková RT-PCR	55
4.4. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A METABOLICKÝ SYNDROM	56
4.4.1. Použitá zvířata	56
4.4.2. Použité chemikálie	56
4.4.3. Stanovení hladiny triglyceridů v séru	56
4.4.4. Stanovení hladiny insulinu v séru	57
4.4.5. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu	57
4.4.6. Měření hladiny mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v tukové tkáni	58
4.5. STANOVENÍ PROTEINU	59
4.6. EXTRAKCE STEROIDŮ	59
4.7. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE – HPLC	59
4.7.1. HPLC - neradioaktivní metoda - tkáňové řezy	59
4.7.2. HPLC - radioaktivní metoda - tkáňový homogenát	60
4.8. STATISTICKÉ METODY	60
4.8.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a pohlavní rozdíly	60
4.8.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v placentě	60
4.8.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v srdci	61
4.8.4. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a metabolický syndrom	61
5. VÝSLEDKY	62
5.1. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A POHLAVNÍ ROZDÍLY	62
5.2. 11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V PLACENTĚ	64

5.2.1.	<i>Vývojové změny 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 v placentě.....</i>	64
5.2.2.	<i>Placentární 11β-hydroxysteroiddehydrogenasa 1 a 2 a hypertenze</i>	68
5.3.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V SRDCI.....	74
5.4.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A METABOLICKÝ SYNDROM.....	78
6.	DISKUZE.....	82
6.1.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A POHLAVNÍ ROZDÍLY	82
6.2.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V PLACENTĚ.....	86
6.3.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA V SRDCI.....	90
6.4.	11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASA A METABOLICKÝ SYNDROM.....	92
7.	ZÁVĚR.....	95
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	97
9.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	126
10.	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	130

1. SOUHRN

Klíčovým článkem periferního metabolismu glukokortikoidů je 11β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11HSD), která katalyzuje přeměnu glukokortikoidů na jejich méně účinné 11-oxo deriváty a naopak a může tak ovlivnit koncentraci těchto hormonů přímo v tkáni. Existují dva isoenzymy 11HSD. 11HSD2 je schopna pouze snížit hladinu glukokortikoidů a je exprimovaná nejen v mineralokortikoidně cílových tkáních ale i např. v placentě. Naproti tomu 11HSD1 *in vivo* převážně zvyšuje lokální koncentraci glukokortikoidů a je exprimovaná v nejrůznějších tkáních. Přítomnost těchto isoenzymů v tkáni má obrovský význam při zprostředkování jak mineralokortikoidního tak i glukokortikoidního signálu. Je známo, že mineralokortikoidy (aldosteron) i glukokortikoidy (kortisol, kortikosteron) mají přibližně stejnou afinitu k mineralokortikoidnímu receptoru (MR) *in vitro* a navíc plazmatická hladina glukokortikoidů je přibližně 1000× vyšší nežli mineralokortikoidů. *In vivo* dochází ovšem k specifické vazbě aldosteronu na MR. Tato selektivní vazba je umožněna díky 11HSD2, která konvertuje glukokortikoidy na méně účinné 11-oxo deriváty. Nedostatečná funkce tohoto isoenzymu vede k nadměrné aktivaci MR glukokortikoidem a tím k rozvoji hypertenze. Poslední dobou se uvažuje o tom, že v srdci a mozku, kde jsou exprimované MR a v malé míře 11HSD2, vytváří MR s glukokortikoidem neaktivní komplex. Jednou z možností, jak zajistit aktivaci receptoru mineralokortikoidem, je přeměnit glukokortikoid pomocí 11HSD2 na méně účinný 11-oxo derivát. 11HSD1 může naopak zvyšovat lokální koncentraci glukokortikoidů a napomáhat tak vytvářet neaktivní komplex MR s glukokortikoidem. Obě dehydrogenasy tím, že mění lokální koncentraci glukokortikoidů, mohou také ovlivnit glukokortikoidní signál zprostředkovaný přes glukokortikoidní receptor či případně ovlivnit působení jiných hormonů. Je totiž znám permissivní účinek glukokortikoidů na působení vasokonstrikčních látek jako je noradrenalin a angiotenzin II. Výhradní postavení má tento enzym i v placentě. Je známo, že vystavení plodu vyšší hladině glukokortikoidů vede k rozvoji hypertenze, ale i dalších chorob (insulinová rezistence, obezita) v dospělosti potomků. Právě 11HSD2 zabraňuje přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu tím, že je konvertuje na méně účinné 11-oxo deriváty. Poslední dobou je kladen velký důraz na studium těchto dvou dehydrogenas zvláště pak ve spojení s rozvojem hypertenze a metabolického syndromu.

Cílem této práce bylo: (1) zjistit pohlavně asociované rozdíly v 11HSD, které by

mohly být spoluzodpovědné za výraznější rozvoj hypertenze u samců oproti samicím; (2) zjistit změny 11HSD v průběhu vývoje placenty a studium obou placentárních isoenzymů v souvislosti s rozvojem hypertenze v dospělosti potomků; (3) prokázat, zda srdeční hypertrofie během hypertenze je spojena se změnami srdeční 11HSD a (4) porovnat metabolismus glukokortikoidů u potkanů s metabolickým syndromem a postulovat roli 11HSD u tohoto onemocnění. Na řešení cílů 1-3 byly použity dva modely hypertenzních potkanů: spontánně hypertenzní potkan (SHR) a jeho normotenzní kontrola Wistar-Kyoto (WKY) a jako druhý model byl použit Dahlův potkan citlivý (DS) a rezistentní (DR) k zvýšenému příjmu soli. Pro studium vývojových změn 11HSD v placentě byl použit potkan Wistar. Na řešení 4. cíle byl použit Pražský hypertriglyceridemický kmen potkana (HTG), který byl vyšlechtěn z potkana Wistar a který byl použit jako kontrolní kmen. Ke studiu byly použity enzymové a molekulárně biologické metody včetně kvantitativní RT-PCR v reálném čase, „western blottingu“ a imunohistochemie.

(1) Na základě porovnání enzymových aktivit v ledvině, tračníku a aortě lze říci, že 11HSD2 nemá pravděpodobně vliv na výraznější rozvoj hypertenze u samců oproti samicím. V žádné tkáni nebyla nalezena vyšší aktivita u samic, která by naznačovala vyšší inaktivaci kortikosteronu u samic nežli u samců. Byl nalezen významný kmenový rozdíl 11HSD2 v aortě Dahlových potkanů, který svědčí o možné vyšší hladině glukokortikoidů v aortě DS potkanů a naznačuje tak možnou roli tohoto isoenzymu v procesu vzniku hypertenze.

(2) Byly zjištěny významné vývojové změny v obou placentárních isoformách 11HSD. Nejvyšší hladina mRNA pro oba isoenzymy byla zaznamenána ve 13. dni březosti (D13) a nejvyšší hladina proteinu pro 11HSD2 v D14 a D19. U žádného hypertenzního kmene nebyla zaznamenána nižší aktivita placentární 11HSD2, která by vedla ke zvýšenému přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu. U DS potkanů byla ke konci gestace zvýšená hladina mRNA 11HSD1, která by naopak mohla přispívat ke zvýšenému přestupu glukokortikoidů do plodu a podílet se tak na rozvoji hypertenze u DS potkanů.

(3) V srdci byly na úrovni mRNA zaznamenány oba isoenzymy 11HSD, avšak 11HSD2 je zde exprimovaná mnohem méně nežli 11HSD1. Bylo prokázáno, že srdeční hypertrofie během hypertenze není spojena se změnami v expresi 11HSD2. U Dahlových potkanů byl ale zaznamenán významný kmenový rozdíl v 11HSD1. Bylo zjištěno, že DR potkani mají vyšší schopnost syntézy glukokortikoidů přímo v srdeční tkáni nežli potkani DS.

(4) HTG potkani mají vyšší schopnost syntézy glukokortikoidů v játrech nežli potkani Wistar. Vysoký příjem fruktosy, který má za následek zvýšení plazmatické hladiny insulinu, vedl ke zvýšení aktivity 11HSD1 v mezenteriálních cévách a tračníku. Kromě zvýšené aktivity 11HSD1 v játrech HTG potkanů a v cévách HTG potkanů na dietě s vysokým obsahem fruktosy nebyl nalezen žádný rozdíl v aktivitě 11HSD1 ani 11HSD2.

Z jednotlivých výsledků je tedy zřejmé, že lokální metabolismus glukokortikoidů je závislý na genotypu zvířat.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Během posledních dvaceti let je stále více vyzdvihován do popředí význam prereceptorového metabolismu steroidních hormonů. Tento metabolismus ovlivňuje účinek hormonů v dané tkáni nezávisle na jejich plazmatické koncentraci a může tudíž zesílit či zeslabit steroidní signál. V současné době je známo, že účinek steroidního hormonu nezáleží pouze na totální plazmatické hladině hormonu a vazebném plazmatickém proteinu, ale hlavně na lokální koncentraci hormonu přímo v tkáni, jeho intracelulárním metabolismu, koncentraci receptoru a jeho případné modifikaci a na spřažení receptorů s efektořem. Kromě modulace steroidního signálu může tento prereceptorový metabolismus hrát roli v ochraně receptorů před vazbou s nesprávným hormonem. Je totiž známo, že různé steroidní hormony vykazují *in vitro* podobné afinity k steroidním receptorům. To znamená, že *in vivo* musí existovat systém, který zabezpečuje vazbu daného hormonu na příslušný receptor. Takovým systémem je právě lokální metabolismus v buňce, díky němuž je steroidní hormon přeměněn na méně aktivní metabolit, který se na receptor váže s nižší afinitou.

Studium prereceptorového metabolismu přineslo již mnoho nových poznatků. Bohužel zatím zůstává mnoho nevyřešených otázek, jejichž zodpovězení by mohlo přispět k pochopení fungování celého organismu na úrovni jednotlivých orgánů a buněk. Tato kapitola by měla přinést alespoň částečný pohled na tuto problematiku u kortikosteroidních hormonů.

2.1. Kortikosteroidní hormony

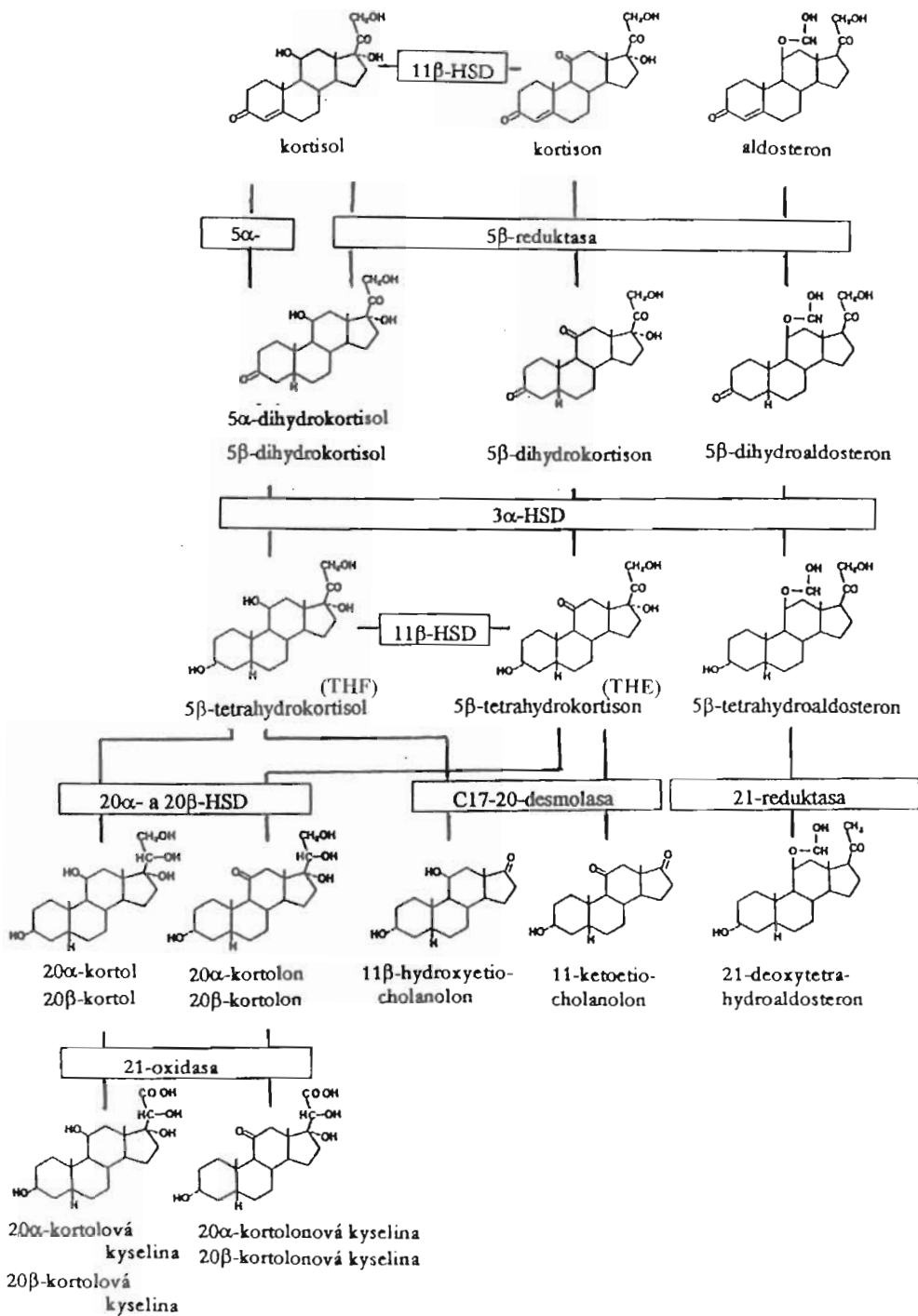
Mezi kortikosteroidní hormony se řadí glukokortikoidy a mineralokortikoidy. U většiny savců včetně člověka je hlavním glukokortikoidem kortisol. Kortikosteron je u těchto druhů minoritním glukokortikoidem, ale je hlavním glukokortikoidem hlodavců. Nejúčinnějším přirozeným mineralokortikoidem je aldosteron. Rozdíly mezi těmito steroidy byly původně založeny na přesné definici jejich funkce. Glukokortikoidy byly charakterizovány jako hormony ovlivňující metabolismus cukrů, zatímco mineralokortikoidy jako hormony, které ovlivňují transepiteliální Na^+ -transport. Tato striktní definice prodělala významné změny. Postupně bylo prokázáno, že glukokortikoidy zprostředkovávají nesčetné fyziologické pochody včetně vývoje, udržování krevního tlaku, ovlivnění imunitních a stresových reakcí organismu, atd. [1, 2]. Mineralokortikoidy mají

kromě vlivu na epiteliální tkáň vliv i na krevní tlak a hrají centrální roli při vyvolání pocitu žízně [1, 3].

2.2. Enzymy kortikosteroidního metabolismu

Kromě klasické cesty syntézy kortikosteroidních hormonů v nadledvině byla popsána i extraadrenální syntéza. Řada tkání má schopnost lokální syntézy kortikosteroidních hormonů buď přímo z cholesterolu nebo z jiných plazmatických steroidních prekurzorů. Tato syntéza významně nepřispívá k celkové plazmatické hladině hormonů (např. v srdci- 0,1 % exprese klíčových enzymů v nadledvinách), ale pravděpodobně pouze zprostředkovává autokrinní a parakrinní účinky [2, 4].

Odbourání hormonů probíhá v játrech a podílí se něm celá řada enzymů včetně 11 β -, 3 α -, 20 α - a 20 β -hydroxysteroiddehydrogenasy a 5 α - a 5 β -reduktasy (obr.2.1) [4]. Tyto enzymy hrají významnou roli nejen v procesu odbourávání hormonů s následným vyloučením z organismu, ale hrají právě i roli v modifikaci steroidního signálu. Enzymy lze zařadit do několika enzymových rodin. Mezi nejprostudovanější patří rodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem („short chain dehydrogenase/reductase (SDR) family“) zahrnující přes 60 enzymů z různých organismů zpracovávajících nejrozličnější substráty - steroidy, cukry, prostaglandiny, alkoholy a další malé molekuly. Tato rodina zahrnuje řadu enzymů majících úlohu při kontrole hormonálních procesů, které se uplatňují při růstu, hypertenzi a plodnosti. Enzymy SDR rodiny vykazují pouze 15 - 30 % aminokyselinovou sekvenční homologii [5]. Na N-koncové části se nalézá kofaktor-vázající doména s motivem Gly-X-X-X-Gly-X-Gly a zřejmě i signál pro zabudování proteinů do membránových kompartmentů. Vazebná struktura pro kofaktor (nukleotid) je tvořena tzv. Rossmannovým záhybem (supersekundární struktura proteinu - $\beta\alpha\beta\alpha\beta$). V centrální části proteinů je aktivní místo, pro které je charakteristická sekvence Tyr-X-X-X-Lys, přičemž Tyr je konzervovaný v aktivním místě všech známých členů SDR rodiny [6, 7]. Do této skupiny patří např. lidská 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 a typu 3, která se účastní metabolismu C₁₉ a C₁₈ steroidů.



Obr.2.1. Odbourávání kortisolu a aldosteronu v játrech.
HSD- hydroxysteroiddehydrogenasa; [4].

Do druhé rodiny tzv. aldo-keto reduktas patří např. savčí 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa, 20 α -hydroxysteroiddehydrogenasa [6] a 5 β -reduktasa [8]. Narozdíl od enzymů z SDR rodiny nemají ve své struktuře Rossmannův záhyb. V aktivním místě mají konzervovaný Tyr, Lys, His a Asp. Dalšími skupinami jsou např. Zn a Fe obsahující dehydrogenasy [7].

2.3. 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa

Tento enzym zajišťuje přeměnu hydroxylové skupiny na C-3 steroidního skeletu na 3-keto skupinu. Vedle degradace kortikosteroidních hormonů v játrech je znám i z centrálního nervového systému, kde přeměňuje 5 α -dihydroprogesteron na 5 α -tetrahydroprogesteron. Druhý zmíněný steroid je alosterickým efektem GABA_A receptoru a zvyšuje chloridovou vodivost. Následkem toho má anestetické účinky. Na druhou stranu ovlivňuje tento enzym i metabolismus C₁₉ steroidů regulací přístupu androgenů k androgenním receptorům. Zajišťuje konverzi 5 α -dihydrotestosteronu ($K_d = 10^{-11}$ M pro androgení receptor) na 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol ($K_d = 10^{-6}$ M pro androgení receptor), který má slabší androgenní účinky. Enzym tak může mít vliv na vývoj prostaty [8].

2.4. 5 α -/5 β -reduktasa

Velký význam těchto enzymů je připisován jejich schopnosti snižovat hladinu téměř všech steroidních hormonů (obsahujících Δ^4 -3-ketoskupinu) zejména v játrech a chránit tak organismus před přemírou cirkulujících hormonů. Tato funkce vyplývá z postavení obou reduktas v degradační dráze hormonů (obr.2.1), kde zaujímají první místo. Navíc v dalších tkáních např. mozku konvertuje 5 α -reduktasa testosteron na více účinný androgen 5 α -dihydrotestosteron [9].

2.5. 20 α -/20 β -hydroxysteroiddehydrogenasa

Kromě degradace steroidů v játrech jsou oba enzymy zřejmě zapojeny do řady dalších fyziologických procesů. Byly detekovány v řadě tkání jako je např. vaječník [10], placenta [11], varle [12], nadledvina [13], střevo [14] a je známo, že zajišťují katabolismus progesteronu na neaktivní 20 α - či 20 β -hydroxyprogesteron. Protože je progesteron prekurzorem biologicky aktivních steroidů, jako jsou androgeny, estrogeny a

kortikosteroidy, mohou se tyto enzymy uplatnit v regulaci biosyntézy těchto steroidů. Také je známo, že plazmatická koncentrace progesteronu se výrazně mění během menstruačního cyklu a maxima dosahuje během těhotenství. 20-hydroxysteroiddehydrogenasa by mohla regulovat výkyvy v koncentraci progesteronu přímo v tkáni. Jiné práce naznačují roli 20 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v prereceptorové modifikaci glukokortikoidních hormonů (20 β -dihydrokortikosteron má 4 \times nižší afinitu ke kortikosteroidním receptorům než kortikosteron) [15].

2.6. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (EC 1.1.1.146, 11 β -hydroxysteroid: NAD(P)⁺-11-oxidoreduktasa, 11HSD) se nachází v mineralokortikoidně cílových tkáních, v játrech [7] a dalších orgánech jako je tenké střevo [14], placenta [16, 17], tuk [18], srdce [2] atd. Význam enzymu spočívá ve vzájemné konverzi glukokortikoidů a jejich biologicky neaktivních 11-oxo derivátů. 11-oxidasová reakce lokálně snižuje hladinu glukokortikoidů v tkáni a 11-reduktasová aktivita ji naopak zvyšuje. 11-oxo deriváty glukokortikoidů tak mohou sloužit jako zdroj těchto hormonů přímo v tkáni.

Pokud je nám známo, byl tento enzym poprvé popsán v roce 1956 [19] a od té doby se ho snažilo mnoho vědců zařadit do užšího fyziologického kontextu. Dlouho se předpokládalo, že upravuje pouze 11-oxo a 11-hydroxy formy steroidů dle potřeb organismu. V 80. letech minulého století byl díky 11HSD vyřešen tzv. paradox mineralokortikoidních receptorů. Vyčištěný nebo rekombinantní mineralokortikoidní receptor (MR) váže totiž jak aldosteron, tak i kortisol a kortikosteron s vysokou a podobnou afinitou *in vitro* (tab.I) [20]. Navíc plazmatická koncentrace volného kortisolu (kortikosteronu u hlodavců) je přibližně 10 \times větší než aldosteronu (přibližně 1000 \times při uvažování totálních koncentrací v plazmě; tab.II). Naproti tomu *in vivo* MR váže selektivně aldosteron. Dvě nezávislé skupiny v roce 1988 demonstrovaly, že specifita MR v ledvině není dána samotným receptorem, ale působením 11HSD [21, 22], která přeměňuje glukokortikoidy (kortisol, kortikosteron) na méně účinné 11-oxo deriváty (kortison, 11-dehydrokortikosteron) (obr.2.4). Tyto deriváty se váží na MR s nižší afinitou (tab.I). Aldosteron není substrát pro 11HSD díky své 11,18-hemiacetálové vazbě a může se tak selektivně vázat na MR *in vivo*. Pokud se glukokortikoid váže na MR v mineralokortikoidně cílových tkáních, dochází k mineralokortikoidní odpovědi [23].

Oxidace kortisolu na kortison nebo kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron enzymem 11HSD představuje fyziologický mechanismus odpovídající za specifitu vazby aldosteronu na MR.

Tab.I Relativní afinita k mineralokortikoidním receptorům v mukosní části střeva vztažená k aldosteronu (100 %).

<i>ligand</i>	<i>potkan</i>
aldosteron	100
11-deoxykortikosteron	73
kortikosteron	106
kortisol	32
11-dehydrokortikosteron	N
kortison	N

N-nedetekovatelná; [24]

Tab.II Totální koncentrace kortikoidů v plazmě člověka a potkana.

<i>hormon</i>	<i>kortisol</i>	<i>kortikosteron</i>	<i>aldosteron</i>
člověk ¹⁾	138-552	11,5-57,8	0,06-0,43
potkan ²⁾	N	57,7-585,9	0,05-0,43

Koncentrace jsou udány v nmol/l.

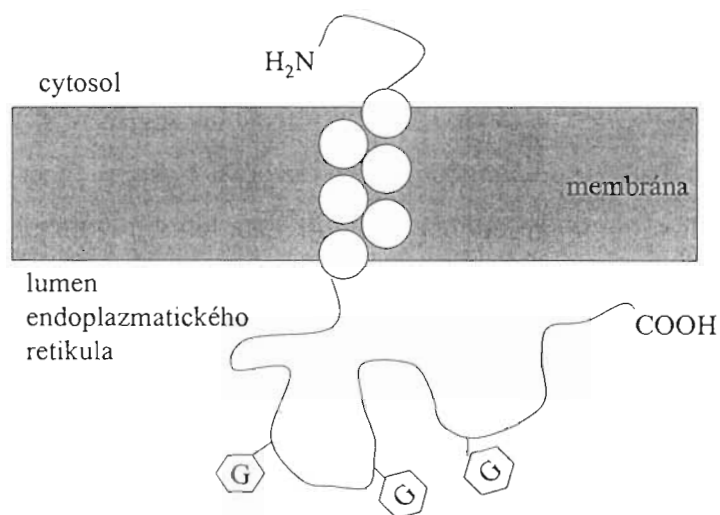
N-nedetekovatelná; ¹⁾ [25]; ²⁾ [26]

Na druhou stranu se ukazuje, že pouhé spojování 11HSD s rolí ochránce MR před glukokortikoidy a tím udržování rovnováhy elektrolytů a vody by mohlo vést k velkému zjednodušení představy o funkci tohoto enzymu (obr.2.4). Např. v játrech zvyšuje tento enzym hladinu plazmatických glukokortikoidů redukcí jejich 11-oxo derivátů [7]. V cévách může díky změnám v lokální koncentraci glukokortikoidů docházet k ovlivnění působení jiných vasoaktivních látek [27, 28]. V některých tkáních, které nejsou považovány za typicky cílové pro mineralokortikoidy (např. srdce), se ukazuje, že MR je za fyziologických podmínek stále okupován glukokortikoidem, který ho ale neaktivuje. Dá se říci, že glukokortikoid spíše chrání MR před nadměrnou aktivací aldosteronem. Lokálními změnami v hladině glukokortikoidů díky 11HSD může docházet ke změnám v aktivaci MR [29, 30].

Existují dva isoenzymy 11HSD, které působí odlišně a jejichž funkce se může do značné míry doplňovat (obr. 2.4). První je jaterní (L) neboli isoenzym typu 1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1; 11HSD1), druhý ledvinový (K) neboli isoenzym typu 2 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2; 11HSD2).

2.6.1. 11β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1

Tento enzym byl poprvé izolován z mikrosomální frakce jater potkana [31]. Je to glykoprotein s molekulovou hmotností 34 kDa a jednou membránovou doménou (obr.2.2) [32, 33], jež vyžaduje NADP^+ či NADPH jako kofaktor. Katalytická doména je nasměrována do lumen endoplazmatického retikula a N-koncová doména směřuje do cytosolu. Někdy se tento enzym označuje jako nízkofinní, protože jeho Michaelisova konstanta K_M pro glukokortikoidní substrát je v mikromolárním rozsahu [34].



Obr.2.2. Model lidské 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 se třemi glykosylačními místy (G). [33]

Celá délka lidské cDNA je velká 1,4 kb a zahrnuje otevřený čtecí rámec o 876 bp předpovídající protein o 292 aminokyselinách. Rekombinantní enzym z cDNA exprimovaný v savčích buňkách vykazuje jak 11β -oxidaseovou tak i reduktaseovou aktivitu [35]. Příslušný lidský gen pro tento isoenzym je lokalizovaný na chromozomu 1 a obsahuje 6 exonů s celkovou délkou přes 9 kb [36].

Tento isoenzym vytváří aktivní glukokortikoidy z neaktivních metabolitů v mnoha tkáních a je tak schopen modulovat glukokortikoidní signál zprostředkovaný přes glukokortikoidní případně mineralokortikoidní receptor (obr.2.4). V intaktních buňkách působí převážně jako reduktasa [31, 37]. Na druhou stranu byla v tkáňových homogenátech prokázána i oxidaseová aktivita tohoto enzymu. Tento rozdíl mezi intaktní

tkání a homogenátem může být způsoben fosforylací enzymu či dostupností kofaktoru [38]. Rozdíl mezi samotnými tkáněmi pak může být způsoben rozdíly v poměru $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. V jaterních buňkách s vysokým zásobením glukosy a aktivním pentosafosfátovým cyklem je většina kofaktoru v redukovaném stavu. Kromě toho NADPH je regenerován hexosa-6-fosfátdehydrogenasou, která je stejně jako 11HSD1 lokalizována na endoplazmatickém retikulu. Tak může být upřednostněna NADPH-dependentní redukce nad oxidací [39]. Další regulujícím faktorem by mohl být stupeň glykosylace [40].

Pomocí gelové permeační chromatografie a SDS (dodecylsulfát sodný) elektroforézy v polyakrylamidovém gelu bylo zjištěno, že tento enzym je funkční jako homodimer. Ve vzorku z lidský jater nebyl nalezen žádný monomerní protein [41].

Nedávno byly vytvořeny homozygotní myši s delecí genu pro 11HSD1 (kap. 2.6.5.1) [42]. Tyto myši se vyznačují neschopností konvertovat 11-dehydrokortikosteron na kortikosteron *in vivo* a mají sníženou aktivaci klíčových jaterních enzymů při hladovění kvůli relativnímu nedostatku glukokortikoidů v játrech.

Zatím jediným živočichem, u kterého nebyla prokázána přítomnost 11HSD1 v játrech, je australská koala (*Phascolarctos cinereus*) [43]. Koala tak nemůže zvýšit hladinu cirkulujícího kortisolu redukcí kortisonu játry. Tím se liší od dosud studovaných savců, případně ryb, ptáků a obojživelníků [44] a poukazuje na evoluční rozdíly jednotlivých druhů.

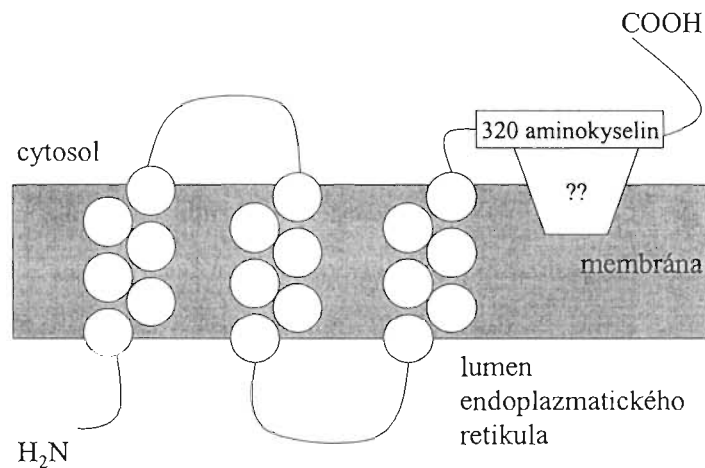
2.6.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2

Tento isoenzym byl poprvé izolován ze sběrného kanálku ledvin králíka. NAD^+ -dependentní 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2 (11HSD2) je enzym pouze s 11 β -dehydrogenasovou aktivitou. Zdá se ale, že 11HSD2 je schopna katalyzovat i redukci některých 11-oxosteroidů. V buněčném homogenátu CHO buněk (Chinese hamster ovary cells) transfekovaných potkání 11HSD2 byl 11-dehydrodexametason metabolizován na dexametason. Schopnost redukce nebyla ale zaznamenána v případě 11-dehydrokortikosteronu jako substrátu. K_M pro glukokortikoidy je přibližně v nanomolárním rozsahu a molekulová hmotnost je přibližně 40 kDa [45-47].

Byly izolovány cDNA kódující tuto isoformu z potkaních [48], ovčích [49] a lidských ledvin [50]. Preferovaný substrát pro rekombinantní enzym je kortikosteron s K_M přibližně 10 \times vyšší než pro kortisol ($K_M \sim 14 - 47$ nM). Je pouze z 21 % identický s

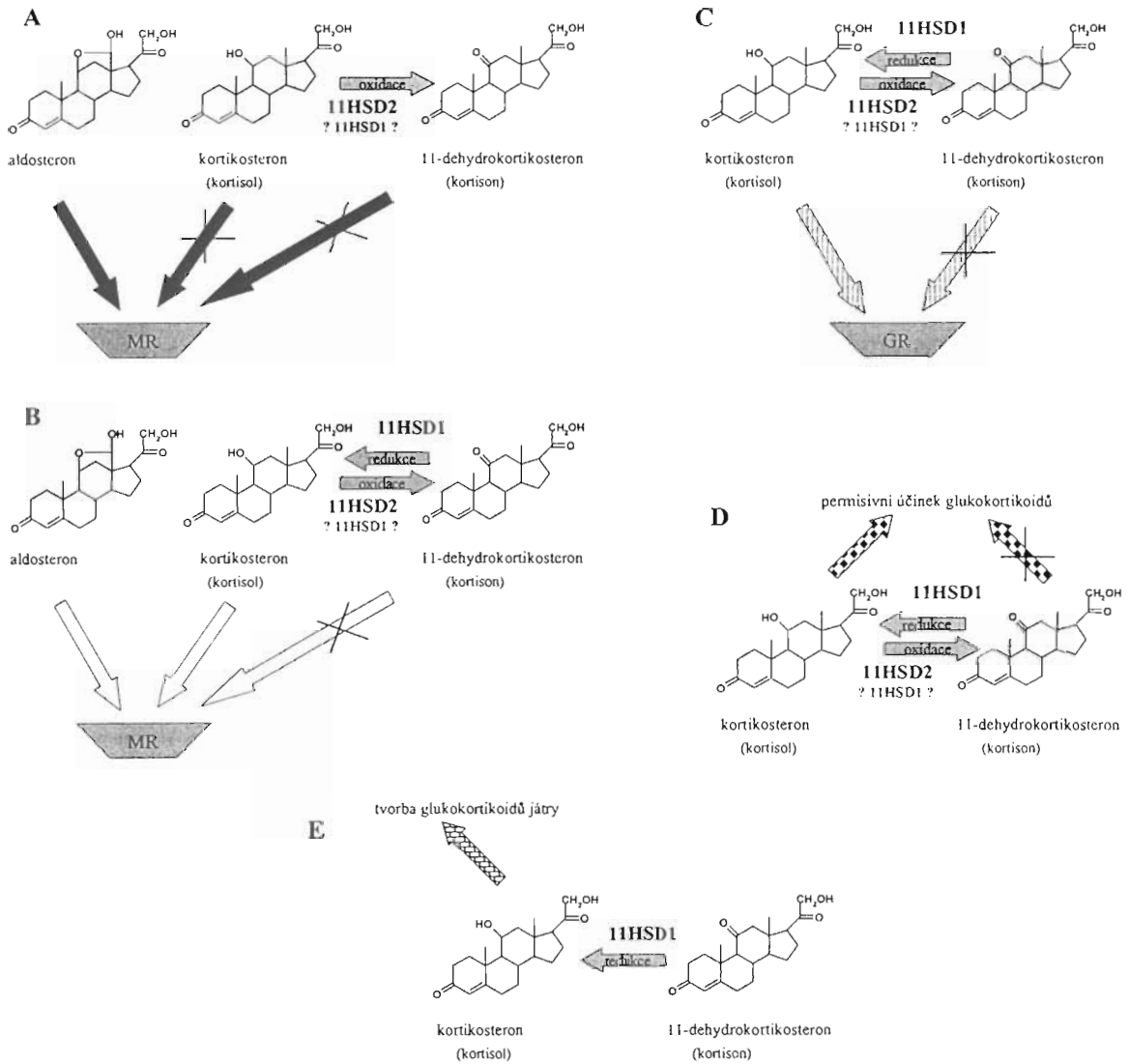
11HSD1. Gen s přibližně 6,2 kb je umístěn u člověka na 16. chromosomu a má 5 exonů. Celý protein má 405 aminokyselin [51].

Pomocí transfekce genu pro 11HSD2 s fusním proteinem- „green fluorescent protein“ do CHO buněk bylo zjištěno, že tento isoenzym je také lokalizován na endoplazmatickém retikulu [52]. Oproti isoenzymu 1 má ale obrácenou orientaci a 3× prochází membránou. Katalytická doména směřuje do cytosolu (C-konec) a N-koncová doména je orientována do lumen endoplazmatického retikula (obr.2.3) [32]. Signál pro zabudování do membrány není zakódován pouze v této N-koncové části proteinu, ale i v jeho dalších částech. Důkazem je vytvořený konstrukt lidské 11HSD2 bez N-konce, který se také váže do mikrosomální frakce [53].



Obr. 2.3. Model lidské 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2. ??-další možné ukotvení do membrány; [53].

Pokud se 11HSD2 analyzuje pomocí „western blottingu“ lze získat rozdílné výsledky při a bez použití redukčního činidla β -merkapt ethanolu. V jeho nepřítomnosti lze na nitrocelulókové membráně pozorovat dva proteiny přibližně 40 kDa a 80 kDa veliké. Při použití β -merkapt ethanolu zůstane pouze 40 kDa protein. Navíc v přítomnosti redukčního činidla se také 10× zvýší Na^+ -dependentní konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. Zdá se tedy, že tento isoenzym je oproti 11HSD1 funkční jako monomer, ale vytváření nefunkčních dimérů může sloužit jako latentní forma. Tím by mohl být regulován mineralokortikoidní a glukokortikoidní účinek na buněčné úrovni [54].



Obr.2.4. Funkce 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1; 11HSD2).

- Aldosteron se může selektivně vázat na MR díky přeměně kortikosteronu na méně aktivní 11-dehydrokortikosteron pomocí 11HSD2. Glukokortikoid se na MR nenaváže (např. ledvina, tračník).
- 11HSD1 a 11HSD2 mění lokální koncentraci glukokortikoidů a následně i hladinu volného MR a hladinu neaktivního komplexu MR-glukokortikoid. Tím je regulován přístup aldosteronu k MR (např. srdce).
- ▨ 11HSD1 a 11HSD2 moduluje účinek glukokortikoidů přes GR.
- ▩ 11HSD1 a 11HSD2 mění lokální koncentraci glukokortikoidů a tím i účinky jiných látek např. noradrenalinu a angiotenzinu II v cévách.
- ▧ 11HSD1 zvyšuje plazmatickou hladinu glukokortikoidů redukcí jejich 11-oxo derivátů v játrech.

MR, mineralokortikoidní receptor; GR, glukokortikoidní receptor; ?, předmětem diskuze, zda 11HSD1 je schopna katalyzovat oxidaci *in vivo*.

Právě tento isoenzym 11HSD je zodpovědný za ochranu MR před přemírou glukokortikoidů (obr.2.4). Pokud je MR exprimován v buňce sám (studováno v HEK-293 buňkách odvozené z lidské fetální ledviny) nachází se jak v cytosolu, tak i v jádře buňky. V případě exprese MR spolu s 11HSD2 současně, dochází zřejmě k asociaci obou proteinů a MR se nachází pouze kolem endoplazmatického retikula. K takové asociaci s MR nedochází v případě 11HSD1 [55]. Nelze vyloučit, že 11HSD2 může modulovat i glukokortikoidní účinky ochranou glukokortikoidních receptorů (GR) [7]. Teoreticky může vysoká exprese 11HSD2 v tkáních bohatých na GR stimulovat proliferaci a potenciálně způsobit neoplastický podnět k buněčnému růstu, protože glukokortikoidy mají diferenciační účinky [56].

2.6.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 3

Poslední dobou přibývají důkazy o existenci dalšího vysokoafinitního NADP⁺-dependentního isoenzymu. Taková aktivita byla zaznamenána v mikrosomech z ovčích ledvin, kde byla změřena K_M pro kortikosteron přibližně 4 nM a pro kortisol 35 nM a za fyziologických podmínek byla nalezena pouze oxidasová aktivita [57]. Podobný enzym, který kineticky neodpovídal 11HSD1 (K_M byla nM rozsahu) byl také nalezen v Leydigových buňkách potkana. 11HSD2 nebyla v těchto buňkách detekována [58].

2.6.4. Exprese, regulace a inhibice 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy

2.6.4.1. Ledvina

Ledvina patří z hlediska 11HSD k jednomu z nejvíce prostudovaných orgánům. U potkana byla 11HSD1 prokázána v proximálním tubulech a v intersticiálních buňkách dřeně ledviny. V mineralokortikoidně cílových částech nebyl tento isoenzym nalezen. Oproti potkanům není 11HSD1 u člověka (i ovce) téměř exprimovaná. Naopak 11HSD2 je vysoce exprimovaná v distálních tubulech a ve sběrném kanálku ledviny s výjimkou konečné části v papile, tedy v mineralokortikoidně cílových segmentech [7]. Díky této lokalizaci může 11HSD2 zajistit citlivost MR k aldosteronu a regulovat tak zpětné vstřebávání Na⁺ do organismu zvýšením absorpce Na⁺ iontů do buňky. Při poruše tohoto isoenzymu dochází ke známému patologickému stavu k tzv. syndromu zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku vedoucího k hypertenzi (kap. 2.6.5.2). Nedávno byla 11HSD2 také prokázána v lidském glomerulu a v buněčné linii viscerálního epitelu glomerulu [59].

Srovnání procentuální konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron u potkanů ukázalo vývojové změny v této aktivitě. U novorozeného potkana byla tato aktivita přibližně 1,5× nižší nežli u osmidenního mláděte a dospělého jedince [60]. U člověka byla pomocí imunohistochemie studována exprese 11HSD2 již prenatálně. Zjistilo se, že 11HSD2 je koexprimována spolu s MR v distálních tubulech, sběrných kanálcích a méně v tlustém segmentu vzestupného raménka Henleovy kličky již 14 týdnů před porodem [61]. U myši je 11HSD2 přítomna již ve 13. dni březosti (celková délka gestace 19 dní) zatímco 11HSD1 se objevuje hned po porodu [62].

Oba isoenzymy podléhají různým regulacím na úrovni enzymové aktivity, hladiny mRNA a proteinu. Na primární kultuře epitelu ledviny bylo prokázáno, že aktivace adenylátcyklasy forskolinem vede k zvýšení jak hladiny mRNA, tak i hladiny proteinu pro 11HSD2. Tento účinek byl zrušen přítomností TPA („tetradecanoyl phorbol acetate“), což je aktivátor proteinkinasy C. Zdá se tedy, že aktivace proteinkinasy A vede k indukci, zatímco aktivace proteinkinasy C k potlačení 11HSD2 [63].

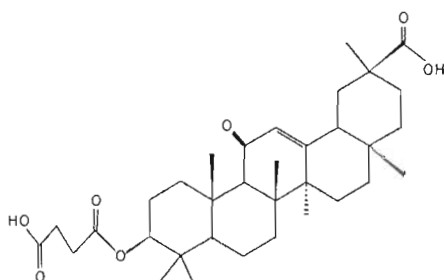
U gonadektomizovaných potkanů vedlo v ledvině podávání estradiolu k zvýšení dehydrogenasové aktivity [64]. Stejně tak byla po podávání estradiolu zvýšená hladina mRNA i proteinu pro 11HSD2 v mikrosomální frakci ledviny, na 11HSD1 měl estradiol opačný vliv, hladinu mRNA i množství proteinu snížil [65].

Podání dexametasonu a deoxykortikosteronu potkanům po adrenalectomii zvýšilo aktivitu 11HSD2, ale na druhou stranu to vedlo k snížení hladiny mRNA pro tento enzym. Tato rozdílná regulace tak svědčí o přítomnosti latentní formy tohoto isoenzymu [66].

V buněčné kultuře LLC-PK₁ (epitelové buňky z prasete) estradiol použitý v koncentraci 10^{-8} M a 10^{-9} M spíše zvyšoval konverzi kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron, při koncentraci 10^{-7} M a 10^{-6} M snižoval. Stejný vliv měl i progesteron [64]. V buňkách 293 (buňky z fetální ledviny) transfekovaných lidskou 11HSD1 nebo 11HSD2 progesteron snížil konverzi kortisonu na kortisol i kortisolu na kortison. Na reduktasovou aktivitu měl ale vyšší inhibiční účinek derivát progesteronu a to 11 α -hydroxyprogesteron. 11 β -hydroxyprogesteron tuto aktivitu neovlivnil. Na oxidasovou aktivitu měly oba tyto deriváty přibližně stejný vliv, také větší než progesteron [67].

V mikrosomech ledvin byly testovány i inhibiční účinky žlučových kyselin. Nejvíce účinné se jeví kyselina lithocholová a chenodeoxycholová, které inhibují jak oxidasovou, tak i reduktasovou aktivitu 11HSD [68]. K snížení 11-dehydrogenasové aktivity vede také nízké pH (akutní acidóza) [69].

Nejznámější exogenní kompetitivní inhibitor je karbenoxolon (CBX, 3-(3-karbonyl-1-oxopropoxy)-11-oxo-elean-12-en-29-ová kyselina (obr. 2.5)), což je hemisukcinovaný derivát glycyrrhetinové kyseliny (GA) [7, 70], která je také významným inhibitorem 11HSD. Oba inhibitory podávané potkanům inhibovaly aktivitu 11HSD nejen v mineralokortikoidně cílových tkáních (ledviny, tračník), ale i v dalších orgánech [71]. CBX i GA inhibují oba isoenzymy [67], ale zdá se, že různé deriváty GA mohou mít různý inhibiční účinek na jednotlivé isoenzymy. Např. 18 β -11-deoxyglycyrrhetinová kyselina měla nižší inhibiční účinek na ledvinovou dehydrogenasovou aktivitu než samotná GA (možná inhibice obou isoenzymů), zatímco na jaterní aktivitu měla stejný vliv jako GA (exprimovaná převážně 11HSD1) [72]. Dále bylo naměřeno, že podávání CBX potkanům zvyšuje 3 \times plazmatickou hladinu kortikosteronu zřejmě jako následek snížení periferní degradace tohoto hormonu katalyzované 11HSD [73].



Obr.2.5. Karbenoxolon

Více nebo méně inhibují 11HSD také některé další látky používané jako farmaka [74]. Z nich nejúčinnější se jeví furosemid, diuretikum, které je podáváno pacientům s hypertenzí nebo při léčbě chronického srdečního selhání. Tato látka je kompetitivním inhibitorem 11HSD *in vivo* i *in vitro* [75].

11HSD je možné ovlivnit i dieteticky. Dieta s vysokým obsahem NaCl (podávaná po dobu 7 dnů) zvýšila aktivitu 11HSD1 4 \times [76]. Naproti tomu nebyl zaznamenán žádný vliv zvýšeného či sníženého příjmu soli (podávané po dobu 10 dnů) na hladinu mRNA 11HSD2 [77].

2.6.4.2. Trávicí systém

2.6.4.2.1. Žaludek

Pomocí „western blottingu“ byla v žaludku potkana prokázána přítomnost 11HSD2 [78]. Později se pomocí imunohistochemie, „northern blottingu“ a RT-PCR určila u

člověka bližší lokalizace. 11HSD2 je kolokalizovaný spolu s MR v parietálních buňkách fundu žaludku, ale ne v antru a mohl by tak chránit MR před vazbou s glukokortikoidy. Žaludek tedy patří k dalším cílovým orgánům pro aldosteron, který tak může regulovat biologické funkce parietálních buněk včetně regulace sekrece žaludečních šťáv [79].

11HSD1, která se u potkana vyskytuje také v parietálních buňkách fundu žaludku, zřejmě ovlivňuje autokrinní a parakrinní účinky glukokortikoidů [80].

2.6.4.2.2. Střevo

Aktivita 11HSD v tračníku byla zaznamenána již během 80. let minulého století. Později bylo prokázáno, že ve střevu jsou exprimovány oba isoenzymy 11HSD. 11HSD2 v epiteliálních buňkách mukosy a buňkách krypt a 11HSD1 v neepiteliálních buňkách *lamina propria* [7, 81, 82]. Funkce 11HSD2 je připisována ochraně MR před přemírou glukokortikoidů a tím regulaci příjmu Na^+ z potravy. 11β -dehydrogenasová aktivita má stoupající tendenci směrem od dvanáctníku k distálnímu tračníku. Ve dvanáctníku je prakticky neměřitelná. V tračníku a slepém střevě, což jsou typické cílové tkáně pro aldosteron, je nejvyšší [83]. Také u prasete má aktivita 11HSD2 zvyšující tendenci směrem od dvanáctníku ke tračníku. Aktivita byla 10× vyšší v tračníku nežli v lačníku a 3× vyšší nežli v kyčelníku [84].

Funkce 11HSD1 je spíše spekulativní. Bude hrát zřejmě roli při samotném maturaci střeva, regulaci glukokortikoidního signálu a případně při regulaci střevních zánětů (kap. 2.6.4.4), při kterých se výrazně mění aktivity a hladiny mRNA obou isoform. Tyto změny mohou být ale na druhou stranu způsobeny i změnami v expresi těchto enzymů přímo v imunitních buňkách.

Aktivita 11HSD podléhá vývojovým změnám. Ve střevech myších embryí se mRNA pro 11HSD1 objevuje těsně před porodem, 11HSD2 zde není přítomna vůbec [62]. Ve slepém střevě, distálním a proximálním tračníku potkana je 11β -dehydrogenasová aktivita vysoká už druhý den po narození a až do dospělosti se mění málo. V kyčelníku je aktivita nízká během prvních dvou týdnů, stoupá více než 5× během dalších dvaceti dnů a pak dochází k menšímu poklesu [85].

Na rozdíl od ledviny je možné střevní 11HSD2 ovlivnit dieteticky. V distálním tračníku potkana došlo k nárůstu hladiny mRNA 11HSD2 a proteinu po nízkosolné dietě [77]. Po vysokosolné dietě byl zaznamenán pokles v aktivitě 11HSD2 [85].

Dexametason a aldosteron významně zvýšily po 48 hod inkubace ve střevních segmentech (kyčelník, distální tračník) konverzi kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. V kyčelníku bylo toto zvýšení výraznější. Insulin a thyreoidální hormon T₃ (3,5,3'-trijodtyronin) tuto aktivitu neovlivnily, CBX a progesteron ji inhibovaly [86]. Bylo také prokázáno, že CBX stimuluje maturaci střeva během postnatálního života [73].

2.6.4.3. Játra

U člověka i hlodavců byla v játrech prokázána přítomnost 11HSD1. Je lokalizovaná centripetálně s maximální expresí kolem centrální žíly [7] a hraje velmi významnou roli v regulaci enzymů, které jsou regulovatelné glukokortikoidy a účastní se v procesu glukoneogeneze (glukosa-6-fosfatasa a fosfoenolpyruvátcarboxykinasa). To bylo prokázáno pomocí 11HSD1 „knockout“ myši (kap. 2.6.5.1). Tyto myši sice měly stejnou bazální hladinu mRNA a aktivitu těchto dvou enzymů jako normální myši, ale snížený příjem potravy nevedl k jejich aktivaci. U normálních myši může 11HSD1 zvýšit lokální koncentraci glukokortikoidů přeměnou jejich 11-oxo derivátů, a tak zvýšit produkci glukosy játry [42].

Bylo diagnostikováno několik žen s tzv. zdánlivým nedostatkem redukce kortisonu („apparent cortisone reductase deficiency“). Tyto ženy mají zvýšenou hladinu metabolitů kortisonu v moči (především redukovaných v poloze 5 β) a téměř žádné metabolity kortisolu. Jako následek relativního nedostatku kortisolu dochází ve zvýšené míře k uvolňování ACTH a hyperandrogenismu, který lze potlačit podáváním dexametasonu. Zatím se neví, jakou přesnou enzymovou poruchou tyto ženy trpí, ale je možné, že se jedná o sníženou aktivitu právě 11HSD1. Genetická analýza zatím ovšem neprokázala žádnou mutaci v genu pro 11HSD1 vedoucí k tomuto onemocnění, a tak se zdá, že se může jednat i o nadměrnou aktivitu 5 β -reduktasy [87, 88].

Naopak zvýšení reduktasové aktivity 11HSD1 může být pozorováno u pacientů s chronickým jaterním selháním. Tito pacienti mají v moči zvýšený poměr (THF+allo-THF)/THE stejně jako pacienti se sníženou aktivitou 11HSD2 (kap. 2.6.5.2) (THF, 5 β -tetrahydrokortisol; allo-THF, 5 α -tetrahydrokortisol; THE, tetrahydrokortison) [89].

Je zajímavé, že cílená nadprodukce 11HSD1 v hepatocytech myši vede k vytvoření mírné insulinové rezistence, dyslipidémii se zvýšenou syntézou lipidů v hepatocytech a k hypertenzi. Ta je způsobena zřejmě paralelním zvýšením exprese angiotenzinogenu. U

těchto myší se ovšem nevytvořila obezita. Tím se liší od klasického metabolického syndromu, na jehož patogenezi se může podílet nadprodukce tohoto isoenzymu v adipocytech (kap. 2.6.5.1) [90].

Aktivitu 11HSD1 může ovlivnit řada látek. Např. trijodtyronin zvýšil reduktasovou aktivitu v primární kultuře hepatocytů potkana, ale neměl žádný vliv na lidské hepatocyty. Progesteron naopak snížil aktivitu 11HSD1 v lidských hepatocytech, ale neměl žádný vliv na hepatocyty potkana [91]. Tyto výsledky svědčí o druhově specifických rozdílech přinejmenším v regulaci 11HSD1. Na hepatocyty potkana měl vliv i růstový hormon a insulin. Oba aktivitu snížily, naproti tomu dexametason ji zvýšil [92].

Mezi další látky, které nemají endokrinní funkci a inhibují 11HSD patří CBX, který významně inhiboval reduktasovou aktivitu v lidských i potkaních hepatocytech [91]. Orální podání CBX (100 mg každých 8 hod) vedlo k zvýšení celkové insulinové sensitivity. Kromě dalších orgánů mohl tento inhibitor působit i na jaterní 11HSD1, což mohlo vést k snížení lokální koncentrace kortisolu a snížení produkce glukosy játry [93].

11HSD2 byla zatím prokázána pouze v epiteliální výstelce intrahepatálních a vylučovacích žlučových kanálcích, kde je zapojena do procesu zakoncentrování žluče [78].

2.6.4.4. Imunitní systém

Glukokortikoidy jsou již dlouhou dobu předepisovány pacientům pro svoje protizánětlivé účinky, ale poměrně málo bylo donedávna známo o lokálním metabolismu těchto hormonů přímo v imunitních buňkách infiltrující zánětlivá ložiska.

V myších T- i B-lymfocytech ($CD4^+$, $CD8^+$ a $B220^+$) byla na úrovni mRNA i proteinu prokázána přítomnost pouze 11HSD1. Tento isoenzym byl nalezen i v obou typech lidských lymfocytů a v lidské B-lymfoidní buněčné linii. Nebyla naměřena žádná oxidasová aktivita naznačující přítomnost 11HSD2 a ani mRNA pro tento isoenzym [94, 95]. Mimoto T- ani B-lymfocyty nejsou místem extraadrenální syntézy glukokortikoidů (neexprimují 11β -hydroxylasu, CYP11B1) [95]. V monocytu není přítomná ani 11HSD1 a ani 11HSD2, zatímco v makrofágu je isoenzym 1 exprimován. 11β -reduktasovou aktivitu lze v monocytech indukovat protizánětlivými cytokiny (IL-4 a IL-13). Tato indukce byla potlačena IFN- γ , což je funkční antagonist těchto interleukinů [96].

O významu 11HSD1 v těchto buňkách se zatím spíše spekuluje. Může hrát roli při diferenciaci a regulaci imunitních funkcí samotných buněk, ale i při regulaci lokální koncentrace glukokortikoidů v jiných tkáních. To by právě mohlo mít význam při

zánětech. Jedna z prvních studií o protizánětlivém účinku glukokortikoidů vyzdvihující prereceptorový metabolismus se zabývala farmakologickou inhibicí 11HSD v kůži. Lokální podání kortisolu sice zmírnilo kožní zánět, ale daleko účinnější bylo podání kortisolu spolu s glycyrrhetinovou kyselinou (GA) nebo 11 α -hydroxyprogesteronem (11 α HP). Přidání těchto inhibitorů 11HSD vedlo k snížení zánětu kůže o více než 70 %. Naproti tomu, samotné podání GA nebo 11 α HP nevedlo k tak obrovskému potlačení zánětu [97].

Je známo, že v průběhu zánětu vzrůstá více či méně hladina prozánětlivých faktorů, jako jsou např. IL-1 β a TNF- α . Tyto látky byly schopny zvýšit hladinu mRNA a reduktasovou aktivitu 11HSD1 v glomerulárních mesangiálních buňkách, a tak zvýšit lokální koncentraci glukokortikoidů. Glukokortikoidy mají oproti výše zmíněným cytokinům protizánětlivé účinky a tudíž tento mechanismus může vést k „samokontrolé“ zánětu [98]. TNF- α stejně jako v glomerulárních mesangiálních buňkách zvýšil hladinu mRNA a reduktasovou aktivitu 11HSD1 v lidských tukových buňkách stromatu. Tento vliv byl zmírněn v přítomnosti insulinu, jenž sám neměl vliv na 11HSD1 [99]. V lidských aortických a bronchiálních hladkosvalových buňkách [100] a v osteoblastech [101] indukovaly oba cytokiny expresi 11HSD1 a snížily hladinu mRNA 11HSD2. Kromě IL-1 β a TNF- α byl studován vliv i dalších cytokinů na 11HSD. IL-5 a IL-6 byl schopen zvýšit oxidasovou aktivitu 11HSD v lidské kultuře granulosových buněk [102] a IL-4 a IL-13 zvýšil přibližně 10 \times expresi mRNA 11HSD1 v monocytech [96].

O „samokontrolé“ zánětu svědčí i nedávno publikovaná práce popisující zánět tračnicku. Při zánětu vyvolaného TNBS (2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina) i DSS (dextranulfát) byla aktivita 11HSD1 zvýšena a 11HSD2 snížena oproti nezáánětlivým kontrolám. S těmito výsledky korelovala i hladina mRNA [103].

2.6.4.5. Nadledviny

V tkáňovém homogenátu nadledviny byla u potkana prokázána přítomnost obou isoenzymů. Imunohistochemické pokusy ukázaly, že isoenzym 2 se vyskytuje v kůře nadledvin a to v *zona fasciculata* a *reticularis*, ale ne v *zona glomerulosa*. Tento výskyt koreluje s expresí enzymů pro tvorbu glukokortikoidů a androgenů. Ve dřeni nadledvin se tento isoenzym také nevyskytuje [78]. 11HSD1 se naopak vyskytuje ve dřeni nadledvin, která syntetizuje katecholaminy, a v *zona glomerulosa*, která je spojena s tvorbou

mineralokortikoidů [80, 104]. *In situ* hybridizace odhalila specifickou lokalizaci 11HSD1 mRNA v buňkách kortiko-medulárního spojení („corticomedullary junction“). Zde může regulovat lokální koncentraci glukokortikoidů a tím i hladinu glukokortikoidně závislých enzymů, jako je např. fenylethanolamin-N-methyltransferasa přeměňující noradrenalin na adrenalin [105]. Po dalším významu 11HSD v nadledvině se zatím pátrá.

U člověka je 11HSD1 přítomna ve všech zónách kůry nadledvin [106]. 11HSD2 u dospělého jedince není, ale dá se pozorovat ve fetální nadledvině [107].

2.6.4.6. Centrální nervový systém

Glukokortikoidy jsou v mozku zahrnuty do různých procesů včetně regulace krevního tlaku, vývoje neuronů a hypothalamo-hypofyzární-nadledvinové osy [108]. Aldosteron přes MR reguluje v mozku potřebu příjmu soli neboli „sodíkový apetit“ (SA) a krevní tlak. Po odstranění nadledvin u potkana dochází k zvýšenému SA jako následku odstranění aldosteronu. Podání kortikosteronu sice napravuje metabolické poruchy způsobené nedostatkem glukokortikoidů, ale SA zůstává. Ten vymizí až po podání aldosteronu [109]. Tento jev může být vysvětlen přítomností 11HSD nebo přítomností membránových receptorů, které již byly v mozkové tkáni prokázány [110]. Tyto membránové MR jsou mnohem selektivnější pro aldosteron než receptory intracelulární. Stejně jako v dalších orgánech tak i v mozku si je třeba uvědomit, že aldosteron i kortikosteron (kortisol) vykazuje podobnou afinitu k intracelulárním MR. Navíc oba steroidní hormony jsou přímo v mozkové tkáni syntetizovány. Jejich hladiny ovšem nedosahují plazmatických koncentrací a tudíž zřejmě působí pouze parakrinně či autokrinně [111].

Již dlouhou dobu je známo, že mozková tkáň potkana je schopna metabolizovat kortisol na kortison a tudíž je zde přítomna 11HSD [112]. Bylo prokázáno, že v centrálním nervovém systému je exprimovaná 11HSD1, jejíž funkcí je regulace lokální koncentrace glukokortikoidů ovlivněním poměru kortikosteron/11-dehydrokortikosteron. Zatímco v primární kultuře hippocampu převládá redukce, která zajišťuje konstantní aktivaci glukokortikoidních receptorů zvláště v hippocampu během nízké bazální koncentrace glukokortikoidů, v homogenátech těchto buněk lze pozorovat i významnou dehydrogenaci. Ta je jak NAD^+ - tak i NADP^+ -dependentní, přičemž aktivita v přítomnosti NADP^+ je výrazně vyšší [38, 113]. Z hlediska ochrany MR před glukokortikoidy je tedy zřejmé, že

inaktivace kortikosteronu v hippocampu je nedostatečná a zdá se, že tyto MR jsou oproti ledvině stále obsazeny glukokortikoidem [114].

V buněčném homogenátu hippocampu zvýšil dexametason přibližně o 100 % jak redukcí tak i oxidaci 11-dehydrokortikosteronu resp. kortikosteronu. Naproti tomu v samotné primární kultuře zvýšil pouze aktivitu reduktasovou [113].

Pomocí *in situ* hybridizace byl u potkana studován prenatální vývoj mozku z hlediska exprese obou 11HSD. Hladina 11HSD2 mRNA je vysoká v různých oblastech mozku v 2. třetině gestace a její exprese dramaticky klesá s výjimkou thalamu a mozečku v průběhu 3. třetiny gestace. Se změnami mRNA korelovala i aktivita 11HSD2 v tkáňovém homogenátu. Naproti tomu 11HSD1 mRNA nebyla zaznamenána až do poslední třetiny gestace. NADP⁺-dependentní dehydrogenace byla velmi nízká a NADPH-dependentní redukce nebyla vůbec zaznamenána (studováno po dnech od 12. dne gestace). GR se začíná objevovat v 2. třetině gestace, zatímco MR se objevuje až před porodem. Vysoká hladina 11HSD2 by tak mohla chránit vyvíjející se mozkovou tkáň před aktivací GR glukokortikoidy [115].

2.6.4.7. Reprodukční systém

2.6.4.7.1. Samčí reprodukční systém

Glukokortikoidy vykazují mnoho účinků na intersticiální Leydigovy buňky (Lb) varlete. Jedná se o přímou inhibici biosyntézy testosteronu, potlačení exprese receptorů pro luteinizační hormon (LH) a indukci apoptosy Lb [116-118]. V roce 1989 byla v Lb potkana potvrzena přítomnost 11HSD1, která zmírňuje inhibici biosyntézy testosteronu přeměnou kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron [118, 119]. Otázka je, zda vůbec může 11HSD1 *in vivo* fungovat jako oxidasa a tuto funkci zajišťovat. V *in vitro* studiích lze zaznamenat jak oxidasovou tak i reduktasovou aktivitu, což zřejmě závisí na podmínkách pěstování buněk v primární kultuře (přítomnost glukosy, médium, doba inkubace) a stáří potkana. 11 β -reduktasová aktivita převládá u nediferencovaných Lb (21. a 35. den po narození), zatímco u diferencovaných Lb (stáří 90 dní) převládá 11-oxidasová aktivita [39, 120]. Navíc, kromě 11HSD1 jejíž exprese roste se stupněm diferenciací Lb, je zde zřejmě přítomný další NADP⁺-dependentní enzym, který má K_M pro kortikosteron 42 nM a katalyzuje převážně dehydrogenaci a mohl by tuto funkci zastávat. Změna z převládající reduktasové aktivity na oxidasovou aktivitu během vývoje může hrát roli ve zvýšené syntéze testosteronu v pubertě [58].

Expresi mRNA 11HSD1 indukoval ve třídní primární kultuře Lb jak LH tak i epidermální růstový faktor (EGF). EGF zvýšil i 11-oxo reduktasovou aktivitu [121].

Aktivita 11HSD byla také prokázána ve spermích a dalších buněčných komponentách lidského spermatu. Ve spermatu byla prokázána oxidasová i reduktasová aktivita a samotné spermie přeměňují kortisol a kortikosteron v přítomnosti NAD^+ i NADP^+ na kortison a 11-dehydrokortikosteron. Byla prokázána souvislost mezi aktivitou 11HSD a počtem, případně morfologií, spermí ve spermatu. Vyšší oxidasová aktivita je spojená s vysokým počtem morfologicky abnormálních spermí a obecně s nižším počtem spermí ve spermatu. Tato korelace naznačuje důležitou roli glukokortikoidů a tím i 11HSD během jejich maturace [122].

2.6.4.7.2. Samičí reprodukční systém

2.6.4.7.2.1. Vaječník

Glukokortikoidy v ovariálních buňkách (granulosové luteinizační buňky) stejně jako u Leydigových inhibují působení gonadotropinu a biosyntézu steroidů [123]. Kortikosteroidy hrají také roli v regulaci akumulace folikulární tekutiny během zvětšování antrálního folikulu [39] a jejich účinek může být ovlivněn jak 11HSD1 tak i 11HSD2, které jsou v ováriu exprimovány. Granulosové buňky nezralých folikulů exprimují převážně 11HSD2, zatímco luteinizační granulosové buňky exprimují převážně 11HSD1 [124, 125]. To svědčí o změnách v expresi obou isoenzymů během ovariálního cyklu. Na začátku ovariálního cyklu je ve folikulárních buňkách exprimovaná převážně 11HSD2 spolu s mineralokortikoidním receptorem. V době ovulace dochází ke změně a v luteinizačních granulosových buňkách se objevuje 11HSD1 spolu s glukokortikoidním receptorem. K tomuto přesmyku může dojít z několika příčin. První pohlíží na ovulaci jako na zánětlivý proces, který je charakterizován zvýšenou syntézou prostaglandinů a prozánětlivých cytokinů. Tyto cytokiny, jako je $\text{IL-1}\beta$, spolu s luteinizačním hormonem jsou schopny zvýšit expresi 11HSD1. Díky zvýšené reduktasové aktivitě 11HSD1 je možné zvýšit lokální koncentraci glukokortikoidů s protizánětlivými účinky, a tak regulovat zánětlivý proces. Další příčina tohoto přesmyku by mohla být daná pohlavními hormony. Konkrétně, expresi 11HSD2 potencovaly estrogény, zatímco progesteron expresi potlačoval. Progesteron navíc indukoval expresi 11HSD1 [39].

11HSD1 byla také prokázána přímo v lidském oocytu i oocytu potkana [126, 127].

2.6.4.7.2.2. Děloha

V děloze potkana jsou exprimovány obě isoformy 11HSD, které kontrolují přístup glukokortikoidů ke glukokortikoidním spíše než k mineralokortikoidním receptorům. Expres obou 11HSD se mění se změnou syntézy progesteronu a estradiolu, kterými jsou regulované [128]. 11HSD1 je řízena přímo účinky estradiolu a nepřímo přes IGF-1 [129]. Hladinu mRNA 11HSD1 v děloze zvyšuje i gonadotropní hormon [130].

Přes nízkou oxidasovou aktivitu během gravidity, která je pravděpodobně způsobená kompetitivní inhibicí progesteronem, lze u potkanů pozorovat v myometriu určité změny. Hladina mRNA a proteinu pro 11HSD2 výrazně stoupá od 10. dne březosti, maxima dosahuje 16. den a klesá během 24 hod po porodu [131]. Také hladina 11HSD1 prodělává vývojové změny. 11-oxoreduktasová aktivita postupně stoupá a je výrazně indukovaná 22. den březosti, tedy jeden den před porodem [132]. V myometriu celkově dochází ke změně z inaktivace na regeneraci glukokortikoidů, což může pomáhat při porodu, jelikož glukokortikoidy ovlivňují kontraktilitu myometria [39].

2.6.4.7.2.3. Placenta

Bylo prokázáno, že v placentě jsou exprimovány obě isoformy 11HSD a to u člověka, paviána [16], potkana [17], myši [133] a ovce [134]. Enzymová aktivita 11HSD byla měřena i v placentě prasete [135].

Placenta je složena z mnoha částí a vrstev a její uspořádání je typické pro daný druh. Skládá se z tzv. bazální a labyrintové zóny. Pro transport látek z mateřské krve do plodu je nejdůležitější labyrintová zóna, jejíž součástí je *syncytiotrofoblast*, který odděluje maternální řečiště od fetálních kapilár. Právě v *syncytiotrofoblastu* placenty se také nachází 11HSD1 i 2 u člověka i paviána [16].

Obecně se předpokládá, že 11HSD2 je v placentě jediný enzym, který zabraňuje přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu. Při jednoduché perfúzi lidské placenty byl kortisol metabolizován pouze na kortison a žádný další metabolit nebyl zaznamenán [136]. Při opakované perfúzi byly pomocí hmotnostního detektoru zaznamenány ovšem i 20 α - a 20 β -dihydro deriváty kortisolu i kortisonu. Převládající metabolit byl ale kortison [137]. K nálezu těchto 20-dihydro derivátů přispěla určitě použitá koncentrace kortisolu v perfúzním roztoku (v μ M rozsahu), která dosahuje K_M obou 20-hydroxysteroiddehydrogenas [138-141]. Také si je třeba uvědomit, že v tomto procesu

může mít i určitou roli 11HSD1, neboť zda působí jako oxidasa či reduktasa záleží na lokálních podmínkách.

11HSD1 i 2 prodělává během vývoje placenty významné vývojové změny. U paviána dochází k nárůstu mRNA pro oba isoenzymy a k nárůstu hladiny proteinu 11HSD1 v průběhu gestace [142]. Narozdíl od paviána se u myši hladina 11HSD2 mRNA během vývoje snižuje a těsně před porodem je téměř neměřitelná, 11HSD1 mRNA narůstá [133]. U potkana byly měřeny hladiny mRNA odděleně v bazální a labyrintové zóně placenty. V labyrintové zóně dochází k nárůstu mRNA pro 11HSD1, zatímco hladina mRNA pro 11HSD2 vývojem klesá (měřeno 16. a 22. den březosti, celková délka gestace 23 dní). Hladina mRNA pro 11HSD2 naopak narůstá v bazální zóně [143]. U morčete se hladina mRNA pro 11HSD2 a 11 β -dehydrogenasová aktivita s postupným stupněm březosti snižuje, mRNA pro 11HSD1 nebyla pomocí „northern blottingu“ detekována vůbec [144].

Změny v expresi a aktivitě obou 11HSD jsou hormonálně regulované. 11HSD2 v placentě paviána je indukovatelná estrogény. Naproti tomu v kultuře *trofoblastu* lidské placenty (přítomna převážně 11HSD2) a chorionu (pouze 11HSD1) z konce gestace inhiboval estradiol i progesteron aktivitu 11HSD2, zatímco na reduktasovou aktivitu 11HSD1 neměly tyto hormony vliv. Progesteron snížil i hladinu mRNA 11HSD2 [145]. Stejně tak NO snížil aktivitu i hladinu mRNA 11HSD2 a neměl žádný vliv na 11HSD1. NO působí zřejmě nejen přes cGMP, ale i přes další alternativní cesty [146]. Expresi mRNA 11HSD2 v *trofoblastu* lidské placenty výrazně snížily také katecholaminy jako je adrenalin a noradrenalin. Toto snížení je zprostředkováno přes α_1 - a α_2 - adrenergní receptory a nikoliv přes β -adrenergní receptory. Zvýšení hladiny mateřských či fetálních katecholaminů může vést k snížení placentární bariéry pro glukokortikoidy a zvýšenému vystavení plodu mateřským glukokortikoidům [147].

Aktivitu 11HSD2 ovlivňují i deriváty kyseliny arachidonové. V JEG-3 buňkách (lidské buňky choriokarcinomu, model placentárního *trofoblastu*) jak prostaglandin E₂ tak i F_{2 α} a leukotrien B₄ snížil aktivitu tohoto isoenzymu. Všechny tři látky inhibovaly pouze aktivitu a nikoliv samotnou expresi mRNA, což dokazuje regulaci na úrovni proteinu [148]. Toto zvyšování hladiny glukokortikoidů díky inhibici 11HSD2 hraje zřejmě významnou úlohu na konci březosti při vyvolání kontrakcí myometria. Oba prostaglandiny zvyšují hladinu glukokortikoidů a ty pak zpětně potencují samotnou syntézu prostaglandinů, potlačují aktivitu 11HSD2 a potencují aktivitu 11HSD1 [39].

Tyto a další práce ukazují na funkci 11HSD2 jako na glukokortikoidní bariéru mezi matkou a plodem. Nadměrné vystavení plodu glukokortikoidům může mít negativní vliv na jeho vývin (kap. 2.6.5.5). Otázkou zůstává, jakou roli hraje v placentě isoenzym 1. V případě, že *in vivo* funguje jako oxidasa, mohl by se podílet na přeměně glukokortikoidů na méně aktivní 11-oxo deriváty a působit jako transplacentární bariéra stejně jako 11HSD2. Jako reduktasa by pak mohl lokálně zvyšovat hladinu glukokortikoidů [149]. V placentě jsou exprimovány jak glukokortikoidní (v bazální i labyrintové zóně placenty), tak i mineralokortikoidní (v labyrintové zóně) receptory, které jsou nezbytné pro přenos signálu [17, 150, 151]. Jelikož je bazální zóna placenty hlavním místem endokrinních funkcí a 11HSD1 i 2 jsou v této zóně exprimovány, mohou mít oba enzymy vliv na ochranu GR a modulaci glukokortikoidního signálu [149].

2.6.4.7.2.4. Mléčná žláza

Aktivita 11HSD byla prokázána v tukových i epiteliálních buňkách mléčné žlázy potkana. Zde tak může regulovat produkci mléka a syntézu jeho proteinů [152, 153]. *In vitro* studie na buňkách prsního karcinomu (MCF-7 a ZR-75-1) ukazuje spíše přítomnost 11HSD2, která metabolizuje glukokortikoidy na 11-oxo deriváty a snižuje tak jejich antiproliferační vlastnosti [154].

2.6.4.8. Oko

Lidské oko je také jedním z cílových orgánů pro působení steroidních hormonů včetně glukokortikoidů. Jejich působení bylo prokázáno v patogenezi očních chorob včetně glaukomu, který je způsoben zvýšením nitroočního tlaku. Již dříve bylo pozorováno, že podání exogenních glukokortikoidů vyvolává zvýšení tohoto tlaku snížením lehkosti odtoku komorové tekutiny [155].

Nitrooční tlak je obecně udržován rovnováhou mezi produkcí komorové tekutiny, která je závislá na transportu Na^+ přes dvojvrstvý řasnatý epitel a drenáží převážně trabekulární síťovinou. Sekrece komorové tekutiny je závislá na mnoha faktorech včetně Na^+/K^+ -ATPasy, která je v mineralokortikoidně cílových tkáních regulovaná kortikosteroidy [156].

U člověka byla na úrovni mRNA (*in situ* hybridizace) 11HSD1 i 2 prokázána v nepigmentovém řasnatém epitelu (NŘE), v trabekulární síťovině (TbS), v anteriorním epitelu čočky (EČ) a v epitelu (EpR) a endotelu (EnR) rohovky. Exprese 11HSD1 spolu s

GR byla vyšší v NŘE, TbS, EČ a EpR. Exprese 11HSD2 spolu s MR byla vysoká pouze v NŘE a EpR. U potkana se oba isoenzymy nachází spolu s MR a GR v čočce, NŘE a TbS a 11HSD2 navíc v EpR a EnR [157, 158].

Jak se ukazuje 11HSD1 i 11HSD2 může hrát důležitou roli v regulaci transportu Na^+ a tedy v ovlivnění nitroočního tlaku. Podání selektivních inhibitorů těchto dehydrogenas by mohlo přinést nový přístup při léčení pacientů s glaukomem. CBX, tedy neselektivní inhibitor, podávaný pacientům se zvýšeným nitroočním tlakem vedl ke snížení tlaku o 10 %. Tento pokles byl také doprovázen i změnami ve složení metabolitů kortisolu v moči [159].

2.6.4.9. Plice

11HSD1 i 11HSD2 je možné detekovat v tkáňovém homogenátu plic potkana od 21. dne gestace. Jejich aktivity se dále zvyšují (měřeno do 7. týdne po narození), ale aktivita isoenzymu 2 je mnohem menší než aktivita isoenzymu 1 [160, 161]. Pomocí imunohistochemie a RT-PCR bylo prokázáno, že 11HSD1 i 11HSD2 (11HSD2 pouze pomocí RT-PCR) jsou exprimovány přímo v alveolárních epitelových buňkách typu II [160, 162].

Převažující reduktasová aktivita a tím i nárůst lokální koncentrace glukokortikoidů během vývoje může mít vliv na samotný vývoj a maturaci plic. Na konci gestace hrají glukokortikoidy v alveolárních buňkách typu II důležitou roli v modulaci syntézy fosfatidylcholinu a proteinů plicního surfaktantu. Fosfatidylcholin snižuje povrchové pnutí alveolární stěny, zabraňuje atelektase a hraje roli nejen v normálním vývoji plic, ale i při udržení normální struktury alveol. Plicní surfaktant je nezbytný v obraném systému po narození [163].

Epitel alveol musí mít také dobré absorpční vlastnosti kvůli zachování prostoru pro výměnu plynů. V této absorpci je zapojen Na^+ kanál a Na^+/K^+ -ATPasa, které jsou řízeny také glukokortikoidy a mineralokortikoidy [162, 164, 165]. Tento proces může být teoreticky ovlivněn oběma isoenzymy.

2.6.4.10. Kost

Jedním z klinických znaků u pacientů s Cushingovým syndromem a pacientů léčených glukokortikoidy je vznik osteoporózy a tím zvýšené riziko vzniku zlomenin. *In vivo* je to částečně způsobeno nepřímými účinky na homeostasu Ca^{2+} (snížení střevní

resorpce, indukce Ca^{2+} exkrece) a na syntézu faktorů pro růst kostí. *In vitro* ovlivňují glukokortikoidy přímo i nepřímo proliferaci a diferenciaci osteoklastů i osteoblastů [166, 167].

Teprve na konci dvacátého století byla popsána přítomnost 11 β -dehydrogenasové aktivity v kostních buňkách a to v lidské buněčné linii osteosarkomu [168]. Další analýza mRNA a enzymové kinetiky potvrdila přítomnost 11HSD2 v této lidské buněčné linii a také v buňkách osteosarkomu potkana [167, 169]. 11HSD2 je exprimovaná i v osteoblastech fetu [170]. Pomocí imunohistochemie a *in situ* hybridizace byla později prokázána přítomnost i isoenzymu 1 11HSD a to v lidských osteoblastech i osteoklastech [171]. Pomocí primárních kultur bylo zjištěno, že aktivita 11HSD1 roste s věkem a může tudíž hrát roli v patogenezi glukokortikoidy indukované osteoporózy u starších lidí. Navíc aktivita 11HSD1 byla stimulovaná prozánětlivými cytokiny jako je IL-1 β a TNF- α , zatímco 11HSD2 byla inhibována [101]. Tyto cytokiny tak mohou zvyšovat citlivost kostní tkáně k účinkům glukokortikoidů a představovat také jeden z mechanismů přispívající k indukci osteoporózy.

2.6.4.11. Pankreas

V ostrůvkách pankreatu myši i lidí je exprimovaná 11HSD1, která v intaktních buňkách katalyzuje redukci 11-dehydrokortikosteronu. Funkce enzymu je připisována vlivu na uvolňování insulínu z β -buněk pankreatu. U myši vedla inkubace ostrůvků s 11-dehydrokortikosteronem k inhibici uvolňování insulínu, které bylo pomocí CBX opět zvýšeno [172]. CBX tak zřejmě inhiboval 11HSD1, která nemohla konvertovat 11-dehydrokortikosteron na kortikosteron. Z této a dalších prací je zřejmé, že glukokortikoidy působí přímo na uvolňování insulínu, což může hrát velmi významnou roli při Cushingově syndromu či diabetu mellitu. U obézních diabetických potkanů ZDF („Zucker Diabetic Fatty Rats“) je v ostrůvkách exprese 11HSD1 zvýšena, zatímco u prediabetických nikoliv. S tím koreluje i enzymová aktivita. Troglitazon, látka, která se používá k léčení insulinové rezistence, zabránila u prediabetických potkanů ZDF dalšímu růstu plazmatické hladiny glukosy, triglyceridů a v ostrůvkách pankreatu hladiny mRNA 11HSD1 [173].

2.6.4.12. Tuková tkáň

Glukokortikoidy jsou jedním z faktorů ovlivňující množství buněk v tukové tkáni. Regulují celou řadu metabolických procesů, které se tam odehrávají a navíc podporují

diferenciaci preadipocytů ve zralé adipocyty a inhibují proliferaci buněk stromatu [174-176]. Ve zralých adipocytech glukokortikoidy regulují expresi mnoha genů včetně leptinu [177], PPAR („peroxisome proliferator-activated receptor“) [178], lipoproteinové lipasy [179], hormon-senzitivní lipasy [180] a tím přispívají k zvýšenému uvolňování volných mastných kyselin a glycerolu do krevního řečiště.

Účinek glukokortikoidů může modulovat 11HSD1, která je v tukové tkáni exprimovaná (převážně v buňkách stromatu a preadipocytů), a která může jejich hladinu lokálně zvyšovat [18, 181]. Tím může 11HSD1 hrát velmi významnou roli v patogenezi vzniku obezity a insulinové rezistence (diabetes mellitus II. typu) (kap. 2.6.5.1). Zdá se také, že v jednotlivých tukových tkáních není kortikosteroidní metabolismus stejný. Aktivita 11HSD1 je např. vyšší v omentální ve srovnání se subkutánní tukovou tkání [181].

11HSD1 může být snížena dietou s vysokým obsahem tuku [182] a dalšími látkami. V poslední době se např. objevují práce o vlivu thiazolidinedionů, léčiv diabetu mellitu II. typu, na 11HSD. Příkladem je rosiglitazon, agonista PPAR γ receptorů, který snížil schopnost adipocytů metabolizovat kortison na kortisol a snížil hladinu mRNA 11HSD1 [183]. Toto snížení nemusí být zprostředkováno přímo, ale prostřednictvím zánětlivých cytokinů např. IL-1 β , IL-6 a TNF, jejichž produkci ligandy PPAR γ receptorů inhibují [184]. Teprve tyto cytokiny mohou modulovat 11HSD1 a ovlivnit tak množství tukové tkáně.

2.6.4.13. Kůže

Lidská kůže je také jednou z cílových tkání pro aldosteron. V potních žlázách je přítomna 11HSD2 preferující NAD⁺ jako kofaktor, zatímco v pokožce je NADP⁺-dependentní 11HSD1. V pokožce není exprimovaná 11HSD2. Potní žláza je typická mineralokortikoidně cílová tkáň, ve které 11HSD2 chrání MR před nesprávnou vazbou s glukokortikoidy. MR je exprimovaný i v keratinocytech pokožky [185, 186]. Cílená inhibice či aktivace jednotlivých isoenzymů by mohla v budoucnu hrát významnou roli při léčbě kožních onemocnění (kap. 2.6.4.4).

2.6.4.14. Kardiovaskulární systém

2.6.4.14.1. Cévy

Bylo prokázáno, že glukokortikoidy potencují vasokonstrikci vyvolanou řadou

látek jako je noradrenalin a angiotenzin II [27, 28]. Účinek glukokortikoidů může být modulován jak 11HSD1 vyskytující se v hladkosvalových a endotelových buňkách cév tak i 11HSD2, jejíž přítomnost byla prokázána pouze v cévním endotelu [187]. 11HSD1 tak může lokálně zvyšovat a 11HSD2 snižovat hladinu glukokortikoidů.

Zřejmě obě dehydrogenasy hrají roli v procesu ovlivnění vasokonstrikce. Inkubace aorty s 11HSD2 „antisense“ oligomerem vedla k zvýšení schopnosti kortikosteronu potencovat konstrikci vyvolanou fenylefrinem (PE). Kromě toho snížil tento oligomer schopnost aorty konvertovat kortikosteron na 11-dehydrokortikosteron. 11-dehydrokortikosteron také potencoval kontraktlní odpověď na PE, což bylo zřejmě způsobeno jeho redukcí díky 11HSD1. Tento vliv byl zmírněn inkubací s 11HSD1 „antisense“ oligomerem, který snížil redukcí 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron [188].

Také kontrakce vyvolaná katecholaminy a angiotenzinem II byla v případě inkubace aorty s kortikosteronem a inhibitory 11HSD (CBX, případně 11 β -hydroxyprogesteron) vyšší nežli bez použití inhibitorů. Naproti tomu kontrakce zaznamenaná při inkubaci s 11-dehydrokortikosteronem v přítomnosti CBX případně 11-ketoprogesteronu byla nižší nežli v přítomnosti samotného 11-dehydrokortikosteronu. Dá se usoudit, že blokováním dehydrogenasové reakce dochází k zesílení, zatímco blokováním 11-oxo redukce k oslabení kontraktlní odpovědi [189, 190]. Lze tedy předpokládat, že hypertenze by mohla být spojena se změnami v aktivitě či expresi 11HSD v cévách.

Vliv na 11HSD má i ACTH. V kultuře lidských endotelových buněk aorty byl schopen snížit expresi a aktivitu 11HSD2 a tím ovlivnit koncentraci kortisolu. To naznačuje, že ACTH může zvýšit krevní tlak nezávisle na produkci glukokortikoidů v dřeni nadledvin [191]. Na hladinu mRNA 11HSD1 v hladkosvalových buňkách cév potkana měl vliv i insulin, který expresi zvýšil a dexametason, který ji naopak snížil. Insulin potlačil i přeměnu kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron, dexametason tuto konverzi zvýšil [192]. V lidských hladkosvalových buňkách aorty zeslabil IL-1 β a TNF- α konverzi kortisolu na kortison a expresi 11HSD2. Na druhou stranu tyto cytokiny zvýšily hladinu mRNA 11HSD1 a stimulovaly konverzi kortisonu na kortisol (kap. 2.6.4.4) [100].

2.6.4.14.2. Srdce

Účinky na srdeční tkáň mají jak glukokortikoidní tak i mineralokortikoidní

hormony. Glukokortikoidy ovlivňují např. srdeční kontraktilitu, expresi atriálního natriuretického peptidu a Na^+/K^+ -ATPasy [193, 194]. Aldosteron zvyšuje aktivitu $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportu, čímž zvyšuje tok Na^+ do buňky a stimuluje Na^+/K^+ -ATPasu [195]. Uvažuje se i o vlivu aldosteronu na syntézu srdečního kolagenu I a III [196, 197], avšak jiné studie to vyvrací [198-200].

Jak již bylo dříve naznačeno, srdeční tkáň má schopnost syntézy jak aldosteronu, tak i kortisolu či kortikosteronu. Nelze proto vyloučit, že tyto hormony mohou prostřednictvím příslušných receptorů působit autokrinně či parakrinně. GR jsou exprimovány v lidských i potkanních myocytech a fibroblastech [194, 201]. Přítomnost MR v myocytech byla prokázána v lidských biopsiích ze srdce, ovšem zatím nejsou známe údaje o endoteliálních buňkách a buňkách fibroblastů [202]. Stejně jako u člověka se MR nachází v myocytech potkana [201, 203], ale ne ve fibroblastech [201].

Pro zajištění selektivní vazby aldosteronu na MR v klasických mineralokortikoidně cílových tkáních je nezbytná koexprese MR s 11HSD2. U člověka byla v srdci prokázána přítomnost obou isoform 11HSD a to jak mRNA (11HSD2) [29, 194], tak i enzymová aktivita v přítomnosti kofaktoru NAD^+ (11HSD2) a NADP^+ (11HSD1) [29, 204]. Zdá se ale, že 11HSD2 je v srdci přítomna v malém množství. Nevyřešenou otázkou prozatím zůstává, jaké typy buněk tyto dehydrogenasy exprimují.

V srdci potkana nebyla prokázána žádná oxidasová aktivita a ani mRNA pro 11HSD2 *in-situ* hybridizací [205] a ribonukleasovou protektivní analýzou [201]. Oproti tomu Konishi *et al.* detekovali mRNA 11HSD2 pomocí RT-PCR v reálném čase v levé srdeční komoře [206]. O přítomnosti 11HSD1 v srdci, která působí pouze jako reduktasa, není pochyb. Jak izolované myocyty tak i fibroblasty exprimují tuto isoformu [201, 207].

Z výše zmíněného plyne, že MR v srdečních myocytech mohou, ale nemusí být koexprimovány s 11HSD2. MR by tak mohly zprostředkovávat jak mineralokortikoidní tak i glukokortikoidní signál. Tento názor podporuje *in vivo* studie, kde bylo prokázáno, že MR v srdci potkana váží oba kortikosteroidní hormony, aldosteron i kortikosteron [208]. Otázka jestli a jak je zajištěna specifita MR pro aldosteron je zatím nevyřešena. Jednou z možností by byla lokalizace steroidogenního systému přímo u MR [2]. Druhou možností, která je v současné době velmi vyzdvihovaná do popředí, je připuštění, že za normálních podmínek může být MR v kardiomyocytech stále okupován glukokortikoidem, který ho ale neaktivuje. Souhrou obou isoenzymů 11HSD by tyto receptory mohly být více či méně obsazeny glukokortikoidem a aktivovány aldosteronem. K aktivaci MR by mohlo případně

dojít i přímo glukokortikoidy při změně redoxního stavu buňky (změny v poměru NAD^+/NADH) [30, 209, 210]. Další nevyřešenou otázkou zůstává zda případná inhibice či porucha tohoto enzymu (11HSD1, případně 11HSD2) může vést ke vzniku hypertrofie (kap.2.6.5.4).

2.6.5. Vybrané patologické stavy

2.6.5.1. Obezita, metabolický syndrom

Obezita patří mezi choroby, které významnou měrou přispívají k předčasné smrti pacientů. Je často spojena s dyslipidemií, insulinovou rezistencí, hypertenzí a dalšími kardiovaskulárními chorobami. Tyto všechny příznaky jsou souhrnně nazývány jako tzv. metabolický syndrom neboli syndrom „X“. Podobné příznaky jsou asociovány i s Cushingovým syndromem, který je způsoben nadměrnou endogenní produkcí glukokortikoidů či jejich exogenním podáváním. Jelikož mají obézní pacienti často plazmatickou hladinu glukokortikoidů v normě, nemusí být jejich zvýšená tvorba způsobená pouze nadledvinami, ale i cílovými tkáněmi [211, 212].

Pacienti s idiopatickou obezitou mají aktivitu 11HSD1 v játrech sniženou, zatímco v adipocytech zvýšenou [213]. Stejně nálezy zrcadlově odráží i zvířecí model obézních ZDF potkanů. I zde je aktivita 11HSD1 snižená v játrech a zvýšená ve viscerální, ale ne v subkutánní tukové tkáni [214].

Důležitost 11HSD1 v patogenezi obezity je zřejmá nejen z *in vitro*, ale i z *in vivo* studií. Nadprodukce 11HSD1 v adipocytech u myši je asociována s obdobnými příznaky jako při metabolickém syndromu. Koncentrace kortikosteronu v séru těchto myši byla stejná jako u kontrolních jedinců. Transgenní myši měly ovšem vyšší koncentraci kortikosteronu přímo ve všech studovaných tukových tkáních (subkutánní, abdominální, mezenterální a epididymální). Zvýšená exprese 11HSD1 je také spojena s vysokou hladinou plazmatického leptinu, $\text{TNF-}\alpha$ a mRNA pro lipoproteinovou lipasu v adipocytech. Dochází také k zvýšené produkci angiotensinogenu, angiotensinu II a aldosteronu, což by mohlo vysvětlit přidruženou hypertenzi [182, 215, 216].

V kap. 2.6.4.3 byla již zmínka o myších, u kterých vede naopak nadprodukce 11HSD1 v játrech také k rozvoji metabolického syndromu, ale bez vzniku obezity [90]. Stejně tak existují neobézní pacienti, kteří jsou ovšem tzv. metabolicky obézní a trpí stejnými poruchami jako obézní pacienti (hypertenzí, insulinovou rezistencí a hypertriglyceridemií) [217].

Naproti tomu „knockout“ myši s homozygotně deletovanou 11HSD1 jsou ochráněny před metabolickými následky obezity. Mají nižší intracelulární koncentraci kortikosteronu, nižší hladinu triglyceridů, vyšší hladinu HDL-cholesterolu v séru a jsou rezistentní vůči vzniku hyperglykémie způsobené stresem. Tyto myši reagují na snížený příjem potravy menší indukcí fosfoenolpyruvátkarboxykinasy a glukosa-6-fosfatasy [42] a při dietě s vysokým obsahem tuku jsou ochráněny před váhovým přírůstkem [182].

K léčení insulinové rezistence, která je často doprovázena obezitou, se zatím používají perorální antidiabetika včetně thiazolidinedionů. Do této skupiny patří již dříve zmíněný troglitazon (kap.2.6.4.11) a rosiglitazon (kap. 2.6.4.12), který má inhibiční účinek na 11HSD1. U obézních potkanů zlepšuje insulinovou citlivost chirurgické odstranění viscerálního tuku [218].

Zdá se tedy, že 11HSD1 hraje významnou úlohu při vzniku obezity a její cílená inhibice by mohla přispět při jejím léčení [181, 182].

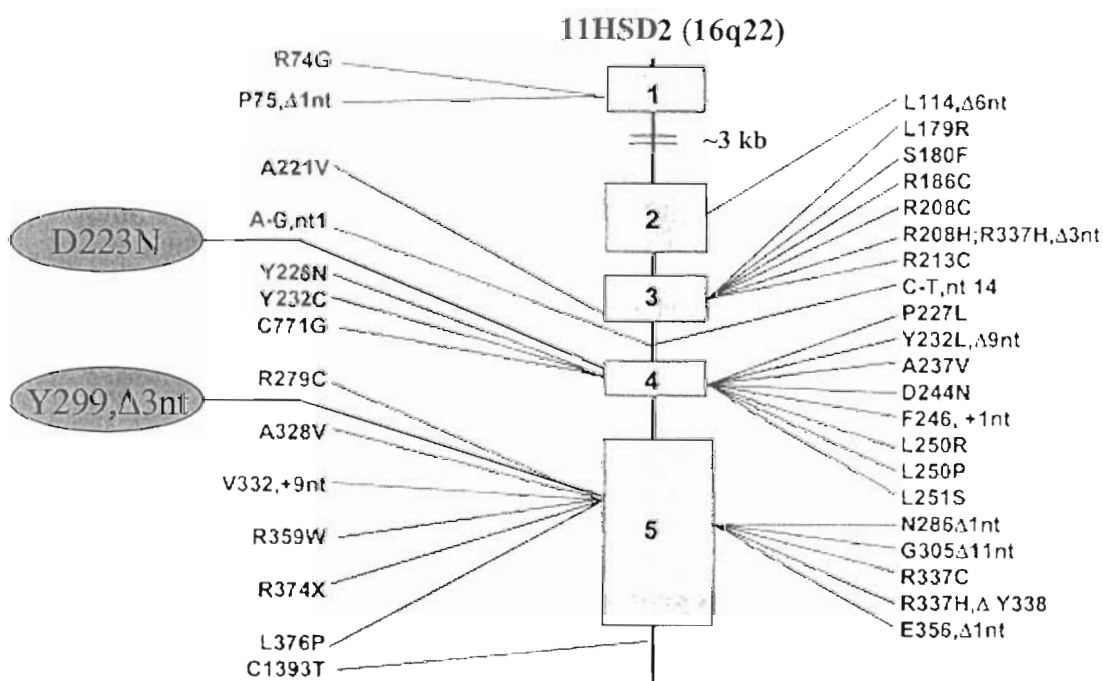
2.6.5.2. Hypertenze, zdánlivý mineralokortikoidní nadbytek

U pacientů s nízkou aktivitou 11HSD2 dochází asi k nejznámějšímu onemocnění k tzv. zdánlivému mineralokortikoidnímu nadbytku (AME), vedoucímu ke zvýšení resorbce Na^+ , hypokalemii a následně k hypertenzi [219]. Při AME jsou hladiny všech známých mineralokortikoidů nízké [220, 221]. K příznakům AME může dojít i inhibicí 11HSD lékořicí. Hlavní součástí lékořice je glycyrrhetinová kyselina inhibující 11HSD v izolovaných mikrosomech z ledviny [222]. Tato lékořicová intoxikace je ovšem od AME odlišná - je vratná.

Syndrom AME se projevuje hypertenzí v dětském věku, hypokalémií a nízkou aktivitou reninu v plazmě. Ačkoliv první pacient s podobnými klinickými příznaky jako AME byl popsán v r.1974, biochemický popis této choroby byl zveřejněn o tři roky později [223, 224]. U tříleté indiánské dívky byly prokázány klasické znaky mineralokortikoidního nadbytku s nízkou sekrecí aldosteronu i po nízkosolné dietě. Podání ACTH nezvýšilo syntézu aldosteronu, ale pouze zhoršilo hypertenzi a hypokalemii. Navíc nebyly zaznamenány žádné hromadící se prekurzory aldosteronu [223]. Tento stav tehdy neodpovídal žádnému známému syndromu. O dva roky později bylo zjištěno, že pacienti mají pozměněný metabolismus kortisolu a vylučují menší množství jeho 11-oxo derivátu (kortisonu) močí. Poprvé bylo také navrženo, že se jedná o poruchu v 11 β -oxidoreduktasovém systému a tehdy byl tento syndrom zřejmě poprvé nazván syndromem

zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku [220].

Komplikace hypertenze zahrnuje cerebrovaskulární příhody a několik pacientů umřelo již během dětství nebo dospívání. Do roku 1999 bylo charakterizováno 30 pacientů s AME [7], v roce 2001 už 60 [224]. Existující případy asymptomatických rodičů a jejich dětí s AME naznačují, že AME je autosomálně recesivní genetická porucha [219]. Většinou se jedná o homozygotní formu, i když byla popsána i heterozygotní forma, u které obě alely kódují enzym bez enzymové aktivity. Stále přibývají nově popsané mutace v genu pro 11HSD2 a kromě více než třiceti mutací byla jako poslední popsána mutace vedoucí k záměně kyseliny asparagové v pozici 223 za asparagin (D223N) na exonu 4 a delece tří nukleotidů na exonu 5 znamenající ztrátu tyrosinu v pozici 299 (Y299) (obr.2.6) [225-227]. Tyto všechny mutace ovlivňují nepříznivě enzymovou aktivitu nebo „splicing“ pre-mRNA (mutace v intronu). Jedná se o změny v čtecím rámci při translaci, delecii aminokyselin včetně důležitého katalytického místa Tyr a nesmyslné mutace [228]. Syndrom AME se rozděluje na typ I a typ II. U obou se ale jedná o mutaci genu pro 11HSD2, a tak se zdá, že toto dělení je nevhodné [7].



Obr.2.6. Mutace v genu kódující 11β-hydroxysteroiddehydrogenasu 2 u pacientů se syndromem zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku.

Gen obsahující 5 exonů (1-5) je 6,2 kb velký a je lokalizován na chromozomu 16q22. Δ, delece; nt, nukleotid; X, stop kodon; v šedě vybarvených polích jsou nově objevené mutace v roce 2003 a 2004. [225-227]

Nízkosolná dieta nebo blokáda mineralokortikoidních receptorů spironolaktonem hypertenzi zlepšuje, kdežto ACTH a kortisol zhoršuje. To naznačuje, že se kortisol chová jako silnější mineralokortikoid než v normálním případě. Pacienti s AME mají abnormální metabolismus kortisolu. Poločas kortisolu v plazmě je prodloužen z přibližně 80 min na 120 - 190 min [220]. U pacientů lze sledovat charakteristické změny ve složení metabolitů kortisolu v moči. Většina kortisolu je vyloučena močí jako 5 β - a 5 α -tetrahydrokortisol (neboli tetrahydrokortisol, THF a allotetrahydrokortisol, allo-THF). Tetrahydrokortison (THE) není vylučován vůbec nebo pouze v malém množství díky deficitu 11HSD2, katalyzující konverzi kortisolu na neaktivní derivát kortison. Nicméně 11-redukce je nenarušena. Značený kortison podaný pacientům s AME je přeměněn na kortisol a další 11 β -redukované metabolity. Poměr (THF+allo-THF)/THE se často zvyšuje z 8 na 70 a víc a oproti zdravým jedincům není vylučován téměř žádný volný kortison. Zdraví jedinci vylučují 2 \times -3 \times více volného kortisonu nežli kortisolu. Často se objevuje i zvýšený poměr allo-THF/THF, což naznačuje i doprovázející defekt 5 β -reduktasy [229, 230].

2.6.5.3. Hypertenze, pohlavní rozdíly

Periferní metabolismus glukokortikoidů může hrát roli nejen na úrovni ledvin, ale i na úrovni dalších orgánů jak bylo zmíněno v předešlých kapitolách. Je dlouho známo, že aktivitu 11HSD ovlivňují i pohlavní hormony (progesteron, estradiol). Dále je zřejmé, že ženy mají na rozdíl od mužů vyšší hladiny těchto hormonů. Progesteron i estradiol dosahují v luteální fázi ovulačního cyklu i 30 \times resp. 9 \times vyšší hladiny nežli u mužů [1]. Tyto markantní rozdíly mohou mít za následek rozdílnou regulaci 11HSD v různých tkáních. Změněná aktivita pak může hrát roli v modulaci kortikosteroidního signálu a tím i v patogenezi hypertenze.

Klinické studie ukazují, že muži mají oproti ženám větší predispozici k rozvoji hypertenze. Podobné pohlavně asociované rozdíly v regulaci krevního tlaku byly prokázány i u několika kmenů hypertenzních potkanů: spontánně hypertenzní potkan (SHR) a Dahlův potkan citlivý k zvýšenému příjmu soli (DS). U obou kmenů mají samci vyšší krevní tlak než samice [231-234].

V mnoha orgánech byl popsán sexuální dimorfismus v metabolismu glukokortikoidů díky 11HSD. Hladina mRNA jaterní 11HSD1 je přibližně 18 \times vyšší u samců potkana nežli u samic. Oproti tomu hladina ledvinové 11HSD1 je pouze 1,4 \times vyšší

u samců [235]. Nižší je naopak aktivita 11HSD1 u samců v srdečních síních, vyšší pak v srdečních komorách [207]. Exprese 11HSD2 v tračniku a ledvině je také vyšší u myších samců [236].

V současné době zůstává nevyřešeno, zda existují pohlavně asociované rozdíly v aktivitě 11HSD i v dalších orgánech a zda rozvoj hypertenze by mohl souviset s těmito rozdíly.

2.6.5.4. Srdeční hypertrofie a fibróza

Je známo, že hypertrofie levé srdeční komory výrazně přispívá ke vzniku srdečních chorob (např. infarkt myokardu) a následně ke smrti pacientů [2, 237, 238]. V rozvoji hypertrofie srdce by mohla hrát určitou roli i 11HSD, jelikož bylo prokázáno, že nadprodukce 11HSD2 v kardiomyocytech transgenních myší je spojena právě s hypertrofií a fibrózou srdce. Tyto transgenní myši měly normální krevní tlak, ale na druhou stranu byla u nich spontánně vytvořena srdeční hypertrofie a fibróza. Myši předčasně umíraly mezi 4.-6. měsícem věku na srdeční selhání. Vysvětlení je dáváno do spojitosti s 11HSD2, která ve zvýšené míře konvertuje kortikosteron na 11-dehydrokortikosteron a umožňuje tak aldosteronu výrazněji aktivovat MR. Podání eplerenonu, selektivního blokátoru receptoru pro aldosteron, stav těchto myší zlepšilo [210].

Také nedávné klinické studie (RALES a EPHEBUS) ukázaly, že zvýšená aktivace MR v srdci vede k srdečnímu selhání. Zjistilo se, že podáním antagonistů MR (spironolaktone) ke standardní léčbě značně zvyšuje přežití (mortalita snížena o 30 %) a zkracuje hospitalizaci pacientů (až o 35 %) [209].

Je tedy zřejmé, že ať již 11HSD1, která zvyšuje hladinu glukokortikoidů a tím dává možnost vzniku neaktivního komplexu MR-glukokortikoid, nebo 11HSD2, která hladinu glukokortikoidů naopak snižuje, hrají v srdci nezastupitelnou roli.

2.6.5.5. Vliv prenatální poruchy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v placentě

Epidemiologické studie z různých populací naznačují, že nízká porodní váha a větší placenta může být jedním z rizikových faktorů pro vznik kardiovaskulárních chorob včetně hypertenze v dospělosti [239-241].

Poslední dobou se začíná uvažovat i o možných poruchách placentární 11HSD vedoucích k esenciální hypertenzi. Uvažuje se již o prenatálním působení mateřských glukokortikoidních hormonů na plod [150]. Za normálních podmínek má plod nižší

hladinu glukokortikoidů než matka. Ke změnám dochází těsně před porodem, kdy hladina fetálního glukokortikoidu prudce stoupá. U některých druhů je pak hladina fetálního kortisolu vyšší nežli u matky. Do této skupiny patří např. kráva, ovce, koza a prase, tedy druhy, u kterých je adrenální aktivita plodu nezbytná pro porod. Do druhé skupiny, která je charakterizovaná vyšší hladinou mateřských glukokortikoidů v plazmě nežli u plodu i před porodem, patří např. morče, myš a člověk [242]. Do jaké míry dochází k přechodu mateřských glukokortikoidů do plodu, je zřejmě dáno aktivitou 11HSD2 v placentě [149]. Důležitou funkci 11HSD2 v placentě naznačuje také její lokalizace (*syncytiotrofoblast*) na rozhraní matka-plod.

Několik experimentálních prací naznačuje, že zvýšené vystavení plodu mateřským glukokortikoidům vede právě k nižší porodní váze a ke zvýšenému krevnímu tlaku v dospělosti, a že 11HSD hraje v placentě důležitou roli:

1. Podání dexametasonu, glukokortikoidu, který je slabě metabolizován 11HSD, gravidním samicím potkana vedlo k nižší porodní hmotnosti a k rozvoji hypertenze v dospělosti [243, 244].

2. Carbenoxolon (CBX), inhibitor steroidních dehydrogenas, podávaný gravidním samicím potkana, způsobil snížení porodní váhy o 20 %, zvýšení krevního tlaku [245] a zvýšení hladiny glukosy v plazmě v dospělosti potkana [246]. CBX tak mohl inhibovat placentární 11HSD2, ale mohl by i procházet placentou a přímo působit na fetální tkáň.

Prozatím ale nebyla prokázána přímá souvislost mezi hypertenzí a změnami v expresi či aktivitě placentární 11HSD2.

3. CÍLE

Cílem předkládané práce bylo přispět k bližšímu porozumění lokálního metabolismu glukokortikoidů a jeho možným implikacím v různých patologických stavech (hypertenze, metabolický syndrom). Byly řešeny následující otázky:

Je vyšší predispozice ke vzniku hypertenze u samců oproti samicím spojena s pohlavně asociovanými rozdíly 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 2?

Tento isoenzym je exprimován v mineralokortikoidně cílových tkáních, kde chrání mineralokortikoidní receptory před přemírou glukokortikoidů. V případě jeho nižší aktivity může docházet k nadměrné vazbě glukokortikoidních hormonů na mineralokortikoidní receptory a k vyvolání falešné mineralokortikoidní odpovědi. V cévách navíc glukokortikoidy, jejichž hladinu snižuje právě 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 2 (11HSD2), potencují vasokonstrikci. Je známo, že u samců dochází k výraznějšímu rozvoji hypertenze nežli u samic, a že u myší existují pohlavní rozdíly v aktivitě 11HSD2 v tračníku a ledvině. Je tedy zřejmé, že změny v aktivitě 11HSD2 by mohly znamenat odlišnou predispozici ke vzniku hypertenze u samců oproti samicím. Byla proto studována obě pohlaví spontánně hypertenzního potkana (SHR), u kterého krevní tlak roste spontánně s věkem a jako normotenzní kontrola byl studován kmen Wistar-Kyoto (WKY). Jako druhý model byl vybrán Dahlův potkan citlivý k zvýšenému příjmu soli (DS), u kterého dochází k zvýšení krevního tlaku po jejím zvýšeném příjmu. Dahlův potkan rezistentní k zvýšenému příjmu soli (DR) byl použit jako normotenzní kontrola.

Existují vývojové změny obou isoenzymů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v placentě potkanů? Mají hypertenzní potkani pozměněnou placentární bariéru pro glukokortikoidy?

V úvodu této práce bylo ukázáno, že pro postnatální vývoj jedince je velmi důležité prenatální působení glukokortikoidů. Zdá se, že nadměrné působení těchto hormonů na fetální tkáň má negativní vliv na jeho vývoj včetně vzniku hypertenze, insulinové rezistence, atd. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které brání přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu je 11HSD2. Tento isoenzym stejně jako 11HSD1, která je také v placentě exprimovaná, prodělává během vývoje placenty určité změny v expresi. K hlubšímu studiu těchto změn byli vybráni potkani kmene Wistar a to od 13. dne březosti.

Ke studiu souvislosti mezi hypertenzí a placentární 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasou byli použiti potkani kmene SHR, WKY a DS, DR.

Lze detekovat oba isoenzymy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v srdeční tkáni potkana? Je srdeční hypertrofie během hypertenze provázena změnami obou isoenzymů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v srdci?

Bylo prokázáno, že kortikosteroidy hrají roli v procesu remodelace srdce. V současné době není známo, zda 11HSD2 je vůbec v srdci exprimovaná a zda je remodelace srdce (vznik srdeční fibrózy, hypertrofie) provázena změnami v expresi či aktivitách obou isoenzymů 11HSD. Ke studiu byli vybráni potkani kmenů SHR a DS, tedy kmeny, u kterých je hypertenze provázená rozvojem srdeční hypertrofie a jejich normotenzní kontroly WKY a DR.

Existují rozdíly v metabolismu glukokortikoidů u potkanů, jejichž fenotyp odráží metabolický syndrom?

Metabolický syndrom, který je doprovázen hypertenzí, insulinovou rezistencí a obezitou, přispívá nemalou měrou k předčasné smrti pacientů. Příčiny jeho vzniku jsou dosud neznámé, avšak poslední dobou se poukazuje na roli 11HSD jako na jednu z možných příčin. Byly proto studovány tři skupiny potkanů. První skupinu tvořili potkani s normálním obsahem triglyceridů v plazmě (Wistar) a druhou hypertriglyceridemický kmen potkanů (HTG), u kterého se projevuje syndrom neobézní isulinová rezistence (hypertriglyceridémie, isulinová rezistence, hyperinsulinémie, hypertenze). Třetí skupinu představovali HTG potkani, u kterých byl tento syndrom ještě více prohlouben pomocí fruktosové diety (HTG+F).

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a pohlavní rozdíly

4.1.1. Použitá zvířata

Všechna zvířata byly získána z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Na pokusy zaměřené na pohlavní rozdíly byli použiti dospělí (věk 90-115 dní) samci a samice potkana kmene SHR (spontánně hypertenzní potkan). Jako normotenzní kontrola byl použit kmen Wistar-Kyoto (WKY). Dále byl použit Dahlov potkan citlivý (DS; SS/Jr) a rezistentní (DR; SR/Jr) k zvýšenému příjmu soli. SHR a WKY potkani byly chováni na standartní dietě. Dahlovi potkani byly drženi 10 týdnů na nízkosolné dietě (0,2 % NaCl) a 6 týdnů před dekapitací byli převedeni na dietu s vysokým obsahem soli (8 % NaCl) (DS-HS, DR-HS). Všechna zvířata měla volný přístup k vodě. Krevní tlak byl měřen přímou punkcí krkavice za použití etherové anestezie. Po dekapitaci byly vyjmuté orgány okamžitě použity na měření enzymové aktivity.

4.1.2. Použité chemikálie

V pokusech byly použity následující chemikálie: od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA) β -hydroxybutyrát sodný, TRIS, NAD⁺, BSA a Coomassie brilliant blue; od firmy Serva (Heidelberg, Německo) kortikosteron; od firmy Calbiochem (La Jolla, CA, USA) deoxykortikosteron; od firmy Amersham International (Aylesburg, Velká Británie) 1,2,6,7-³H-kortikosteron (specifická aktivita ~79 Ci/mmol); od firmy Technoplyn-Linde (Praha, ČR) pneumoxid a N₂; od firmy Merck (Darmstadt, Německo) methanol Lichrosolv grade. Ostatní chemikálie byly od firmy Lachema (Brno, ČR) v p.a. kvalitě.

4.1.3. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech

11 β -oxidasová aktivita v tkáňových řezech byla stanovena podle dříve popsané metody [83, 85]. Zvířata byla usmrcena dekapitací a jednotlivé orgány (ledvina, aorta a tračník) byly vyjmuty, omyty v ledovém fyziologickém roztoku a na ledu očištěny od tukových a pojivových tkání. Tračník byl podélně rozstřížen a očištěn navlhčenou buničinou. Ledvina byla rozdělena na kůru a dřeň, protože aktivita v jednotlivých částech ledviny se liší [7]. Žiletkou byly nařezány tenké řezy, které byly vloženy do Erlenmayerových baněk (celková váha 100 mg u ledvinové kůry a dřeně, 500 mg u aorty a 250 mg v případě tračníku) obsahujících 10 ml inkubačního pufru (Krebs-Ringer), který

měl následující složení (vše mM): 119,0 NaCl; 1,2 CaCl₂; 1,2 MgCl₂; 21,0 NaHCO₃; 2,4 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 10,0 glukosa; 2,5 glutamin; 0,5 β-hydroxybutyrát sodný; 10,0 manitol a byl probublán pneumoxidem (95 % O₂, 5 % CO₂), pH 7,4. Po 20 min preinkubaci (37°C) v neprodyšně uzavřených baňkách pod atmosférou pneumoxidu byla reakce zahájena přidáním kortikosteronu (1,45×10⁻⁶ M) případně samotného methanolu. Po probublání pneumoxidem byly nádoby opět neprodyšně uzavřeny. Inkubace probíhala 20 min u ledviny, 240 min u aorty a 90 min v případě tračnicku při 37°C. Po jejím ukončení byl přidán interní standart 11-deoxykortikosteron (1,45×10⁻⁶ M). Roztok byl zamíchán a baňka vložena do ledové tříště (10 min). Inkubační médium bylo centrifugováno 10 min při 1600×g. Peleta byla použita na stanovení sušiny, steroidy ze supernatantu byly vyextrahovány (kap. 4.6) a analyzovány pomocí HPLC (kap. 4.7.1). Výsledky byly vyjádřeny v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu vztaženého na mg suché váhy a hodinu.

Množství tkáně a doba inkubace byla stanovena na základě předběžných pokusů.

4.1.4. Měření aktivity 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu

Aktivita byla stanovena pomocí dříve popsané metody [14]. Zvířata byla usmrcena dekapitací a jednotlivé orgány (ledvina, aorta a tračník) byly vyjmuty a očištěny jako u tkáňových řezů. Tkáně byly zhomogenizovány na přístroji Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) v ledovém homogenizačním pufru (0,2 M sacharosa; 0,01 M TRIS; pH 8,5) za vzniku 10 % homogenátů (w/v). Homogenáty byly poté centrifugovány při 1000×g po dobu 10 min při 4°C a v supernatantu byl stanoven protein podle Bradforda (kap.4.5).

Aktivita byla měřena v reakční směsi (celkový objem 1,04 ml) obsahující 750 μl pufru TRIS-KCl (0,05 M TRIS; 0,1 M KCl, pH 8,5), 0 μl nebo 40 μl NAD⁺ (0,01 M) a 250 μl tkáňového homogenátu (výsledná koncentrace proteinu: ledvina 0,125 mg/ml; aorta 0,5 mg/ml; tračník 1 mg/ml). Reakce byla zahájena po 10 min preinkubaci (37°C) přidáním [³H]-kortikosteronu (výsledná koncentrace 20 nM). Inkubace při 37°C probíhala 10 min v případě ledvin, 150 min u aorty a 30 min u tračnicku. Reakce byla zastavena ochlazením v ledové tříšti a vzorky byly poté 15 min centrifugovány při 3000×g. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy (kap. 4.6) a analyzovány pomocí HPLC (kap. 4.7.2). Výsledky byly vyjádřeny v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu na mg proteinu a hodinu.

Jednotlivá měření byla provedena dvakrát. Množství proteinu a doba inkubace byla určena z přípravných pokusů.

4.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v placentě

4.2.1. Použitá zvířata

Pro určení vývojových změn 11HSD v placentě byly použity placenty potkana Wistar (chov FgÚ AV ČR) v 13., 14., 16., 19. a 22. dni březosti (D13, D14, D16, D19, D22). Po dekapitaci byly placenty vyjmuty a zamraženy do tekutého dusíku pro stanovení hladiny mRNA (11HSD1, 11HSD2) a hladiny proteinu (11HSD2), případně fixovány v paraformaldehydu pro imunohistochemické stanovení (11HSD2). Na pokusy zaměřené na patogenezi hypertenze byly použity placenty z 16. a 20. dne březosti (D16, D20) z dospělých samic kmene DS a DR a pouze z 20. dne březosti kmene SHR a WKY (chov FgÚ AV ČR; vysvětlivky kap. 4.1.1). Dahlovi potkani byly drženi na dietě s nízkým obsahem soli (DS-LS, DR-LS), potkani SHR a WKY na standardní dietě. Část placent byla okamžitě použita na měření enzymových aktivit a část byla zamražena do tekutého dusíku pro měření hladiny mRNA (11HSD1, 11HSD2) a hladiny proteinu (11HSD2). Všechna zvířata měla volný přístup k vodě. Krevní tlak byl měřen přímou punkcí krkavice za použití etherové anestezie.

4.2.2. Použité chemikálie

Pro měření enzymových aktivit byly použity chemikálie popsané v kapitole 4.1.2. 11-dehydrokortikosteron byl pořízen od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA).

Pro zjištění změn hladiny mRNA 11HSD1 a 11HSD2 v placentě během vývoje byly použity následující chemikálie: od firmy MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Německo) Taq DNA-polymerasa a dNTP mix; od firmy Promega (Madison, WI, USA) RQ1-deoxyribonukleasa; od firmy Top-Bio (Praha, ČR) agarosa a 6 \times koncentrovaný vkladací pufr na elektroforézu; od firmy Roche (Mannheim, Německo) Fast Start DNA Master SYBR Green I; od firmy Gibco (v současné době firma Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) RNaseOUT, oligo-dT primer a M-MLV reverzní transkriptasa. Od firmy VBC-Genomics (Wien, Rakousko) byly pořízeny specifické primery pro 11HSD1 (5'→3'; GAGTTCAGACCAGAAATGCTCC-forward, TGTGTGATGTGATTGAGAATGAGC-reverse) [247], 11HSD2 (5'→3'; CCGGTTGTGACACTGGTTTTG-forward, GGGGTATGGCATGTCTCCTG-reverse; vybrané použitím počítačového programu

DNAS_{tar} (DNAS_{tar}, Madison, WI, USA)) a pro β -aktin (5'→3'; CCGTAAAGACCTCTATGCCA-forward, AAGAAAGGGTGTAAAACGCA-reverse) [248]. U pokusů zaměřených na patogenezi hypertenze byl použit jiný primer pro 11HSD2 (5'→3'; GATGTTCCCCTCGCCTGAA-forward, ATGAGCAGTGCAATAGCTGCC TTG-reverse) [247] od firmy VBC-Genomics a jiný kit pro kvantifikaci mRNA (RNA Amplification Kit SYBR Green I od firmy Roche). Ostatní chemikálie byly od firmy Sigma a potřebný plastový materiál od firmy P-Lab (Praha, ČR).

Pro kvantifikaci 11HSD2 pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a „western blottingu“ byl použit inhibitor proteas Complete Mini od firmy Roche; od firmy Serva (Heidelberg, Německo) 30 % (w/v) roztok akrylamidu/bisakrylamidu (37,5:1); od firmy Pierce (Rockford, IL, USA) chemiluminiscenční substrát SuperSignal west femto a sekundární protilátka Rabbit anti-sheep IgG (kat.č. 31441); od firmy Chemicon International (Temecula, CA, USA) primární polyklonální protilátka Sheep anti-rat 11HSD2 (kat.č. AB1296); od firmy P-Lab blotovací papír Whatman 3MM; od firmy Pall (Ann Arbor, MI, USA) nitroceluloseová membrána. Ostatní chemikálie byly opatřeny od firmy Sigma.

Pro imunohistochemii byly použity tyto chemikálie: od firmy Spolchemie (Praha, ČR) citronan sodný; od firmy Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice, Polsko) kyselina pikrová; od firmy Sigma paraplax (parafin), BSA, hematoxylin a potkaní sérum; od firmy Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) Vectastain ABC kit; od firmy Dako (Carpinteria, CA, USA) Dako Liquid DAB+large volume substrate-chromogen solution a od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko) Eukitt quick-hardening mounting medium. Primární protilátka proti 11HSD2 byla stejná jako při „western blottingu“. Sekundární protilátka Donkey anti-sheep IgG (kat.č. AB360) byla zakoupena od firmy Binding Site (Birmingham, Velká Británie). Ostatní chemikálie byly od firmy Lachema (Brno, ČR).

4.2.3. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech

Aktivita 11HSD byla měřena obdobně, jak bylo popsáno v kapitole 4.1.3. Nařezané tkáňové řezy o hmotnosti 250-300 mg byly inkubovány v inkubačním pufru Krebs-Ringer. V případě měření oxidasové reakce byl jako substrát použit kortikosteron a v případě měření redukce byl použit 11-dehydrokortikosteron, oba v koncentraci $1,45 \times 10^{-6}$ M. Po 90 min inkubaci byl přidán interní standard 11-deoxykortikosteron ($1,45 \times 10^{-6}$ M) a reakce byla zastavena ochlazením v ledové tříšti. Po centrifugaci byly ze supernatantu

vyextrahovány steroidy (kap. 4.6), peleta byla použita na stanovení sušiny a steroidy byly analyzovány na HPLC (kap. 4.7.1). Výsledky byly vyjádřeny jako pmol vzniklého produktu vztaženého na mg suché váhy a hodinu.

4.2.4. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu

Aktivita byla stanovena obdobně jak bylo popsáno v kap. 4.1.4. Celá placenta z D20 byla zhomogenizována v ledovém homogenizačním pufru za vzniku 10 % homogenátu. Po centrifugaci při 1000 \times g byl v supernatantu stanoven protein (kap. 4.5).

Aktivita byla měřena v reakční směsi obsahující 750 μ l pufr TRIS-KCl (0,05 M TRIS; 0,1 M KCl, pH 8,5), 40 μ l NAD⁺ (0,01 M) a 250 μ l tkáňového homogenátu (výsledná koncentrace proteinu 1 mg/ml). Reakce byla zahájena po 10 min preinkubací přidáním [³H]-kortikosteronu (výsledná koncentrace 14,5 nM). Po 60 min inkubace byla reakce zastavena ochlazením a vzorky byly zcentrifugovány. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy (kap. 4.6), které byly analyzovány pomocí HPLC (kap. 4.7.2). Výsledky byly vyjádřeny jako množství vzniklého 11-dehydrokortikosteronu na mg proteinu a hodinu.

4.2.5. Měření hladiny mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2

4.2.5.1. Izolace RNA-příprava vzorku

Celková RNA byla vyizolována použitím metody dle Chomczynského [249] z placent zamražených v tekutém dusíku. Celá placenta byla zhomogenizována v ledovém denaturačním roztoku (4 M guanidiniothiokyanát; 25 mM citrát sodný, pH 7,0; 0,1 M β -merkapt ethanol; 0,5 % sarkosyl; 1 ml roztoku na 100 mg tkáně) na Polytronu PT 3000 (Kinematica AG, Švýcarsko) při 13000 ot/min 1 min. Na 1 ml použitého denaturačního roztoku bylo k homogenátu přidáno 0,1 ml 2 M acetátu sodného, pH 4; 1 ml vodou saturovaného fenolu a 0,2 ml směsi chloroform-isoamylalkohol (49:1). Po protřepání a 15 min inkubace při 4°C byl vzorek centrifugován při 10000 \times g, 20 min, 4°C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a RNA 30 min precipitována isopropylalkoholem v poměru 1:1 (supernatant:isopropylalkohol) při -20°C. Poté byl vzorek centrifugován (10000 \times g, 20 min, 4°C), peleta (RNA) rozpuštěna v 0,4 ml denaturačního roztoku a znovu precipitována 0,4 ml isopropylalkoholu 30 min při -20°C. Po opětovné centrifugaci (10000 \times g, 10 min, 4°C) byla peleta omyta v 75 % ethanolu a vzorek znovu centrifugován

(10000×g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn, RNA peleta byla vysušena při 37°C, rozpuštěna ve vodě pro injekce a uskladněna při -70°C nebo rovnou ošetřena DNAsou na odstranění DNA ze vzorku.

Odstranění DNA ze vzorku bylo provedeno RQ1-deoxyribonukleasou dle návodu dodaného s chemikálií. Po přeštípání bylo ke vzorku přidáno jednu tolik směsi fenol:chloroform:isoamylalkoholu (25:24:1), následovala centrifugace (10000×g, 10 min, 4°C), přenesení horní vodné fáze s RNA do nových zkumavek a srážení RNA přes noc (-20°C) pomocí 3 M octanu sodného, pH 5,0 a 96 % ethanolu (vzorek:octan:ethanol, 1:0,1:4). Po precipitaci byl vzorek centrifugován (10000×g, 20 min, 4°C), peleta byla omyta v 75 % ethanolu a opět následovala centrifugace (10000×g, 20 min, 4°C), vysušení pelety, rozpuštění ve vodě na injekce a uskladnění při -70°C.

Zda vzorek obsahuje DNA či nikoliv bylo stanoveno pomocí PCR. Reakce byly provedeny na přístroji PCRcycler-Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo) v celkovém objemu 25 µl dle návodu dodaného s Taq DNA-polymerasou. Byl použit 3 mM MgCl₂; 0,1 mM dNTPmix (0,1 mM každý nukleotid dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0,25 µM každý z páru primerů pro β-aktin a následující program: 95°C 2 min; 95°C 40 sec, 60°C 30 sec a 72°C 50 sec, celkem 35×; a 72°C 5 min. Po ochlazení byl vzorek přeštípan ribonukleasou A 20 min při pokojové teplotě (dle návodu dodaného s chemikálií). Ke vzorku bylo dále přidáno 5 µl 6× koncentrovaného vkladacího pufru na elektroforézu. Celkem 18 µl vzorku bylo nanášeno na 2 % agarosový gel (1g agarosy považen v 50 ml TAE pufru) a následná elektroforéza proběhla v TAE pufru s ethidium bromidem (0,1 µg/ml) při 100 V přibližně 40 min. DNA marker a případné produkty amplifikace byly vyhodnoceny v UV světle. V případě, že v původním vzorku s RNA byla přítomna i DNA byl vzorek znovu přeštípan DNAsou.

Množství RNA ve vzorku bylo stanoveno absorbancí při 260 nm na přístroji Biophotometr (Eppendorf).

4.2.5.2. Kvantitativní dvoukroková RT-PCR- měření vývojových změn

Nejprve byla RNA přepsána do cDNA pomocí M-MLV reverzní transkriptasy. Reakční směs o celkovém objemu 20 µl měla následující složení: 0,5 µg oligo-dT primeru; reakční pufr (1x); 0,01 M DTT; 0,5 mM dNTP mix; 40 jednotek RNaseOUT a 200 jednotek M-MLV. Nejprve byla RNA (5 µg) zahřívána s oligo-dT primerem při 70°C

10 min a hned zchlazena v ledové tříšti. Po ochlazení byly přidány zbylé chemikálie a celá reakční směs byla inkubována 60 min při 37°C. Reakce byla zastavena zahříváním při 95°C po dobu 5 min. Vzorky s cDNA byly 10× naředěny a uskladněny při -20°C.

Pro kvantifikaci byl použit přístroj LightCycler (Roche, Mannheim, Německo) a Fast Start DNA Master Sybr Green I kit. Reakce byla provedena v celkovém objemu 10 µl obsahující 1 µl naředěné cDNA; 3 mM (11HSD1), 4 mM (11HSD2) nebo 5 mM (β-aktin) MgCl₂; 0,5 µM každý z páru primerů; reakční pufr (1×) a enzym dle návodu dodaného s kitem. Hladina mRNA byla spočítána na základě kalibračních křivek, které byly sestrojeny pro každý pár primerů. Jako standardní cDNA byla použita cDNA z ledviny (rozsah 5×-1000× ředěná cDNA pro 11HSD1, 5×-10000× pro 11HSD2 a 5×-100000× pro β-aktin). K analýze byl použit následující program: počáteční denaturace a inkubace 95°C 10 min; amplifikace 95°C 15 sec, 55°C 10 sec (11HSD1, β-aktin) nebo 60°C 5 sec (11HSD2); 72°C 15 sec (11HSD1, β-aktin) nebo 20 sec (11HSD2) celkem 45×. Teplotní změna byla nastavena vždy na 20°C/sec. Fluorescence byla měřena na konci každé elongace. Pro zjištění, zda se amplifikoval pouze námi požadovaný fragment, byla hned po amplifikaci provedena rozpouštěcí analýza: 95°C 0 sec; 65°C 60 sec (teplotní spád vždy 20°C/sec) a 99°C 0 sec (teplotní spád 0,1°C/sec). Při rozpouštěcí analýze (přechod mezi 65°C a 99°C) byla fluorescence měřena kontinuálně. V každé analýze byl se vzorkem analyzován i jeden standard na korekci výsledků mezi jednotlivými analýzami. Po rozpouštěcí analýze byly náhodně vybrané vzorky analyzovány na elektroforéze (2 % agarózový gel) pro zkontrolování délky nasyntetizovaných fragmentů. Výsledky byly vypočítány jako poměr 11HSD1/β-aktin a 11HSD2/β-aktin.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány dvakrát nebo třikrát. Koncentrace MgCl₂ a primerů byla určena na základě předběžných pokusů. To, že se jedná o primery, které ohraničují námi požadované úseky jednotlivých genů, bylo prokázáno sekvenací daných fragmentů a jejich porovnáním se známými sekvencemi z internetových databází. Postup a výsledky nejsou součástí této dizertační práce.

4.2.5.3. Kvantitativní jednokroková RT-PCR- patogeneze hypertenze

Byl použit přístroj LightCycler a RNA Amplification Kit SYBR Green I. Reakce byla provedena v celkovém objemu 10 µl obsahující 50 ng (11HSD1, 11HSD2) nebo 1 ng (β-aktin) totální RNA; 7 mM MgCl₂; 0,3 µM (11HSD1, 11HSD2) nebo 0,5 µM (β-aktin)

každého z páru primerů; reakční pufr a směs enzymů dle návodu dodaného s kitem. Hladina mRNA z placent byla odečtena z kalibračních křivek, které byly vytvořeny pro každý pár primerů. Jako standardní RNA byla použita totální RNA z ledviny (rozsah 1-150 ng pro 11HSD1 a 0,05-150 ng pro 11HSD2 a β -aktin). K analýze byl použit následující program: reverzní transkripce 55°C 20 min; počáteční denaturace 95°C 30 sec; amplifikace 95°C 1 sec, 55°C 10 sec a 72°C 15 sec celkem 45 \times . Teplotní změna byla nastavena vždy na 20°C/sec kromě elongace při 72°C, kdy to bylo 5°C/sec. Na konci každé elongace byla také měřena fluorescence. Pro zjištění, zda se amplifikoval pouze námi požadovaný fragment, byla hned po amplifikaci provedena rozpouštěcí analýza: 95°C 0 sec; 65°C 60 sec (teplotní spád vždy 20°C/sec) a 95°C 0 sec (teplotní spád 0,1°C/sec). Při rozpouštěcí analýze (přechod mezi 65°C a 95°C) byla fluorescence měřena kontinuálně. Po rozpouštěcí analýze následovala u náhodně vybraných vzorků elektroforéza (2 % agarózový gel) pro kontrolu délky nasyntetizovaného fragmentu. Výsledky byly vypočítány jako poměr 11HSD1/ β -aktin a 11HSD2/ β -aktin.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány dvakrát nebo třikrát. Koncentrace $MgCl_2$ a primerů byla určena na základě předběžných pokusů. To, že se jedná o primer pro 11HSD2 bylo také prokázáno sekvenací daného fragmentu a jeho porovnáním se známou sekvencí z internetové databáze. Postup a výsledky nejsou součástí této dizertační práce.

4.2.6. Kvantifikace proteinu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2

4.2.6.1. Příprava vzorku

Celá placenta byla zhomogenizována v homogenizačním pufru (0,25 M sacharosa; 0,1 M TRIS; 0,1 mM $MgCl_2$; pH 8) s přidavkem inhibitoru proteas Complete Mini (30 μ l inhibitoru na 1 ml homogenátu) na přístroji Polytron PT 3000 (Kinematica AG) za vzniku 10 % homogenátů (w/v). Pro přípravu kalibrační křivky a standardu byla místo placenty použita ledvina. Po 60 sec sonikaci (300 W, 20 kHz) (Ultrasonic Processor, Cole Palmer, Vernon Hills, IL, USA) byl homogenát centrifugován při 400 \times g 10 min 4°C. Peleta byla odstraněna a supernatant byl centrifugován při 100000 \times g 60 min 4°C. Peleta byla resuspendována v homogenizačním pufru (500 μ l – 700 μ l) s přidavkem inhibitoru za vzniku tzv. partikulární frakce. V supernatantu, který byl obohacen o cytosolární proteiny (tzv. cytosolární frakce), i v partikulární frakci byl stanoven protein podle Bradforda (kap. 4.5). Obě frakce byly před dalším zpracováním zamrazeny při -70°C.

Partikulární a část cytosolárních frakcí (náhodný výběr) byly naředěny na určitou koncentraci proteinu (většinou 6 mg/ml) homogenizačním pufrům. Ke vzorkům byl přidán 2x koncentrovaný pufr pro přípravu vzorků (20 % glycerol; 4 % SDS; 125 mM TRIS (pH 6,8) a 0,02 % bromfenolová modř; těsně před použitím byl přidán β-merkaptotanol (40 μl na 1 ml pufru)) v poměru 1:1. Po promíchání byly vzorky 3 min povařeny a uskladněny při -20°C.

4.2.6.2. Separace bílkovin a „western blotting“

K separaci bílkovin byla použita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a aparatura Mini-PROTEAN 3 Cell od firmy Bio-Rad (Hercules, CA, USA). 10 % separační a 5 % zaostřovací gel byl připraven dle tab. III.

Tab.III Polyakrylamidový gel

	10 % separační gel (ml)	5 % zaostřovací gel (ml)
deionizovaná voda	3,95	4,1
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5	-
1 M TRIS (pH 6,8)	-	0,75
10 % SDS (w/v)	0,1	0,06
směs akrylamidu a bisakrylamidu	3,35	1
TEMED	0,004	0,006
10 % persíran amonný (w/v)	0,1	0,06

Na elektroforézu bylo naneseno 5 μl proteinového markeru, 2x standard (0,7 μg proteinu) a vzorky z placent. V případě partikulárních frakcí bylo nanášeno přibližně 12,6 μg proteinu a v případě cytosolární frakce 20 μg proteinu. Pro zjištění, zda se pohybujeme v lineární oblasti signálu, byla sestrojena kalibrační závislost v rozsahu 0,5-6 μg proteinu z partikulární frakce ledviny.

Elektroforéza probíhala při 200 V přibližně 45 min. Po elektroforéze byl zaostřovací gel oddělen a separační gel byl spolu s filtračními papíry a nitroceluloseovou membránou inkubován 15 min v pufru pro „blotting“ (39 mM glycin; 48 mM TRIS; 0,037 % SDS a 20 % methanol; pH 8,3). Po inkubaci byl vytvořen „sendvič“, který se skládal z: 6x obyčejný filtrační papír, 2x filtrační papír Whatman, nitroceluloseová membrána, separační gel, 2x filtrační papír Whatman a 6x obyčejný filtrační papír. Pro „blotting“ byla použita aparatura od firmy Omni-Bio (Brno, ČR). Celý přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 2 hod při 0,83 mA/cm².

Membrána byla po přenosu proteinů opláchnuta v pufru „B“ (5 % Tween v PBS pufru: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) a 15 min inkubovaná v Ponceau S (0,1 % Ponceau S; 5 % kyselina octová). Po vizualizaci proteinů (důkaz, že proběhl přenos proteinů z gelu na membránu) byla membrána odbarvována v pufru B 10 min, blokována puftrem „A“ 1 hod (5 % odtučněné sušené mléko v pufru B) a dále inkubována s primární protilátkou (titr 1:2000; v pufru A) 1 hod při pokojové teplotě a přes noc při 4°C. Druhý den byla membrána promývána 6×5 min puftrem A, poté inkubována se sekundární protilátkou 1 hod (titr 1:50000) při pokojové teplotě, opět promývána 6×10×5 min puftrem B a vyhodnocena pomocí Super Signal West Femto substrátu. Chemiluminiscence byla detekována na systému LAS-1000 (Fuji, Tokyo, Japonsko) a vyhodnocena pomocí softwaru AIDA (Raytest, Straubenhardt, Německo). Pro zjištění, zda se sekundární protilátka neváže přímo na proteiny z placenty, byla v předběžných pokusech membrána inkubovaná nejprve se sekundární protilátkou, vyhodnocena pomocí chemiluminiscence a teprve pak následovala inkubace s protilátkou primární a postup popsán výše. Výsledky byly vyjádřeny jako signál na µg partikulárního proteinu.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány dvakrát nebo třikrát.

4.2.7. Lokalizace 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy 2 pomocí imunohistochemie

Placenty byly po odebrání fixovány ve 4 % paraformaldehydu (4 g paraformaldehydu rozpuštěné v 96 ml PBS při cca 60°C, po zchlazení přefiltrované) při 4°C po dobu 48-72 hod. Poté byly placenty promývány fyziologickým roztokem 1 hod, odvodněny acetonem (celkem 3 lázně během 16 hod) a projasněny xylenem 2×15 min. Po prosycení parafínem (2×2 hod) při 56°C byly vzorky zality do parafínových bločků. Histologické řezy (tloušťka 5-6 µm) byly krájeny na diskovém mikrotomu Leica DSC1 (Leica Microsystems, Nussloch, Německo) a přeneseny na sklíčka potažená želatinou.

Pro samotné imunohistochemické stanovení byla použita metoda nepřímé imunohistochemie. Řezy byly nejprve odparafinovány xylenem 3×5 min, následovalo promytí 96 % ethanolem 5 min, 70 % ethanolem také 5 min a zavodnění destilovanou vodou 5 min. Po 15 min blokádě endogenních peroxidas 3 % H₂O₂ (v PBS pufru) byly řezy opláchnuty destilovanou vodou a povařeny v mikrovlnné troubě (750 W) v 0,01 M citrátovém pufru (pH 6) 15 min. Po zchlazení na pokojovou teplotu (cca 20 min) byly

řezy promývány 2×5 min v PBS, blokovány 30 min v PBS s přidavkem 10 % sušeného mléka, inkubovány přes noc s primární protilátkou (titr 1:1000 – 1:1500; v PBS s 5 % BSA) a poté promývány v PBS 2×5 min. Dále následovala inkubace se sekundární protilátkou (titr 1:600; v PBS pufru s 5 % BSA a s 2 % potkaního séra) 1 hod, promytí 2×5 min v PBS, inkubace v roztoku Vectastain ABC kitu (dle návodu dodaného s kitem) 30 min a opět promývány v PBS 2×5 min. Následovala inkubace se substrátem DAB 0,5-2 min (pod mikroskopem bylo kontrolováno zbarvení) a promývání v destilované vodě 5 min. Pro dobarvení preparátu byl použit roztok hematoxylinu 1-2 sec (4 g hematoxylinu, 0,4 g jodičnanu sodného a 35,2 g síranu hlinitého v 710 ml destilované vody + 250 ml ethylenglykolu + 40 ml kys. octové; před použitím přefiltrovány a naředěný 1:8 – 1:10 destilovanou vodou), následovalo promývání obyčejnou vodou 1-2 min, opláchnutí v destilované vodě, opláchnutí v acetonu, odvodňování nejprve v roztoku aceton-xylen (1:1) 3 min, poté v roztoku aceton-xylen (1:10) 3 min a v samotném xylenu 3×3 min. Nakonec byly obarvené preparáty zamontovány do montovacího média Eukitt a vyhodnoceny pomocí počítačové analýzy obrazu s využitím mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Nikon, Japonsko), digitální kamery PixelLINK PL-A642 (Ottawa, Kanada) a softwaru LUCIA (Laboratory Imaging, Praha, ČR). Pro zjištění nespecifických interakcí sekundární protilátky se vzorky byla inkubace s primární protilátkou nahrazena inkubací pouze v pufru PBS s 5 % BSA.

4.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v srdci

4.3.1. Použitá zvířata

V těchto pokusech byly použity samci potkana kmene SHR a WKY (stáří 60-64 dní) a oba fenotypy Dahlova potkana (DR, DS) (chov FgÚ AV ČR; vysvětlivky kap. 4.1.1). SHR a WKY potkani byly chováni na standardní dietě. Dahlovi potkani byly drženi do 6. týdne věku na nízkosolné dietě (0,2 % NaCl) a poté byly rozděleni do dvou skupin. První byla držena nadále na dietě s nízkým obsahem soli (0,2 % NaCl; DR-LS, DS-LS) a druhá byla převedena na dietu s vysokým obsahem soli (8 % NaCl; DR-HS, DS-HS) po dobu 7 týdnů. Všechna zvířata měla volný přístup k vodě.

Krevní tlak byl měřen přímou punkcí krkavice za použití etherové anestezie.

4.3.2. Použité chemikálie

Na měření enzymové aktivity v tkáňovém homogenátu byly použity stejné chemikálie popsané již v kap. 4.1.2. Od firmy Sigma byl navíc pořízen kofaktor NADP^+ . Pro kvantifikaci mRNA byly použity stejné chemikálie jako při měření vývojových změn v placentě (kap. 4.2.2).

4.3.3. Měření aktivity 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu

Aktivita byla stanovena obdobně, jak bylo popsáno v kap. 4.1.4. Celé srdce bylo zhomogenizováno v ledovém homogenizačním pufru za vzniku 10 % homogenátu. Po centrifugaci při $1000\times g$ byl v supernatantu stanoven protein (kap. 4.5).

Aktivita byla měřena v celkovém objemu 1,04 ml a obsahovala: 750 μl pufr TRIS-KCl (0,05 M TRIS; 0,1 M KCl, pH 8,5), 0 μl nebo 40 μl kofaktoru NAD^+ či NADP^+ (0,01 M) a 250 μl tkáňového homogenátu (výsledná koncentrace proteinu 1 mg/ml). Reakce byla zahájena po 10 min preinkubaci přidáním [^3H]-kortikosteronu (výsledná koncentrace 20 nM). Po 90 min inkubaci byla reakce zastavena ochlazením v ledové tříšti a vzorky byly zcentrifugovány. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy (kap. 4.6). Výsledky byly vyjádřeny jako procento konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. Z předběžných pokusů bylo kromě množství proteinu a doby inkubace zjištěno, že při použití μM koncentrace kortikosteronu spolu s kofaktorem NADP^+ nebyla zaznamenána žádná významná aktivita.

4.3.4. Měření hladiny mRNA 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2

4.3.4.1. Izolace RNA-příprava vzorku

Izolace RNA ze srdce byla provedena guanidinthiokyanátovou metodou z celého srdce popsanou v kap. 4.2.5.1. DNA byla ze vzorku odstraněna pomocí RQ1-DNAsy, což bylo následně zkontrolováno pomocí PCR. Množství RNA ve vzorku bylo stanoveno absorbcí při 260 nm na přístroji Biophotometr. RNA byla uskladněna při -70°C .

4.3.4.2. Kvantitativní dvoukroková RT-PCR

Nejprve byla RNA přepsána do cDNA pomocí M-MLV reverzní transkriptasy stejně jako v případě analýzy RNA z placent (kap. 4.2.5.2). Vzorky s cDNA byly 5 \times naředěny a uskladněny při -20°C . Kvantifikace proběhla za stejných podmínek jako při

analýze placent. Jako standardní cDNA byla použita cDNA z ledviny nebo z placenty. Výsledky byly vypočítány jako poměr 11HSD1/ β -aktin a 11HSD2/ β -aktin.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány dvakrát nebo třikrát.

4.4. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a metabolický syndrom

4.4.1. Použitá zvířata

Byly použity samice Pražského hypertriglyceridemického potkana (inbrední kmen) z chovu FgÚ AV ČR, které od 2. měsíce pily buď obyčejnou vodu (HTG) nebo 10 % roztok fruktosy po dobu 8-10 týdnů (HTG+F). Tito potkani byli vyšlechtěny Dr. Vránou v Institutu klinické a experimentální medicíny z obyčejného potkana Wistar (Velaz, ČR), který byl použit jako jejich normotriglyceridemická kontrola. Jednotlivé orgány (ledvina, tračník, srdce, mezenterium, játra) byly hned použity na měření enzymových aktivit, mezenteriální a subkutánní tuková tkáň (TM, TS) byla do dalšího použití (stanovení hladiny mRNA) uskladněna v tekutém dusíku. Krevní tlak byl měřen přímou punkcí krkavice za použití etherové anestezie. V séru byla stanovena hladina triglyceridů a insulinu.

4.4.2. Použité chemikálie

Na stanovení hladiny triglyceridů byl požit BIO-LA-TEST od firmy Lachema (Brno, ČR) a na stanovení insulinu Rat Insulin RIA Kit od firmy Linco (St. Charles, MO, USA). Pro měření enzymových aktivit byly použity chemikálie popsané v kapitole 4.1.2. Od firmy Serva byl pořízen Triton X-100, od firmy Sigma NADP⁺ a kolagenasa (C-0130) a od firmy Top-Bio (Praha, ČR) RNA-Blue. Ostatní použité chemikálie pro kvantitativní dvoukrokovou RT-PCR byly stejné jako v případě měření hladiny mRNA pro 11HSD1 a β -aktin v placentě (kap.4.2.2).

4.4.3. Stanovení hladiny triglyceridů v séru

Hladina byly stanovena podle modifikovaného protokolu dodaného s kitem. K 50 μ l odebraného séra, dodaného standardu (čidlo 1) nebo destilované vody byly přidány 2 ml isopropylalkoholu (čidlo 5) a jedna odměrka (cca 0,13 g) adsorbentu (čidlo 6). Po 15 min protřepávání byly vzorky odstředěny při 3000 ot/min 5 min. Na 1 ml supernatantu, který byl přenesen do nové zkumavky, bylo přidáno 0,25 ml hydroxidu draselného (čidlo 4). Vzorky v zazátkovaných zkumavkách byly inkubovány 10 min při

60°C a ochlazený ve studené vodě (5 min). Po přidání 0,25 ml jodistanu draselného (čínidlo 3) byly vzorky ponechány 10 min při pokojové teplotě. Dále bylo ke vzorkům přidáno 0,25 ml acetylacetonu (čínidlo 2), vzorky byly promíchány a inkubovány 30 min při 60°C. Po ochlazení vzorků byla měřena absorbance (A) při 420 nm proti kontrolnímu vzorku s destilovanou vodou. Hladina triglyceridů (mM) byla vypočítána dle vzorce: $c=3,39 \cdot A_{\text{vzorku}}/A_{\text{standardu}}$.

4.4.4. Stanovení hladiny insulinu v séru

Množství insulinu v séru bylo stanoveno podle návodu dodaného s kitem. Do jednotlivých zkumavek bylo dáno 100 µl standardu (0,1-10 ng/ml), kontroly, odebraného séra nebo pufru; 100 µl izotopu (^{125}I -insulin) a 100 µl protilátky proti insulinu. Po promíchání a 24 hod inkubaci při 4°C byl přidán 1 ml precipitačního činidla. Následovala 20 min inkubace při 4°C, centrifugace (3000×g, 20 min, 4°C), odstranění supernatantu a vyhodnocení na γ -counteru. Hladina insulinu byla vyjádřena v pmol/l.

4.4.5. Měření aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňovém homogenátu

Aktivita byla stanovena obdobně, jak bylo popsáno v kap. 4.1.4, ale pro lepší oddělení aktivit isoenzymů 11HSD byl použit modifikovaný protokol [250]. Pro stanovení 11HSD2 byla půlka ledviny a tračnicku zhomogenizována v ledovém homogenizačním pufru (0,2 M sacharosa, 0,01 M TRIS, pH 8,5) za vzniku 10 % homogenátů. Na měření 11HSD1 v srdci a v mezenteriálních cévách byl použit stejný homogenizační pufr jako při stanovení aktivity 11HSD2. Pro stanovení 11HSD1 v druhé půlce ledviny, tračnicku a v játrech byl použit jiný homogenizační pufr (10 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1 % Triton, pH 7,5). Vždy byly připraveny 10 % homogenáty. Po centrifugaci při 1000×g byl v supernatantu stanoven protein (kap. 4.5). Od mezenteriálních cév byla před homogenizací nejprve odstraněna tuková tkáň. Mezenterium bylo inkubováno 13 min při 37°C v 5 ml pufru Krebs-Ringer (kap. 4.1.3) s přídavkem kolagenasy (10 mg). Pak byla opatrně odstraněna tuková tkáň a mezenteriální cévy byly zhomogenizovány.

Aktivita 11HSD2 (v ledvině a tračnicku) a 11HSD1 (v srdci a v mezenteriálních cévách) byla měřena v reakční směsi (celkový objem 1,04 ml) obsahující 750 µl pufru TRIS-KCl (0,05 M TRIS; 0,1 M KCl, pH 8,5), 40 µl NAD^+ (ledvina, tračník; 0,01 M) nebo 40 µl NADP^+ (srdce, mezenteriální cévy; 0,01 M) a 250 µl tkáňového homogenátu

(výsledná koncentrace proteinu: ledvina 0,25 mg/ml; tračník 1 mg/ml; srdce 1 mg/ml; mezenterální cévy 0,5 mg/ml). V tomto případě byla reakce zahájena po 10 min preinkubace přidáním [³H]-kortikosteronu (výsledná koncentrace 20 nM). Inkubace probíhala 15 min v případě ledviny, 120 min v případě tračníku, srdce a cév. Aktivita 11HSD1 v ledvině, tračníku a játrech byla měřena v reakční směsi (celkový objem také 1,04 ml) obsahující 750 μl pufru TRIS (0,2 M TRIS, pH 8,5), 40 μl NADP⁺ (0,01 M) a 250 μl homogenátu (výsledná koncentrace proteinu: ledvina 0,25 mg/ml; tračník 1 mg/ml; játra 0,1 mg/ml). Po 10 min preinkubace byla reakce zahájena přidáním [³H]-kortikosteronu a neradioaktivního kortikosteronu (výsledná koncentrace 1 μM). Vzorky byly inkubovány 45 min v případě ledviny, 120 min v případě tračníku a 60 min v případě jater. Reakce byla zastavena ochlazením v ledové tříšti a vzorky byly poté 15 min centrifugovány při 3000×g. Ze supernatantu byly vyextrahovány steroidy (kap. 4.6) a analyzovány pomocí HPLC (kap. 4.7.2). Výsledky byly vyjádřeny v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu na mg proteinu a hodinu.

Jednotlivá měření byla provedena dvakrát. Množství proteinu a doba inkubace byla určena z přípravných pokusů. Z těchto pokusů bylo také patrné, že v srdci a mezenterálních cévách bylo optimální použití nM koncentrace kortikosteronu jako substrátu.

4.4.6. Měření hladiny mRNA 11β-hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v tukové tkáni

RNA byla vyizolována z tkání zamražených v tekutém dusíku pomocí RNA-Blue podle návodu dodaného s chemikálií. Vzorek byl zhomogenizován v RNA-Blue (1 ml roztoku na 50-100 mg tkáně) na Polytronu PT 3000, centrifugován (12000×g, 10 min, 4°C) a supernatant byl v nové zkumavce inkubován 5 min při pokojové teplotě. Ke vzorku byl dále přidán chloroform (0,2 ml na 1 ml použité RNA-Blue). Po protřepání byl vzorek inkubován 5 min při pokojové teplotě a opět centrifugován (12000×g, 10 min, 4°C). RNA v horní vodné fázi byla přenesena do čistých zkumavek a byla precipitována isopropylalkoholem (0,5 ml na 1 ml použité RNA-Blue) 20 min při 4°C. Následovala centrifugace (12000×g, 10 min, 4°C), odstranění supernatantu, omytí RNA pelety v 1 ml 75 % ethanolu a opět centrifugace (12000×g, 5 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn, RNA peleta byla vysušena při 37°C, rozpuštěna ve vodě na injekce a uskladněna při -70°C nebo rovnou ošetřena DNAsou jak bylo popsáno dříve. Zjištění případné kontaminace DNA a

stanovení množství RNA ve vzorku bylo popsáno již v kap. 4.2.5.1. Stanovení hladiny mRNA pomocí dvoukrokové RT-PCR pro 11HSD1 proběhlo za stejných podmínek jak bylo popsáno v kapitole o analýze 11HSD1 a β -aktinu v placentě (kap.4.2.5.2).

4.5. Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno metodou podle Bradforda [251]. Reakční směs (celkový objem 1,1 ml) obsahovala: 1000 μ l reakčního činidla (25 mg Coomassie Brilliant Blue v 12,5 ml ethanolu (96 %) + 25 ml 85 % kyseliny fosforečné, doplněné vodou na 250 ml, přefiltrované), 10-100 μ l 0,15 M NaCl a vzorek nebo hovězí sérový albumin. Po aplikaci reakčního činidla byla po dvou minutách měřena absorbance při 595 nm. Kalibrační závislost byla sestrojena od 4 do 10 μ g proteinu v reakční směsi.

4.6. Extrakce steroidů

Extrakce steroidů byla prováděna u radioaktivních i neradioaktivních pokusů na kolonkách reverzní fáze C-18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA, USA). Kolonky byly promyty methanolem (5 ml) a poté vodou (5 ml). Po nanesení vzorku byla kolonka propláchnuta vodou (4 ml) a vysušena proudem vzduchu. Steroidy byly extrahovány 1,5 ml methanolu. Vzorky byly do sucha odpařeny pod atmosférou dusíku při teplotě 45°C, uskladněny při -20°C a analyzovány pomocí HPLC (kap. 4.7)

4.7. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

4.7.1. HPLC - neradioaktivní metoda - tkáňové řezy

Kortikosteroidy byly analyzovány použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Hawlett-Packard HP 1100, Palo Alto, CA, USA). Vzorky byly rozpuštěny v 50 μ l methanolu a 20 μ l vzorku bylo nanášeno na kolonu LiChrospher 100 RP 18 (125x4 mm, Merck, Darmstadt, Německo). Teplota kolony byla 46°C. Eluce probíhala využitím lineárního gradientu voda-methanol od 65:35 (v/v) do 38:62 (v/v) po dobu 25 min při průtoku 1 ml/min. Poté byla kolona izokraticky promývána 100 % methanolem (průtoková rychlost 2 ml/min) po dobu 5 min. Po dobu 8 min byla kolona ekvilibrována směsí voda-methanol 65:35 při průtoku 1,7 ml/min dále pak při průtoku 1 ml/min. Měření UV absorbance probíhalo při 254 nm.

Kalibrace byla naměřena v rozmezí 0,1-5 μg steroidů na nástřik. Identifikace byla provedena na základě srovnání retenčních časů. Struktura jednotlivých produktů byla ověřena pomocí hmotnostního detektoru a již dříve popsané metody [252].

4.7.2. HPLC - radioaktivní metoda - tkáňový homogenát

Kortikosteroidy značené tritiem byly analyzovány na přístroji Hewlett-Packard HP 1100. Vzorky byly rozpuštěny v 50 μl methanolu a 20 μl bylo aplikováno na kolonu LiChrospher 100 RP 18 (125 \times 4 mm, Merck, Darmstadt, Německo). Eluce probíhala pomocí lineárního gradientu voda-methanol od 58:42 (v/v) do 38:62 (v/v) po dobu 15 min (průtoková rychlost 1 ml/min, teplota kolony 46°C) a poté byla kolona izokraticky promývána 5 min 100 % methanolem (průtoková rychlost 1,5 ml/min). Dále probíhala 5 min příprava na aplikaci dalšího vzorku vymýváním kolony směsí voda-methanol 58:42 (v/v). Pro „on-line“ detekci β -záření byl použit detektor Beckman 171 citlivý na β -záření (Beckman, Fullerton, CA, USA). Identifikace byla provedena na základě srovnání retenčních časů.

4.8. Statistické metody

Hodnoty jsou udány jako aritmetický průměr \pm střední chyba aritmetického průměru. Počet měření „n“ je uveden vždy jednotlivě u příslušného údaje. Hladina významnosti byla volena 5 %.

4.8.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a pohlavní rozdíly

Získaná data byla vyhodnocena dvojnou analýzou rozptylu (kmen vs. pohlaví). Jestliže ANOVA vyšla signifikantní, byly rozdíly pro jednotlivé skupiny následně hodnoceny Newman-Keulsovým testem.

4.8.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v placentě

Vývojové změny byly hodnoceny jednoduchou analýzou rozptylu. Pokud ANOVA vyšla signifikantní byly rozdíly vyhodnoceny Newman-Keulsovým testem. Rozdíly mezi kmeny SHR a WKY byly hodnoceny dvouvýběrovým Studentovým t-testem rovnosti středních hodnot dvou souborů, kterému předcházela F-test rovnosti rozptylů dvou souborů.

Rozdíly mezi kmeny DR a DS byly hodnoceny dvojnou analýzou rozptylu (kmen vs. doba březosti). V případě signifikance byl proveden Newman-Keulsův test.

4.8.3. 11β -hydroxysteroiddehydrogenasa v srdci

Rozdíly mezi kmeny SHR a WKY byly hodnoceny dvouvýběrovým Studentovým t-testem rovnosti středních hodnot dvou souborů, kterému předcházela F-test rovnosti rozptylů dvou souborů. Rozdíly mezi kmeny DR a DS byly hodnoceny dvojnou analýzou rozptylu (kmen vs. dieta). Jestliže ANOVA vyšla signifikantní, byly rozdíly pro jednotlivé skupiny následně hodnoceny Newman-Keulsovým testem.

4.8.4. 11β -hydroxysteroiddehydrogenasa a metabolický syndrom

Rozdíly mezi skupinami (HTG vs. Wistar, HTG vs. HTG+F, Wistar vs. Wistar+F, TS vs. TM) byly hodnoceny dvouvýběrovým Studentovým t-testem rovnosti středních hodnot dvou souborů, kterému předcházela F-test rovnosti rozptylů dvou souborů.

5. VÝSLEDKY

5.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a pohlavní rozdíly

Krevní tlak u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) byl významně vyšší nežli u normotenzních potkanů kmene Wistar-Kyoto (WKY) a zároveň vyšší u samců nežli u samic (tab.IV). Stejně tak Dahlovi potkani citliví k zvýšenému příjmu soli držení na vysokosolné dietě (DS-HS) měli vyšší krevní tlak ve srovnání s potkany rezistentními k zvýšenému příjmu soli (DR-HS). U samců potkana DS-HS byl krevní tlak také vyšší nežli u samic.

Tab.IV Arteriální krevní tlak u hypertenzních a normotenzních potkanů.

MBP (mmHg)	SHR	WKY	DS-HS	DR-HS
samci ♂	194 ± 10 ^{†,**}	130 ± 4	186 ± 7 ^{†,*}	123 ± 3
samice ♀	157 ± 6 [†]	125 ± 3	160 ± 8 [†]	126 ± 4

MBP, střední arteriální krevní tlak; SHR, spontánně hypertenzní potkan; WKY, normotenzní potkan Wistar-Kyoto; DS-HS a DR-HS, Dahlov potkan citlivý a rezistentní k zvýšenému příjmu soli - oba na vysokosolné dietě;

[†] ($p < 0,01$), významně vyšší krevní tlak ve srovnání s normotenzní kontrolou (SHR vs. WKY; DS-HS vs. DR-HS); * ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání se samicemi téhož kmene; $n = 12-16$

Aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 (11HSD2) v tkáňovém homogenátu byla měřena v aortě, tračniku a ledvině (odděleně ve dřeni a kůře). Jak ukazuje tab.V, byly ve všech tkáních nalezeny významné pohlavní rozdíly. Aktivita byla ve všech tkáních vyšší u samců nežli u samic. Výjimku tvořila aorta u SHR a WKY potkanů a tračník u WKY potkanů, kde byla obecně zaznamenána velmi nízká aktivita u obou pohlaví. Nejvýraznější rozdíl byl naopak zaznamenán v tračniku DR-HS a DS-HS potkanů, kde samci měli oproti samicím 12,5 \times resp. 10,7 \times vyšší aktivitu 11HSD2. Velký rozdíl byl pozorován i v aortě DS-HS potkanů, kde byla aktivita 9,5 \times vyšší u samců nežli u samic. V ostatních tkáních se poměr aktivit (samci/samice) u všech kmenů pohyboval od 1,6 do 5,2.

U potkanů byly také nalezeny kmenové rozdíly. V dřeni ledviny a tračniku byla aktivita vyšší u SHR ve srovnání s WKY potkany. Naopak v aortě byla aktivita vyšší u potkanů DR-HS nežli u potkanů DS-HS. Všechny tyto kmenové rozdíly byly nalezeny u samců i u samic. Žádné kmenové rozdíly nebyly nalezeny v ledvinové kůře. Samci Dahlových potkanů metabolizovali kortikosteron daleko víc v tračniku a v aortě nežli

potkani SHR a WKY. Nicméně aktivita v aortě dosahovala většinou pouze 20-50 % aktivity v tračniku a přibližně 1-4 % v ledvině.

Tab.V Aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 v tkáňovém homogenátu u samců a samic v dřeni a kůře ledviny, aortě a tračniku

	SHR	WKY	DS-HS	DR-HS
<i>dřeň ledviny</i>				
samci ♂	861 ± 58 ^{**†}	615 ± 53 ^{**}	983 ± 80 ^{**}	809 ± 128 ^{**}
samice ♀	189 ± 18 [†]	119 ± 16	387 ± 83	256 ± 34
<i>kůra ledviny</i>				
samci ♂	967 ± 74 ^{**}	766 ± 70 ^{**}	842 ± 51 ^{**}	742 ± 84 ^{**}
samice ♀	370 ± 42	334 ± 44	486 ± 59	461 ± 59
<i>aorta</i>				
samci ♂	6,4 ± 1,4	4,6 ± 0,7	22,9 ± 2,8 ^{**†}	30,8 ± 4,3 ^{**}
samice ♀	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,7 [†]	9,1 ± 0,4
<i>tračník</i>				
samci ♂	31,9 ± 2,9 ^{*†}	9,3 ± 0,8	120,6 ± 18,8 ^{**}	102,4 ± 15,7 ^{**}
samice ♀	11,5 ± 0,9 [†]	6,7 ± 0,7	11,3 ± 1,7	8,2 ± 1,0

Výsledky jsou vyjádřeny v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg proteinu. V ledvinové kůře ukázala analýza rozptylu (ANOVA) významné pohlavní rozdíly, ale ne rozdíly mezi kmeny. V ledvinové dřeni, tračniku a aortě ukázala ANOVA významné změny mezi pohlavím i kmenem. [†] ($p < 0,05$), významně odlišné od normotenzní kontroly (SHR vs. WKY; DS-HS vs. DR-HS); * ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání se samicemi téhož kmene; bližší detaily v tab.IV; n = 12-16

11 β -oxidasová aktivita (konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron) v tkáňových řezech byla obdobná výsledkům z tkáňových homogenátů (tab.VI). Významně víc metabolizovali kortikosteron samci a to u všech studovaných kmenů a tkání s výjimkou aorty u SHR a WKY a tračniku u WKY potkanů. V tračniku a aortě byla také zaznamenána nižší aktivita nežli v ledvině. Kmenově asociované rozdíly byly prokazatelné u samců v dřeni ledviny a tračniku mezi SHR a WKY potkany a u samců i samic v aortě mezi Dahlovými potkany.

Tab.VI 11 β -oxidasaová aktivita v tkáňových řezech u samců a samic v dřeni a kůře ledviny, aortě a tračníku

	<i>SHR</i>	<i>WKY</i>	<i>DS-HS</i>	<i>DR-HS</i>
<i>dřeň ledviny</i>				
samci ♂	945 ± 79 ^{**} , [†]	720 ± 63 ^{**}	1120 ± 163 [*]	1080 ± 121 ^{**}
samice ♀	380 ± 30	289 ± 33	652 ± 72	602 ± 75
<i>kůra ledviny</i>				
samci ♂	996 ± 105 [*]	1008 ± 132 ^{**}	1160 ± 138 ^{**}	1240 ± 129 ^{**}
samice ♀	585 ± 63	610 ± 75	545 ± 82	600 ± 90
<i>aorta</i>				
samci ♂	4,3 ± 0,8	5,2 ± 0,6	7,1 ± 0,7 ^{**} , [†]	11,8 ± 1,5 ^{**}
samice ♀	2,9 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,4 ^{††}	7,5 ± 1,0
<i>tračník</i>				
samci ♂	95 ± 13 ^{**} , [†]	56 ± 8	195 ± 26 ^{**}	144 ± 19 ^{**}
samice ♀	39 ± 5	45 ± 7	58 ± 6	49 ± 6

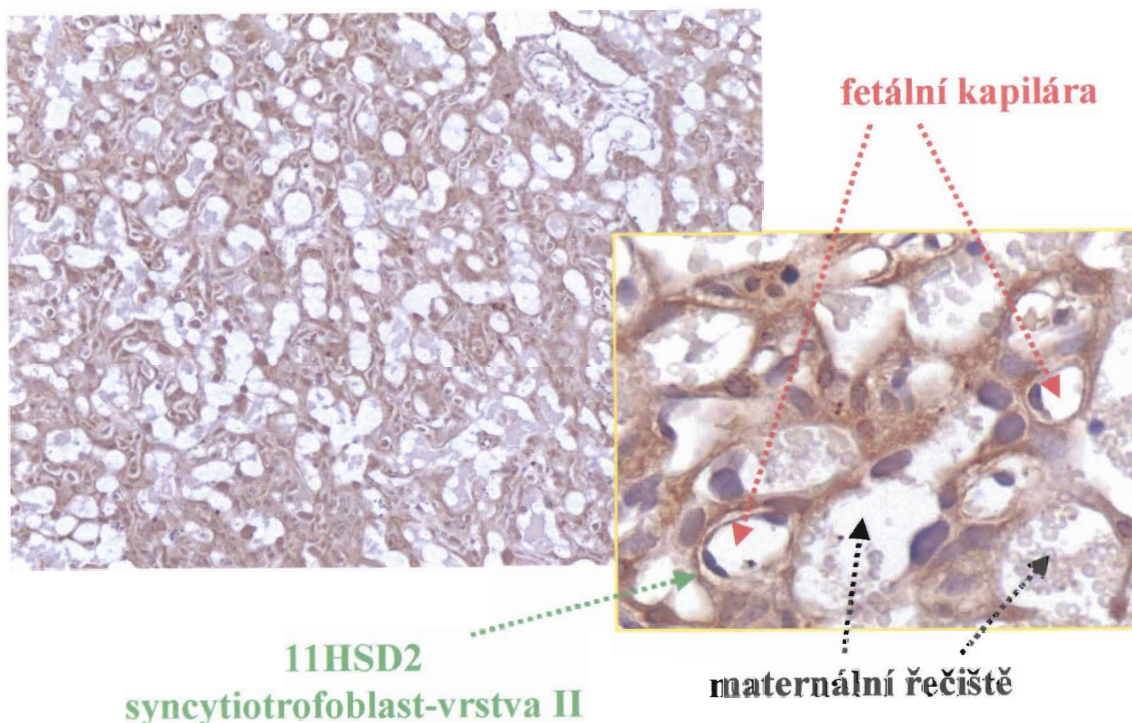
Aktivita je vyjádřena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg sušiny. V ledvinové kůře ukázala ANOVA významné pohlavní rozdíly, ale ne rozdíly mezi kmeny; v ledvinové dřeni, tračníku a aortě byly významné změny mezi pohlavím i kmenem.

[†] (p < 0,05) a ^{††} (p < 0,01), významně odlišné od normotenzní kontroly (SHR vs. WKY; DS-HS vs. DR-HS); ^{*} (p < 0,05) a ^{**} (p < 0,01), významně rozdílné ve srovnání se samicemi téhož kmene; bližší detaily v tab.IV; n = 12-16

5.2. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v placentě

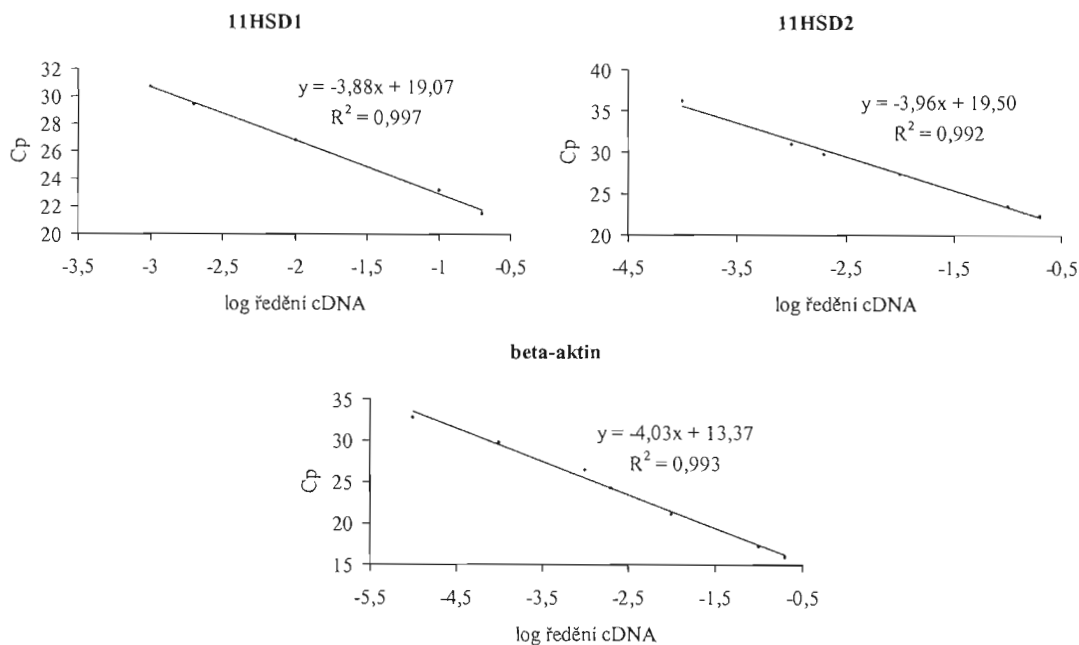
5.2.1. Vývojové změny 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 v placentě

Změny 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v placentě během jejího vývoje byly studovány pomocí imunohistochemie, „western blottingu“ a kvantitativní RT-PCR v reálném čase u potkanů kmene Wistar. Výsledky z imunohistochemického stanovení ukázaly, že ve všech studovaných dnech byla 11HSD2 lokalizována v *syncytiotrofoblastu* labyrintové zóny placenty (obr.5.1). U potkana je *syncytiotrofoblast* tvořen třemi vrstvami buněk. 11HSD2 byla detekována ve vrstvě II, která je součástí placentární bariéry oddělující fetální a maternální cirkulaci. Pozitivita byla zřejmá v cytoplazmě buněk této vrstvy. Méně výrazný signál byl zaznamenán v tzv. obřích buňkách bazální zóny potkaní placenty a v některých leukocytech pozorovaných v maternálním řečišti. Z jednotlivých pokusů byl také zřejmý samotný vývoj placenty. V D13 a D14 (13. a 14. den březosti) byla placenta pevně připojena k děloze (*decidua basalis*), zatímco v D16 byla placenta již od dělohy oddělena. Expres 11HSD2 v děloze byla velmi malá, o mnoho slabší nežli v *syncytiotrofoblastu*. V žádném pokuse nebyla zaznamenána nespecifická reakce samotné sekundární protilátky.



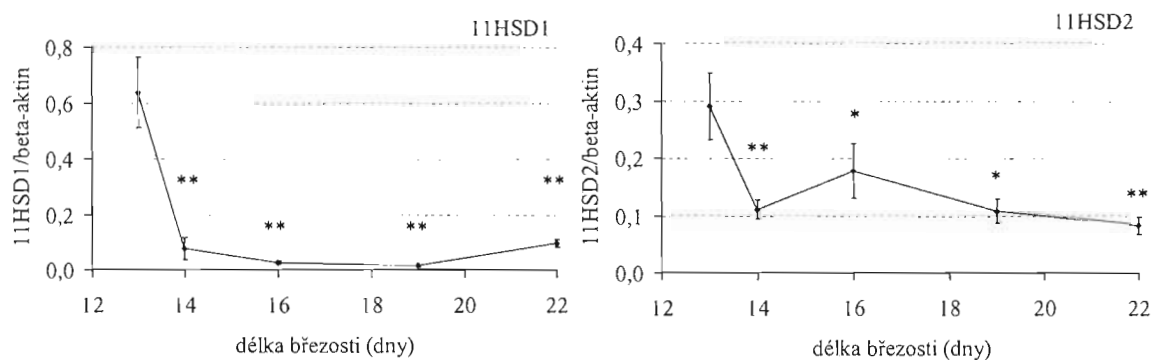
Obr.5.1. Imunohistochemické stanovení 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 v placentě potkana kmene Wistar ze 16. dne březosti s detailnějším výřezem. 11HSD2 se nachází v labyrintové zóně v *syncytiotrofoblastu*. (originální zvětšení 200 \times , detailnější výřez 400 \times)

Ve všech studovaných dnech byla měřena hladina mRNA obou isoenzymů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy a získané výsledky vztaženy na „housekeeping“ gen β -aktin. Pro jednotlivé geny byly sestrojeny kalibrační křivky pomocí různě ředěné cDNA připravené z ledviny (obr.5.2). Na základě rozpouštěcích analýz, porovnání délky namnožených fragmentů pomocí elektroforézy a sekvenací bylo prokázáno, že fragmenty namnožené v PCR reakci odpovídají studovaným genům. Samotné výsledky jsou zobrazeny na obr.5.3 a ukazují, že hladina mRNA 11HSD1 i 11HSD2 se dramaticky mění v průběhu vývoje placenty. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v D13, kdy mRNA 11HSD1 dosahovala 6 \times -43 \times vyšší hladiny nežli v ostatních studovaných dnech. U mRNA 11HSD2 byla hodnota v D13 zvýšena pouze 1,6 \times -3,5 \times . Z obr.5.3 je také zřejmý, avšak statisticky nevýznamný, trend snižování hladiny mRNA 11HSD2 směrem ke konci gestace.



Obr.5.2. Kalibrační závislost pro 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu 1, 2 (11HSD1, 11HSD2) a β -aktin.

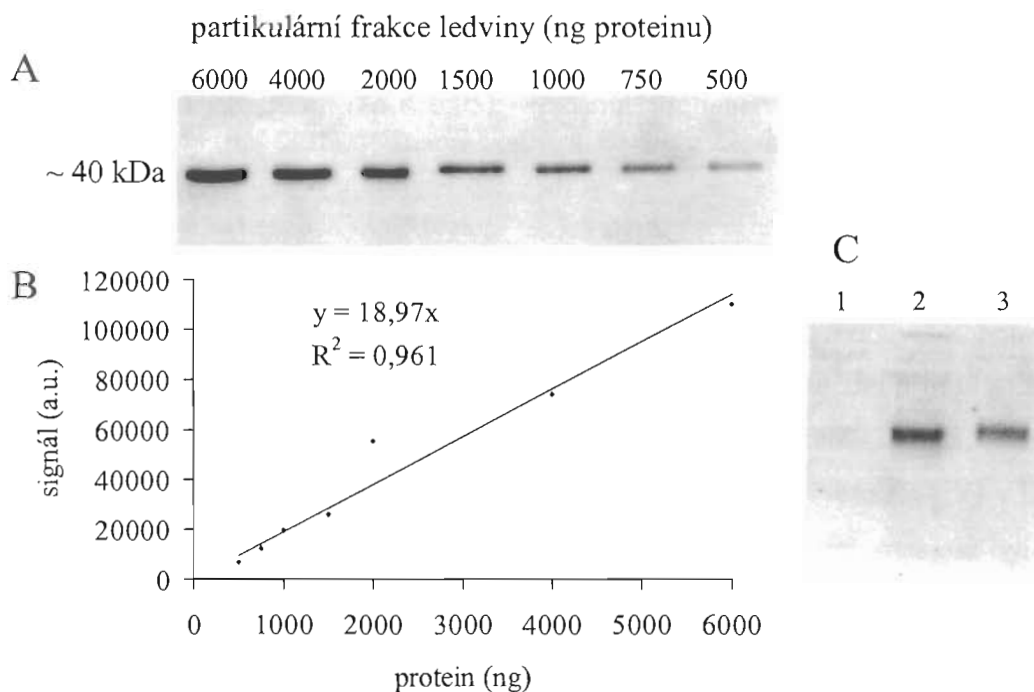
Cp, „crossing point“ (cyklus PCR, ve kterém dochází k lineárnímu nárůstu fluorescence, a který je závislý na koncentraci templátu)



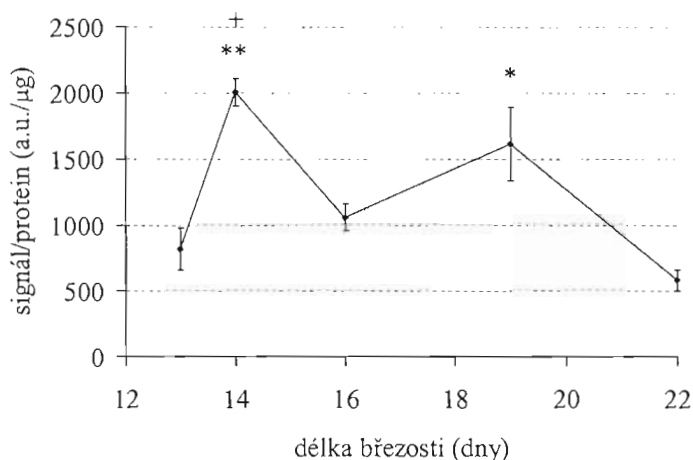
Obr.5.3. Vývojové změny v hladině mRNA placentární 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) u potkanů Wistar. Hodnoty jsou udány jako poměr 11HSD/ β -aktin. ANOVA prokázala významné vývojové rozdíly hladiny mRNA obou dehydrogenas.

* ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$), významně rozdílné oproti 13. dni březosti; $n = 3-7$

Pomocí „western blottingu“ byla sledována hladina proteinu 11HSD2. Nejprve bylo ověřeno, zda se pohybujeme v lineární oblasti signálu. Výsledek popisuje kalibrační křivka zobrazená na obr. 5.4, která byla vytvořena ze vzorku ledviny. Hrubý homogenát placent byl vždy rozdělen na tzv. partikulární a cytosolární frakci. Z obr. 5.4C vyplývá, že množství 11HSD2 v naší připravené cytosolární frakci bylo zanedbatelné a všechny protein bylo možné detekovat ve frakci partikulární. V žádném pokuse nebyla zaznamenána rovněž nespecifická reakce sekundární protilátky. Samotné výsledky popisuje obr.5.5. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v D14 a D19. Stejně jako u mRNA je možné i zde sledovat snížení hladiny 11HSD2 na konci gestace. V D22 bylo naměřeno 2,8× méně tohoto enzymu nežli v D19.



Obr.5.4 (A) „Western blotting“ 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 – chemiluminiscence pro různá množství totálního proteinu (500-6000 ng) naneseného na vertikální elektroforézu; (B) Kalibrační křivka (závislost signálu chemiluminiscence na množství totálního proteinu); (C) „Western blotting“ 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 z cytosolární frakce placenty (1), partikulární frakce placenty (2) a ledviny (3).
a.u., arbitrární jednotka



Obr.5.5. Vývojové změny v hladině proteinu placentární 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 u potkanů Wistar. Hodnoty jsou udány jako získaný signál na μg proteinu partikulární frakce. ANOVA prokázala významné rozdíly hladiny proteinu v průběhu vývoje.

a.u., arbitrární jednotka; + ($p < 0,05$), významně odlišné od 16. dne březosti; * ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$), významně odlišné od 13. a 22. dne březosti; $n = 3-7$

5.2.2. Placentární 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 a 2 a hypertenze

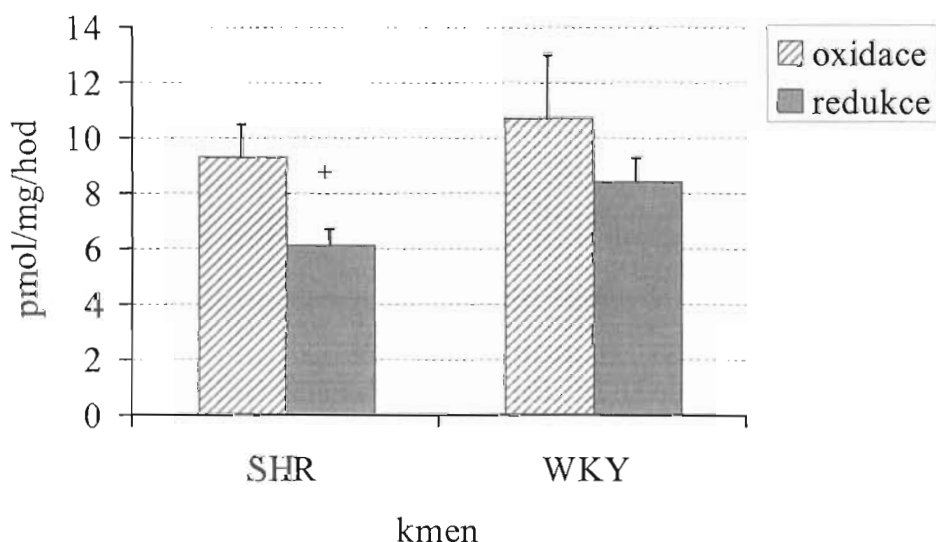
Krevní tlak u Dahlových potkanů (DS-potkan citlivý k zvýšenému příjmu soli, DR-potkan rezistentní k zvýšenému příjmu soli; oba na nízkosolné dietě (DS-LS, DR-LS)), spontánně hypertenzních (SHR) a normotenzních potkanů Wistar-Kyoto (WKY) v D20 je uveden v tab.VII. Z výsledků je zřejmé, že krevní tlak u hypertenzních potkanů byl vyšší nežli u příslušných normotenzních kmenů (SHR vs. WKY a DS-LS vs. DR-LS). Hmotnost samic nebyla u studovaných potkanů rozdílná, ale byly zaznamenány rozdíly v hmotnosti jejich plodů. Plody hypertenzního kmene SHR byly lehčí ve srovnání s normotenzním kmenem WKY, naopak plody hypertenzního kmene DS-LS byly těžší nežli plody kmene DR-LS. Vypočítaný poměr hmotnosti placenty ku hmotnosti plodu byl vyšší u potkanů SHR, ale nižší u DS-LS ve srovnání s normotenzními kontrolami.

Tab.VII Arteriální krevní tlak, hmotnost samic a hmotnost plodu ve dvacátém dni březosti u hypertenzních a normotenzních potkanů.

	<i>SBP samice (mmHg)</i>	<i>hmotnost samice (g)</i>	<i>hmotnost plodu (g)</i>	<i>hmotnost placenty / hmotnost plodu</i>
SHR	195,9 ± 5,7 **	277 ± 10	2,7 ± 0,1 *	0,17 ± 0,01 **
WKY	138,7 ± 6,5	261 ± 12	3,1 ± 0,2	0,14 ± 0,01
DS-LS	171,6 ± 3,4 **	363 ± 11	2,9 ± 0,1 **	0,22 ± 0,01 **
DR-LS	136,9 ± 5,7	295 ± 10	2,5 ± 0,1	0,26 ± 0,01

SBP, systolický krevní tlak; SHR, spontánně hypertenzní potkan; WKY, normotenzní potkan Wistar-Kyoto; DS-LS a DR-LS, Dahluv potkan citlivý a rezistentní k zvýšenému příjmu soli - oba na nízkosolné dietě.

* ($p < 0,05$) a ** ($p < 0,01$), významně rozdílné ve srovnání s normotenzním kmenem (SHR vs. WKY; DS-LS vs. DR-LS); $n = 7-8$ pro parametry ze samic; $n = 31-44$ pro plod a placentu

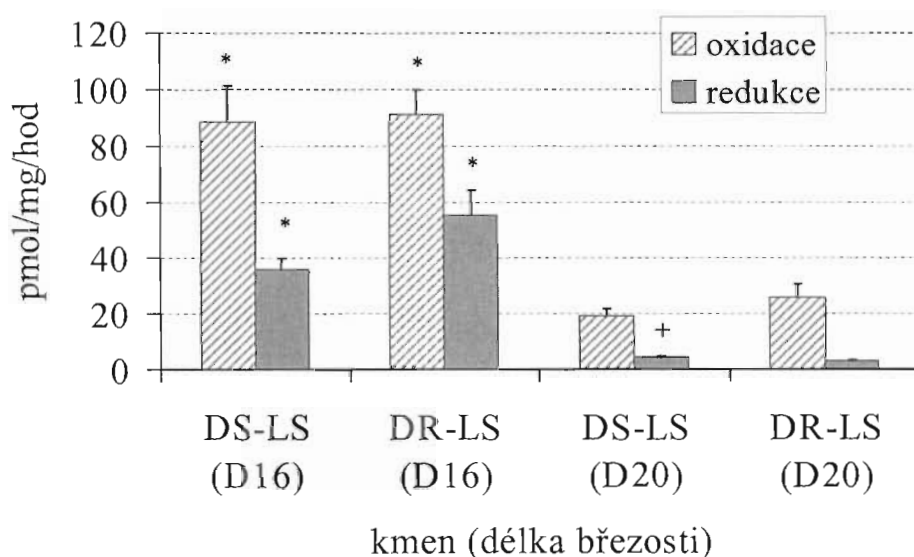


Obr.5.6. Konverze kortikosteronu (oxidace) a 11-dehydrokortikosteronu (redukce) v tkáňových řezech placenty SHR a WKY potkanů v D20. Aktivita je uvedena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu (oxidace) nebo kortikosteronu (redukce) za hod na mg suché váhy placenty.

+ ($p < 0,05$), významně rozdílné ve srovnání s normotenzním kmenem; podrobnosti v tab.VII; $n = 9$

Aktivita 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy v tkáňových řezech byla měřena jako konverze kortikosteronu a 11-dehydrokortikosteronu. Mezi kmeny SHR a WKY (D20) byl zaznamenán významný rozdíl pouze v redukcí 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron (obr. 5.6). Žádný rozdíl nebyl zaznamenán v oxidaci kortikosteronu. U Dahlových potkanů (D20) byl také patrný kmenový rozdíl v reduktasové aktivitě (obr. 5.7). Potkani kmene DS-LS jsou tak schopni o 68 % více zvyšovat lokální koncentraci glukokortikoidů nežli

potkani kmene DR-LS. U těchto potkanů byl také patrný výrazný vývojový rozdíl. Placenty potkana DR-LS i DS-LS metabolizovaly kortikosteron i 11-dehydrokortikosteron v D16 daleko více nežli v D20. Stejně jako u SHR a WKY potkanů nebyly ani u Dahlových potkanů pozorovány žádné změny v oxidasové aktivitě, tedy v odbourávání kortikosteronu, a to v obou studovaných dnech březosti.



Obr.5.7. Konverze kortikosteronu (oxidace) a 11-dehydrokortikosteronu (redukce) v tkáňových řezech placenty Dahlových potkanů. Aktivita je uvedena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu (oxidace) nebo kortikosteronu (redukce) za hod na mg suché váhy placenty. U Dahlových potkanů prokázala ANOVA významné změny 11HSD v závislosti na délce březosti a mezi kmeny.

* ($p < 0,01$) mezi 16. vs. 20. dnem březosti (D16 vs. D20); + ($p < 0,05$), rozdílné od normotenzní kontroly v D20 (DS-LS vs. DR-LS); podrobnosti v tab.VII; $n = 9$ pro měření v D20; $n = 12-13$ pro měření v D16

Z obr. 5.6 i 5.7 je zřejmé, že u všech studovaných kmenů převládá oxidace nad redukcí, tedy převládá odbourávání kortikosteronu nad jeho tvorbou. Tento rozdíl aktivit (RA, oxidasová minus reduktasová aktivita) nebyl mezi SHR a WKY potkany odlišný (tab.VIII). Naproti tomu v placentě DS-LS potkanů v D16 byl RA vyšší nežli v D20 (tab.IX). U potkanů DR-LS byl tento trend obdobný avšak statisticky nevýznamný. Kromě toho u DS-LS potkanů v D20 byl RA přibližně 1,5× nižší nežli u DR-LS potkanů.

Tab.VIII Rozdíl aktivit 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (oxidasová minus reduktasová) v tkáňových řezech placenty hypertenzních a normotenzních potkanů

	<i>rozdíl aktivit</i>
SHR	3,6 \pm 0,9
WKY	2,6 \pm 0,6

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

bližší detaily tab.VII; n = 9

Tab.IX Rozdíl aktivit 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (oxidasová minus reduktasová) v tkáňových řezech placenty hypertenzních a normotenzních potkanů

	<i>rozdíl aktivit</i>
DS-LS (D16)	65,0 \pm 12,5 *
DR-LS (D16)	43,5 \pm 5,4
DS-LS (D20)	14,5 \pm 2,0 †
DR-LS (D20)	22,4 \pm 2,2

Rozdíl aktivit je uvedena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg sušiny. U Dahlových potkanů prokázala ANOVA významný rozdíl v délce březosti i mezi kmeny.

* ($p < 0,01$), významně rozdílné mezi DS-LS (D16. vs. D20); † ($p < 0,05$), rozdílné od normotenzní kontroly v D20 (DS-LS vs. DR-LS); bližší detaily tab.VII; n = 9-11

Výsledky z měření v tkáňových homogenátech v D20 jsou shrnuty v tab.X. Stejně jako v tkáňových řezech se nelišila dehydrogenasová aktivita u obou hypertenzních a příslušných normotenzních kmenů.

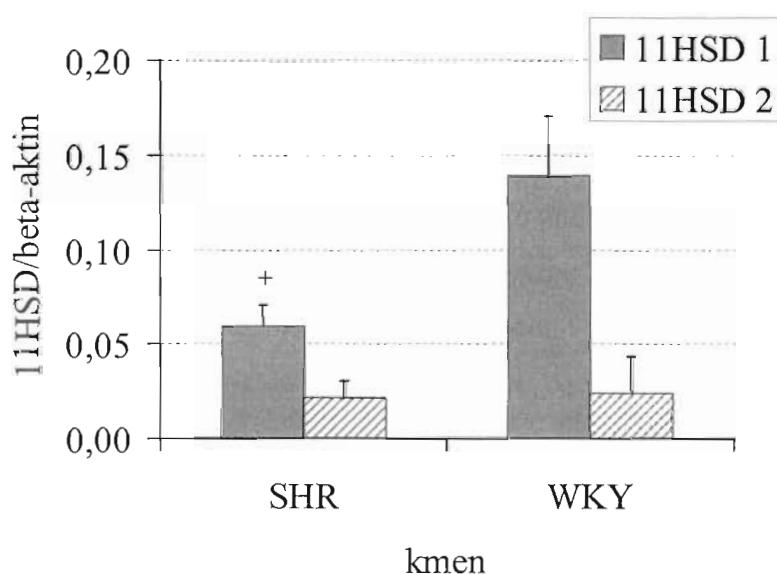
Tab.X Aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 v tkáňových homogenátech placent hypertenzních a normotenzních potkanů z dvacátého dne březosti.

	<i>aktivita</i>
SHR	14,6 \pm 2,1
WKY	12,9 \pm 1,9
DS-LS	12,0 \pm 1,4
DR-LS	9,8 \pm 1,4

Aktivita je uvedena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg proteinu.

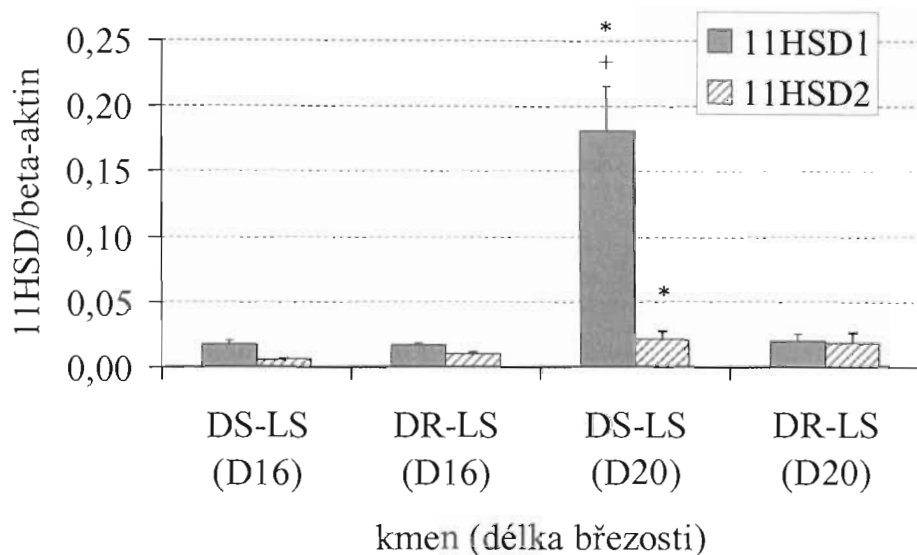
bližší detaily tab.VII; n = 10-14

Pomocí jedнокrokové RT-PCR v reálném čase byla měřena hladina mRNA obou 11HSD a jejich množství bylo také vztaženo na „housekeeping“ gen β -aktin. Z výsledků vyplynulo, že hladina mRNA 11HSD1 byla vyšší u normotenzních potkanů WKY nežli u hypertenzních SHR (obr. 5.8). Hladina mRNA 11HSD2 nebyla u těchto potkanů rozdílná. U Dahlových potkanů v D20 bylo také možné pozorovat kmenový rozdíl v hladině mRNA 11HSD1 (obr.5.9). V tomto případě byla ale hladina vyšší u hypertenzních DS-LS ve srovnání s normotenzními DR-LS potkany. V D16 nebyl tento rozdíl zaznamenán. V průběhu březosti dochází u DS-LS potkanů k vývojovým změnám 11HSD. Hladina obou 11HSD byla vyšší s vyšším stupněm březosti. Tento rozdíl byl výraznější pro 11HSD1, kde byla hladina mRNA v D20 zvýšena 10,5× oproti placentám z D16, u 11HSD2 to bylo pouze 3,6×.



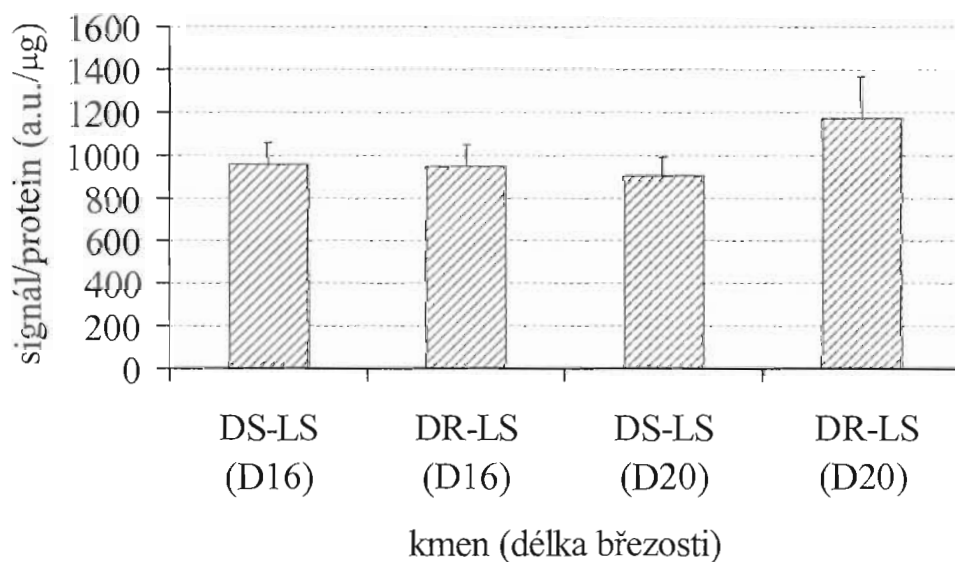
Obr.5.8 Hladina mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v placentě hypertenzních a normotenzních potkanů v D20.
[†] ($p < 0,05$), mezi SHR vs. WKY; bližší detaily tab.VII; n = 4-7

Množství proteinu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 bylo měřeno pouze u Dahlových potkanů. Výsledky popisuje obr. 5.10. Z něj je patrné, že nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v hladině proteinu 11HSD2. V placentě potkana DR-LS v D20 byla sice mírně zvýšená hladina tohoto isoenzymu ale statisticky nevýznamně.



Obr.5.9 Hladina mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v placentě hypertenzních a normotenzních potkanů. V expresi 11HSD1 prokázala ANOVA kmenové rozdíly (DS-LS vs. DR-LS) a významné změny v délce březosti; v expresi 11HSD2 pouze v délce březosti.

+ ($p < 0,01$), mezi DS-LS (D20) vs. DR-LS (D20); * ($p < 0,01$), DS-LS (D16) vs. DS-LS (D20); bližší detaily tab. VII; n = 11-21



Obr.5.10 Hladina proteinu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 2 v partikulární frakci placent Dahlových potkanů. Signál je vztažen na μ g proteinu partikulární frakce. ANOVA neprokázala žádné kmenové rozdíly ani rozdíly v délce březosti potkana.

a.u., arbitrární jednotka; bližší detaily tab. VII; n = 11-13

5.3. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v srdci

Jak ukazuje tab. XI krevní tlak u spontánně hypertenzních potkanů SHR byl významně vyšší nežli u jejich normotenzních kontrol WKY (Wistar-Kyoto). U Dahlových potkanů citlivých na sůl vedla vysokosolná dieta (DS-HS) k výraznému zvýšení krevního tlaku ve srovnání s DS potkanem na nízkosolné dietě (DS-LS) a DR potkany (DR-HS, DR-LS). U DS-LS potkanů byl také zaznamenán vyšší krevní tlak oproti oběma skupinám DR potkanů avšak žádný rozdíl nebyl zjištěn v jejich hmotnosti srdce. Rozdíl v hmotnosti srdce byl zaznamenán pouze mezi SHR vs. WKY a DS-HS vs. ostatní Dahlovi potkani. V obou případech byla hypertenze spojena s větší hmotností srdce.

Tab.XI Arteriální krevní tlak a relativní hmotnost srdce u hypertenzních a normotenzních potkanů

	<i>SBP (mmHg)</i>	<i>hmotnost srdce/BW (mg/g)</i>
SHR	149 \pm 3 *	3,73 \pm 0,08 *
WKY	131 \pm 3	3,01 \pm 0,08
DS-LS	141 \pm 4 †	2,75 \pm 0,03
DS-HS	200 \pm 5 ^{o,†}	4,07 \pm 0,08 ^{o,†}
DR-LS	129 \pm 3	2,89 \pm 0,03
DR-HS	128 \pm 5	2,96 \pm 0,06

SBP, systolický krevní tlak; BW, hmotnost potkana; SHR, spontánně hypertenzní potkan; WKY, normotenzní potkan Wistar-Kyoto; DS-LS a DR-LS, Dahlov potkan citlivý a rezistentní k zvýšenému příjmu soli držen na nízkosolné dietě; DS-HS a DR-HS, Dahlov potkan citlivý a rezistentní k zvýšenému příjmu soli držen na vysokosolné dietě. U Dahlových potkanů prokázala ANOVA významné rozdíly ve kmeni i dietě u obou měřených faktorů.

* ($p < 0,01$), významně odlišné od WKY; ^o ($p < 0,01$), odlišné od DS-LS;

† ($p < 0,01$), odlišné od DR-LS i DR-HS; $n = 6-15$

Aktivita 11HSD byla měřena v přítomnosti kofaktoru NAD⁺ nebo NADP⁺ a bez přidaného kofaktoru. Z tab. XII je zřejmé, že konverze kortikosteronu v přítomnosti NAD⁺, tedy aktivita 11HSD2, je velmi nízká a není odlišná od konverze naměřené bez přidání kofaktoru. Naproti tomu aktivita v přítomnosti NADP⁺, která v tomto případě odráží spíše aktivitu 11HSD1, byla zaznamenána ve všech studovaných kmenech. Analýza rozptylu ukázala významný kmenový rozdíl u Dahlových potkanů. DR potkani metabolizovali kortikosteron více nežli DS potkani.

Tab.XII 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasová aktivita v tkáňovém homogenátu srdce v přítomnosti kofaktorů NAD⁺ nebo NADP⁺

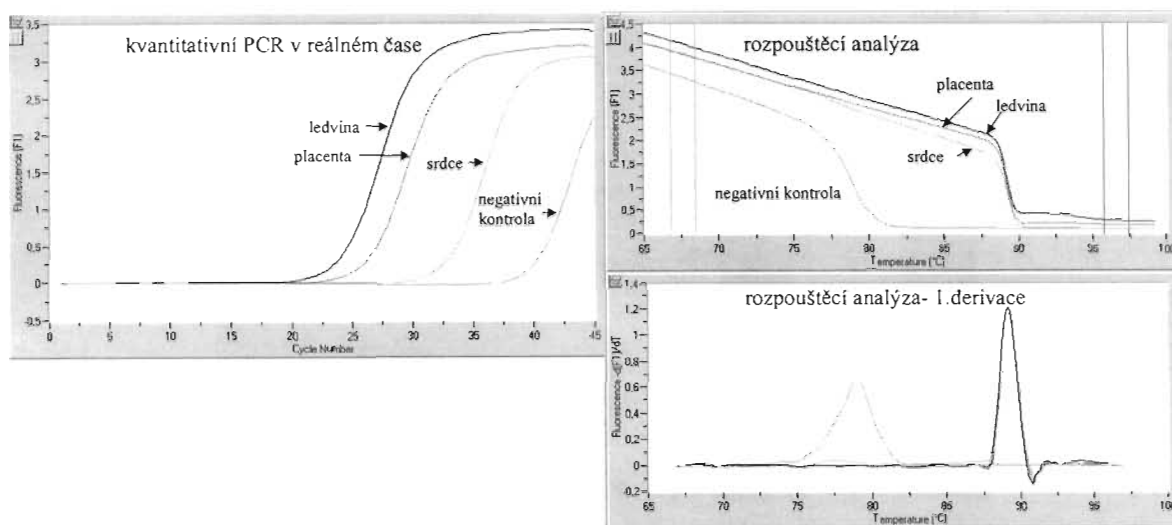
	<i>bez kofaktoru</i>	<i>NAD⁺</i>	<i>NADP⁺</i>
SHR	4,2 ± 0,6	3,6 ± 0,5	16,8 ± 1,5
WKY	5,1 ± 0,6	5,9 ± 0,7	16,1 ± 1,9
DS-LS	4,8 ± 0,6	5,9 ± 0,6	18,1 ± 1,7
DS-HS	3,9 ± 0,5	4,3 ± 0,4	21,7 ± 1,1
DR-LS	5,4 ± 0,3	5,2 ± 0,4	26,7 ± 3,2 *
DR-HS	4,2 ± 0,5	5,0 ± 0,6	28,9 ± 3,1 *

Výsledky jsou uvedeny jako procento konverze kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. U Dahlových potkanů prokázala ANOVA významné rozdíly pouze ve kmeni.

* ($p < 0,05$), významný rozdíl mezi DR a DS; bližší popis tab.XI; $n = 6-15$

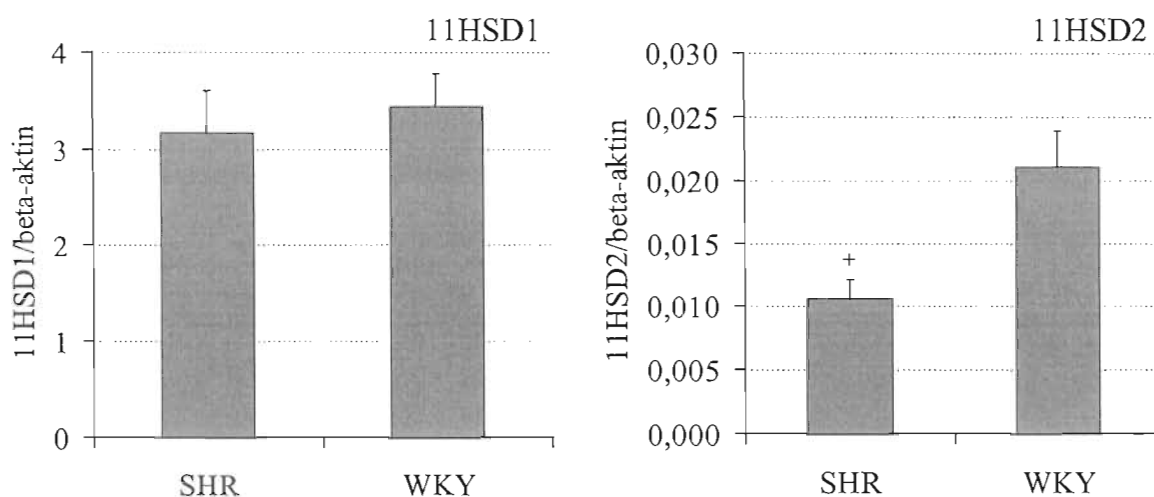
V srdci byla měřena hladina mRNA obou 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas (11HSD1, 11HSD2) a jejich hladina byla vztažena na „housekeeping“ gen β -aktin. Měření ukázalo přítomnost mRNA pro oba isoenzymy a to u všech studovaných potkanů. Hladina 11HSD2 byla ale nižší nežli hladina 11HSD1 a pohybovala se těsně na hranici detekce. To, že se nejedná o nespecifitu, ale opravdu o mRNA 11HSD2 potvrdila rozpouštěcí analýza následovaná po kvantitativní PCR (obr.5.11). Teplota tání pro fragment 11HSD2 z ledviny a placenty byl stejný jako pro namnožený fragment ze srdce.

Jak je ukázáno na obr. 5.12, hladina mRNA 11HSD1 byla u DR potkanů významně vyšší nežli u DS potkanů. Nebyl zaznamenán žádný efekt vysokého příjmu soli na hladinu 11HSD1. Tyto výsledky jsou v souladu s enzymovou aktivitou 11HSD1 (tab.XII). U hladiny 11HSD2 byl zaznamenán obdobný trend, avšak statisticky významně se lišil pouze DR-LS od DS-LS. Ani zde nebyl prokázán vliv zvýšeného příjmu soli. V případě SHR a WKY nebyly prokázány žádné kmenové rozdíly v expresi 11HSD1 (obr.5.13). Expres 11HSD2 byla také nižší nežli exprese 11HSD1 a dokonce 2 \times nižší u potkanů SHR nežli u WKY.



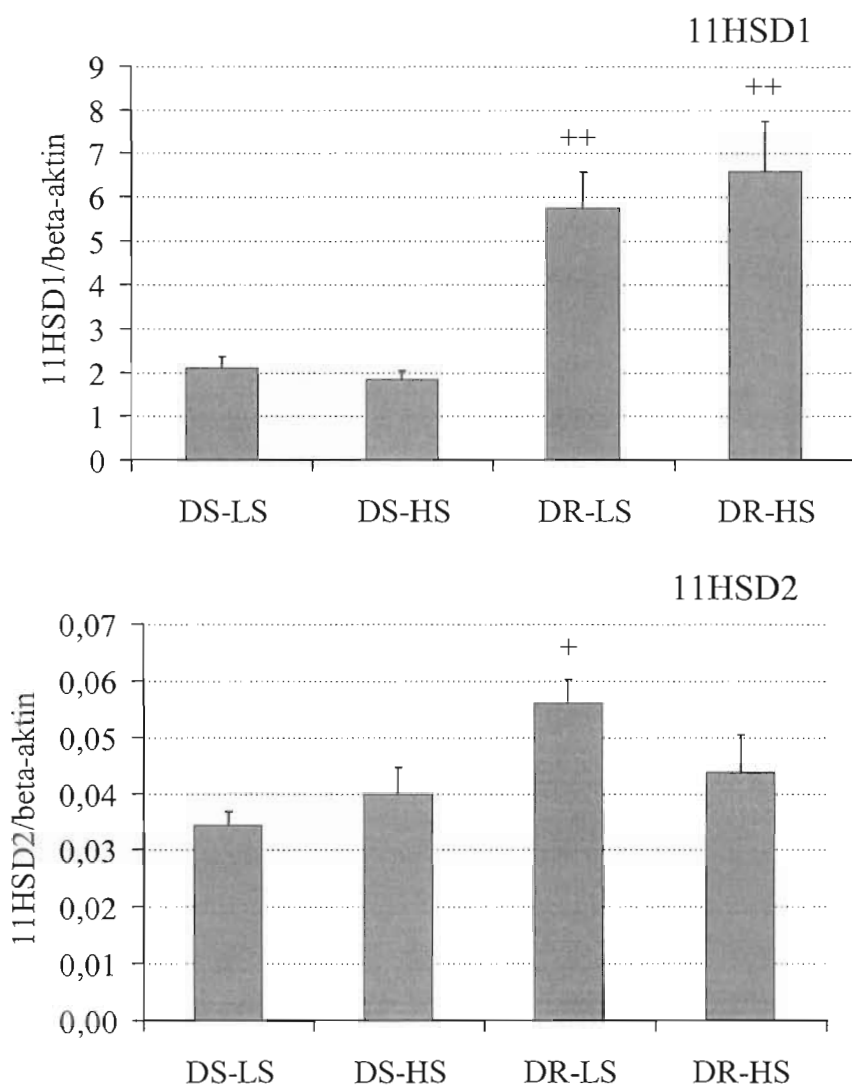
Obr.5.11 Záznam z kvantitativní PCR v reálném čase a z následné rozpouštěcí analýzy s vypočítanou její první derivací.

Jako templát byla použita 10× ředěná cDNA z ledviny a placenty a 5× ředěná ze srdce. Porovnání teploty tání mezi jednotlivými tkáněmi dokazuje přítomnost mRNA 11HSD2 v srdci.



Obr.5.13 Expres 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v srdci SHR a WKY potkanů.

⁺ ($p < 0,01$) SHR vs. WKY; bližší detaily v tab.XI; $n = 8-13$



Obr.5.12 Expresie 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v srdci Dahlových potkanů. ANOVA analýza ukázala významný rozdíl mezi kmeny.

⁺ ($p < 0,05$) a ⁺⁺ ($p < 0,01$) mezi DR-LS vs. DS-LS a DR-HS vs. DS-HS; bližší detaily v tab.XI; n = 6-12

5.4.11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a metabolický syndrom

Z tab.XIII je zřejmé, že fruktosová dieta (F) podávaná hypertriglyceridemickým potkanům (HTG) po více než 8 týdnů, podporuje u těchto potkanů rozvoj metabolického syndromu. Vyšší příjem fruktosy způsobil výrazné zvýšení krevního tlaku a více než dvojnásobné zvýšení hladiny triglyceridů (TG) a insulinu. Samotné HTG samice měly také vyšší krevní tlak a hladinu TG nežli kontrolní skupina – normotriglyceridemický potkan Wistar. Tělesná hmotnost samic byla ve všech třech skupinách stejná.

Tab.XIII Arteriální krevní tlak, hladina triglyceridů a insulinu v séru samic hypertriglyceridemických a normotriglyceridemických potkanů

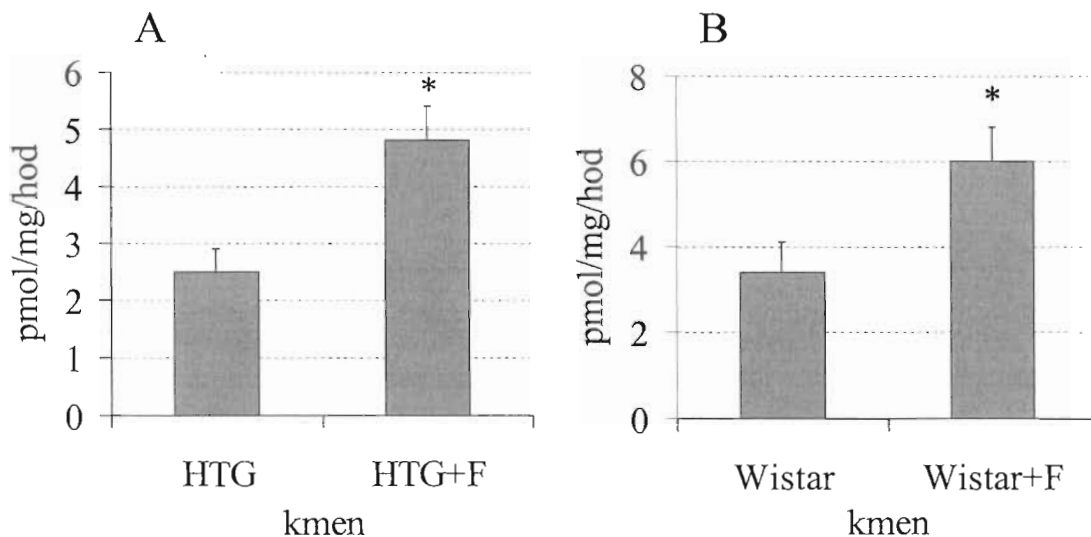
	<i>hmotnost samice</i> (g)	<i>TG</i> (mmol/l)	<i>Insulin</i> (pmol/l)	<i>SBP</i> (mmHg)
Wistar	218 ± 4	1,27 ± 0,06	232 ± 27	129 ± 4
HTG	227 ± 4	2,24 ± 0,25 *	252 ± 32	163 ± 7 *
HTG+F	216 ± 7	4,68 ± 0,48 ††	520 ± 88 ††	182 ± 3 †

TG, triglyceridy; SBP, systolický krevní tlak; HTG, samice hypertriglyceridemického potkana; HTG+F, samice hypertriglyceridemického potkana chované na fruktosové dietě.

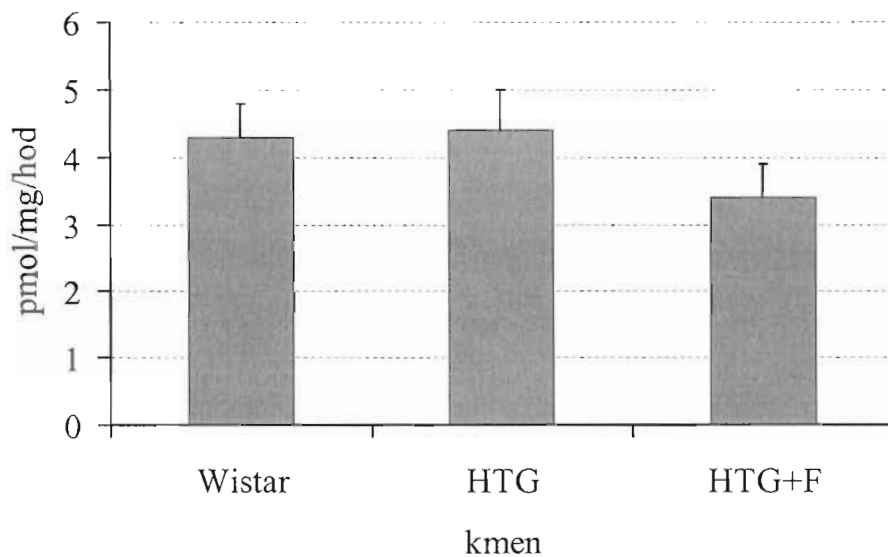
* (p < 0,01), významně odlišné od potkanů Wistar; † (p < 0,05) a †† (p < 0,01), odlišné od HTG; n = 8-10

Měření ukázalo, že fruktosová dieta zvyšuje aktivitu 11HSD1, ale neovlivňuje 11HSD2 (obr.5.14, obr. 5.15, tab.XIV). Změny v aktivitě byly tkáňově specifické. V mezenteriálních cévách byla aktivita u potkanů HTG+F 1,9× vyšší nežli u potkanů HTG (obr.5.14). Pro srovnání byl obdobný pokus proveden i u běžných potkanů Wistar. Pro tento pokus byli použiti samci, neboť je u nich známo, že vykazují obecně vyšší aktivitu 11HSD nežli samice. I u těchto samců způsobila fruktosová dieta „upregulaci“ aktivity 11HSD1. Bylo zajímavé, že i v této tkáni, stejně jako v srdci, nebyla pozorována významná konverze kortikosteronu (nM koncentrace) v přítomnosti kofaktoru NAD⁺ a ani v přítomnosti NADP⁺ při použití vysoké koncentrace substrátu (μM koncentrace).

Zvýšení aktivity 11HSD1 po zvýšeném příjmu fruktosy bylo patrné i v tračníku, ale ne v játrech, ledvině (tab.XIV) a srdci (obr.5.15). V játrech a tračníku byl zaznamenán kmenový rozdíl v aktivitě 11HSD1. V játrech byla konverze kortikosteronu o 100 % vyšší u potkanů HTG, v tračníku naopak o 38 % u potkanů Wistar.



Obr.5.14. Aktivita 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v tkáňovém homogenátu mezenteriálních cév u samic (A) a u samců (B). Aktivita je vyjádřena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg proteinu. HTG, samice hypertriglyceridemického potkana; F, fruktosová dieta. * ($p < 0,05$), významně vyšší ve srovnání s potkany bez fruktosové diety; $n = 6-11$



Obr.5.15. Aktivita 11β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v tkáňovém homogenátu srdce u samic. Aktivita je vyjádřena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg proteinu. bližší detaily v tab.XIII; $n = 7-8$

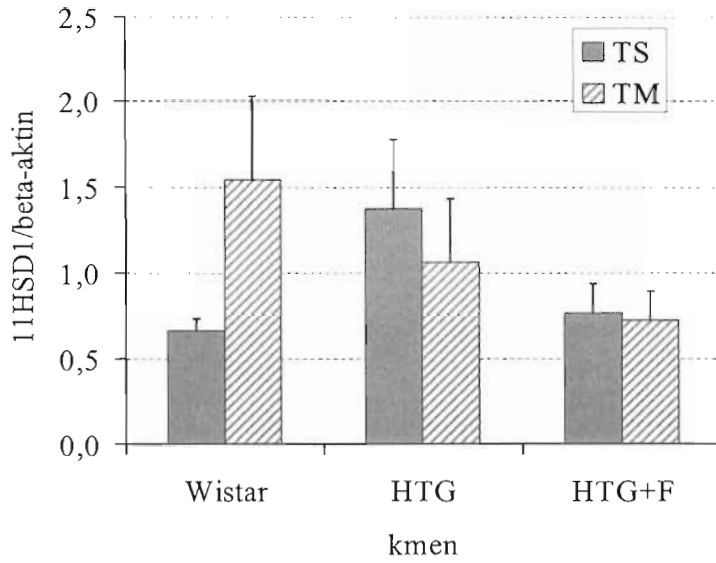
Tab.XIV Aktivita 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 a 2 (11HSD1, 11HSD2) v tkáňových homogenátech u samic hypertriglyceridemických a normotriglyceridemických potkanů

	11HSD1	11HSD2
<i>játra</i>		
Wistar	1100 \pm 16	N
HTG	2208 \pm 87 *	N
HTG+F	2011 \pm 203	N
<i>ledvina</i>		
Wistar	1006 \pm 51	522 \pm 51
HTG	1120 \pm 84	611 \pm 101
HTG+F	1216 \pm 81	683 \pm 40
<i>tračník</i>		
Wistar	157 \pm 11,3	12,0 \pm 1,2
HTG	97,6 \pm 1,7 *	11,7 \pm 1,6
HTG+F	143 \pm 12 †	8,9 \pm 1,7

Aktivita je vyjádřena v pmol vzniklého 11-dehydrokortikosteronu za hod na mg proteinu. N, neměřeno.

* ($p < 0,01$), významně odlišné od potkanů Wistar; † ($p < 0,05$), odlišné od HTG; další detaily v tab.XIII; $n = 14-19$ u ledviny a tračníku potkanů Wistar, ostatní $n = 8-13$

Expresa 11HSD1, tedy hladina mRNA, byla měřena v mezenteriální (TM) a v subkutánní tukové tkáni (TS). Jak ukazuje obr.5.16, nezpůsobila fruktosová dieta změny v hladině mRNA tohoto isoenzymu ani v jedné tukové tkáni. Nebyl zaznamenán ani žádný významný rozdíl mezi potkany Wistar a HTG a ani mezi TM a TS u jednotlivých skupin potkanů. Hladina 11HSD2 byla prakticky neměřitelná.



Obr.5.16. Hladina mRNA 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 v subkutánní (TS) a mezenteriální (TM) tukové tkáni u samic hypertriglyceridemických a normotriglyceridemických potkanů. bližší detaily v tab.XIII; n = 9-12

6. DISKUZE

6.1. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a pohlavní rozdíly

Různé abnormality v metabolismu glukokortikoidů mohou vést ke vzniku hypertenze. Jednou z možných příčin může být porucha v isoenzymu 2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11HSD2). Svědčí o tom práce, ve které byl podáván nespecifický inhibitor steroidních dehydrogenas glycyrrhetinová kyselina (GA) normotenzním potkanům Wistar-Kyoto (WKY) a u kterých došlo následně k zvýšení krevního tlaku [253, 254]. GA tak mohla inhibovat 11HSD2 a způsobit (1) zvýšenou aktivaci mineralokortikoidních receptorů (MR) glukokortikoidem nebo (2) vyvolat vasokonstrikci. V případě zvýšené aktivace MR glukokortikoidními hormony (např. v ledvině), které jsou nedostatečně odbourávány na méně účinné 11-oxo deriváty, se tak mohly projevit stejné příznaky jako u tzv. syndromu zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku (kap. 2.6.5.2). V druhém případě mohlo dojít přímo k ovlivnění vaskulárního tonu díky lokálním změnám v koncentraci glukokortikoidů. Bylo totiž prokázáno, že glukokortikoidy potencují vasokonstrikci vyvolanou např. angiotenzinem II a katecholaminy [27, 28]. Tato vasokonstrikce byla navíc vyšší v přítomnosti inhibitorů 11HSD2. Naproti tomu 11-oxo deriváty glukokortikoidů vykazovaly nižší kontraktilní odpověď v případě inhibice 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1 (11HSD1) zřejmě díky nižší konverzi 11-oxo derivátů na účinné glukokortikoidy [189, 190]. Také bylo ukázáno, že inhibice 11HSD2 v cévách vede k zvýšení glukokortikoidem indukované vazby angiotenzinu II na příslušné receptory [255]. Je tedy pravděpodobné, že snížená aktivita 11HSD2 by mohla být spojena s hypertenzí u experimentálních zvířat, jako jsou spontánně hypertenzní potkan (SHR) a Dahlův potkan citlivý k zvýšenému příjmu soli (DS) držený na vysokosolné dietě (DS-HS). Navíc je známo, že vznik hypertenze je pohlavně závislý [231, 233] avšak příčiny tohoto pohlavního rozdílu nejsou zatím zřejmé. Jelikož oba isoenzymy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11HSD) jsou regulovatelné pohlavními hormony [7], mohly by právě tyto steroidní dehydrogenasy hrát roli v rozvoji pohlavně asociované hypertenze .

Výsledky naší práce ukázaly pohlavní rozdíly v aktivitě 11HSD. Naměřená aktivita v tkáňových řezech i v tkáňových homogenátech představovala díky nastaveným reakčním podmínkám aktivitu 11HSD2, neboť tento isoenzym je NAD⁺-dependentní a *in vivo* katalyzuje pouze oxidaci kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron [7]. V ledvině, aortě i

tračnicku byla aktivita 11HSD2 vyšší u samců nežli u samic a navíc stejné výsledky byly získány při měření aktivity v tkáňových homogenátech i v tkáňových řezech. Pohlavní rozdíly byly patrné u jednotlivých hypertenzních i normotenzních kmenů potkanů avšak výjimku tvořila aorta jak u SHR tak i u WKY potkanů a tračnicku u WKY potkanů. V těchto třech případech nebyly pohlavní rozdíly zaznamenány.

Výsledky jsou v souladu s nálezy z myší ledviny a tračnicku, kde aktivita i mRNA 11HSD2 byla také vyšší u samců nežli u samic [236]. Naopak v ledvině potkana nebyl nalezen žádný významný pohlavní rozdíl v konverzi kortikosteronu v přítomnosti kofaktoru NAD^+ [235]. Je ovšem zajímavé, že v této studii byla u samců zaznamenaná přibližně stejná aktivita 11HSD v přítomnosti NAD^+ i bez přidaného kofaktoru. Bez použití kofaktoru byla aktivita 11HSD přibližně 4× vyšší u samců nežli u samic a přidání kofaktoru NAD^+ do reakční směsi potencovalo aktivitu 11HSD2 pouze u samic. Jelikož se ale jednalo o tkáňový homogenát, tak se nedá jednoznačně určit, která isoforma 11HSD byla za tuto basální konverzi, tedy konverzi bez přidaného kofaktoru, zodpovědná. Rozpor s našimi výsledky může být způsoben i použitím jiného kmene potkana („Sprague-Dawley“) a může se tak jednat o kmenově závislé rozdíly. O kmenových rozdílech se ovšem nedá už hovořit v případě porovnávání výsledků přímo s Dahlovými potkany. Bylo zjištěno, že hladina mRNA 11HSD2 v ledvině není odlišná u samců a samic [256]. Tyto výsledky hovoří ovšem o hladině mRNA, která nemusí vždy korelovat s enzymovou aktivitou.

Sexuální dimorfismus byl jednoznačně prokázán v 11HSD1. Bylo naměřeno, že aktivita jaterní 11HSD1 je vyšší u samců nežli u samic zřejmě díky estrogenům, které aktivitu 11HSD1 snižují [257]. I hladina mRNA 11HSD1 byla v játrech 18× vyšší u samců nežli u samic, v ledvině pouze 1,4× [235]. Je znám účinek pohlavních steroidních hormonů a růstového hormonu i na 11HSD2, a tak nelze vyloučit, že právě tyto hormony jsou zodpovědné za pohlavně asociované rozdíly v aktivitě 11HSD2 [92, 235, 257, 258].

Bylo prokázáno, že samice hypertenzních potkanů (studováno u kmene „New Zealand hypertensive rats“) vylučují více Na^+ , K^+ a Cl^- ve srovnání s hypertenzními samci a normotenzními samicemi. Toto zvýšení u samic je doprovázeno nižší koncentrací aldosteronu a naopak vyšší koncentrací kortikosteronu v plazmě [259]. Naše výsledky vylučují, že by tento rozdíl mohl být způsoben pohlavními rozdíly v 11HSD2. Pokud uvážíme, že 11HSD2 hraje roli v prerreceptorové modifikaci glukokortikoidů a zabraňuje jejich vazbě na MR, je zřejmé, že nižší aktivita tohoto isoenzymu vede k zvýšené aktivaci

MR a následnému zvýšenému vychytávání Na^+ v ledvině. Nižší aktivita 11HSD2 u samic oproti samcům tudíž nevysvětluje vyšší vylučování Na^+ ledvinami. Pokud bychom ale připustili, že glukokortikoidy mohou s MR vytvářet neaktivní komplex stejně jako se předpokládá v srdci, pak by vyšší aktivita u samců naznačovala zvýšenou schopnost degradace glukokortikoidů v tkáni, následně pak zvýšenou aktivaci MR aldosteronem, zvýšenou retenci Na^+ a možnost rozvoje hypertenze. Pro platnost této druhé teorie v ledvině a tračniku chybí ovšem jakékoliv důkazy.

Rozdíly v aktivitě 11HSD2 nalezené v ledvinové dřeni mezi spontánně hypertenzním potkanem (SHR) a normotenzním WKY se neshodovaly s výší krevního tlaku, ačkoliv je známo, že hypertenzní potkani (SHR i DS) vylučují méně Na^+ [260, 261]. Snížené vylučování Na^+ by teoreticky mohlo být spojeno s nižší aktivitou 11HSD2 v ledvině, ovšem naše výsledky prokázaly naopak vyšší aktivitu u hypertenzních potkanů SHR. I z dalších výsledků je zřejmé, že 11HSD2 v ledvině nehraje roli v patogenezi hypertenze SHR potkanů. Nebyly nalezeny ani žádné rozdíly v ledvině Dahlových potkanů. To souhlasí s výsledky i jiných autorů, kteří nenašli žádné významné změny v hladině mRNA 11HSD2 mezi Dahlovými potkany [256]. Ani studie u lidí neukázala, že by snížená aktivita 11HSD2 přispívala ke zvýšení krevního tlaku po zvýšeném příjmu soli [262]. Změny ve vylučování Na^+ u hypertenzních potkanů budou mít tudíž jiný zřejmě genetický podklad. Na druhou stranu byl přinejmenším v jedné práci popsán kmenový rozdíl v 11HSD2 mezi Dahlovými potkany („Dahl-Iwai rats“). V této práci byla u DS-HS potkanů nalezena významně nižší enzymová aktivita a hladina mRNA 11HSD2 oproti Dahlovým potkanům rezistentním k zvýšenému příjmu soli také držených na vysokosolné dietě (DR-HS) a DS potkanům na nízkosolné dietě (DS-LS). Toto snížení bylo doprovázeno i zvýšeným poměrem vylučovaného kortikosteronu/11-dehydrokortikosteronu [263].

Podobnou situaci jako v ledvině bylo možné pozorovat i v tračniku. Zatímco mezi kmene SHR a WKY byly patrné kmenové rozdíly, mezi Dahlovými potkany nebyly žádné rozdíly prokázány. Potkani kmene SHR tak byli schopni více metabolizovat kortikosteron na 11-dehydrokortikosteron nežli normotenzní kmen WKY, což v důsledku může vést k zajištění vyšší selektivity MR pro aldosteron u SHR potkanů. Ani v tomto případě se nalezené rozdíly neshodovali s výškou krevního tlaku.

V aortě byly zaznamenány jak kmenové tak i pohlavní rozdíly v aktivitě 11HSD2. Aktivita byla vyšší u samic obou studovaných kmenů Dahlových potkanů a zároveň vyšší

u samců i samic potkana DR-HS nežli u hypertenzního potkana DS-HS. Tyto výsledky se shodují s již dřívějším pozorováním u Dahlových potkanů („Dahl-Iwai rats“). I zde byla pozorována nižší aktivita a dokonce i hladina mRNA 11HSD2 u DS-HS potkanů [263, 264]. Vyšší aktivita 11HSD2 v aortě samců DS-HS potkanů nevysvětluje zvýšenou predispozici samců k rozvoji hypertenze. Uvážíme-li, že vyšší aktivita tohoto isoenzymu způsobuje zvýšené odbourávání glukokortikoidů, je zřejmé, že nižší lokální koncentrace glukokortikoidů u samců by mohla méně potencovat vazokonstrikční účinky např. noradrenalinu či angiotenzinu II. Patogeneze solné hypertenze u Dahlových potkanů není zatím zřejmá, ovšem je možné, že významnou roli v tomto procesu bude hrát právě 11HSD2 v cévách [255, 263-267]. Snížená konverze glukokortikoidů u DS-HS oproti DR-HS potkanům na méně účinné 11-oxo deriváty může vést k zvýšení lokální koncentrace glukokortikoidů, a tak i k ovlivnění působení vazokonstrikčních látek [27, 28].

Mechanismus interakce 11HSD2 a vaskulárního tonu není v současnosti objasněn. Je ale známo, že prostaglandiny, významné vazokonstrikční faktory uvolňované z endotelu, jsou inhibitory 11HSD2 [148]. Z endotelu jsou uvolňovány také další vasoaktivní mediátory (endotelin-1, NO), které jsou zapojeny nejen do regulace vaskulárního tonu ale i cévní struktury [268-270]. K stimulaci exprese endotelinu a k snížení hladiny NO v cévách potkanů (zřejmě jako následek snížení hladiny NO-syntasy (NOS)) vedlo intraperitoneální podávání GA [253], což je významný inhibitor i obou isoenzymů 11HSD. Naše výsledky ukázaly nižší aktivitu 11HSD2 v aortě Dahlových potkanů DS a je známo, že tyto potkani mají i nižší hladinu jak inducibilní tak i endoteliální NOS v aortě nežli potkani DR. Mimoto hladina obou NOS je významně nižší u potkanů držených na vysokosolné dietě [271]. Nižší aktivita 11HSD2 u DS potkanů by tak mohla být spojena nejen s vyšší lokální koncentrací glukokortikoidů, ale i s nižší hladinou NO v cévách a ve svém důsledku s menšími vasodilatačními schopnostmi. Bylo také prokázáno, že samotná inhibice NOS u DR potkanů způsobuje sůl-senzitivní hypertenzi u těchto potkanů [272], avšak účinek NO na 11HSD2 přímo v aortě není zatím znám.

Závěrem lze říci, že aktivita 11HSD2 byla významně vyšší u samců oproti samicím. Jelikož tento isoenzym funguje jako dehydrogenasa a tudíž snižuje lokální koncentraci glukokortikoidů, je nepravděpodobné, že by byl přímo zapojen do procesu vzniku pohlavně-asociované hypertenze. Nicméně, výsledky z aorty DS potkanů naznačující nižší inaktivaci kortikosteronu v této tkáni oproti DR potkanům. Narušená aktivita 11HSD2 by

mohla potencionálně hrát roli v regulaci vaskulárního tonu a tím i krevního tlaku u DS potkanů.

6.2.11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v placentě

V současné době je dáván velký význam prenatálnímu působení různých faktorů na vyvíjející se plod. Jedním z negativních faktorů může být i nadměrný přísun glukokortikoidů, který je často spojován do souvislosti s nižší porodní váhou a rozvojem hypertenze v pozdějších stádiích života [239]. Souhra obou isoenzymů 11HSD, které jsou v placentě exprimovány [7, 16, 17], by tak mohla hrát významnou roli nejen v regulaci lokální koncentrace glukokortikoidních hormonů v placentě, ale i v přestupu těchto hormonů z těla matky do plodu.

Naše výsledky prokázaly významné změny v hladině mRNA i proteinu obou isoenzymů 11HSD během vývoje placenty. Vysoká hladina mRNA 11HSD2 ve 13. dni březosti (D13) a proteinu v D14 svědčí o vysoké ochraně plodu v této fázi vývoje. Bohužel tyto výsledky neodráží pouze stav v placentě, ale i v děloze (*decidua basalis*), která je v této fázi vývoje (D13 i D14) pevně s placentou spojena. Oba isoenzymy se v děloze exprimují a podléhají vývojovým změnám v průběhu gravidity [39, 143]. Nelze tedy vyloučit vysokou expresi obou isoenzymů ani v *decidua basalis*. Nicméně výsledky z imunohistochemického stanovení ukázaly malý signál pro 11HSD2 v *decidua basalis* oproti placentě. Bohužel pro 11HSD1, jejíž exprese byla také vysoká v D13, není v současné době komerčně dostupná protilátka, která by určila její lokalizaci v tkáni.

Měření mRNA a enzymových aktivit byly již dříve demonstrovány změny 11HSD v placentě potkanů a to odděleně v labyrintové a basální zóně placenty. Bylo zjištěno, že zatímco exprese a aktivita 11HSD1 vzrůstá v labyrintové zóně (studováno v D16, D19 a D22) a klesá v basální zóně placenty směrem ke konci gestace, 11HSD2 vykazuje opačný trend. V labyrintové zóně v D22 došlo k snížení aktivity a hladiny mRNA 11HSD2 oproti D16 případně D19. Naopak v basální zóně došlo k zvýšení exprese tohoto isoenzymu [17, 143]. Naše měření (RT-PCR a „western blotting“) proběhlo na celých placentách a není tedy možné je srovnávat přímo s výše zmíněnými nálezy. Avšak je možné, že nárůst v basální zóně je vyrovnán poklesem v zóně labyrintové a na úrovni celé placenty nemusí být změny patrné. Žádné markantní změny 11HSD2 nebyly pozorovány ani pomocí imunohistochemie. Pro „downregulaci“ 11HSD2 směrem ke konci gestace svědčí pouze nižší hladina proteinu 11HSD2 v D22 oproti D19 a případně nižší oxidasová

aktivita u Dahlových potkanů v D20 oproti D16. Ke konci gestace, kdy dosahuje hladina mateřských glukokortikoidů maxima [273], může docházet ke zvýšenému přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu. Na druhou stranu plod může v tomto období už sám regulovat hladinu glukokortikoidů, jelikož je u něj již plně vyvinutá hypothalamo-hypofyzární-nadledvinová osa [274].

Je zřejmé, že oba isoenzymy jsou exprimovány také v basální zóně placenty [17, 143], která je hlavním místem syntézy placentárních hormonů. Funkcí obou isoenzymů v této části placenty je zřejmě modulace účinku glukokortikoidních a případně mineralokortikoidních hormonů přes příslušné receptory. Zatímco GR byl pomocí *in situ* hybridizace nalezen v obou placentárních zónách (v D16, D19 a D22), přítomnost MR u potkana nebyla zatím prokázána vůbec [17]. U člověka byla přítomnost MR prokázána pouze v *syncytiotrofoblastu* placenty a tudíž se zdá, že kromě regulace přestupu mateřských glukokortikoidů může 11HSD2 regulovat i transplacentární transport elektrolytů a vody [151, 275].

Studium souvislosti mezi rozvojem hypertenze a placentární 11HSD vycházelo z epidemiologických studií, které ukázaly, že nízká porodní váha a zvětšená placenta je spojena s větším rizikem rozvoje hypertenze v dospělosti jedince [239, 240, 276]. Jiné práce dokázaly, že zvýšený přestup glukokortikoidů z matky do plodu má také za následek zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních chorob v dospělosti [243-245, 277], avšak jiné práce tento názor vyvracejí [278]. U potkanů, kterým byl podáván inhibitor 11HSD karbenoxolon (CBX) a dexametason, syntetický glukokortikoid slabě metabolizovatelný 11HSD2, bylo možné pozorovat snížení porodní váhy a zvýšení krevního tlaku v dospělosti zvířete [243-245, 277]. Některé studie na placentě potkana, prasete a člověka ukázaly korelaci mezi aktivitou placentární 11HSD a hmotností placenty případně hmotností novorozence [135, 244, 279]. V souvislosti s podáváním CBX a dexametasonu je také důležité uvážit významný úbytek hmotnosti samic [243, 245], protože sama kachexie během gestace zřejmě vede k retardaci růstu a vzniku hypertenze [280]. Omezení proteinů ve výživě o 50 % u potkanů v době březosti má za následek nižší porodní hmotnost, snížení hladiny mRNA 11HSD2 v placentě (studováno v D14 a D20) a následně také v ledvině dospělého jedince [281, 282]. Na základě těchto skutečností vyvstává do popředí otázka, zda březost u hypertenzních kmenů potkanů je spojena s nízkou aktivitou placentární 11HSD. Tato hypotéza je podpořena nálezy o nízké porodní váze a větší placentě u SHR oproti WKY potkanům [283].

Naše výsledky ukázaly, že ani oxidasová aktivita (inaktivace kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron) ani hladina mRNA 11HSD2 nebyla rozdílná mezi hypertenzním kmenem SHR a normotenzním kmenem WKY. Na druhou stranu reduktasová aktivita (konverze 11-dehydrokortikosteronu na kortikosteron) a hladina mRNA 11HSD1 byla výrazně nižší u potkanů SHR. Zatímco hladiny mRNA byly díky specifickým primerům měřeny pro každý isoenzym zvlášť, u měření enzymových aktivit je nutné zvážit působení obou isoenzymů současně. 11HSD1 je schopna katalyzovat oxidaci i redukci 11-hydroxy resp. 11-oxo steroidů, zatímco 11HSD2 katalyzuje pouze oxidaci *in vivo* i *in vitro* [7]. Je tedy zřejmé, že klíčovou otázkou je, jak funguje 11HSD1 v placentě *in vivo*. Pokud katalyzuje oxidaci (11 β -dehydrogenaci), může přispívat k inaktivaci kortikosteronu. Naproti tomu, pokud katalyzuje převážně redukci 11-oxo steroidů, potom by mohla 11HSD1 lokálně zvyšovat hladinu glukokortikoidů. Jelikož jsme nenašli žádné rozdíly v oxidasové aktivitě (tkáňové řezy i tkáňový homogenát), ukazují naše výsledky spíše na druhou možnost. Je patrné, že placenty potkanů WKY mají na konci gestace vyšší kapacitu pro syntézu kortikosteronu z méně účinného 11-dehydrokortikosteronu. To může vést k většímu přestupu glukokortikoidů do plodu nebo zvýšené aktivaci GR v placentě.

U Dahlových potkanů byla situace odlišná. Ani v tomto případě nebyly sice nalezeny žádné kmenové rozdíly (v D16 i D20) v oxidasové aktivitě 11HSD, hladině mRNA a proteinu 11HSD2, ale byly patrné výrazné vývojové rozdíly. V dřívějším stadiu vývoje (D16) byla u hypertenzních potkanů DS-LS hladina mRNA 11HSD2 nižší nežli v D20. Tyto výsledky se neshodovaly s hladinou proteinu, neboť zde nebyly žádné vývojové změny patrné. Vývojové změny byly ale zjištěny při měření oxidasové aktivity, avšak výrazně vyšší aktivita byla naměřena v D16 nežli v D20 u obou Dahlových kmenů potkanů. Kromě toho byl zjištěn markantní vývojový i kmenový rozdíl v hladině mRNA 11HSD1 a reduktasové aktivitě 11HSD. Potkani DS-LS měli významně vyšší hladinu mRNA 11HSD1 v D20 nežli potkani DR-LS a nežli potkani DS-LS v D16. Reduktasová aktivita byla stejně jako oxidasová vyšší v D16 nežli v D20 také u obou Dahlových kmenů. Navíc potkani DS-LS v D20 metabolizovali 11-dehydrokortikosteron více nežli potkani DR-LS. Otázkou je, čím může být tato neshoda mezi hladinou mRNA a aktivitou způsobena. Jedním z vysvětlení by mohla být regulace enzymové aktivity přímo v tkáni. Některé práce dokazují, že 11HSD2 je funkční jako monomer, ale vytváří i neaktivní dimery. U 11HSD1 je to zřejmě naopak. Ta je aktivní jako dimer a neaktivní jako monomer [41, 54]. Je tedy možné, že pouze regulace reverzibilní dimerizace na buněčné

úrovni může ovlivnit aktivitu obou isoenzymů, což ale nemusí mít vliv na hladinu mRNA. To potvrzují i naše předběžné pokusy s dithiothreitem (DTT), který byl přidáván do reakční směsi. V závislosti na koncentraci DTT byl pak pozorován nárůst dehydrogenasové aktivity (výsledky nejsou součástí této dizertační práce). Dalším významným faktorem, by mohl být i samotný rychlý vývoj placenty. U potkanů Wistar je patrné, že vyšší hladině proteinu v D14 předchází vyšší hladina mRNA v D13. Délka březosti u potkanů je přibližně 23 dní a při tak rychlém vývoji placenty nemusí v jednotlivých dnech souhlasit hladina mRNA s množstvím proteinu a ani případně s jeho aktivitou.

Z výsledků je patrné, že jsme nezaznamenali žádný rozdíl, který by naznačoval porušenou placentární bariéru (v podobě 11HSD2) pro glukokortikoidy u hypertenzních potkanů. Nicméně, důležitou roli u těchto potkanů může hrát 11HSD1. Jako jediný enzym je schopen konvertovat méně účinný 11-dehydrokortikosteron na kortikosteron. Tato tvorba aktivních glukokortikoidů *in vivo* v placentě potkanů může být velmi významná, protože koncentrace 11-dehydrokortikosteronu v plazmě je relativně vysoká a zároveň je tento steroid daleko méně vázán na plazmatické proteiny nežli kortikosteron [284]. Experimenty na placentách potkana a paviána ukázaly, že 11HSD1 je spojena s placentární konverzí kortisonu a 11-dehydrokortikosteronu na kortisol resp. kortikosteron [143, 285]. Nicméně naše pokusy na tkáňových řezech placent hypertenzních a normotenzních potkanů naznačují, že převládá oxidace (11 β -dehydrogenace) nad redukcí. Rozdíl těchto aktivit v D20 byl významně nižší u hypertenzního kmene DS-LS nežli u kmene DR-LS, což naznačuje nižší kapacitu inaktivace kortikosteronu u hypertenzního kmene. Mezi kmeny SHR a WKY nebyl patrný žádný rozdíl.

U potkanů ovlivňují glukokortikoidy v poslední třetině gestace vývoj orgánů, které jsou zapojeny do regulace krevního tlaku [286]. Podávání dexametasonu nebo CBX potkanům během této periody gestace vedlo k rozvoji hypertenze v dospělosti mlád'at [150, 243, 277]. Prenatální ovlivnění glukokortikoidy je tedy přinejmenším významné v poslední třetině gestace, ale nelze vyloučit ani ovlivnění i v dřívějších stádiích březosti. Naše data ukazují, že na konci gestace (D20) nehraje placentární 11HSD2 roli v hormonálním „naprogramování“ hypertenze u potomků potkanů kmene SHR a DS. To samé se dá říci i o dřívějším stádiu březosti (D16) u Dahlových potkanů. Naproti tomu nemůže být vyloučeno, že určitý podíl na rozvoji hypertenze má rozdílná exprese 11HSD1. Tento isoenzym je kolokalizován s GR [17] a navíc je známo, že mnoho důležitých

placentárních funkcí, včetně syntézy prostaglandinů, steroidních a peptidových hormonů, je ovlivněno glukokortikoidy [287-289]. Každopádně lokální koncentrace glukokortikoidů může být závislá na aktivitě těchto enzymů.

Demonstrovali jsme, že oba isoenzymy placentární 11HSD podléhají významným vývojovým změnám. 11HSD2 v D16 u DS-LS potkanů a v D20 u DS-LS a SHR potkanů není zřejmě zapojena do procesu „naprogramování“ hypertenze v dospělosti, neboť nebyly zaznamenány žádné rozdíly v hladině mRNA a proteinu 11HSD2 a ani v aktivitě tohoto isoenzymu mezi hypertenzními a normotenzními kmeny. Výrazné rozdíly byly patrné v 11HSD1. Nemůžeme tak vyloučit, že tento faktor v kombinaci s jinými fetálními nebo maternálními faktory (např. faktory, které byly ukázány při reciprokém přenosu embryí u Dahlových [290], ale ne u SHR a WKY potkanů [291]) může být kritický pro rozvoj hypertenze v pozdějším životě.

6.3.11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa v srdci

Naše výsledky jasně prokazují přítomnost obou isoenzymů 11HSD v srdeční tkáni potkana na úrovni mRNA. Zatímco přítomnost 11HSD1 v srdci byla již demonstrována mnoha autory [80, 201, 207, 292], o přítomnosti 11HSD2 se vedly spory. Pomocí *in-situ* hybridizace [205], ribonukleasové protektivní analýzy [201] a měření enzymové aktivity [207] nebyla v srdci potkana prokázána přítomnost tohoto isoenzymu. Naše výsledky jsou v souladu s nedávno provedenou studií u potkanů, která potvrdila přítomnost mRNA 11HSD2 pomocí RT-PCR v reálném čase [206] a s pozorováním u člověka, kde byly také prokázány oba isoenzymy 11HSD. Stejně jako naše výsledky svědčí o nižší expresi 11HSD2 oproti 11HSD1 [2, 29, 194, 204]. Nízká hladina 11HSD2 v srdci tak naznačuje výskyt v minoritních buňkách srdce např. v endotelových buňkách velkých cév nebo v imunitních buňkách [2].

Určité nejasnosti zůstávají i kolem 11HSD1. Sekvence mRNA vymezená primery sice odpovídá sekvenci 11HSD1 z ledviny a jater, avšak enzymaticky jí neodpovídá. NADP⁺-dependentní aktivita zaznamenaná při nízké koncentraci kortikosteronu jako substrátu naznačuje spíše přítomnost jiné formy enzymu či dalšího isoenzymu, který je některými autory označován jako 11HSD3 [57, 58].

Kortikosteroidní hormony hrají jak u člověka tak i u potkana roli při vzniku srdeční hypertrofie a fibrózy [2, 195, 209]. Jak je zajištěno zprostředkování jejich signálu v srdci však jasné zatím není. V kardiomyocytech jsou exprimovány jak glukokortikoidní

(GR) tak i mineralokortikoidní receptory (MR), kdežto v srdečních fibroblastech pouze GR [201]. 11HSD1, která *in vivo* pracuje převážně jako reductasa a tím zvyšuje lokální koncentraci glukokortikoidů, je exprimovaná v srdci novorozeného potkana jak v kardiomyocytech tak i fibroblastech [201], zatímco u dospělého potkana byla detekována pouze ve fibroblastech [80]. Nízká hladina 11HSD2, která v ledvině i tračnicku zajišťuje selektivní vazbu aldosteronu na MR tím, že přeměňuje kortikosteron na méně účinný 11-dehydrokortikosteron, ovšem naznačuje, že MR v srdci nejsou dostatečně nebo v limitním případě nejsou vůbec chráněny před přemírou glukokortikoidů. Uvažuje se o tom, že glukokortikoidy fungují v srdci spíše jako antagonisté nežli jako agonisté MR. Tuto teorii podporuje několik prací. Zaprvé, dvě nedávné studie RALES a EPHEsus ukázaly, že podávání nízkých dávek spironolaktonu, antagonisty MR, lidem se srdečním selháním vede k zlepšení jejich zdravotního stavu [209]. Zadruhé, cílená nadprodukce 11HSD2 přímo v kardiomyocytech myši byla spojena s rozvojem srdeční hypertrofie a fibrózou a vedla k srdečnímu selhání. 11HSD2 tak může u těchto myši snižovat lokální koncentraci glukokortikoidů v srdci a tím povolit aldosteronu ve větší míře aktivovat MR. Eplerenon, selektivní blokátor MR, vedl k zlepšení fenotypu těchto myši [210]. Zatřetí, bylo prokázáno, že potkani s maligní hypertenzí (potkani kmene M-SHRSP („Malignant stroke-prone SHR“)) mají vyšší hladinu mRNA 11HSD2 v srdci nežli potkani normotenzního kmene WKY [206].

Vztah mezi 11HSD a srdeční hypertrofií a fibrózou jsme se snažili objasnit na základě studia dvou hypertenzních kmenů potkanů (SHR, DS), u kterých je hypertenze provázena hypertrofií a remodelací srdce [293-295]. Ačkoliv Konishi et. al. [206] nenašli žádný významný rozdíl v hladině mRNA 11HSD2 mezi kmeny SHR a WKY, z našich výsledků vyplynulo, že SHR potkani mají 2× nižší hladinu mRNA tohoto isoenzymu oproti normotenzním kontrolám WKY. Dá se tedy usoudit, že 11HSD2 nehraje roli v patogenezi vzniku srdeční hypertrofie u SHR potkanů. Expres MR v srdci SHR a WKY potkanů je přibližně stejná [206, 296] a tudíž nižší hladina 11HSD2 svědčí o možnosti zvýšené hladiny neaktivního komplexu MR-glukokortikoid. Zda dojde k aktivaci tohoto komplexu či nikoliv bude vyžadovat další studie. Také byl zaznamenán kmenový rozdíl v hladině mRNA 11HSD2 mezi Dahlovými potkany. U potkanů DR-LS byla exprese vyšší nežli u potkanů DS-LS. Tento rozdíl nebyl ovšem zaznamenán mezi potkany na vysokosolné dietě. Je tedy zřejmé, že nadprodukce 11HSD2 v srdci není nezbytná pro rozvoj srdeční hypertrofie a fibrózy.

Vznik srdeční fibrózy, je komplexní děj na kterém se podílí řada faktorů. V rámci studia 11HSD by tento děj neměl být spojován pouze s aktivací MR, ale spíše s aktivací GR, které jsou spolu s 11HSD1 exprimovány ve fibroblastech. Mezi DS a DR potkany jsme našli významný rozdíl jak v expresi, tak i aktivitě tohoto isoenzymu. Zdá se tedy, že DR potkani jsou schopni efektivněji zvyšovat hladinu glukokortikoidů nežli DS potkani. Vyšší lokální koncentrace glukokortikoidů by se u DR potkanů mohla uplatnit autokrinně při vazbě na GR ve fibroblastech či parakrinně při vazbě na MR a GR v kardiomyocytech. Pokud uvážíme možnost, že glukokortikoidy v srdci působí jako antagonisté MR [209, 210] a ne jako agonisté, tak dostupnost glukokortikoidů a tím vytváření neaktivního komplexu MR-glukokortikoid u DS potkanů může být menší nežli u DR potkanů. Tento výrazný kmenový rozdíl v metabolismu glukokortikoidů v srdci by mohl přispívat k rozdílné citlivosti DS a DR potkanů na příjem soli a přispívat k rozvoji hypertrofie u DS-HS potkanů [293, 297].

U Dahlových potkanů jsme nenašli žádný významný vliv vysokého příjmu soli na aktivitu a mRNA obou isoenzymů srdeční 11HSD i když u DS potkanů došlo k výraznému nárůstu hmotnosti srdce. To je v souladu s pracemi, ve kterých bylo prokázáno, že vysoký příjem soli nemá vliv na metabolismus glukokortikoidů. V ledvině a v játrech nebyl zaznamenán žádný vliv zvýšeného příjmu soli na aktivity 11HSD [77, 298]. Naopak v některých studiích, byl po vysokosolné dietě zaznamenán nárůst aktivity 11HSD1 v ledvině [76] a pokles v aktivitě 11HSD2 v tračnicku [77, 85]. Nicméně Melander et al. [299] nedávno ukázali, že vliv 11HSD na indukci solné hypertenze je bezvýznamný.

Tato studie poukazuje na rozdílný metabolismus glukokortikoidů mezi kmeny potkanů s různou formou hypertenze (SHR, DS). Výsledky ovšem ukázaly, že ani 11HSD2 ani 11HSD1 nepředstavují etiologický faktor, který hraje roli v patofyziologii srdeční hypertrofie.

6.4.11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a metabolický syndrom

Metabolismus glukokortikoidů ve vztahu k metabolickému syndromu, který je doprovázen hypertenzí, obezitou, isulinovou rezistencí, hyperlipidémií, atd., jsme studovali na modelu hypertriglyceridemického kmene potkana (HTG). Tento kmen je znám rozvojem neobězní isulinové rezistence, který je možno prohloubit zvýšeným příjmem sacharidů (sacharosa, fruktosa) [300, 301]. Z výsledků je zřejmé, že HTG potkani mají zvýšenou aktivitu 11HSD1 v játrech. Jejich schopnost intrahepatální regenerace

glukokortikoidů je tak vyšší nežli u obyčejných potkanů Wistar, z kterých byli původně vyšlechtěni. Stejný fenotypový obraz byl pozorován i u myši s cílenou nadprodukcí 11HSD1 v játrech [90]. Otázkou je, zda vyšší aktivita 11HSD1 v játrech může přispívat i ke zvýšení celkové plazmatické hladiny glukokortikoidů. Odpověď je zatím zřejmá u těchto myši, kde nebyly zjištěny žádné rozdíly v plazmatické hladině těchto hormonů oproti netransgením myším, a tudíž je pravděpodobné, že působí pouze autokrinně či parakrinně [90].

Fruktosová dieta vedla ke zvýšení aktivity 11HSD1 pouze v tračníku a v mezenteriálních cévách. Žádný vliv nebyl zaznamenán v játrech, srdci a v ledvině. Mimoto nebyl patrný ani vliv zvýšeného příjmu fruktosy na aktivitu 11HSD2. Vzhledem k tomu, že tato dieta zvyšuje plazmatickou hladinu insulinu, lze předpokládat, že právě insulin by mohl být zodpovědný za tkáňově specifickou stimulaci 11HSD1. Jeho vliv na střevní 11HSD2 i na cévní 11HSD1 je v souladu s dřívějšími studiemi. Bylo zjištěno, že insulin neovlivňuje konverzi kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron katalyzovanou 11HSD2 ve střevě [86], ale má „upregulační“ vliv na hladinu mRNA 11HSD1 v hladkosvalových buňkách cév [192]. Naopak odlišné jsou výsledky z jater, neboť v primární kultuře hepatocytů měl insulin inhibiční vliv na aktivitu 11HSD1 [92] a zároveň „downregulační“ účinek na expresi 11HSD1 [302].

Při interpretaci výsledků z tkáňových homogenátů mezenteriálních cév je důležité zvážit možnou přítomnost zbytků tukové tkáně, ve které je 11HSD1 také exprimovaná. V mezenteriální a ani v subkutánní tukové tkáni nebyl však žádný vliv fruktosové diety na hladinu mRNA patrný, a tak případná kontaminace touto tkání nemůže mít významnější vliv na interpretaci výsledků z mezenteriálních cév.

Stejně jako u myši s nadprodukcí 11HSD1 v játrech [90] tak i u HTG potkanů nebyly zaznamenány žádné známky obezity. Nebyl patrný žádný hmotnostní rozdíl mezi potkany Wistar a HTG a nebyla ani patrná změna hmotnosti po fruktosové dietě. S tím nepřímo souhlasí i námi zjištěná nezměněná hladina mRNA 11HSD1 ve studovaných tukových tkáních. Glukokortikoidy, které mohou být v tukové tkáni pomocí 11HSD1 syntetizovány, stimulují diferenciaci preadipocytů ve vyzrálé adipocyty a ovlivňují tak množství tukové tkáně [174-176, 303]. To bylo patrné také při cílené nadprodukcí 11HSD1 v adipocytech myši, která vedla k vytvoření centrální obezity [182, 215]. Také studie u obézních ZDF potkanů („Zucker Diabetic Fatty Rats“) [214] a některé [213, 304-306], ale ne všechny [307] studie u člověka prokázaly, že obezita je doprovázena zvýšenou

expresí či aktivitou 11HSD1 v tukové tkáni a často naopak sníženou v játrech. Navíc je známo, že insulin neovlivňuje 11HSD1 v lidských tukových buňkách [99].

Z výsledků je také zřejmé, že výrazná hypertenze u HTG potkanů na fruktosové dietě může být daná zvýšenou aktivitou 11HSD1 v cévách. Zvýšená lokální koncentrace glukokortikoidů pak může potencovat účinek řady vasokonstrikčních látek jako jsou noradrenalin a angiotensin-II [27, 28]. Nezodpovězenou otázkou ovšem zůstává, jaké mechanismy vedou ke vzniku hypertenze již u samotných HTG potkanů. Nebyly nalezeny žádné rozdíly v aktivitě 11HSD2 v mineralokortikoidně cílových tkáních (tračník, ledvina) mezi kmeny HTG a Wistar, které by vedly k nadměrné aktivaci mineralokortikoidních receptorů a tím k rozvoji hypertenze. Jednou z možností, jak vysvětlit přidruženou hypertenzi by mohla být zvýšená exprese angiotenzinogenu v játrech, která byla pozorovaná u myši s nadprodukcí jaterní 11HSD1 [90]. Studie přímo na HTG potkanech ale ukázala, že se u těchto potkanů nejedná o renin-dependentní hypertenzi, nýbrž zřejmě o zvýšenou vasokonstrikci závislou na sympatickém nervovém systému [308].

Již v předešlé kapitole (kap. 6.3) byla diskutována možnost přítomnosti jiné formy enzymu 11HSD1 či přítomnosti 11HSD3 v srdci. Tato možnost se nedá vyloučit ani u námi studovaných potkanů (HTG, Wistar). Navíc obdobná NADP⁺-dependentní aktivita zaznamenaná při nízké koncentraci kortikosteronu jako substrátu byla pozorována i v mezenterálních cévách.

Naše výsledky ukázaly významně zvýšenou intrahepatální syntézu glukokortikoidů z jejich méně účinných 11-oxo derivátů u HTG potkanů. Tito potkani tak vedle myši s nadprodukcí jaterní 11HSD1 představují druhý zvířecí model, u kterého je asociovaná „upregulace“ 11HSD1 se vznikem neobězní insulinové rezistence. Zda se jedná o „upregulaci“ na úrovni mRNA či proteinu bude vyžadovat další studii. Dále tato studie prokázala, že aktivitu 11HSD1 v cévách je možné zvýšit vysokým příjmem sacharidů (zřejmě jako následek elevace insulinu), což může mít patofyziologické následky na výši krevního tlaku.

7. ZÁVĚR

Na položené otázky v úvodu studie lze odpovědět takto:

Je vyšší predispozice ke vzniku hypertenze u samců oproti samicím spojena s pohlavně asociovanými rozdíly 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 2 (11HSD2)?

Vyšší predispozice k rozvoji hypertenze u samců Dahlových potkanů citlivých k zvýšenému příjmu soli (DS) a spontánně hypertenzních potkanů (SHR) patrně nesouvisí s rozdíly v aktivitě 11HSD2. Nebyl nalezen žádný důkaz o nižší aktivitě 11HSD2 u samců oproti samicím v mineralokortikoidně cílových tkáních (ledvina, kolon), které by naznačovaly zvýšenou aktivaci mineralokortikoidních receptorů. Ačkoliv výsledky neprokázaly ani pohlavní rozdíly v aktivitě 11HSD2 v aortě, které by vedly k rozdílné modulaci dalších vasokonstrikčních látek, bylo poukázáno na potenciální roli tohoto isoenzymu v cévním systému při regulaci krevního tlaku u Dahlových potkanů.

Existují vývojové změny obou isoenzymů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v placentě potkanů? Mají hypertenzní potkani pozměněnou placentární bariéru pro glukokortikoidy?

V placentě potkanů existují významné vývojové změny jak 11HSD1, tak i 11HSD2. Rozvoj hypertenze není u DS ani u SHR potkanů spojen s porušenou placentární bariérou (v podobě 11HSD2) pro glukokortikoidy, která by vedla k vyššímu přestupu glukokortikoidů z těla matky do plodu. U DS potkanů je ovšem na konci gestace významně zvýšená exprese 11HSD1, která *in vivo* zvyšuje hladinu glukokortikoidů. U tohoto kmene může tudíž docházet ke zvýšenému přestupu glukokortikoidů do plodu díky 11HSD1 spíše než k jejich nedostatečnému odbourávání pomocí 11HSD2.

Lze detekovat oba isoenzymy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v srdeční tkáni potkana? Je srdeční hypertrofie během hypertenze spojena se změnami obou isoenzymů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy v srdci?

V srdeční tkáni jsou sice exprimovány oba isoenzymy 11HSD, ale 11HSD2 několikanásobně méně nežli 11HSD1. Hypertrofie srdce u DS ani u SHR potkanů

nesouvisí s rozdíly v 11HSD jelikož v žádném případě nebyla hypertrofie provázená „upregulací“ 11HSD2 případně „downregulací“ 11HSD1. Nicméně z výsledků je patrné, že lokální koncentrace glukokortikoidů v srdci může být vyšší u DR nežli u DS potkanů.

Existují rozdíly v metabolismu glukokortikoidů u potkanů, jejichž fenotyp odráží metabolický syndrom?

U hypertriglyceridemického kmene potkana, u něhož dochází k prohloubení neoběžní insulinové rezistence po zvýšeném příjmu fruktosy, jsme prokázali významně vyšší intrahepatální aktivitu 11HSD1 a tím i schopnost regenerace glukokortikoidů z jejich 11-oxo derivátů. Navíc byl prokázán vliv fruktosové diety na aktivitu cévní 11HSD1, která tak může hrát roli v rozvoji hypertenze u těchto potkanů. U těchto potkanů nebyl na druhou stranu pozorován žádný rozdíl v odbourávání glukokortikoidů pomocí 11HSD2.

Tato práce svědčí o významné roli prereceptorového metabolismu glukokortikoidů v cílových tkání. Porušení rovnováhy mezi syntézou a odbouráváním glukokortikoidů v tkáni může vést k patofyziologickým stavům jako je např. rozvoj hypertenze a neoběžní insulinová rezistence. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 (11HSD1) a typu 2 (11HSD2), které jsou za tento prereceptorový metabolismus zodpovědné, by mohly být v budoucnu jedním z cílů terapie.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] R. Murray, D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell, Harperova biochemie. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1998.
- [2] K.E. Sheppard, Corticosteroid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and the heart, *Vitam. Horm.* 66 (2003) 77-112.
- [3] E.P. Gomez-Sanchez, C.E. Gomez-Sanchez, Central hypertensinogenic effects of glycyrrhizic acid and carbenoxolone, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 263 (6) (1992) E1125-E1130.
- [4] K. Hierhorzer, H. Bühler, Metabolism of cortical steroid hormones and general mode of action, V: R. Greger, U. Windhorst (Eds.), *Comprehensive Human Physiology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996, s. 403-429.
- [5] H. Jornvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery, D. Ghosh, Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry* 34 (18) (1995) 6003-6013.
- [6] W.L. Duax, J.F. Griffin, D. Ghosh, The fascinating complexities of steroid-binding enzymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (6) (1996) 813-823.
- [7] P.M. Stewart, Z.S. Krozowski, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Vitam. Horm.* 57 (1999) 249-324.
- [8] T.M. Penning, Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldoketo reductases. Lessons from 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69 (1) (1999) 211-225.
- [9] T.M. Penning, H. Ma, J.M. Jez, Engineering steroid hormone specificity into aldoketo reductases, *Chem. Biol. Interact.* 130-132 (1-3) (2001) 659-671.
- [10] P. Pongsawasdi, B.M. Anderson, Kinetic studies of rat ovarian 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* 799 (1) (1984) 51-58.
- [11] R.C. Strickler, B. Tobias, D.F. Covey, Human placental 17 beta-estradiol dehydrogenase and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Two activities at a single enzyme active site, *J. Biol. Chem.* 256 (1) (1981) 316-321.
- [12] F. Sato, Y. Takagi, M. Shikita, 20-hydroxysteroid dehydrogenase of porcine testes, *J. Biol. Chem.* 247 (3) (1972) 815-823.
- [13] C. Matthijssen, J.E. Mandel, P.T. Seiden, Separation of a purified adrenal 20 alpha-hydroxy-steroid dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* 89 (1964) 363-364.

- [14] M. Vylitova, I. Miksik, J. Pacha, Metabolism of corticosterone in mammalian and avian intestine, *Gen. Comp. Endocrinol.* 109 (3) (1998) 315-324.
- [15] J.A. DiBattista, A.Z. Mehdi, T. Sandor, Steroid C-20 oxidoreductase activity of duck intestinal mucosa: the interrelations of the enzymatic activity with steroid binding, *Gen. Comp. Endocrinol.* 74 (1) (1989) 136-147.
- [16] G.J. Pepe, M.G. Burch, E.D. Albrecht, Expression of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 proteins in human and baboon placental syncytiotrophoblast, *Placenta* 20 (7) (1999) 575-582.
- [17] B.J. Waddell, R. Benediktsson, R.W. Brown, J.R. Seckl, Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action, *Endocrinology* 139 (4) (1998) 1517-1523.
- [18] I.J. Bujalska, S. Kumar, P.M. Stewart, Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?, *Lancet* 349 (9060) (1997) 1210-1213.
- [19] H.J. Hubener, D.K. Fukushima, T.F. Gallagher, Substrate specificity of enzyme reducing the 11- and 20-keto groups of steroid, *J. Biol. Chem.* 220 (2) (1956) 499-511.
- [20] Z.S. Krozowski, J.W. Funder, Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80 (19) (1983) 6056-6060.
- [21] J.W. Funder, P.T. Pearce, R. Smith, A.I. Smith, Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated, *Science* 242 (4878) (1988) 583-585.
- [22] C.R. Edwards, P.M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M.A. McIntyre, W.S. Sutanto, E.R. de Kloet, C. Monder, Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor, *Lancet* 2 (8618) (1988) 986-989.
- [23] J.W. Funder, P.T. Pearce, K. Myles, L.P. Roy, Apparent mineralocorticoid excess, pseudohypoaldosteronism, and urinary electrolyte excretion: toward a redefinition of mineralocorticoid action, *FASEB J.* 4 (14) (1990) 3234-3238.
- [24] T. Sandor, E. Skadhauge, J.A. DiBattista, A.Z. Mehdi, Interrelation of the intestinal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor systems with salt homeostasis. V: M.R. Hughes, A. Chadwick (Eds.), *Progress in avian osmoregulation*, Leeds

Philosophical and Literary Society, Leeds, 1989, s. 305-332.

- [25] P. Karlson, W. Gerok, W. Gross, *Pathobiochemie*, Academia, Praha, 1987.
- [26] G. Vinson, J. Hinson, P.W. Raven, The relationship between tissue preparation and function; methods for the study of control of aldosterone secretion: A review, *Cell Biochem. Funct.* 3 (1985) 235-253.
- [27] M. Pirpiris, K. Sudhir, S. Yeung, G. Jennings, J.A. Whitworth, Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans, *Hypertension* 19 (6) (1992) 567-574.
- [28] B.R. Walker, B.C. Williams, Corticosteroids and vascular tone: mapping the messenger maze, *Clin. Sci. (Lond)* 82 (6) (1992) 597-605.
- [29] S.H. Slight, V.K. Ganjam, C.E. Gomez-Sanchez, M.Y. Zhou, K.T. Weber, High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 (4) (1996) 781-787.
- [30] J.W. Funder, Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation, *Mol. Cell. Endocrinol.* 217 (1-2) (2004) 263-269.
- [31] V. Lakshmi, C. Monder, Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta-dehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex, *Endocrinology* 123 (5) (1988) 2390-2398.
- [32] A. Odermatt, P. Arnold, A. Stauffer, B.M. Frey, F.J. Frey, The N-terminal anchor sequences of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane, *J. Biol. Chem.* 274 (40) (1999) 28762-28770.
- [33] A. Blum, A. Raum, H. Martin, E. Maser, Human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1/carbonyl reductase: additional domains for membrane attachment?, *Chem. Biol. Interact.* 130-132 (1-3) (2001) 749-759.
- [34] A.K. Agarwal, M.T. Tusie-Luna, C. Monder, P.C. White, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase using recombinant vaccinia virus, *Mol. Endocrinol.* 4 (12) (1990) 1827-1832.
- [35] A.K. Agarwal, C. Monder, B. Eckstein, P.C. White, Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta-dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 264 (32) (1989) 18939-18943.
- [36] G.M. Tannin, A.K. Agarwal, C. Monder, M.I. New, P.C. White, The human gene for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Structure, tissue distribution, and

- chromosomal localization, *J. Biol. Chem.* 266 (25) (1991) 16653-16658.
- [37] S.C. Low, K.E. Chapman, C.R. Edwards, J.R. Seckl, 'Liver-type' 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase cDNA encodes reductase but not dehydrogenase activity in intact mammalian COS-7 cells, *J. Mol. Endocrinol.* 13 (2) (1994) 167-174.
- [38] J.R. Seckl, B.R. Walker, Minireview: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action, *Endocrinology* 142 (4) (2001) 1371-1376.
- [39] A.E. Michael, L.M. Thurston, M.T. Rae, Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes, *Reproduction* 126 (4) (2003) 425-441.
- [40] T.M. Penning, Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases, *Endocr. Rev.* 18 (3) (1997) 281-305.
- [41] E. Maser, B. Volker, J. Friebertshausen, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase, *Biochemistry* 41 (7) (2002) 2459-2465.
- [42] Y. Kotelevtsev, M.C. Holmes, A. Burchell, P.M. Houston, D. Schmall, P. Jamieson, R. Best, R. Brown, C.R. Edwards, J.R. Seckl, J.J. Mullins, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94 (26) (1997) 14924-14929.
- [43] S. Kong, R.A. McKinnon, B. Mojarrabi, I. Stupans, Absence of type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme in koala liver, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131 (1) (2002) 39-50.
- [44] C. Monder, V. Lakshmi, Corticosteroid 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in vertebrate liver, *Steroids* 52 (5-6) (1988) 515-528.
- [45] E. Rusvai, A. Naray-Fejes-Toth, A new isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells, *J. Biol. Chem.* 268 (15) (1993) 10717-10720.
- [46] R.W. Brown, K.E. Chapman, P. Murad, C.R. Edwards, J.R. Seckl, Purification of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 from human placenta utilizing a novel affinity labelling technique, *Biochem. J.* 313 (3) (1996) 997-1005.
- [47] K.X. Li, V.R. Obeyesekere, Z.S. Krozowski, P. Ferrari, Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11 beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase type 2 enzyme, *Endocrinology* 138 (7) (1997) 2948-2952.
- [48] M.Y. Zhou, E.P. Gomez-Sanchez, D.L. Cox, D. Cosby, C.E. Gomez-Sanchez, Cloning, expression, and tissue distribution of the rat nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Endocrinology* 136 (9) (1995) 3729-3734.
- [49] A.K. Agarwal, T. Mune, C. Monder, P.C. White, NAD(+)-dependent isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Cloning and characterization of cDNA from sheep kidney, *J. Biol. Chem.* 269 (42) (1994) 25959-25962.
- [50] A.L. Albiston, V.R. Obeyesekere, R.E. Smith, Z.S. Krozowski, Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme, *Mol. Cell. Endocrinol.* 105 (2) (1994) R11-R17.
- [51] A.K. Agarwal, F.M. Rogerson, T. Mune, P.C. White, Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (type 2) isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Genomics* 29 (1) (1995) 195-199.
- [52] A. Naray-Fejes-Toth, G. Fejes-Toth, Subcellular localization of the type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. A green fluorescent protein study, *J. Biol. Chem.* 271 (26) (1996) 15436-15442.
- [53] V.R. Obeyesekere, K.X. Li, P. Ferrari, Z. Krozowski, Truncation of the N- and C-terminal regions of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme and effects on solubility and bidirectional enzyme activity, *Mol. Cell. Endocrinol.* 131 (2) (1997) 173-182.
- [54] E.P. Gomez-Sanchez, V. Ganjam, Y.J. Chen, Y. Liu, S.A. Clark, C.E. Gomez-Sanchez, The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 exists as an inactive dimer, *Steroids* 66 (11) (2001) 845-848.
- [55] A. Odermatt, P. Arnold, F.J. Frey, The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *J. Biol. Chem.* 276 (30) (2001) 28484-28492.
- [56] E.H. Rabbitt, J. Ayuk, K. Boelaert, M.C. Sheppard, M. Hewison, P.M. Stewart, N.J. Gittoes, Abnormal expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pituitary adenomas: a prereceptor determinant of pituitary cell proliferation, *Oncogene* 22 (11) (2003) 1663-1667.
- [57] E.P. Gomez-Sanchez, V. Ganjam, Y.J. Chen, D.L. Cox, M.Y. Zhou, S. Thanigaraj,

- C.E. Gomez-Sanchez, The sheep kidney contains a novel unidirectional, high affinity NADP(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD-3), *Steroids* 62 (5) (1997) 444-50.
- [58] R.S. Ge, H.B. Gao, V.L. Nacharaju, G.L. Gunsalus, M.P. Hardy, Identification of a kinetically distinct activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, *Endocrinology* 138 (6) (1997) 2435-2442.
- [59] S. Kataoka, A. Kudo, H. Hirano, H. Kawakami, T. Kawano, E. Higashihara, H. Tanaka, F. Delarue, J.D. Sraer, T. Mune, Z.S. Krozowski, K. Yan, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is expressed in the human kidney glomerulus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2) (2002) 877-882.
- [60] A.S. Brem, B. Bina, K.L. Matheson, J.L. Barnes, D.J. Morris, Developmental changes in rat renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Kidney Int.* 45 (3) (1994) 679-683.
- [61] G. Hirasawa, H. Sasano, T. Suzuki, J. Takeyama, Y. Muramatu, K. Fukushima, N. Hiwatashi, T. Toyota, H. Nagura, Z.S. Krozowski, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (4) (1999) 1453-1458.
- [62] A. Thompson, V.K. Han, K. Yang, Differential expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 mRNA and glucocorticoid receptor protein during mouse embryonic development, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88 (4-5) (2004) 367-375.
- [63] R. Lecybyl, B. Rubis, Z. Krozowski, W.H. Trzeciak, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II expression in the renal epithelial cells, *Endocr. Res.* 29 (2) (2003) 211-216.
- [64] C. Leckie, K.E. Chapman, C.R. Edwards, J.R. Seckl, LLC-PK1 cells model 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 regulation of glucocorticoid access to renal mineralocorticoid receptors, *Endocrinology* 136 (12) (1995) 5561-5569.
- [65] E.P. Gomez-Sanchez, V. Ganjam, Y.J. Chen, Y. Liu, M.Y. Zhou, C. Toroslu, D.G. Romero, M.D. Hughson, A. de Rodriguez, C.E. Gomez-Sanchez, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the rat kidney by estradiol, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2) (2003) E272-E279.
- [66] K.X. Li, R.E. Smith, P. Ferrari, J.W. Funder, Z.S. Krozowski, Rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme is expressed at low levels in the

- placenta and is modulated by adrenal steroids in the kidney, *Mol. Cell. Endocrinol.* 120 (1) (1996) 67-75.
- [67] I. Bujalska, M. Shimojo, A. Howie, P.M. Stewart, Human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue, *Steroids* 62 (1) (1997) 77-82.
- [68] F.H. Perschel, H. Buhler, K. Hierholzer, Bile acids and their amidates inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase obtained from rat kidney, *Pflugers Arch.* 418 (6) (1991) 538-543.
- [69] P.J. Nolan, M.A. Knepper, R.K. Packer, Inhibition of IMCD 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by low pH and acute acid loading, *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 (4) (1997) 530-534.
- [70] P.M. Stewart, A.M. Wallace, S.M. Atherden, C.H. Shearing, C.R. Edwards, Mineralocorticoid activity of carbenoxolone: contrasting effects of carbenoxolone and liquorice on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man, *Clin. Sci. (Lond)* 78 (1) (1990) 49-54.
- [71] C.B. Whorwood, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, Licorice inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels and potentiates glucocorticoid hormone action, *Endocrinology* 132 (6) (1993) 2287-2292.
- [72] Y. Shimoyama, K. Hirabayashi, H. Matsumoto, T. Sato, S. Shibata, H. Inoue, Effects of glycyrrhetic acid derivatives on hepatic and renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (6) (2003) 811-817.
- [73] J. Pacha, R. Vagnerova, J. Bryndova, Carbenoxolone accelerates maturation of rat intestine, *Pediatr. Res.* 53 (5) (2003) 808-813.
- [74] M. Bicikova, M. Hill, R. Hampl, L. Starka, Inhibition of rat renal and testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by some antihypertensive drugs, diuretics, and epitestosterone, *Horm. Metab. Res.* 29 (9) (1997) 465-468.
- [75] G. Escher, K.V. Meyer, B.S. Vishwanath, B.M. Frey, F.J. Frey, Furosemide inhibits 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vitro and in vivo, *Endocrinology* 136 (4) (1995) 1759-1765.
- [76] A.S. Brem, R.B. Bina, T. King, M.C. Chobanian, D.J. Morris, Influence of dietary sodium on the renal isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 214 (4) (1997) 340-345.

- [77] R. Norregaard, T.R. Uhrenholt, C. Bistrup, O. Skott, B.L. Jensen, 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.* 285 (2) (2003) F348-F358.
- [78] R.E. Smith, K.X. Li, R.K. Andrews, Z. Krozowski, Immunohistochemical and molecular characterization of the rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme, *Endocrinology* 138 (2) (1997) 540-547.
- [79] K. Kato, H. Sasano, S. Ohara, H. Sekine, S. Mochizuki, T. Mune, K. Yasuda, H. Nagura, T. Shimosegawa, T. Toyota, Z. Krozowski, Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in human gastric mucosa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (7) (1999) 2568-2573.
- [80] P.S. Brereton, R.R. van Driel, F. Suhaimi, K. Koyama, R. Dilley, Z. Krozowski, Light and electron microscopy localization of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme in the rat, *Endocrinology* 142 (4) (2001) 1644-1651.
- [81] C.B. Whorwood, M.L. Ricketts, P.M. Stewart, Epithelial cell localization of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat and human colon, *Endocrinology* 135 (6) (1994) 2533-2541.
- [82] R.E. Smith, J.A. Maguire, A.N. Stein-Oakley, H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima, Z.S. Krozowski, Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in human epithelial tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (9) (1996) 3244-3248.
- [83] J. Pacha, I. Miksik, Distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase along the rat intestine, *Life Sci.* 54 (11) (1994) 745-749.
- [84] R. Claus, S. Raab, M. Lacorn, Activities of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in different regions of the intestinal tract of pigs, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 (7) (2001) 374-377.
- [85] J. Pacha, I. Miksik, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in developing rat intestine, *J. Endocrinol.* 148 (3) (1996) 561-566.
- [86] J. Pacha, I. Miksik, V. Lisa, I. Pohlova, Hormonal regulation of intestinal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Life Sci.* 61 (24) (1997) 2391-2396.
- [87] J.W. Tomlinson, P.M. Stewart, Cortisol metabolism and the role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 15 (1) (2001) 61-78.
- [88] A. Jamieson, A.M. Wallace, R. Andrew, B.S. Nunez, B.R. Walker, R. Fraser, P.C.

- White, J.M. Connell, Apparent cortisone reductase deficiency: a functional defect in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (10) (1999) 3570-3574.
- [89] P.M. Stewart, P. Burra, C.H. Shackleton, M.C. Sheppard, E. Elias, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76 (3) (1993) 748-751.
- [90] J.M. Paterson, N.M. Morton, C. Fievet, C.J. Kenyon, M.C. Holmes, B. Staels, J.R. Seckl, J.J. Mullins, Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (18) (2004) 7088-7093.
- [91] M.L. Ricketts, K.J. Shoemith, M. Hewison, A. Strain, M.C. Eggo, P.M. Stewart, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in primary cultures of rat and human hepatocytes, *J. Endocrinol.* 156 (1) (1998) 159-168.
- [92] Y.J. Liu, Y. Nakagawa, K. Nasuda, H. Saegusa, Y. Igarashi, Effect of growth hormone, insulin and dexamethasone on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity on a primary culture of rat hepatocytes, *Life Sci.* 59 (3) (1996) 227-234.
- [93] B.R. Walker, A.A. Connacher, R.M. Lindsay, D.J. Webb, C.R. Edwards, Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (11) (1995) 3155-3159.
- [94] T.Y. Zhang, X. Ding, R.A. Daynes, The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities, *J. Immunol.* 174 (2) (2005) 879-889.
- [95] Z. Zhou, C.H. Shackleton, S. Pahwa, P.C. White, P.W. Speiser, Prominent sex steroid metabolism in human lymphocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 138 (1-2) (1998) 61-69.
- [96] R. Thieringer, C.B. Le Grand, L. Carbin, T.Q. Cai, B. Wong, S.D. Wright, A. Hermanowski-Vosatka, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages, *J. Immunol.* 167 (1) (2001) 30-35.
- [97] J.D. Hennebold, R.A. Daynes, Inhibition of skin 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo potentiates the anti-inflammatory actions of

- glucocorticoids, *Arch. Dermatol. Res.* 290 (8) (1998) 413-419.
- [98] G. Escher, I. Galli, B.S. Vishwanath, B.M. Frey, F.J. Frey, Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta enhance the cortisone/cortisol shuttle, *J. Exp. Med.* 186 (2) (1997) 189-198.
- [99] K. Handoko, K. Yang, B. Strutt, W. Khalil, D. Killinger, Insulin attenuates the stimulatory effects of tumor necrosis factor alpha on 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 in human adipose stromal cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72 (3-4) (2000) 163-168.
- [100] T.Q. Cai, B. Wong, S.S. Mundt, R. Thieringer, S.D. Wright, A. Hermanowski-Vosatka, Induction of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 77 (2-3) (2001) 117-122.
- [101] M.S. Cooper, I. Bujalska, E. Rabbitt, E.A. Walker, R. Bland, M.C. Sheppard, M. Hewison, P.M. Stewart, Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation, *J. Bone Miner. Res.* 16 (6) (2001) 1037-1044.
- [102] M. Evagelatou, S.L. Peterson, B.A. Cooke, Leukocytes modulate 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) activity in human granulosa-lutein cell cultures, *Mol. Cell. Endocrinol.* 133 (2) (1997) 81-88.
- [103] J. Bryndova, S. Zbankova, M. Kment, J. Pacha, Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue, *Scand. J. Gastroenterol.* 39 (6) (2004) 549-553.
- [104] V. Konradova, A. Zajicova, J. Uhlik, L. Vajner, *Histologie, Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany, 1996.*
- [105] M. Shimojo, J. Condon, C.B. Whorwood, P.M. Stewart, Adrenal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Endocr. Res.* 22 (4) (1996) 771-780.
- [106] M.L. Ricketts, J.M. Verhaeg, I. Bujalska, A.J. Howie, W.E. Rainey, P.M. Stewart, Immunohistochemical localization of type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (4) (1998) 1325-1335.
- [107] C.L. Coulter, R.E. Smith, M. Stowasser, H. Sasano, Z.S. Krozowski, R.D. Gordon, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11betaHSD-2) in the developing human adrenal gland and human adrenal cortical carcinoma and

- adenoma, *Mol. Cell. Endocrinol.* 154 (1-2) (1999) 71-77.
- [108] C. Monder, P.C. White, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Vitam. Horm.* 47 (1993) 187-271.
- [109] B.S. McEwen, L.T. Lambdin, T.C. Rainbow, A.F. De Nicola, Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats, *Neuroendocrinology* 43 (1) (1986) 38-43.
- [110] M. Orchinik, T.F. Murray, F.L. Moore, A corticosteroid receptor in neuronal membranes, *Science* 252 (5014) (1991) 1848-1851.
- [111] E.P. Gomez-Sanchez, C.E. Gomez-Sanchez, Is aldosterone synthesized in the CNS regulated and functional?, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (10) (2003) 444-446.
- [112] N.A. Peterson, I.L. Chaikoff, C. Jones, The in vitro conversion of cortisol to cortisone by subcellular brain fraction of young and adult rats, *J. Neurochem.* 12 (1965) 273-278.
- [113] V. Rajan, C.R. Edwards, J.R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity, *J. Neurosci.* 16 (1) (1996) 65-70.
- [114] E.P. Gomez-Sanchez, Central hypertensive effects of aldosterone, *Front. Neuroendocrinol.* 18 (4) (1997) 440-462.
- [115] R. Diaz, R.W. Brown, J.R. Seckl, Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions, *J. Neurosci.* 18 (7) (1998) 2570-2580.
- [116] T.H. Bambino, A.J. Hsueh, Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro, *Endocrinology* 108 (6) (1981) 2142-2148.
- [117] H.B. Gao, M.H. Tong, Y.Q. Hu, Q.S. Guo, R. Ge, M.P. Hardy, Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells, *Endocrinology* 143 (1) (2002) 130-138.
- [118] C. Monder, Y. Miroff, A. Marandici, M.P. Hardy, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells, *Endocrinology* 134 (3) (1994) 1199-1204.
- [119] D.M. Phillips, V. Lakshmi, C. Monder, Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis, *Endocrinology* 125 (1) (1989) 209-216.
- [120] R.S. Ge, D.O. Hardy, J.F. Catterall, M.P. Hardy, Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and

- reductive activities in rat Leydig cells, *Endocrinology* 138 (12) (1997) 5089-5095.
- [121] H.B. Gao, R.S. Ge, V. Lakshmi, A. Marandici, M.P. Hardy, Hormonal regulation of oxidative and reductive activities of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, *Endocrinology* 138 (1) (1997) 156-161.
- [122] V.L. Nacharaju, O. Muneyyirci-Delale, N. Khan, Presence of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human semen: evidence of correlation with semen characteristics, *Steroids* 62 (3) (1997) 311-314.
- [123] A.E. Michael, L.A. Pester, P. Curtis, R.W. Shaw, C.R. Edwards, B.A. Cooke, Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 38 (6) (1993) 641-644.
- [124] A.E. Michael, M. Evagelatou, D.P. Norgate, R.J. Clarke, J.W. Antoniow, B.A. Stedman, A. Brennan, R. Welsby, I. Bujalska, P.M. Stewart, B.A. Cooke, Isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 132 (1-2) (1997) 43-52.
- [125] M. Tetsuka, F.J. Thomas, M.J. Thomas, R.A. Anderson, J.I. Mason, S.G. Hillier, Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (6) (1997) 2006-2009.
- [126] M.P. Smith, R.S. Mathur, S.D. Keay, L. Hall, M.G. Hull, J.M. Jenkins, Periovarian human oocytes, cumulus cells, and ovarian leukocytes express type 1 but not type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase RNA, *Fertil. Steril.* 73 (4) (2000) 825-830.
- [127] R. Benediktsson, J.L. Yau, S. Low, L.P. Brett, B.E. Cooke, C.R. Edwards, J.R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary: high expression in the oocyte, *J. Endocrinol.* 135 (1) (1992) 53-58.
- [128] P.J. Burton, Z.S. Krozowski, B.J. Waddell, Immunolocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in rat uterus: variation across the estrous cycle and regulation by estrogen and progesterone, *Endocrinology* 139 (1) (1998) 376-382.
- [129] J.S. Moore, J.P. Monson, G. Kaltsas, P. Putignano, P.J. Wood, M.C. Sheppard, G.M. Besser, N.F. Taylor, P.M. Stewart, Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by growth hormone and insulin-like growth factor: in vivo

- and in vitro studies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (11) (1999) 4172-4177.
- [130] C.K. Ho, M. Tetsuka, S.G. Hillier, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms and glucocorticoid receptor gene expression in the rat uterus, *J. Endocrinol.* 163 (3) (1999) 425-431.
- [131] P.J. Burton, B.J. Waddell, Myometrial expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat pregnancy, *J. Endocrinol.* 172 (3) (2002) 519-526.
- [132] P.J. Burton, A.M. Dharmarajan, S. Hisheh, B.J. Waddell, Induction of myometrial 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid and protein expression late in rat pregnancy, *Endocrinology* 137 (12) (1996) 5700-5706.
- [133] A. Thompson, V.K. Han, K. Yang, Spatial and temporal patterns of expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 messenger RNA and glucocorticoid receptor protein in the murine placenta and uterus during late pregnancy, *Biol. Reprod.* 67 (6) (2002) 1708-1718.
- [134] C.B. Whorwood, K.M. Firth, H. Budge, M.E. Symonds, Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type I angiotensin II receptor in neonatal sheep, *Endocrinology* 142 (7) (2001) 2854-2864.
- [135] H.G. Klemcke, Dehydrogenase and oxoreductase activities of porcine placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Life Sci.* 66 (11) (2000) 1045-1052.
- [136] R. Benediktsson, A.A. Calder, C.R. Edwards, J.R. Seckl, Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 46 (2) (1997) 161-166.
- [137] H.M. Dodds, P.J. Taylor, L.P. Johnson, R.H. Mortimer, S.M. Pond, G.R. Cannell, Cortisol metabolism and its inhibition by glycyrrhetic acid in the isolated perfused human placental lobule, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62 (4) (1997) 337-343.
- [138] A.E. Krafft, P.B. Hylemon, Purification and characterization of a novel form of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium scindens*, *J. Bacteriol.* 171 (6) (1989) 2925-2932.
- [139] E.S. Szymanski, C.S. Furfine, 20 beta-hydroxysteroid oxidoreductase. Kinetics and binding of corticosteroids and corticosteroid-21-aldehydes, *J. Biol. Chem.* 252 (1) (1977) 205-211.

- [140] S. Nakajin, S. Ohno, M. Shinoda, 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of neonatal pig testis: purification and some properties, *J. Biochem. (Tokyo)* 104 (4) (1988) 565-569.
- [141] Y. Higaki, N. Usami, S. Shintani, S. Ishikura, O. El-Kabbani, A. Hara, Selective and potent inhibitors of human 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone, *Chem. Biol. Interact.* 143-144 (2003) 503-513.
- [142] G.J. Pepe, J.S. Babischkin, M.G. Burch, M.G. Leavitt, E.D. Albrecht, Developmental increase in expression of the messenger ribonucleic acid and protein levels of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the baboon placenta, *Endocrinology* 137 (12) (1996) 5678-5684.
- [143] P.J. Burton, R.E. Smith, Z.S. Krozowski, B.J. Waddell, Zonal distribution of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 messenger ribonucleic acid expression in the rat placenta and decidua during late pregnancy, *Biol. Reprod.* 55 (5) (1996) 1023-1028.
- [144] R. Sampath-Kumar, S.G. Matthews, K. Yang, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the predominant isozyme in the guinea pig placenta: decreases in messenger ribonucleic acid and activity at term, *Biol. Reprod.* 59 (6) (1998) 1378-1384.
- [145] K. Sun, K. Yang, J.R. Challis, Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts, *Biol. Reprod.* 58 (6) (1998) 1379-1384.
- [146] K. Sun, K. Yang, J.R. Challis, Differential regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 by nitric oxide in cultured human placental trophoblast and chorionic cell preparation, *Endocrinology* 138 (11) (1997) 4912-4920.
- [147] S. Sarkar, S.W. Tsai, T.T. Nguyen, M. Plevyak, J.F. Padbury, L.P. Rubin, Inhibition of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by catecholamines via alpha-adrenergic signaling, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281 (6) (2001) R1966-R1974.
- [148] D.B. Hardy, L.E. Pereria, K. Yang, Prostaglandins and leukotriene B4 are potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells, *Biol. Reprod.* 61 (1) (1999) 40-45.

- [149] P.J. Burton, B.J. Waddell, Dual function of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action, *Biol. Reprod.* 60 (2) (1999) 234-240.
- [150] J.R. Seckl, M. Cleasby, M.J. Nyirenda, Glucocorticoids, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming, *Kidney Int.* 57 (4) (2000) 1412-1417.
- [151] G. Hirasawa, J. Takeyama, H. Sasano, K. Fukushima, T. Suzuki, Y. Muramatu, A.D. Darnel, C. Kaneko, N. Hiwatashi, T. Toyota, H. Nagura, Z.S. Krozowski, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (3) (2000) 1306-1309.
- [152] S.J. Quirk, J. Slattery, J.W. Funder, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mammary gland, *J. Steroid Biochem.* 35 (5) (1990) 623-625.
- [153] S.J. Quirk, J.A. Slattery, J.W. Funder, Epithelial and adipose cells isolated from mammary glands of pregnant and lactating rats differ in 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37 (4) (1990) 529-534.
- [154] S. Hundertmark, H. Buhler, M. Rudolf, H.K. Weitzel, V. Ragosch, Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells, *J. Endocrinol.* 155 (1) (1997) 171-180.
- [155] B. Becker, D.W. Mills, Corticosteroids and intraocular pressure, *Arch. Ophthalmol.* 70 (1963) 500-507.
- [156] J. Usukura, G.L. Fain, D. Bok, [3H]ouabain localization of Na-K ATPase in the epithelium of rabbit ciliary body pars plicata, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29 (4) (1988) 606-614.
- [157] J. Stokes, J. Noble, L. Brett, C. Phillips, J.R. Seckl, C. O'Brien, R. Andrew, Distribution of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human and rat ocular tissues, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (7) (2000) 1629-1638.
- [158] S. Rauz, E.A. Walker, C.H. Shackleton, M. Hewison, P.I. Murray, P.M. Stewart, Expression and putative role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes within the human eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (9) (2001) 2037-2042.
- [159] S. Rauz, C.M. Cheung, P.J. Wood, M. Coca-Prados, E.A. Walker, P.I. Murray, P.M. Stewart, Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 lowers intraocular pressure in patients with ocular hypertension, *QJM* 96 (7) (2003) 481-

- [160] S. Suzuki, H. Tsubochi, A. Darnel, T. Suzuki, H. Sasano, Z.S. Krozowski, T. Kondo, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in alveolar epithelial cells in rats, *Endocr. J.* 50 (4) (2003) 445-451.
- [161] S. Hundertmark, V. Ragosch, B. Schein, H. Buhler, U. Lorenz, M. Fromm, H.K. Weitzel, Gestational age dependence of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the enzymes of phosphatidylcholine synthesis in lung and liver of fetal rat, *Biochim. Biophys. Acta* 1210 (3) (1994) 348-354.
- [162] S. Suzuki, H. Tsubochi, T. Suzuki, A.D. Darnel, Z.S. Krozowski, H. Sasano, T. Kondo, Modulation of transalveolar fluid absorption by endogenous aldosterone in adult rats, *Exp. Lung Res.* 27 (2) (2001) 143-155.
- [163] S.A. Rooney, S.L. Young, C.R. Mendelson, Molecular and cellular processing of lung surfactant, *FASEB J.* 8 (12) (1994) 957-967.
- [164] D.H. Ingbar, S. Duvick, S.K. Savick, D.E. Schellhase, R. Detterding, J.D. Jamieson, J.M. Shannon, Developmental changes of fetal rat lung Na-K-ATPase after maternal treatment with dexamethasone, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 272 (4) (1997) L665-L672.
- [165] G. Champigny, N. Voilley, E. Lingueglia, V. Friend, P. Barbry, M. Lazdunski, Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na⁺ channel by steroid hormones, *EMBO. J.* 13 (9) (1994) 2177-2181.
- [166] P. Ferrari, Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17 (4) (2003) 575-589.
- [167] E.A. Walker, P.M. Stewart, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections, *Trends Endocrinol. Metab.* 14 (7) (2003) 334-339.
- [168] R. Bland, C.A. Worker, B.S. Noble, L.J. Eyre, I.J. Bujalska, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, M. Hewison, Characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines, *J. Endocrinol.* 161 (3) (1999) 455-464.
- [169] L.J. Eyre, E.H. Rabbitt, R. Bland, S.V. Hughes, M.S. Cooper, M.C. Sheppard, P.M. Stewart, M. Hewison, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat osteoblastic cells: pre-receptor regulation of glucocorticoid responses in bone, *J. Cell. Biochem.* 81 (3) (2001) 453-462.

- [170] J. Condon, C. Gosden, D. Gardener, P. Nickson, M. Hewison, A.J. Howie, P.M. Stewart, Expression of type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83 (12) (1998) 4490-4497.
- [171] M.S. Cooper, E.A. Walker, R. Bland, W.D. Fraser, M. Hewison, P.M. Stewart, Expression and functional consequences of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone, *Bone* 27 (3) (2000) 375-381.
- [172] B. Davani, A. Khan, M. Hult, E. Martensson, S. Okret, S. Efendic, H. Jornvall, U.C. Oppermann, Type 1 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mediates glucocorticoid activation and insulin release in pancreatic islets, *J. Biol. Chem.* 275 (45) (2000) 34841-34844.
- [173] L. Duplomb, Y. Lee, M.Y. Wang, B.H. Park, K. Takaishi, A.K. Agarwal, R.H. Unger, Increased expression and activity of 11beta-HSD-1 in diabetic islets and prevention with troglitazone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (3) (2004) 594-599.
- [174] H. Hauner, G. Entenmann, M. Wabitsch, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel, E.F. Pfeiffer, Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium, *J. Clin. Invest.* 84 (5) (1989) 1663-1670.
- [175] D. Gaillard, M. Wabitsch, B. Pipy, R. Negrel, Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids, *J. Lipid Res.* 32 (4) (1991) 569-579.
- [176] P.M. Stewart, Tissue-specific Cushing's syndrome, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action, *Eur. J. Endocrinol.* 149 (3) (2003) 163-168.
- [177] R.S. Ahima, J.S. Flier, Leptin, *Annu. Rev. Physiol.* 62 (2000) 413-437.
- [178] A.J. Vidal-Puig, R.V. Considine, M. Jimenez-Linan, A. Werman, W.J. Pories, J.F. Caro, J.S. Flier, Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids, *J. Clin. Invest.* 99 (10) (1997) 2416-2422.
- [179] M. Ottosson, K. Vikman-Adolfsson, S. Enerback, G. Olivecrona, P. Bjorntorp, The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (3) (1994) 820-825.
- [180] B.G. Slavin, J.M. Ong, P.A. Kern, Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase

- activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes, *J. Lipid Res.* 35 (9) (1994) 1535-1541.
- [181] P.M. Stewart, J.W. Tomlinson, Cortisol, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (3) (2002) 94-96.
- [182] D.J. Wake, B.R. Walker, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome, *Mol. Cell. Endocrinol.* 215 (1-2) (2004) 45-54.
- [183] J. Berger, M. Tanen, A. Elbrecht, A. Hermanowski-Vosatka, D.E. Moller, S.D. Wright, R. Thieringer, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit adipocyte 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity, *J. Biol. Chem.* 276 (16) (2001) 12629-12635.
- [184] R.A. Daynes, D.C. Jones, Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (10) (2002) 748-759.
- [185] G. Hirasawa, H. Sasano, K. Takahashi, K. Fukushima, T. Suzuki, N. Hiwatashi, T. Toyota, Z.S. Krozowski, H. Nagura, Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human epithelia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (11) (1997) 3859-3863.
- [186] S. Kenouch, M. Lombes, F. Delahaye, E. Eugene, J.P. Bonvalet, N. Farman, Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (5) (1994) 1334-1341.
- [187] A.S. Brem, R.B. Bina, T.C. King, D.J. Morris, Localization of 2 11beta-OH steroid dehydrogenase isoforms in aortic endothelial cells, *Hypertension* 31 (1) (1998) 459-462.
- [188] G.W. Souness, A.S. Brem, D.J. Morris, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase antisense affects vascular contractile response and glucocorticoid metabolism, *Steroids* 67 (3-4) (2002) 195-201.
- [189] A.S. Brem, R.B. Bina, N. Hill, C. Alia, D.J. Morris, Effects of licorice derivatives on vascular smooth muscle function, *Life Sci.* 60 (3) (1997) 207-214.
- [190] A.S. Brem, R.B. Bina, T. King, D.J. Morris, 11 betaOH-progesterone affects vascular glucocorticoid metabolism and contractile response, *Hypertension* 30 (3) (1997) 449-454.
- [191] H. Hatakeyama, S. Inaba, N. Taniguchi, I. Miyamori, Functional adrenocorticotrophic hormone receptor in cultured human vascular endothelial cells:

- possible role in control of blood pressure, *Hypertension* 36 (5) (2000) 862-865.
- [192] Y. Takeda, I. Miyamori, T. Yoneda, Y. Ito, R. Takeda, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rat vascular smooth muscle cells, *Life Sci.* 54 (4) (1994) 281-285.
- [193] S.H. Slight, J. Joseph, V.K. Ganjam, K.T. Weber, Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31 (6) (1999) 1175-1184.
- [194] K.M. Kayes-Wandover, P.C. White, Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7) (2000) 2519-2525.
- [195] C. Delcayre, J.S. Silvestre, Aldosterone and the heart: towards a physiological function?, *Cardiovasc. Res.* 43 (1) (1999) 7-12.
- [196] G. Zhou, J.C. Kandala, S.C. Tyagi, L.C. Katwa, K.T. Weber, Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts, *Mol. Cell. Biochem.* 154 (2) (1996) 171-178.
- [197] C.G. Brilla, G. Zhou, L. Matsubara, K.T. Weber, Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (7) (1994) 809-820.
- [198] E. Kohler, S. Bertschin, T. Woodtli, T. Resink, P. Erne, Does aldosterone-induced cardiac fibrosis involve direct effects on cardiac fibroblasts?, *J. Vasc. Res.* 33 (4) (1996) 315-326.
- [199] M.J. Fullerton, J.W. Funder, Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies, *Cardiovasc. Res.* 28 (12) (1994) 1863-1867.
- [200] P. Lijnen, V. Petrov, Induction of cardiac fibrosis by aldosterone, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 (6) (2000) 865-879.
- [201] K.E. Sheppard, D.J. Autelitano, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart, *Endocrinology* 143 (1) (2002) 198-204.
- [202] J.P. Bonvalet, N. Alfaidy, N. Farman, M. Lombes, Aldosterone: intracellular receptors in human heart, *Eur. Heart J* 16 (Suppl N) (1995) 92-97.
- [203] A. Sato, J.W. Funder, High glucose stimulates aldosterone-induced hypertrophy via type I mineralocorticoid receptors in neonatal rat cardiomyocytes, *Endocrinology* 137 (10) (1996) 4145-4153.
- [204] M. Lombes, N. Alfaidy, E. Eugene, A. Lessana, N. Farman, J.P. Bonvalet, Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart, *Circulation* 92 (2) (1995) 175-182.
- [205] B.L. Roland, J.W. Funder, Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: in situ studies, *Endocrinology* 137 (3) (1996) 1123-1128.
- [206] A. Konishi, C. Tazawa, Y. Miki, A.D. Darnel, T. Suzuki, Y. Ohta, K. Tabayashi, H. Sasano, The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85 (2-5) (2003) 439-442.
- [207] R.E. Smith, Z.S. Krozowski, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme in the hearts of normotensive and spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23 (8) (1996) 642-647.
- [208] P.T. Pearce, J.W. Funder, Steroid binding to cardiac type I receptors: in vivo studies, *J. Hypertens. Suppl* 6 (4) (1988) S131-S133.
- [209] J.W. Funder, Is aldosterone bad for the heart?, *Trends Endocrinol. Metab.* 15 (4) (2004) 139-142.
- [210] W. Qin, A.E. Rudolph, B.R. Bond, R. Rocha, E.A. Blomme, J.J. Goellner, J.W. Funder, E.G. McMahon, Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure, *Circ. Res.* 93 (1) (2003) 69-76.
- [211] R.C. Andrews, B.R. Walker, Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets, *Clin. Sci. (Lond)* 96 (5) (1999) 513-523.
- [212] P. Bjorntorp, R. Rosmond, Obesity and cortisol, *Nutrition* 16 (10) (2000) 924-936.
- [213] E. Rask, T. Olsson, S. Soderberg, R. Andrew, D.E. Livingstone, O. Johnson, B.R. Walker, Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (3) (2001) 1418-1421.
- [214] D.E. Livingstone, C.J. Kenyon, B.R. Walker, Mechanisms of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats, *J. Endocrinol.* 167 (3) (2000) 533-539.
- [215] H. Masuzaki, J. Paterson, H. Shinyama, N.M. Morton, J.J. Mullins, J.R. Seckl, J.S. Flier, A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome, *Science* 294 (5549) (2001) 2166-2170.
- [216] H. Masuzaki, H. Yamamoto, C.J. Kenyon, J.K. Elmquist, N.M. Morton, J.M. Paterson, H. Shinyama, M.G. Sharp, S. Fleming, J.J. Mullins, J.R. Seckl, J.S. Flier, Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high

- blood pressure in mice, *J. Clin. Invest.* 112 (1) (2003) 83-90.
- [217] N. Ruderman, D. Chisholm, X. Pi-Sunyer, S. Schneider, The metabolically obese, normal-weight individual revisited, *Diabetes* 47 (5) (1998) 699-713.
- [218] N. Barzilai, L. She, B.Q. Liu, P. Vuguin, P. Cohen, J. Wang, L. Rossetti, Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance, *Diabetes* 48 (1) (1999) 94-98.
- [219] P.C. White, T. Mune, F.M. Rogerson, K.M. Kayes, A.K. Agarwal, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess, *Pediatr. Res.* 41 (1) (1997) 25-29.
- [220] S. Ulick, L.S. Levine, P. Gunczler, G. Zanconato, L.C. Ramirez, W. Rauh, A. Rosler, H.L. Bradlow, M.I. New, A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (5) (1979) 757-764.
- [221] S.E. Oberfield, L.S. Levine, R.M. Carey, F. Greig, S. Ulick, M.I. New, Metabolic and blood pressure responses to hydrocortisone in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56 (2) (1983) 332-339.
- [222] C. Monder, P.M. Stewart, V. Lakshmi, R. Valentino, D. Burt, C.R. Edwards, Licorice inhibits corticosteroid 11 beta-dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies, *Endocrinology* 125 (2) (1989) 1046-1053.
- [223] M.I. New, L.S. Levine, E.G. Biglieri, J. Pareira, S. Ulick, Evidence for an unidentified steroid in a child with apparent mineralocorticoid hypertension, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44 (5) (1977) 924-933.
- [224] R.C. Wilson, S. Nimkarn, M.I. New, Apparent mineralocorticoid excess, *Trends Endocrinol. Metab.* 12 (3) (2001) 104-111.
- [225] K. Lin-Su, P. Zhou, N. Arora, B.P. Betensky, M.I. New, R.C. Wilson, In vitro expression studies of a novel mutation delta299 in a patient affected with apparent mineralocorticoid excess, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (5) (2004) 2024-2027.
- [226] C.A. Carvajal, A.A. Gonzalez, D.G. Romero, A. Gonzalez, L.M. Mosso, E.T. Lagos, P. Hevia Mdel, M.P. Rosati, T.O. Perez-Acle, C.E. Gomez-Sanchez, J.A. Montero, C.E. Fardella, Two homozygous mutations in the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (6) (2003) 2501-2507.
- [227] M. Quinkler, P.M. Stewart, Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle, *J. Clin.*

Endocrinol. Metab. 88 (6) (2003) 2384-2392.

- [228] T. Mune, F.M. Rogerson, H. Nikkila, A.K. Agarwal, P.C. White, Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Nat. Genet.* 10 (4) (1995) 394-399.
- [229] P.M. Stewart, Cortisol as a mineralocorticoid in human disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69 (1-6) (1999) 403-408.
- [230] C.H. Shackleton, J. Rodriguez, E. Arteaga, J.M. Lopez, J.S. Winter, Congenital 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency associated with juvenile hypertension: corticosteroid metabolite profiles of four patients and their families, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 22 (6) (1985) 701-712.
- [231] U. Ganten, G. Schroder, M. Witt, F. Zimmermann, D. Ganten, G. Stock, Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment, *J. Hypertens.* 7 (9) (1989) 721-726.
- [232] J.F. Reckelhoff, H. Zhang, J.P. Granger, Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 31 (1) (1998) 435-439.
- [233] M.A. Bayorh, R.R. Socci, D. Eatman, M. Wang, M. Thierry-Palmer, The role of gender in salt-induced hypertension, *Clin. Exp. Hypertens.* 23 (3) (2001) 241-255.
- [234] G. Gong, A. Dobin, M.L. Johnson, W.A. Pettinger, Sexual dimorphism of renal alpha2-adrenergic receptor regulation in Dahl rats, *Hypertens. Res.* 19 (2) (1996) 83-89.
- [235] A.L. Albiston, R.E. Smith, Z.S. Krozowski, Sex- and tissue- specific regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA, *Mol. Cell. Endocrinol.* 109 (2) (1995) 183-188.
- [236] J. Condon, M.L. Ricketts, C.B. Whorwood, P.M. Stewart, Ontogeny and sexual dimorphic expression of mouse type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol. Cell. Endocrinol.* 127 (2) (1997) 121-128.
- [237] M.J. Koren, R.B. Devereux, P.N. Casale, D.D. Savage, J.H. Laragh, Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension, *Ann. Intern. Med.* 114 (5) (1991) 345-352.
- [238] M. Bikkina, M.G. Larson, D. Levy, Asymptomatic ventricular arrhythmias and mortality risk in subjects with left ventricular hypertrophy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 22 (4) (1993) 1111-1116.

- [239] D.J. Barker, A.R. Bull, C. Osmond, S.J. Simmonds, Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life, *BMJ* 301 (6746) (1990) 259-262.
- [240] G.C. Curhan, W.C. Willett, E.B. Rimm, D. Spiegelman, A.L. Ascherio, M.J. Stampfer, Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men, *Circulation* 94 (12) (1996) 3246-3250.
- [241] G.C. Curhan, G.M. Chertow, W.C. Willett, D. Spiegelman, G.A. Colditz, J.E. Manson, F.E. Speizer, M.J. Stampfer, Birth weight and adult hypertension and obesity in women, *Circulation* 94 (6) (1996) 1310-1315.
- [242] M. Dalle, P. Pradier, P. Delost, The regulation of glucocorticosteroid secretion during the perinatal period, *Reprod. Nutr. Dev.* 25 (5) (1985) 977-991.
- [243] N.S. Levitt, R.S. Lindsay, M.C. Holmes, J.R. Seckl, Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat, *Neuroendocrinology* 64 (6) (1996) 412-418.
- [244] R. Benediktsson, R.S. Lindsay, J. Noble, J.R. Seckl, C.R. Edwards, Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension, *Lancet* 341 (8841) (1993) 339-341.
- [245] R.S. Lindsay, R.M. Lindsay, C.R. Edwards, J.R. Seckl, Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring, *Hypertension* 27 (6) (1996) 1200-1204.
- [246] R.S. Lindsay, R.M. Lindsay, B.J. Waddell, J.R. Seckl, Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone, *Diabetologia* 39 (11) (1996) 1299-1305.
- [247] J.J. Hermans, M.A. Fischer, P.M. Schiffers, H.A. Struijker-Boudier, High dietary potassium chloride intake augments rat renal mineralocorticoid receptor selectivity via 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* 1472 (3) (1999) 537-549.
- [248] I.H. Jonsdottir, P. Schjerling, K. Ostrowski, S. Asp, E.A. Richter, B.K. Pedersen, Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles, *J. Physiol.* 528 (1) (2000) 157-163.
- [249] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1)

- (1987) 156-159.
- [250] G. Escher, A. Nawrocki, T. Staub, B.S. Vishwanath, B.M. Frey, J. Reichen, F.J. Frey, Down-regulation of hepatic and renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rats with liver cirrhosis, *Gastroenterology* 114 (1) (1998) 175-184.
- [251] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [252] I. Miksik, M. Vylitova, J. Pacha, Z. Deyl, Separation and identification of corticosterone metabolites by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 726 (1-2) (1999) 59-69.
- [253] F. Ruschitzka, T. Quaschnig, G. Noll, A. deGottardi, M.F. Rossier, F. Enseleit, D. Hurlimann, T.F. Luscher, S.G. Shaw, Endothelin 1 type a receptor antagonism prevents vascular dysfunction and hypertension induced by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition: role of nitric oxide, *Circulation* 103 (25) (2001) 3129-3135.
- [254] T. Quaschnig, F. Ruschitzka, B. Niggli, C.M. Lunt, S. Shaw, M. Christ, M. Wehling, T.F. Luscher, Influence of aldosterone vs. endothelin receptor antagonism on renovascular function in liquorice-induced hypertension, *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 (11) (2001) 2146-2151.
- [255] H. Hatakeyama, S. Inaba, I. Miyamori, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured human vascular cells. Possible role in the development of hypertension, *Hypertension* 33 (5) (1999) 1179-1184.
- [256] R. Franco-Saenz, P. Shen, S.J. Lee, G.T. Cicila, W.L. Henrich, Regulation of the genes for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidney of the Dahl rat, *J. Hypertens.* 17 (8) (1999) 1089-1093.
- [257] E.R. Lax, R. Ghraf, H. Schriefers, The hormonal regulation of hepatic microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat, *Acta Endocrinol.* 89 (2) (1978) 352-358.
- [258] S.C. Low, K.E. Chapman, C.R. Edwards, T. Wells, I.C. Robinson, J.R. Seckl, Sexual dimorphism of hepatic 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat: the role of growth hormone patterns, *J. Endocrinol.* 143 (3) (1994) 541-548.
- [259] N. Ashton, R.J. Balment, Sexual dimorphism in renal function and hormonal status of New Zealand genetically hypertensive rats, *Acta Endocrinol.* 124 (1) (1991) 91-

- [260] R.J. Roman, Abnormal renal hemodynamics and pressure-natriuresis relationship in Dahl salt-sensitive rats, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 251 (1) (1986) F57-F65.
- [261] R. Dietz, A. Schöming, H. Haebra, W. Pascher, J.B. Lüth, F. Gross, Studies on the pathogenesis of spontaneously hypertension of rats, *Circ. Res.* 43 (Suppl 1) (1978) S98-S106.
- [262] O. Melander, M. Orho-Melander, K. Bengtsson, U. Lindblad, L. Rastam, L. Groop, U.L. Hulthen, Association between a variant in the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and primary hypertension, *J. Hum. Hypertens.* 14 (12) (2000) 819-823.
- [263] Y. Takeda, S. Inaba, K. Furukawa, I. Miyamori, Renal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in genetically salt-sensitive hypertensive rats, *Hypertension* 32 (6) (1998) 1077-1082.
- [264] Y. Takeda, I. Miyamori, T. Yoneda, K. Iki, H. Hatakeyama, R. Takeda, Gene expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the mesenteric arteries of genetically hypertensive rats, *Hypertension* 23 (5) (1994) 577-580.
- [265] H. Hatakeyama, S. Inaba, I. Miyamori, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human aortic smooth muscle cells, *Hypertens. Res.* 24 (1) (2001) 33-37.
- [266] P.W. Hadoke, C. Christy, Y.V. Kotelevtsev, B.C. Williams, C.J. Kenyon, J.R. Seckl, J.J. Mullins, B.R. Walker, Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Circulation* 104 (23) (2001) 2832-2837.
- [267] Y. Takeda, I. Miyamori, T. Yoneda, H. Hatakeyama, K. Iki, R. Takeda, Decreased activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive rats, *Life Sci.* 54 (18) (1994) 1343-1349.
- [268] M. Yanagisawa, H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, T. Masaki, A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells, *Nature* 332 (6163) (1988) 411-415.
- [269] M. Doi, M. Shichiri, M. Yoshida, F. Marumo, Y. Hirata, Suppression of integrin alpha(v) expression by endothelin-1 in vascular smooth muscle cells, *Hypertens. Res.* 23 (6) (2000) 643-649.
- [270] M. Barton, L.V. d'Uscio, S. Shaw, P. Meyer, P. Moreau, T.F. Luscher, ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and

- endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension, *Hypertension* 31 (1) (1998) 499-504.
- [271] Z. Ni, F. Oveisi, N.D. Vaziri, Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats, *Hypertension* 34 (4) (1999) 552-557.
- [272] D.Y. Tan, S. Meng, G.W. Cason, R.D. Manning, Mechanisms of salt-sensitive hypertension: role of inducible nitric oxide synthase, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (6) (2000) R2297-R2303.
- [273] H.C. Atkinson, B.J. Waddell, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone, *Endocrinology* 136 (2) (1995) 512-520.
- [274] S. Milkovic, K. Milkovic, J. Paunovic, The initiation of fetal adrenocorticotrophic activity in the rat, *Endocrinology* 92 (2) (1973) 380-384.
- [275] P.M. Driver, S. Rauz, E.A. Walker, M. Hewison, M.D. Kilby, P.M. Stewart, Characterization of human trophoblast as a mineralocorticoid target tissue, *Mol. Hum. Reprod.* 9 (12) (2003) 793-798.
- [276] C.M. Law, A.W. Shiell, Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature, *J. Hypertens.* 14 (8) (1996) 935-941.
- [277] S.C. Langley-Evans, Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet, *Clin. Sci. (Lond)* 93 (5) (1997) 423-429.
- [278] E.P. Gomez-Sanchez, C.E. Gomez-Sanchez, Maternal hypertension and progeny blood pressure: role of aldosterone and 11beta-HSD, *Hypertension* 33 (6) (1999) 1369-1373.
- [279] P.M. Stewart, C.B. Whorwood, J.I. Mason, Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55 (5-6) (1995) 465-471.
- [280] C.R. Edwards, R. Benediktsson, R.S. Lindsay, J.R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects, *Steroids* 61 (4) (1996) 263-269.
- [281] C. Bertram, A.R. Trowern, N. Copin, A.A. Jackson, C.B. Whorwood, The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms

- underlying the programming of hypertension in utero, *Endocrinology* 142 (7) (2001) 2841-2853.
- [282] S.C. Langley-Evans, M. Nwagwu, Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets, *Life Sci.* 63 (7) (1998) 605-615.
- [283] B.M. Johnston, Fetal growth retardation and increased placental weight in the spontaneously hypertensive rat, *Reprod. Fertil. Dev.* 7 (3) (1995) 639-645.
- [284] P.M. Jamieson, B.R. Walker, K.E. Chapman, R. Andrew, S. Rossiter, J.R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is a predominant 11 beta-reductase in the intact perfused rat liver, *J. Endocrinol.* 165 (3) (2000) 685-692.
- [285] G.J. Pepe, B.J. Waddell, M.G. Burch, E.D. Albrecht, Interconversion of cortisol and cortisone in the baboon placenta at midgestation: expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger RNA, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58 (4) (1996) 403-410.
- [286] J.R. Seckl, Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms, *Mol. Cell. Endocrinol.* 185 (1-2) (2001) 61-71.
- [287] F.A. Patel, K. Sun, J.R. Challis, Local modulation by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of glucocorticoid effects on the activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human chorion and placental trophoblast cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (2) (1999) 395-400.
- [288] P. Paakki, P. Kirkinen, H. Helin, O. Pelkonen, H. Raunio, M. Pasanen, Antepartum glucocorticoid therapy suppresses human placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes, *Placenta* 21 (2-3) (2000) 241-246.
- [289] B.R. King, R. Smith, R.C. Nicholson, The regulation of human corticotrophin-releasing hormone gene expression in the placenta, *Peptides* 22 (5) (2001) 795-801.
- [290] H.M. Kubisch, S. Mathialagan, E.P. Gomez-Sanchez, Modulation of blood pressure in the Dahl SS/jr rat by embryo transfer, *Hypertension* 31 (1) (1998) 540-545.
- [291] R. Di Nicolantonio, K. Koutsis, M.E. Wlodek, Fetal versus maternal determinants of the reduced fetal and placental growth in spontaneously hypertensive rats, *J. Hypertens.* 18 (1) (2000) 45-50.
- [292] B.R. Walker, J.L. Yau, L.P. Brett, J.R. Seckl, C. Monder, B.C. Williams, C.R. Edwards, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vascular smooth muscle and heart: implications for cardiovascular responses to glucocorticoids, *Endocrinology*

129 (6) (1991) 3305-3312.

- [293] F.H. Leenen, B. Yuan, Dietary-sodium-induced cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rat versus Wistar-Kyoto rat, *J. Hypertens.* 16 (6) (1998) 885-892.
- [294] H.C. Yu, L.M. Burrell, M.J. Black, L.L. Wu, R.J. Dilley, M.E. Cooper, C.I. Johnston, Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats, *Circulation* 98 (23) (1998) 2621-2628.
- [295] H. Hayakawa, L. Rajj, The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension, *Hypertension* 29 (1) (1997) 235-241.
- [296] M. Mirshahi, C. Nicolas, M.K. Agarwal, Enhanced activation of the mineralocorticoid receptor in genetically hypertensive rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1) (1998) 120-125.
- [297] M. Inoko, Y. Kihara, I. Morii, H. Fujiwara, S. Sasayama, Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 267 (6) (1994) H2471-H2482.
- [298] T. Niepel, E. Maser, J.J. Hermans, The effect of amiloride and sodium chloride on rat renal and hepatic 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities, *Pharmacol. Toxicol.* 80 (3) (1997) 127-131.
- [299] O. Melander, E. Frandsen, L. Groop, U.L. Hulthen, No evidence of a relation between 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and salt sensitivity, *Am. J. Hypertens.* 16 (9) (2003) 729-733.
- [300] I. Klimes, A. Vrana, J. Kunes, E. Sebkova, Z. Dobesova, P. Stolba, J. Zicha, Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new animal model of metabolic alterations in hypertension, *Blood Press.* 4 (3) (1995) 137-142.
- [301] M. Kadlecova, J. Cejka, J. Zicha, J. Kunes, Does Cd36 gene play a key role in disturbed glucose and fatty acid metabolism in Prague hypertensive hypertriglyceridemic rats?, *Physiol. Res.* 53 (3) (2004) 265-271.
- [302] P.M. Jamieson, K.E. Chapman, C.R. Edwards, J.R. Seckl, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta-reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations, *Endocrinology* 136 (11) (1995) 4754-4761.
- [303] G. Wolf, The molecular mechanism of the stimulation of adipocyte differentiation

by a glucocorticoid, *Nutr. Rev.* 57 (10) (1999) 324-326.

- [304] O. Paulmyer-Lacroix, S. Boullu, C. Oliver, M.C. Alessi, M. Grino, Expression of the mRNA coding for 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (6) (2002) 2701-2705.
- [305] D.J. Wake, E. Rask, D.E. Livingstone, S. Soderberg, T. Olsson, B.R. Walker, Local and systemic impact of transcriptional up-regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue in human obesity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (8) (2003) 3983-3988.
- [306] S. Engeli, J. Bohnke, M. Feldpausch, K. Gorzelniak, U. Heintze, J. Janke, F.C. Luft, A.M. Sharma, Regulation of 11 beta-HSD genes in human adipose tissue: influence of central obesity and weight loss, *Obes. Res.* 12 (1) (2004) 9-17.
- [307] J.W. Tomlinson, B. Sinha, I. Bujalska, M. Hewison, P.M. Stewart, Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue is not increased in human obesity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (12) (2002) 5630-5635.
- [308] J. Kunes, Z. Dobesova, J. Zicha, Altered balance of main vasopressor and vasodepressor systems in rats with genetic hypertension and hypertriglyceridaemia, *Clin. Sci. (Lond)* 102 (3) (2002) 269-277.

9. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

11 α HP	11 α -hydroxyprogesteron
11HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
11HSD1 (L)	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa isoenzym 1
11HSD2 (K)	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa isoenzym 2
11HSD3	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 3
A	(v souvislosti s metodou „western blotting“) pufr: 5 % odtučněné sušené mléko v pufru B (5 % Tween v PBS)
A	(v kap.4.4.3.) absorbance
a.u.	arbitrární jednotka
ACTH	adrenokortikotropní hormon
allo-THF	5 α -tetrahydrokortisol
AME	Syndrom zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku
ANOVA	analýza rozptylu
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosin-5`-trifosfát
ATPasa	ATP-fosfohydrolasa
B	pufr: 5 % Tween v PBS
b, bp	báze, pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
BW	hmotnost potkana
CBX	karbenoxolon 3-(3-karbonyl-1-oxopropoxy)-11-oxo-elean-12-en-29-ová kyselina
C _{číslo}	steroidní látka s daným počtem uhlíků
C-číslo	uhlík steroidní látky daného čísla
cDNA	komplementární DNA
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
Cp	„crossing point“
dATP	deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCTP	deoxycytidin-5'-trifosfát
Dčíslo (např. D13)	den březosti (např. 13. den březosti)
dGTP	deoxyguanosin-5'-trifosfát

DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAsa	deoxyribonukleasa
dNTP	směs nukleotidů dATP, dTTP, dGTP a dCTP
DR (SR/Jr)	kmen potkanů; Dahlův potkan rezistentní k zvýšenému příjmu soli
DR-HS	potkan kmene DR držený na dietě s vysokým obsahem soli
DR-LS	potkan kmene DR držený na dietě s nízkým obsahem soli
DS (SS/Jr)	kmen potkanů; Dahlův potkan citlivý k zvýšenému příjmu soli
DS-HS	potkan kmene DS držený na dietě vysokým obsahem soli
DS-LS	potkan kmene DS držený na dietě s nízkým obsahem soli
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidin-5'-trifosfát
EČ	anteriorní epitel čočky
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EnR	endotel rohovky
EpR	epitel rohovky
F	fruktosová dieta (kromě obr.2.6)
FgÚ AV ČR	Fyziologický ústav Akademie věd České republiky
GA	glycyrrhetinová kyselina
GABA	4-aminomáselná kyselina
Gly	glycin
GR	glukokortikoidní receptor
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	vysokosolná dieta (8 % NaCl)
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
HTG	kmen potkanů; Pražský hypertriglyceridemický potkan
HTG+F	potkan kmene HTG držený na fruktosové dietě
CHO buňky	„Chinese hamster ovary cells“
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IGF	„insulin like growth factor“

IL	interleukin
K_d	disociační konstanta
K_M	Michaelisova konstanta
Lb	Leydigovy buňky
LH	luteinizační hormon
LS	nízkosolná dieta (0,2 % NaCl)
Lys	lysin
MBP	střední arteriální krevní tlak
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	mediátorová RNA
N	(tab.I a II) neměřitelná hodnota; (tab XIV) neměřeno
n	počet měření
NAD^+ , NADH	nikotinamidadenin dinukleotid a jeho redukovaná forma
$NADP^+$, NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát a jeho redukovaná forma
NOS	NO-synthasa
NŘE	nepigmentovaný řasnatý epitel
p	pravděpodobnost
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	fenylefrin
PPAR	„peroxisome proliferator-activated receptor“
RA	rozdíl enzymových aktivit (oxidasová minus reduktasová)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí
SA	„sodíkový apetit“, potřeba příjmu soli
SBP	systolický krevní tlak
SDR	dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SHR	kmen potkanů; spontánně hypertenzní potkan
TAE	TRIS-acetát-EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TG	triglyceridy
THE	tetrahydrokortison

THF	5 β -tetrahydrokortisol
TM	mezenterální tuková tkáň
TNF	„tumor necrosis factor“
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TbS	trabekulární síťovina
TS	subkutánní tuková tkáň
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
Wistar+F	potkan Wistar držený na fruktosové dietě
WKY	kmen potkanů; potkan Wistar-Kyoto
X	(v souvislosti s proteinovou sekvencí) aminokyselina
ZDF	kmen potkanů; „Zucker Diabetic Fatty Rats“

10. SEZNAM PUBLIKACÍ

- K. Mazancová, I. Mikšík, J. Kuneš, J. Zicha, J. Pácha, Sexual dimorphism of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in hypertensive and normotensive rats, *Hypertens. Res.* 26 (2003) 333-338.
- K. Mazancová, I. Mikšík, J. Kuneš, J. Pácha, Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Dahl and spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Hypertens.* 16 (2003) 401-406.
- K. Mazancová, M. Kopecký, I. Mikšík, J. Pácha, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the heart of normotensive and hypertensive rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94 (2005) 273-277.
- F. Štaud, K. Mazancová, I. Mikšík, P. Pávek, Z. Fendrich, J. Pácha, Corticosterone transfer and metabolism in the dually perfused rat placenta: effect of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Placenta* (v tisku).