

Přírodovědecká fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



VLIV 7-OXO-DEHYDROEPIANDROSTERONU NA PRODUKCI  
CYTOKINŮ IZOLOVANÝMI LIDSKÝMI LEUKOCYTY

Bakalářská diplomová práce

Eva Bartošová

2008

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ladislav Janský, DrSc.

Mgr. Jan Okrouhlík

## **Bakalářská diplomová práce**

Bartošová E. , 2007: Vliv 7-oxo-dehydroepiandrosteronu na produkci cytokinů izolovanými lidskými leukocyty. [Effect of 7-oxo-dehydroepiandrosterone on cytokine production in human mononuclear cells. Bc. Thesis, in Czech.] – 31 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

### **Anotace**

*In vitro* production of cytokines (IL-6, IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) by human peripheral blood mononuclear cells was studied after incubation with different concentrations of 7-oxo-dehydroepiandrosterone.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....

Bartošová Eva

V Českých Budějovicích 2.1.2008

Ráda bych poděkovala svým školitelům prof. RNDr. Ladislavu Janskému, DrSc. a Mgr. Janu Okrouhlíkovi za odborné vedení této práce. Mé poděkování patří také dobrovolníkům, kteří darovali krev. Děkuji všem, kteří mi pomáhali slovem i skutkem.

# OBSAH

1 ÚVOD .....	5
1.1 Horečka .....	5
1.1.1 Endogenní pyroxeny .....	6
1.1.2 Mechanismus působení endogenních pyroxenů.....	6
1.1.3 Biologický význam horečky.....	7
1.2 Steroidní látky .....	7
1.2.1 Cholesterol .....	8
1.2.2 Steroidní hormony.....	8
1.2.3 Dehydroepiandrosteron (DHEA) .....	10
1.2.4 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA).....	11
1.3 Cytokiny .....	11
1.3.1 Membránové receptory pro cytokiny. ....	12
1.3.2 Úloha cytokinů v zánětlivé odpovědi.....	13
1.3.3 Cytokiny a choroby. ....	14
1.3.4 Úloha cytokinů v aktivaci lymfocytů.....	14
1.3.5 Interleukin 1 .....	15
1.3.6 Interleukin 6 .....	16
1.3.7 Tumor necrosis factor $\alpha$ .....	16
1.4 Cíl práce .....	17
2 MATERIÁL A METODY .....	18
2.1 Odběr materiálu.....	18
2.2 Izolace PBMC .....	18
2.3 Počítání buněk.....	19
2.4 Kultivace PBMC .....	19
2.5 Detekce cytokinové produkce. ....	19
2.6 Zpracování naměřených hodnot.....	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY .....	21
4 DISKUZE.....	27
5 ZÁVĚR.....	29
6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....	30

# 1 ÚVOD

## 1.1 HOREČKA

Horečka je fyziologický jev, který je průvodním symptomem mnoha infekčních nebo zánětlivých onemocnění. Zvýšení tělesné teploty nad fyziologickou mez patří k přirozeným obranným mechanismům (Nouza a John, 1987). Při horečce nastávají změny v řízení tělesné teploty. Zvýšení teploty při horečce je podmíněno změnou činností termoregulačních center umístěných v hypotalamu. Hypertermií naopak rozumíme zvýšení tělesné teploty, které nastává během usilovné práce, za stresových podmínek a nebo při dlouhodobém pobytu ve vysokých teplotách. Při hypertermii fungují termoregulační centra normálně, zvýšení tělesné teploty nastává proto, že vysoká produkce tepla uvnitř organismu a nebo zvýšený přesun tepla z prostředí do těla dočasně přesáhnou výkonnost mechanismů tepelných ztrát (pocení, vazomotorika).

Horečku vyvolává vniknutí exogenních pyrogenů do organismu. Exogenní pyrogeny jsou rozmanitého charakteru a různého původu, patří mezi ně živé i mrtvé viry, bakterie, mikrobiální houby a plazmodia (prvoci vyvolávající malárii). Účinnou složkou některých exogenních pyrogenů jsou lipopolysacharidy zvané endotoxin, které se obvykle získávají z gramnegativních bakterií. Endotoxin se využívá především pro experimentální vyvolání horečky u laboratorních zvířat. Exogenní pyrogeny mikrobiálního charakteru vyvolávají horečku nepřímo a to tak, že indukují produkci nízkomolekulových endogenních pyrogenů, které jsou tvořené především monocyty, makrofágy, lymfocyty a neutrofilními leukocyty (Nouza a John, 1987). Antigenem aktivované makrofágy začnou produkovat specifickou bílkovinu interleukin 1, která stimuluje T-lymfocyty, vyvolává jejich aktivaci a spustí celou kaskádu dějů, vedoucích ke vzniku protilátek, působících proti antigenům (mikrobům). Aktivované T-lymfocyty produkují interleukin 2, který spouští proliferaci T-buněk, dále jsou zodpovědné za produkci interferonů, které aktivují makrofágy, a růstových a diferenciacních faktorů, které stimulují růst a dělení B-lymfocytů. Z hlediska vzniku horečky je důležité, že T-lymfocyty začnou produkovat prostaglandiny. Prostaglandiny potlačují činnost makrofágů (negativní zpětná vazba) a zároveň vyvolávají horečku (Janský, 2000).

### 1.1.1 Endogenní pyrogeny

Humorální faktory, vznikající v průběhu imunitní odpovědi organismu, působí jako endogenní pyrogeny. Nejúčinnějšími z nich jsou interleukin 1, interleukin 6, IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis faktor  $\alpha$ ). Tyto látky vznikají převážně v monocytech. Není definitivně objasněno, zda horečku vyvolávají endogenní pyrogeny přímo a nebo zda je jejich účinek zprostředkován jinými látkami. Je jisté, že horečku je možno vyvolat působením prostaglandinů E a jiných metabolitů arachidonové kyseliny jako jsou tromboxany, prostacykliny, endoperoxidy aj. Pro tento názor svědčí nálezy, že látka indometacin, která brání přeměně arachidonové kyseliny na prostaglandiny, snižuje horečku. V současné době je jasné, že neexistuje jediný specifický pyrogen. Pyrogenní účinek má více látek. Jisté je, že účinek endogenních pyrogenů není druhově specifický – pyrogenní látky, získané z jedinců jednoho druhu, vyvolávají horečku u jedinců druhu jiného. Molekulární hmotnost endogenního pyrogenu činí asi 15 000 až 40 000. K vyvolání horečky stačí přítomnost nanogramových množství endogenního pyrogenu v organismu (Janský, 2000).

### 1.1.2 Mechanismus působení endogenních pyrogenů

Horečka nastává působením endogenních pyrogenů, které stimulují hypotalamické centrum termoregulace. Působením těchto pyrogenů dochází k aktivaci osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny, a tím k mobilizaci tkáňového metabolismu (Hořejší a Bartůňková, 2005). Endopyrogenní látky mají poměrně velkou molekulu a nemohou tedy snadno přecházet z krve do mozku, tudíž se zdá, že endogenní pyrogeny obcházejí hematoencefalickou bariéru a vstupují do mozku tzv. cirkumventrikulárním orgánem umístěným ve stěně třetí mozkové komory v blízkosti preoptické oblasti hypotalamu. Nervové buňky zde reagují specificky na změny teploty a jejich aktivita může být ovlivněna jak endogenními pyrogeny tak prostaglandiny. Existují nálezy, které dokazují, že je možno vyvolat horečku i po injekci endogenních pyrogenů do těch částí mozku, které se na řízení tělesné teploty podílejí jen nepřímo (prodloužená mícha, mícha) (Janský, 2000).

Zvýšení „set pointu“ při horečce způsobí, že termoregulační centra začnou vnímat normální teplotu těla jako chlad a začnou zapínat termoregulační mechanismy typické pro

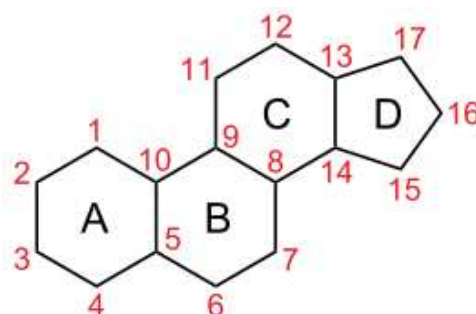
obranu vůči chladu (husí kůže, periferní cévy se stahují, svalový třes, netřesová termogeneze). Tento stav trvá tak dlouho, až se obsah tepla v těle zvýší do té míry, že teplota těla dosáhne nově nastaveného „set pointu“. Organismus potom reguluje tělesnou teplotu na této zvýšené úrovni po dobu několika hodin. Když se produkce endogenních pyrogenů v těle sníží, „set point“ postupně klesá a organismus začne pociťovat, že má v sobě nahromaděno příliš mnoho tepla. Uvede proto v činnost děje vedoucí ke zvyšování tepelných ztrát z těla. Nastane vazodilatace, pocení a zrychlené dýchání (Janský, 2000).

### 1.1.3 Biologický význam horečky

Zvýšení tělesné teploty nad fyziologickou mez patří k přirozeným obranným mechanismům, horečka je nedílnou složkou infekčního zánětu a pomáhá ničit škodlivé látky v těle. Příznivý vliv horečky je především ve zvýšení obranyschopnosti infikovaného organismu – zvyšuje se např. pohyblivost leukocytů a monocytů i jejich fagocytární schopnost a aktivita metabolických procesů, intenzivněji a rychleji probíhá tvorba cytokinů a protilátek. Snižování horečky při akutních infekčních onemocněních není správné, nižší horečky nejsou pro jinak zdravý organismus škodlivé. Déletrvajíc horečka nad 41°C však může poškodit mozek. (Nouza a John, 1987).

## 1.2 STEROIDNÍ LÁTKY

Chemicky patří steroidní látky do skupiny isoprenů. Je známo přes 5 000 přírodních isoprenů a lze je dělit podle počtu pětiuhlíkatých stavebních jednotek na mono- až polyterpeny. Za zvláštní skupinu je považována velice početná a pestrá rodina, odvoditelná od nasyceného tetracyklického uhlovdíku steranu (obr. 1), nazývaná steroidy.



Obrázek 1 Steran

Mezi steroidy patří nejrůznější látky živočišného a rostlinného původu, dovedou je však vyrábět i tak primitivní organismy jako jsou kvasinky, plísně a bakterie. Do skupiny steroidních látek patří regulátory životních procesů, nezbytné součásti buněčných membrán,

emulgátory v procesu trávení či obranné látky některých živočichů. Mezi steroidy nalezneme látky nesmírně toxické i nenahraditelná léčiva.

Pestrost steroidních látek je dána druhem, počtem a pozicí substituentů a konfigurací jejich vazeb, dále počtem a pozicí dvojných vazeb ve steranovém systému. Různorodost steroidů je dále zvyšována možností různých vzájemných konfigurací kruhů.

### 1.2.1 Cholesterol

Prekurzorem všech steroidních hormonů u člověka je cholesterol. Cholesterol má také klíčový význam pro biosyntézu dalších důležitých steroidů – žlučových kyselin a kalciferolů (vitamin D). Cholesterol je významnou součástí plazmatických membrán, moduluje jejich tekutost a permeabilitu. Ve větší míře je přítomen v mozku (tvoří asi 10 % jeho sušiny), ve žluči, krevní plasmě, kde je esterifikován nenasycenými mastnými kyselinami a tvoří součást plasmových lipoproteinů v nadledvinách, nervové tkáni, kde je součástí myelinových obalů nervových buněk. Vylučování cholesterolu se z větší části uskutečňuje v játrech přeměnou cholesterolu na žlučové kyseliny. Nepřeměněná část se odbourává činností střevních bakterií redukcí na 5  $\beta$ -cholestan-3  $\beta$ -ol (Vodrážka, 1996).

### 1.2.2 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou látky lipofilního charakteru, které snadno procházejí membránou a vstupují do cytosolu. Steroidy se váží na intracelulární receptory, které jsou buď v cytosolu nebo v jádře cílových buněk. Komplex hormon-receptor působí jako transkripční faktor, tzn. že aktivuje nebo potlačuje expresi genů. V případě aktivace genů, dochází k syntéze proteinů, které vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Vzhledem k tomu, že steroidy zasahují do exprese genů nastupují jejich účinky ve srovnání s ostatními hormony pomaleji, ale zato jsou déletrvající.

Všechny steroidní hormony se tvoří z cholesterolu přeměnou na pregnenolon, dalším krokem jsou gestageny, z nichž různými reakcemi vznikají glukokortikoidy, mineralokortikoidy, androgeny a estrogeny.



Dle místa svého vzniku se steroidní hormony rozdělují na dvě skupiny: adrenokortikoidní hormony a gonadální hormony.

Adrenokortikoidní hormony (kortikoidy) jsou vylučovány kůrou nadledvin po stimulaci peptidovým hormonem ACTH (adrenokortikotropní hormon). Je známo více než 40 různých kortikoidů. Přes výraznou příbuznost jednotlivých kortikoidů existují dva funkčně rozdílné typy těchto hormonů: glukokortikoidy a mineralokortikoidy.

Glukokortikoidní hormony (např. hydrokortizon) regulují metabolismus sacharidů, jmenovitě provokují biosyntézu glykogenu. Brzdí proteosyntézu a podporují degradaci bílkovin na aminokyseliny, které pak slouží jako prekurzory pro výrobu glykogenu. Ten se ukládá v játrech a tím se současně brzdí periferní využívání glukózy.

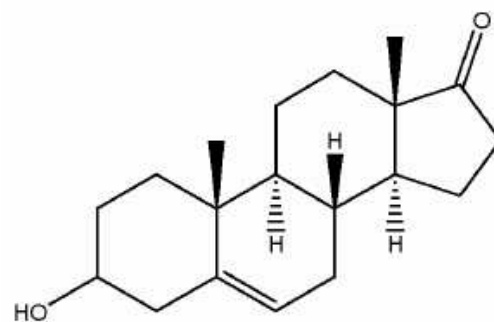
Glukokortikoidy mají silné protizánětlivé a protialergické účinky. Byly vyvinuty vysoce účinné syntetické deriváty přírodních hormonů široce využívané při léčení revmatismu, astmatu, kožních onemocnění aj.

Mineralokortikoidy (např. aldosteron) kontrolují metabolismus minerálních látek a zadržováním iontů  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^-$  ledvinami a vylučováním iontů  $\text{K}^+$  dochází ke zvyšování krevního tlaku. Zvýšení  $\text{Na}^+$  iontů vede ke zvýšení osmotického tlaku a tím ke zvýšení množství intravaskulárních tělesných tekutin, což způsobuje zvýšení krevního tlaku. Při snížení  $\text{Na}^+$  toto platí naopak.  $\text{K}^+$  ionty udržují osmotický tlak v buňkách a tím i stabilní množství tekutin v buňkách.

Gonadální hormony se tvoří v pohlavních žlázách a ovlivňují vývoj a funkci pohlavních orgánů a určují tak samčí a samičí charakter organismu a vytváření sekundárních pohlavních znaků. V samičím organismu se vytvářejí dvě fyziologicky odlišné skupiny pohlavních hormonů: estrogeny (jako jsou estron, estradiol a estriol) a gestageny (jako např. progesteron). Varlata produkují samčí pohlavní hormony androgeny (jako je testosteron), které jsou třeba ke zrání spermatu, dále stimulují anabolické procesy, jako je syntéza bílkovin (Vodrážka, 1996).

### 1.2.3 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

DHEA je metabolitem cholesterolu. Po cholesterolu je nejrozšířenějším steroidem v organismu. Polovina DHEA se syntetizuje v kůře nadledvin (Murray et al., 2002), zbytek vzniká v pohlavních žlázách, tukové tkáni, mozku (Celest a Stárka, 2002). V krevní plazmě je ve své sulfátové podobě (DHEA-S). DHEA je prekurzorem všech pohlavních hormonů. Nejvyšší hladinu DHEA nacházíme v prenatálním období, po porodu hladina DHEA klesá téměř na nulu. DHEA se pak začíná vyplavovat do krve asi v 6 letech života, nejvíce je ho v krvi asi kolem 26 let a potom pomalu klesá. V průběhu života se hladina DHEA v organismu lineárně snižuje a v 80. roce je již snížena o 95%. Z tohoto důvodu se vědci o tuto látku zajímají a zkoumají ji jako možný přípravek na zpomalení stárnutí. Hladina DHEA je objektivním ukazatelem stáří organismu - můžeme mluvit o biologickém opotřebování v jakémkoliv období života. Liší se u mužů a žen.



**Obrázek 2** Dehydroepiandrosteron (DHEA)

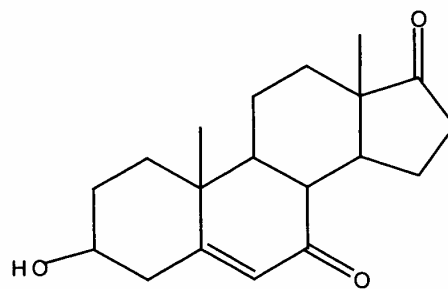
DHEA ovlivňuje tvorbu kortikoidů, které vykonávají mnoho funkcí např. v boji proti infekcím, zánětům. DHEA hraje důležitou roli v metabolismu tuků. Při nízké hladině DHEA se tuky nespálují, ale ukládají. Nízkou hladinu DHEA nacházíme u diabetiků.

DHEA má nezastupitelné místo při léčbě lupénky (Furie 2000, Doria et al.2002), adrenální nedostatečnosti, depresí, diabetes mellitus, hypertenze, používá se také jako podpůrný prostředek při léčbě HIV pozitivních pacientů (Rabkin et al., 2000), při šokových stavech, traumatech, rozsáhlém krvácení a různých revmatologických onemocněních (Cutolo, 2000).

DHEA smí být podáván pouze pod dohledem lékaře. Nesprávné podávání či vysoké dávky tohoto steroidu mohou vyvolat řadu nežádoucích účinků, např. vznik na hormonech závislých tumorů (rakovina prsu, prostaty), zvýšená produkce mužských hormonů u žen a změny nálad. Příliš velké dávky DHEA podávané dlouhodobě vedly u laboratorních zvířat v některých případech k rakovině jater.

## 1.2.4 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA)

3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-7,17-dione (7-oxo-dehydroepiandrosteron), metabolit DHEA, je přirozenou složkou krevního séra. Hladina 7-oxo-DHEA je řádově 10<sup>-1</sup> nmol/l (přibližně 0,2 nmol/l) (Kazihnitková et al., 2007). 7-oxo-DHEA je mezistupněm při biosyntéze 7-hydroxylovaných forem DHEA, které



**Obrázek 3** 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA)

mají lokální imunosupresivní účinky (Morfin, 2002). 7-oxo-DHEA má termogenní účinky, které jsou srovnatelné s termogenními účinky thyroidních hormonů, a proto 7-oxo-DHEA patří do skupiny ergosteroidů (Lardy et al., 1995). 7-oxo-DHEA vzniká z DHEA zřejmě působením enzymů vyskytujících se v lidské kůži a jiných tkáních. Hodně pokusů na zvířatech na účinky DHEA totiž prokázalo nejlepší výsledky při podkožní aplikaci DHEA (Faredin et al., 1969). Tato látka se jeví jako nízko toxická (2000mg/kg u kryš či 500mg/kg u primátů nevyvolalo žádné nežádoucí toxické či mutagenní účinky). 7-oxo-DHEA zvýšil paměť u stárnoucích potkanů (Tejkalová a Benešová, 2002). Někteří uživatelé 7-oxo-DHEA a DHEA registrovali při užívání 7-oxo-DHEA absenci depresivních výkyvů nálady, který se vyskytoval po konzumaci DHEA a mnohdy činil překážku tomuto užívání. Navíc 7-oxo-DHEA není narozdíl od DHEA prekurzorem biologicky aktivních androgenů a estrogenů, které pravděpodobně zvyšují riziko vzniku rakoviny ženských reprodukčních orgánů a prostaty u mužů. Pro své termogenní účinky byl 7-oxo-DHEA navržen jako prevence Raynaudovy choroby (abnormální vazokonstrikce při odpovědi na chlad) (Ihler a Chami-Stemman H., 2003).

## 1.3 CYTOKINY

Cytokiny jsou chemické látky proteinového charakteru, které jsou produkovány především buňkami imunitního systému. Dále mohou být vytvářeny např. fibroblasty, endotelovými buňkami, astrocyty, gliovými buňkami atd.

Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní, tzn. že působí na několik různých druhů buněk. Často také cytokiny působí v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a celý cytokinový systém je do určité míry redundantní, tzn. že jednotlivé cytokiny mohou být často nahrazeny jinými. Cytokiny působí buď autokrinně na buňku, která je sekretovala, nebo parakrinně na sousední buňky, nebo endokrinně a pak se váží na vzdálené buňky. Vazba cytokinu na buněčný receptor přenáší signál do buňky a vede k aktivaci a expresi genů. Cytokiny regulují intenzitu a trvání imunitní odpovědi stimulací a inhibicí proliferace různých buněk nebo sekrecí protilátek nebo jiných cytokinů těmito buňkami.

Dva cytokiny mohou působit synergicky, jejich účinek je potom tedy větší než součet účinků jednotlivých cytokinů. Cytokiny na sebe mohou také působit antagonisticky, kdy účinek jednoho cytokinu inhibuje účinek jiného. Účinek jednoho cytokinu na buňku obvykle reguluje expresi cytokinového receptoru a expresi dalších cytokinů, které působí na další buňky.

Určitá nespecifita v působení cytokinů je nahrazena přísnou regulací exprese cytokinových receptorů na buňkách. Často jsou tyto receptory exprimovány na buňce až po její interakci s antigenem. Tím je nespecifická lymfocytová aktivace omezena na lymfocyty, které se setkaly s antigenem. Jiným mechanismem udržujícím specifitu je požadavek na vzájemný kontakt buněk, aby se vytvořily účinné koncentrace cytokinu. Účinné koncentrace různých cytokinů se pohybují řádově mezi  $10^{-10}$  –  $10^{-12}$  mol/l.

K poznání struktury a funkce cytokinů přispělo objevení nádorových buněk sekretujících cytokiny. To poskytlo možnost získat homogenní populace buněk, sekretujících cytokiny ve větším množství než kultury lymfoidních buněk. Dalším pokrokem byl objev buněčných linií, jejichž růst byl závislý na určitém cytokinu. Když bylo popsáno velké množství cytokinů na základě svého účinku, zjistilo se, že často jsou popisovány různé aktivity téhož faktoru. Byla proto vytvořena standardizovaná nomenklatura, v níž většina cytokinů byla označena jako interleukiny, aby se zdůraznila jejich úloha v komunikaci mezi leukocyty (Hořejší a Bartůňková, 2005).

### 1.3.1 Membránové receptory pro cytokiny

Cílová buňka, na který má cytokin působit, musí mít na svém povrchu receptor pro daný cytokin. Jeden cytokin může nacházet na buňce více receptorů s podobnými vazebnými

vlastnostmi. Signály, které cytokiny vyvolávají vazbou s receptory mají několik společných aktivačních cest, obdobných u různých receptorů i různých ligandů, cytokinů, hormonů, neurotransmiterů a dalších informačních molekul

Na základě molekulových homologií můžeme řadit receptory do společných strukturních rodin. Jednu skupinu tvoří receptory pro nervový růstový faktor, kam patří i tumor necrosis faktor, TNF-R I,II (Mallet a Barclay, 1991).

Receptory pro IL-1 byly nejprve stanoveny funkčně na cílových buňkách (např. fibroblastech, lymfocytech). Každá buňka nese 5 – 15000 receptorů pro IL-1 a váží jak IL-1 $\alpha$ , tak i IL-1 $\beta$  (Oppenheim et al., 1986). Místo zásahu IL-1 je širokospektré a proto také receptory jsou přítomny na řadě typů buněk.

Receptor pro IL-6 je tvořen dvěma podjednotkami a je exprimován na aktivovaných B- a T-lymfocytech, monocytech a mnoha dalších buňkách zahrnujících epiteliální buňky, fibroblasty, hepatocyty a nervové buňky (Callard, 1994).

Pro TNF existují dva typy receptorů, oba váží TNF-  $\alpha$  i TNF-  $\beta$ . TNF receptory jsou přítomny téměř na všech buněčných typech s několika výjimkami jako jsou např. erytrocyty a klidové T-lymfocyty.

### 1.3.2 Úloha cytokinů v zánětlivé odpovědi

V odpovědi na infekci nebo poškození tkáně dochází ke kaskádě nespecifických jevů známých jako odpověď akutní fáze. Pod vlivem cytokinů dochází k adherenci zánětlivých buněk na vaskulární endotel a k jejich migraci do tkáně. Výsledkem je příliv lymfocytů, neutrofilů, monocytů, eosinofilů, basofilů a žírných buněk do místa poškození a účast těchto buněk v likvidaci antigenu. Systémová odpověď zahrnuje vývoj horečky, zvýšenou syntézu hormonů (např. ACTH, hydrokortizon), leukocytózu a produkci proteinů akutní fáze. Zvýšená teplota inhibuje růst patogenů a zvyšuje imunitní odpověď.

Akutní fáze zánětlivé reakce je zahájena aktivací tkáňových makrofágů a uvolněním tří cytokinů: IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$ . Tyto cytokiny působí synergicky a indukují množství lokálních i systémových změn. Pod jejich vlivem dochází ke koagulaci a zvýšení propustnosti cév. TNF  $\alpha$  a IL-1 zvyšují expresi adhezivních molekul na cévních endoteliích. Oba cytokiny také působí na makrofágy a indukují produkci IL-8, který zvyšuje adhezi neutrofilů k endotelovým buňkám a současně funguje jako jejich chemotaktický faktor

Společné působení IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$  vyvolává horečku, TNF stimuluje sekreci kolonie stimulujících faktorů endoteliálními buňkami a makrofágy.

Syntéza IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$  je indukována různými stimuly jako jsou viry, endotoxin a cytokiny samotné. TNF $\alpha$  a IL-1 vzájemně indukují svou expresi nebo expresi IL-6 (Hořejší a Bartůňková, 2005).

### 1.3.3 Cytokiny a choroby

Úloha nadprodukce cytokinů v patogenezi může být ilustrována septickým šokem. K vývoji šoku dochází během několika hodin po infekci některými gramnegativními bakteriemi jako např. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* aj. Symptomy bakteriálního septického šoku jsou pokles krevního tlaku, teplota, průjem a rozsáhlé srážení krve v různých orgánech. Za šok zodpovídá nadprodukce IL-1 a TNF $\alpha$  makrofágy, které jsou stimulovány endotoxinem. Zdá se, že by se mohlo podařit odvrátit šok injekcí monoklonálních protilátek proti těmto cytokinům.

Nekontrolovatelná produkce cytokinů hraje úlohu i u některých nádorových onemocnění. Některé B myelomy sekretují IL-6, který slouží jako autokrinní stimulátor jejich růstu. Buňky infikované virem lidské T buněčné leukémie konstitutivně exprimují IL-2 a IL-2 receptor, což je stimuluje k proliferaci (Nouza a John, 1987).

### 1.3.4 Úloha cytokinů v aktivaci lymfocytů

Klidové T-lymfocyty jsou necyklující buňky v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu. Po aktivaci vstupují do buněčného cyklu přes G<sub>1</sub> fázi do S fáze, ve které se replikuje DNA. Aktivace klidových T buněk z G<sub>0</sub> do časně G<sub>1</sub> fáze vyžaduje dva tzv. kompetenční signály. První vzniká při interakci komplexu antigen – MHC (hlavní histokompatibilní komplex) s TCR, druhým kostimulačním signálem je IL-1. Po transdukci signálů přes plazmatickou membránu dojde k transkripci řady genů včetně genů pro IL-2 a IL-2 receptor. Následující vazba IL-2 na svůj receptor slouží jako progresivní signál, který umožňuje přechod T buňky z G<sub>1</sub> fáze do S fáze.

Klidové B-lymfocyty jsou aktivované antigenem a různými cytokiny produkovanými  $T_H$  buňkami. Kromě vazby antigenu na protilátkové receptory jsou nezbytné kostimulační signály IL-1 a IL-4. Interakce antigenu s membránovým protilátkovým receptorem slouží jako signál, který uvede klidovou B buňku z fáze  $G_0$  do časně  $G_1$ , ve které je schopna odpovědět na IL-4 signál. Interakce s IL-4 působí jako signál uvádějící B buňku do pozdní  $G_1$  fáze. IL-4 funguje jako progresivní signál umožňující přechod buňky do S fáze.

### 1.3.5 Interleukin 1 (IL-1)

IL-1 je produkován řadou buněk zahrnujících monocyty, makrofágy, B-lymfocyty, dendritické buňky, fibroblasty, Langerhansovy buňky, neutrofilny, epiteliální a endotelové buňky. IL-1 je těmito buňkami produkován pouze po jejich stimulaci. Jako stimul pro produkci IL-1 může sloužit fagocytóza bakterií. Lipopolysacharid (LPS) z buněčné stěny gramnegativních bakterií sám indukuje syntézu IL-1. Při vysoké koncentraci IL-1 se uplatňuje autokrinní regulace (Manson et al., 1989). Vysoká koncentrace IL-1 má inhibiční účinek, snižující se koncentrace působí stimulačně. Tvorba IL-1 je dále inhibována kortikoidy a některými cytokiny, histaminem a prostaglandiny.

Existují dva typy IL-1: IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Oba polypeptidy mají stejnou velikost molekuly (15-17 kDa), ale liší se nábojem. Oba mají společný prekurzor, ze kterého jsou proteolyticky štěpeny. IL-1 $\alpha$  je většinou vázaný na buněčné membráně a aktivuje T buňky při membránové interakci.

Hlavní úlohou IL-1 je aktivace  $T_H$  buněk. Vazba IL-1 na buněčné receptory rozvíjí sled dalších dějů. Dochází ke zvýšené expresi vlastních receptorů pro IL-1, stoupá membránová denzita receptorů pro IL-2 a zvyšuje se sekrece dalších cytokinů jako IL-2, IL-3, IL-4, IL-6. IL-1 je značně pleiotropní ve svém účinku. Urychluje zrání a klonální expanzi B buněk po antigenem indukované aktivaci. Zvyšuje aktivitu NK buněk a ovlivňuje lokální zánětlivou reakci. Po podání IL-1 *in vivo* neutrofilny opouštějí kostní dřeň, vstupují do cirkulace a pronikají přes stěny kapilár do tkání. IL-1 má na neutrofilny a makrofágy chemotaktický účinek. Kromě toho má IL-1 endokrinní efekt a indukuje produkci proteinů akutní fáze jaterními hepatocyty. Působí též na nervový systém a vyvolává horečku, ospalost, nechutenství.

### 1.3.6 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 je produkován aktivovanými  $T_H$  buňkami, makrofágy, monocyty, fibroblasty a endotelovými buňkami. V nervové tkáni je IL-6 tvořen astrocyty a mikrogliovými buňkami a tím přispívá k lokální obraně proti infekcím (Frei et al., 1989). U nádorových buněk funguje autokrinně a stimuluje buněčnou proliferaci. Stimuluje sekreci imunoglobulinů plazmatickými buňkami a společně s IL-1 působí kostimulačně na aktivaci  $T_H$  buněk. Tvorba IL-6 je stimulována TNF. IL-6 potlačuje zpětnou vazbou další tvorbu TNF a tím snižuje nadměrný zánětlivý proces.

IL-6 má, stejně jako IL-1, pyrogenní účinek. Vlivem IL-1 dochází k tvorbě IL-6 a k řádovému zvýšení jeho biologické účinnosti. Samostatně nebo v interakci s ostatními faktory zvyšuje IL-6 primární a zvláště sekundární protilátkovou odpověď. (Takatsuki et al., 1988). Působí také na terminální diferenciaci B-lymfocytů v mukózních tkáních a podmiňuje vysokou lokální koncentraci plazmatických buněk, které sekretují IgA. IL-6 se účastní zánětlivých procesů. IL-6 reguluje nejen imunitní procesy, ale také metabolické funkce jaterních buněk, zvláště syntézu proteinů akutní fáze.

### 1.3.7 Tumor necrosis faktor alfa (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$  je produkován makrofágy jako reakce na endotoxin. Má přímý cytotoxický účinek na nádorové buňky, na normální buňky tento vliv nemá. Má také důležitou roli ve vývoji zánětlivé odpovědi. Jeho nadprodukce však může poškozovat hostitele. Bylo zjištěno, že za rozsáhlý úbytek váhy (cachexie), provázející některé bakteriální a parazitické infekce a tumory je zodpovědný právě TNF $\alpha$  (dříve označovaný jako cachetin). Dalším chemicky příbuzným polypeptidem, který sekretují aktivované T buňky, je TNF $\beta$  (lymfotoxin). Podobně jako TNF $\alpha$  zabíjí nádorové buňky.



## 1.4 CÍL PRÁCE

Steroidní hormony je různorodá skupina látek, z nichž některé mají prokazatelný pyretický účinek (vyvolávají horečku), zatímco některé jiné látky horečku potlačují (antipyretický účinek). Cílem této práce bylo sledovat na mononukleárních buňkách lidské periferní krve účinek 7-oxo-dehydroepiandrosteronu na produkci cytokinů a zjistit zda se účinek této látky může na rozvoj horečky realizovat přímo a nebo nepřímo přes zvýšenou produkci cytokinů izolovanými lidskými leukocyty.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Odběr materiálu

Odebíráno bylo vždy 18 ml venózní krve z předloktí od zdravých dárců (mužů a žen ve věku 20-23 let). Krev byla odebírána do sterilních heparizovaných zkumavek (Vacuette, Grenier Laborortechnik, Austria). Odběry prováděla kvalifikovaná zdravotní sestra.

### 2.2 Izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC)

K izolaci byla použita metoda gradientové hustotní centrifugace za pomoci roztoku Ficoll-Paque (Boyum, 1968).

Ve sterilních zkumavkách o objemu 15 ml (GAMA, a.s., České Budějovice) bylo 6 ml odebrané krve naředěno 6 ml Hanksova roztoku (lékarna VFN, Praha) a promícháno. Do dalších sterilních zkumavek byl po 3 ml napipetován roztok Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Na tento roztok bylo opatrně navrstveno 6 ml naředěné krve tak, aby nedošlo k vzájemnému promíchání tekutin.

Následovala centrifugace vzorků po dobu 40 minut při 1200 otáčkách za minutu a pokojové teplotě na centrifuze Universal 32R (HETTRICH Zentrifugen, Denmark). Ve zkumavkách se vytvořily tři vrstvy, na dně zkumavky sediment, uprostřed zkumavky bílý prstenec mononukleárních buněk (lymfocyty, monocyty), nad prstencem supernatant (plazma). Plazma byla posléze odsáta a prstenec s PBMC byl odsát a přepipetován sterilní špičkou do jiné sterilní zkumavky. Ta byla doplněna do 10 ml Hanksovým roztokem a následovala další centrifugace po dobu 10 minut při pokojové teplotě a 1200 otáčkách za minutu. PBMC se během této centrifugace usadily na dně zkumavky. PBMC byly promyty stejným způsobem ještě jednou, tím byly očištěny od sérových proteinů.

Použité roztoky byly skladovány v ledniče při teplotě 4°C a před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu. Izolace byla prováděna asepticky v digestoři (Jouan MSC 12)

## 2.3 Počítání buněk

Po slítí supernatantu byly vyizolované PBMC naředěny 1 ml kultivačního média (RPMI-1640) a promíchány, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení buněk v médiu. Pro počítání byl použit jeden díl kultury buněk a 9 dílů barviva (trypanová modř, 0,5% vodný roztok). Obarvené buňky byly počítány v Bürkerově komůrce a jejich výsledný počet se stanovil podle vzorce:

$$\text{počet buněk/ml} = \text{počet buněk ve 25 polích} * 10 * 10^{\text{(ředění)}} * 10^3$$

## 2.4 Kultivace PBMC

Izolované PBMC byly kultivovány na mikrotitrační destičce v médiu RPMI-1640 obohaceného o penicilin, streptomycin a L-glutamin (Bio Whittaker, A Cambrex Company, Maryland). Kultura PBMC byla naředěna kultivačním médiem RPMI-1640 a rozpipetována po 200  $\mu\text{l}$  do jednotlivých jamek, aby byl počet PBMC v každé jamce  $10^6$ . Dále se do jamek přidaly 2  $\mu\text{l}$  roztoku 7-oxo-DHEA v různých koncentracích. Byly použity tyto konečné koncentrace 7-oxo-DHEA:  $10^{-2}$  nmol/l,  $10^{-1}$  nmol/l,  $10^0$  nmol/l,  $10^1$  nmol/l,  $10^2$  nmol/l,  $10^3$  nmol/l,  $10^4$  nmol/l. 7-oxo-DHEA jsem obdržela v prášku (dar od p. prof. Hampla z Endokrinologického ústavu v Praze), který byl převeden na zásobní roztok. Nejprve byl prášek rozpuštěn v 1 dílu metanolu a poté bylo přidáno 9 dílů vody. Jako kontrola byly použity buňky v kultivačním médiu, bez přídavku 7-oxo-DHEA. Vzorky byly inkubovány v kultivačním termostatu (MCO-17 AIC, Scholler Instruments, Praha) při konstantní teplotě 37 °C a 3,5 %  $\text{CO}_2$  v atmosféře. Vzorky média z kultivačních jamek byly odebírány v časech 24 a 48 hodin na jinou mikrotitrační destičku a zamrazovány při teplotě -20 °C.

## 2.5 Detekce cytokinové produkce

Během této práce byly stanovovány cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ . pomocí metody ELISA (Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay). Byly používány imunoenzymatické kity (Bender MedSystems, Wien, Austria). Kvantitativní stanovení jednotlivých cytokinů bylo

prováděno dle postupu poskytnutého výrobcem. Kity byly skladovány v ledničce při teplotě 4 °C a před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu.

Jamky s navázanými monoklonálními protilátkami byly nejdříve dvakrát promyty promývacím pufrem. Do jamek bylo napipetováno 50 µl vzorků či standardů, k nim přidáno 50 µl ředícího pufru. Do jamky sloužící jako negativní kontrola bylo napipetováno pouze 100 µl ředícího roztoku. Poté bylo do všech jamek přidáno 50 µl biotin-konjugátu (sekundární protilátka proti danému cytokinu s navázaným biotinem). Pak následovala inkubace na třepače za pokojové teploty po dobu 2 hodin, kdy se IL-1/ IL-6/ TNF- $\alpha$  přítomný ve vzorcích či standardech navázal na protilátky na dně jamek, biotin-konjugát se jako sekundární protilátka navázal na IL-1/ IL-6/ TNF- $\alpha$ .

Po inkubaci byly jamky čtyřikrát promyty 300 µl promývacího roztoku. Tím se odstranil nenavázaný materiál. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl streptavidinu-HRP. Streptavidin má vysokou afinitu k biotinu a zároveň je na jeho molekule navázaný enzym křenová peroxidáza. Vzorky byly opět inkubovány na třepače po dobu 1 hodiny. Streptavidin-HRP se během inkubace navázal na v předchozích krocích vzniklý komplex biotin-konjugát anti-IL-1/ IL-6/ TNF- $\alpha$ .

Po inkubaci byly jamky čtyřikrát promyty a bylo do nich napipetováno 100 µl chromogenního substrátu (3,3', 5,5' - tetramethyl benzidin + peroxid vodíku). Následující inkubace probíhala ve tmě na třepače po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby se do jamek přidalo 100 µl stopovacího roztoku (kyselina fosforečná). Koncentrace látky v jednotlivých jamkách byly přímo úměrné intenzitě zbarvení. Absorbance byly změřeny pomocí spektrofotometru (Tecan, Austria, typ Sunrise). Byla užita vlnová délka 450 nm. Získaná data byla dále zpracovávána pomocí počítačového softwaru KIM (Immunochemical Methods for Windows, Daniel Kittrich, 2000).

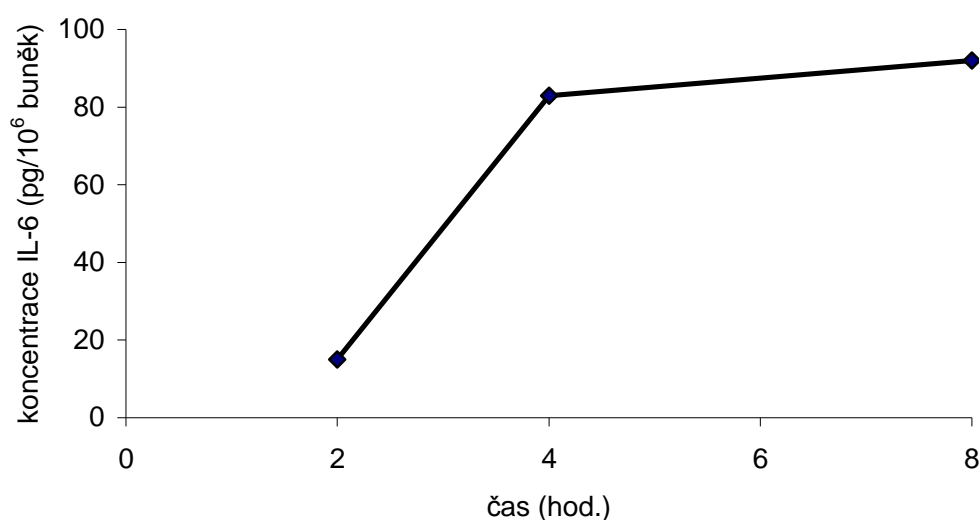
## 2.6 Zpracování naměřených hodnot

Vzorky byly stanoveny v singlech nebo duplikátech. V případě duplikátů ukazují výsledky průměrné hodnoty. Koncentrace cytokinů ze vzorků byly určeny ze standardních kalibračních křivek, které byly získány ze série ředění rekombinantních lidských cytokinů. Grafy ukazují průměrné hodnoty, přepočtené na 10<sup>6</sup> buněk.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

Experimentální výsledky byly získány měřením produkce cytokinů IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$ . Izolované PBMC byly inkubovány spolu s kulturačním médiem RPMI 1640 a různými koncentracemi 7-oxo-DHEA při *in vivo* podmínkách. Koncentrace jednotlivých cytokinů byly stanovovány metodou ELISA.

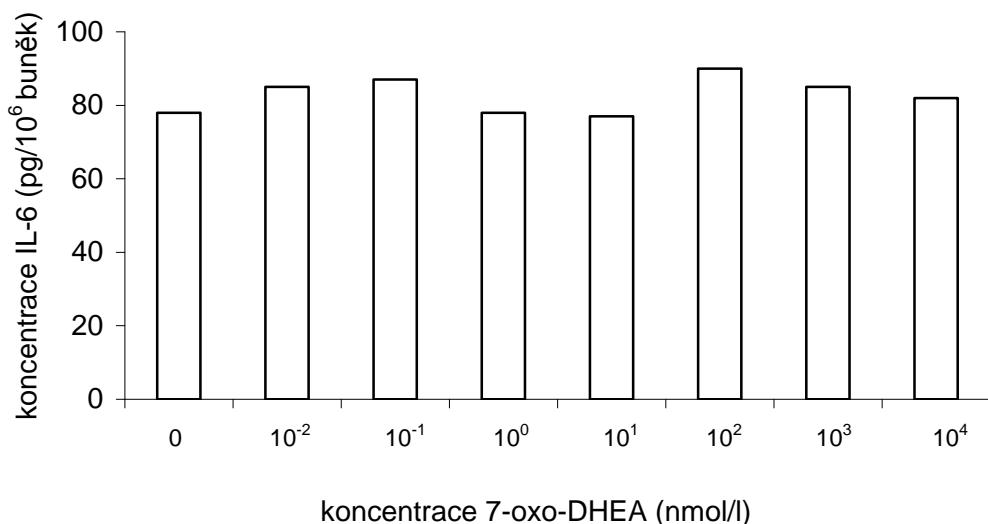
#### Produkce interleukinu 6 (IL-6)



**Obrázek 4** Časová produkce IL-6 nestimulovanými PBMC

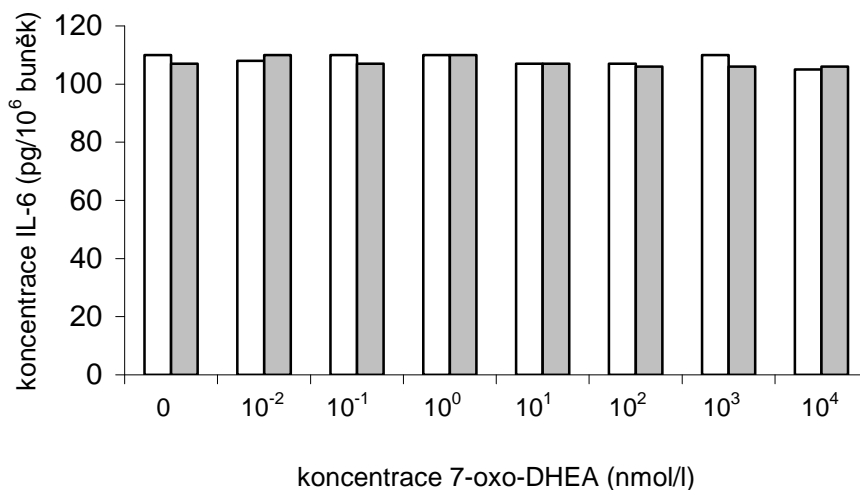
Zdá se, že produkce IL-6 nestimulovanými PBMC dosahuje maximálních hodnot (83 pg/10<sup>6</sup> buněk) po 4 hodinách inkubace (Obr. 4). Po tomto čase se hladina IL-6 již významně nezvyšovala. Toto potvrzují i jiní autoři (Stará, 2004).

Při zjišťování vlivu 7-oxo-DHEA na produkci IL-6 byly PBMC inkubovány nejdříve po dobu 4 hodin (Obr. 5).



**Obrázek 5** Produkce IL-6 lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace 4 hod.

Poločas rozpadu steroidních hormonů se pohybuje v hodinách až desítkách hodin (Marwah et al., 2001), tudíž i jejich účinek se dostavuje po delší době, proto byla v dalším pokusu zvolena delší doba inkubace - 24 a 48 hodin (Obr. 6).



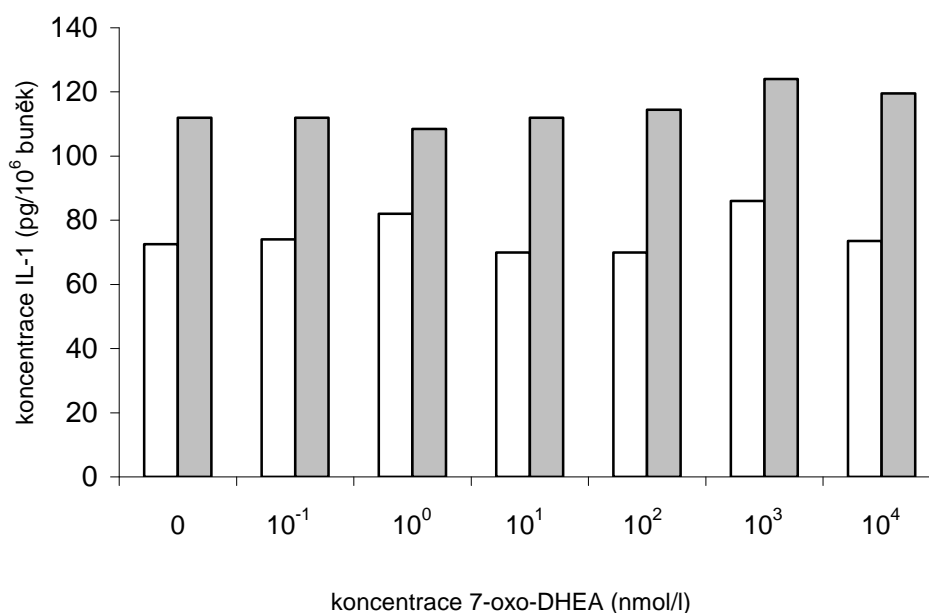
**Obrázek 6** Produkce IL-6 lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace: bílé sloupce 24 hod., šedé sloupce 48 hod.  $n=1$

Kontrolní hodnoty byly 110 pg/10<sup>6</sup> buněk pro čas inkubace 24 hod. a 107 pg/10<sup>6</sup> buněk pro čas inkubace 48 hod. Stimulované PBMC vykazovaly hodnoty koncentrací IL-6 od

105 do 110 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 24 hod.) a od 106 do 110 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 48 hod.). Drobné rozdíly mezi jednotlivými hodnotami vztahujícími se k různým koncentracím 7-oxo-DHEA nejsou statisticky signifikantní.

## Produkce interleukinu 1 (IL-1)

Vliv 7-oxo-DHEA byl zkoumán i na produkci IL-1 (Obr. 7).

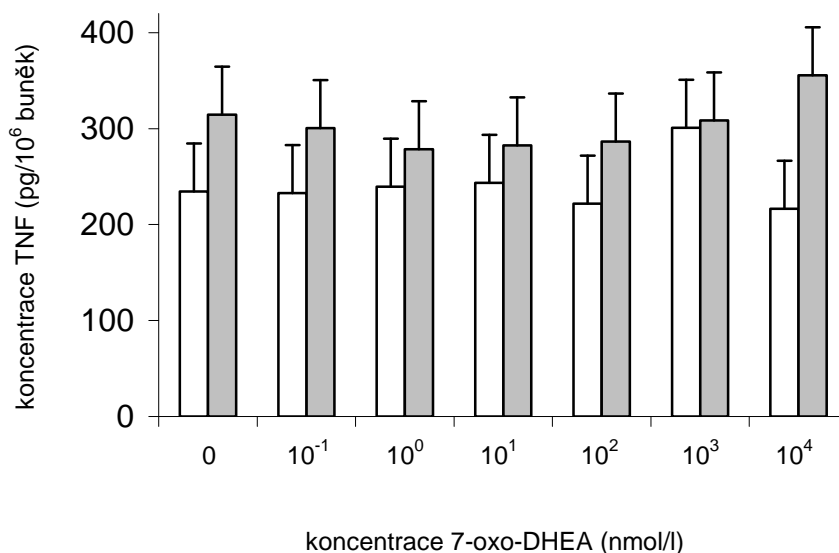


**Obrázek 7** Produkce IL-1 lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace: bílé sloupce 24 hod., šedé sloupce 48 hod. n=2

Hodnoty koncentrací IL-1 u nestimulovaných PBMC (kontroly) byly průměrně 72 pg/10<sup>6</sup> buněk pro čas inkubace 24 hod. a 112 pg/10<sup>6</sup> buněk pro čas inkubace 48 hod. Průměrné hodnoty koncentrací IL-1 stimulovaných PBMC se pohybovaly od 70 do 86 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 24 hod.) a od 108 do 124 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 48 hod.). Hodnoty IL-1 se u stimulovaných PBMC výrazně neliší od hodnot kontrolních (sloupec 0). Vyšší hodnoty u doby inkubace 48 hod. lze přisoudit časovému průběhu produkce IL-1. Ani v tomto případě nelze mluvit o výrazném účinku 7-oxo-DHEA (při použitých koncentracích) na zvýšenou produkci IL-1.

## Produkce tumor necrosis faktoru $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Vliv 7-oxo-DHEA byl zkoumán i na produkci TNF $\alpha$  (Obr. 8).

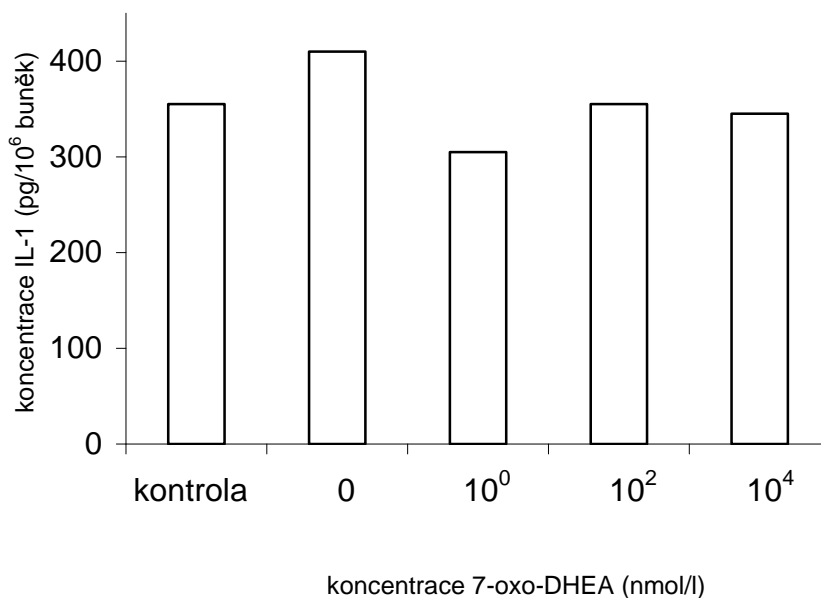


**Obrázek 8** Produkce TNF $\alpha$  lidskými PBMC stimulovanými různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace: bílé sloupce 24 hod., černé sloupce 48 hod.  $n=2$

V tomto případě nelze zaznamenat pozitivní výsledek v účinku 7-oxo-DHEA na zvýšenou produkci TNF $\alpha$ . Kontrolní hodnoty byly průměrně 234 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 24 hod.) a 314 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 48 hod.). Hodnoty koncentrací TNF $\alpha$  stimulovanými PBMC se pohyboval od 216 do 301 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 24 hod.) a od 278 do 355 pg/10<sup>6</sup> buněk (inkubace 48 hod.). Při koncentraci 7-oxo-DHEA 10<sup>3</sup> lze vidět možný účinek na zvýšenou produkci TNF $\alpha$  v čase inkubace 24 hod., také koncentrace 10<sup>4</sup> měla po delší době inkubace (48 hod.) vliv na zvýšenou produkci TNF $\alpha$ . Tyto výsledky ale nebyly dostatečně verifikovány. Navíc koncentrace 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> nmol/l nejsou fyziologickými koncentracemi.

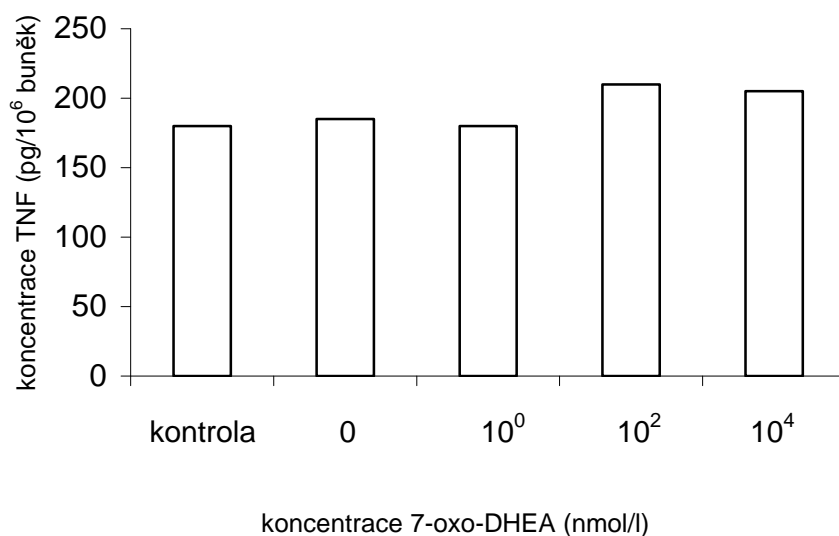


Další pokusy byly prováděny s PBMC stimulovanými noradrenalinem v koncentraci  $1\mu\text{mol/l}$  ( $10^{-6}$  M), koncentrace 7-oxo-DHEA byly 0,  $10^0$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  nmol/l (Obr. 9, 10). Noradrenalin v koncentracích  $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  M zvyšuje produkci IL-1 o 11-30%, produkce TNF $\alpha$  se při stejných koncentracích noradrenalinu zvyšuje o 10-30% (Matějovská, 2004)



**Obrázek 9** Produkce IL-1 lidskými PBMC stimulovanými noradrenalinem ( $10^{-6}$  M) a různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace 12 hod. Jako kontrola byla použita kultura PBMC + kultivační médium.  $n=1$

Byl prokázán stimulační účinek noradrenalinu, hodnota koncentrace IL-1 se oproti kontrole zvýšila o  $55\text{ pg}/10^6$  buněk. Nelze ale zaznamenat stimulační účinek na produkci IL-1 při společném působení noradrenalinu a 7-oxo-DHEA.



**Obrázek 10** *Produkce TNF $\alpha$  lidskými PBMC stimulovanými noradrenalinem ( $10^{-6}$  M) a různými koncentracemi 7-oxo-DHEA. Doba inkubace 12 hod. Jako kontrola byla použita kultura PBMC + kultivační médium.  $n=1$*

Zde nebyl zaznamenán stimulační účinek samotného noradrenalinu na zvýšenou produkci TNF $\alpha$ . Také nelze prokázat výrazný stimulační účinek na produkci TNF $\alpha$  při spoluúčinku noradrenalinu a 7-oxo-DHEA.

## 4 DISKUZE

Význam této práce byl v prokázání pyrogenního účinku 7-oxo-DHEA prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$ . V krvi zdravých jedinců se cytokiny vyskytují jen v minimálním množství (IL-1: 0-5 pg/ml, IL-6: 3-10 pg/ml, TNF $\alpha$ : 0-20 pg/ml) (Ullum et al., 1994).

Produkce cytokinů se zvyšuje při patologických situacích. PBMC reagují na nejrůznější stimuly. Produkce cytokinů se mění i *in vitro* a to i u nestimulovaných PBMC.

O 7-oxo-DHEA se v literatuře vyskytuje velmi málo publikací, je to látka, jež nebyla doposud dopodrobna popsána a jejíž účinky na nejrůznější cílové buňky nejsou prozkoumány. Také se neví, jak může tato látka ovlivňovat výdej cytokinů. Na druhou stranu bylo vypracováno dostatečné množství publikací o DHEA.

V literatuře lze nalézt práce, které se zabývaly vzájemnými vztahy mezi hodnotami DHEA v krvi a IL-6. Zhang a Watson (1999) objevili, že hladina IL-6 se dosti výrazně zvyšuje při stárnutí organismu, kdy se hladina DHEA naopak snižuje. Straub a kolegové (1998) studovali skupinu 120 jedinců ve věku 15-76 let a zjistili, že klesající hodnota DHEA v séru během zánětlivého onemocnění koresponduje se signifikantním zvýšením produkce IL-6 a že DHEA působí inhibičně na produkci IL-6 lidskými PBMC. Naproti tomu naše výsledky neprokázaly, že by 7-oxo-DHEA inhiboval produkci IL-6.

Daneneberg et al. (1992) prováděli pokus na myších, kterým byl podán DHEA a následně byly myši vystaveny působení LPS (lipopolysacharid) gramnegativních bakterií. Jednou z hlavních odpovědí na LPS *in vivo* je rapidně se zvyšující produkce cytokinů, které se uplatňují při zánětlivých procesech, jako např. TNF $\alpha$  (Beutler et al., 1985, 1986, 1989). Toxicita LPS může být redukována podáním imunosupresivních glukokortikoidů, které inhibují produkci TNF a dalších cytokinů, jestliže se myším dají dříve než LPS (Waage, 1987). Zdaleka ne všechny steroidní látky mají stejný inhibiční účinek, studie prokázaly, že např. 17-13 estradiol nebo aldosteron jsou neúčinné při potlačení produkce TNF při reakci na LPS (Waage a Bakke, 1988). Výše zmíněná Danenbergova studie prokázala, že podání DHEA ochránilo myši před letální dávkou LPS a to tak, že byla potlačena vysoká produkce TNF a tudíž nebyly myši vystaveny toxicitě tohoto cytokinu. DHEA měl tedy inhibiční účinek na produkci TNF, obdobný účinek 7-oxo-DHEA se nám nepodařilo prokázat.

Zdá se, že DHEA ovlivňuje i produkci IL-1. Powell a Sonnenfeld (2006) zjistili, že DHEA snížil produkci IL-1 u myších slezinných buněk, stimulovaných mitogenem. Naše výsledky nepotvrdily, že by 7-oxo-DHEA měl inhibiční účinek na produkci IL-1.

Mnoho studií potvrdilo stimulační účinek noradrenalinu na produkci cytokinů, neví se ale, jak se uplatňuje spolupůsobení noradrenalinu s dalšími látkami, resp. steroidy. Můžeme uvažovat synergismus ale zároveň antagonismus. Naše pokusy nenaznačují, že by 7-oxo-DHEA zvyšoval produkci IL-1 a TNF $\alpha$  PBMC stimulovanými noradrenalinem. Naše výsledky nejsou ovšem vzhledem k malému počtu provedení průkazné a mohou být zatíženy značnou chybou, čemuž nasvědčuje i fakt, že kontrolní hodnota koncentrace IL-1 (Obr. 9) byla přibližně třikrát vyšší než kontrolní hodnota jiných pokusů (Obr. 7).

## 5 ZÁVĚR

Na modelu mononukleárních buněk periferní lidské krve (PBMC) byl studován vliv 7-oxo-DHEA na produkci cytokinů IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$ . Nebylo prokázáno, že by tato látka měla nápadný efekt na zvýšenou produkci sledovaných cytokinů a lze tedy předpokládat, že případný pyrogenní účinek 7-oxo-DHEA se nerealizuje prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů IL-1, IL-6 či TNF $\alpha$ .

## 6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

**Beutler B., Cerami A. (1989):** The biology of cachetin/TNF, a primary mediator of the host response, *Annu. Rev. Immunol.* 6: 625-655

**Beutler B., Krochin N., Millsark I. W., Luedke C., Cerami A. (1986):** Control of cachetin (tumor necrosis faktor) synthesis: mechanism of endotoxin resistance, *Science* 232: 977-980

**Beutler B., Millsark I. W., Cerami A. (1985):** Passive imunization against cachetin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin, *Science* 229: 869-871

**Boyum A. (1968):** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Sppl.* 21: 77-89

**Callard R. E., Gearing A. J. H. (1994):** The cytokine – Facts book, Academic Press London

**Celec P., Stárka L. (2003):** Dehydroepiandrosterone – Is the Fountain of Youth Drying out? *Physiol. Res.* 52:397-407

**Cutolo M., Capellino S., Sulli A., Seriola B., Secchi M. E., Villaggio B., Straub R. H. (2006):** Estrogens and Autoimmune Diseases, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089: 538–547

**Danenberg, H., Alpert G., Lustig G., Nathan D. (1992):** Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2275-79

**Dinarrelo C. A.:** Cytokines as endogenous pyrogens, *J. Inf. Diseases*, 179: S294-304, 1999

**Doria A., Cutolo M., Ghirardello A., Zampieri S., Vescovi F., Sulli A., Giusti M., Piccoli A., Grella P., Gambari P.F. (2002):** Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 47: 202-209

**Faredin I. (1969):** Transformation in vitro of [4-14C] - dehydroepiandrosterone into 7-oxygenated derivatives by normal human male and female skin tissue, *J Invest Dermatol* 52

**Frei K., Malipiero U. V., Leist T. P., Zirkernagel R. M., Schwab M. E., Fontana A. (1989):** On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases, *Eur. J. Immunol.* 19, 689-694

**Furie R. (2000):** Dehydroepiandrosterone and biologics in the treatment of systemic lupus erythematosus, *Curr Rheumatol Rep* 2: 44-50

**Hořejší V., Bartůňková J. (1998):** Základy imunologie, Triton

**Ihler G., Chami-Stemman H. (2003):** 7-oxo-DHEA and Raynaud's phenomnom, *Med. Hypotheses* 60: 391-9

**Janský L. (2000):** Teplota a život, skripta BF JČU

**Kazihnitková H., Zamrazilová L., Hill M., Lapčík O., Pouzar V., Hampl R. (2007):** A novel radioimmunoassay of 7-oxo-DHEA and its physiological levels, *Steroids* 72:342-350

**Lardy H., Marwah A., Marwah P. (2005):** C19-5-Ene steroids in nature. *Vitam Horm* 71:263–99

**Mallett S., Barclay A. N. (1991):** A new superfamily of cell-surface proteins related to nerve growth-factor receptor, *Immunol. Tod.* 12: 220-223

- Matějovská T. (2004):** Ovlivnění aktivity imunitního systému mediátory sympatického nervového systému, diplomová práce, BF JČU
- Morfin R.(2002):** Involvement of steroids and cytochromes P<sub>450</sub> species in the triggering of immune defenses, *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80: 273-90
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2002):** Harperova biochemie
- Nouza K., John C. (1987):** Imunologie zdraví a nemoci, Avicenum
- Oppenheim J. J., Kovacs E. J., Matsushima K., Durum S. K. (1986):** There is more than one interleukin 1, *Immunol. Tod.* 7, 45-56
- Powell J. M., Sonnenfeld G. (2006):** The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on *in vitro* spleen cell proliferation and cytokine production, *J. Interferon Cytokine Res.*
- Rabkin J.G., Ferrando S.J., Wagner G.J., Rabkin R. (2000):** DHEA treatment for HIV+ patients: effects on mood, androgenic and anabolic parameters. *Psychoneuroendocrinology* 25: 53-68
- Regelson W., Kalimi M. (1994):** Dehydroepiandrosterone (DHEA) - the multifunctional steroid
- Stará A. (2004):** Humorální faktory řídící výdej cytokinů, diplomová práce, BF JČU
- Straub, R. et al. (1998):** Serum DHEA and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man *in vitro.*, *J Clin Endocrino. Metab* 83: 2012-17
- Takatsuki F., Okano A., Suzuki C., Chieda R., Takahara Y., Hirano T., Kishimoto T., Hamuro J., Akiyama Y. (1988):** Human recombinant IL-6-B-cells stimulatory factor-II augments murine antigen-specific antibody-responses *in vitro* and *in vivo*, *J. Immunol.* 141, 3072-3077
- Tejkalová H., Benešová O. (2002):** Může podávání dehydroepiandrosteronu a jeho oxo-derivátů příznivě ovlivnit behaviorální projevy a paměť stárnoucích potkanů? *Psychiatrie* 6(1), Supp. 1: 41
- Ullum H., Haahr P. M., Diamant M., Palmo J., Halkjer-Kristensen J., Pedersen B. K. (1994):** Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1, IL-6 or TNF $\alpha$  pre-mRNA in BMNC, *J. Appl. Physiol.*, 77(1): 93-97
- Vodrážka Z. (1996):** Biochemie, 2.vyd., Academia
- Waage A. (1987):** Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethasone, *Clin. Immun. Immunopath.* 45:348-355
- Waage, A., Bakke O. (1988):** Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes, *Immunology* 63:299-302
- Zhang Z., Watson R. (1999):** DHEA in Immune modulation and aging, in *Health Promotion and Aging*, R. Watson, ed. Harwood Acad. Pub., pp. 113-23