

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



Vplyv etiocholanolónu na spotrebu kyslíku ľudských leukocytov

Bakalárska diplomová práca

Lucia Homolová

2009

Vedúci práce: prof. RNDr. Ladislav Janský, DrSc

Mgr. Jan Okrouhlík

Bakalárska diplomová práca

Homolová L., 2008: Vplyv etiocholanolónu na spotrebu kyslíku ľudských leukocytov.
[Effect of etiocholanolone on oxygen consumption of human PBMC. Bc. Thesis, in Slovak.]

Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech
republic

Anotace

Effect of etiocholanolone on oxygen consumption peripheral blood mononuclear cells, isolated by gradient centrifugation, was studied using Clark oxygen electrode. It was found, that oxygen consumption stimulated by etiocholanolone after 18 hours of incubation with etiocholanolone was potentiated by 92%.

Prehlasujem, že som túto bakalársku diplomovú prácu vypracovala samostatne, len s použitím citovanej literatúry.

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení, súhlasím s uverejnením svojej bakalárskej práce, a to v neskrátenej podobe elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databázy STAG spravovanej Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jej internetových stránkach.

.....
Lucia Homolová

V Českých Budějovicích 5.1.2009

Pod'akovanie

Rada by som vyjadrila svoju vd'aku všetkým ľuďom, ktorí mi pomohli k dokončeniu tejto práce. Moja vd'aka patrí nielen všetkým darcom krvi, ktorí mi vždy ochotne pomohli, ale predovšetkým Mgr. Janu Okrouhlíkovi za jeho neoceniteľnú pomoc a veľkú trpezlivosť, najmä po tom čo po Prof. Janskom prevzal vedenie mojej práce.

Obsah

1. Úvod a literárny prehľad.....	6
1.1. Termogenéza	6
1.1.1.Hormóny a termogenéza	6
1.1.2.Metódy merania hormonálnej termogenézy	7
1.2. Hormóny	7
1.2.1.Tyroidné hormóny	8
1.2.2.Glukagón	8
1.2.3.Inzulín	8
1.2.4.Katecholamíny	8
1.2.4.1.Mechanizmus katecholamínovej termogenézy	9
1.2.5.Steroidné hormóny	10
1.2.5.1.Etiocholanolon	11
1.3. Cieľ práce	12
2. Materiál a metódy	13
2.1. Materiál	13
2.2. Izolácia ľudských leukocytov	13
2.3. Stanovenie počtu leukocytov	14
2.4. Inkubácia buniek (PBMC)	14
2.5. Meranie spotreby kyslíku	14
2.5.1.Clarkova kyslíková elektróda	14
2.5.2.Meracia komôrka	14
2.5.3.Prevod nameraných dát.	15
2.5.4.Princíp merania spotreby kyslíku	15
2.5.5.Kalibrácia elektródy	15
2.5.6.Priebeh vlastného merania	16
2.6. Spracovanie nameraných dát	17
3. Experimentálne výsledky	18
3.1. Meranie akútnej spotreby leukocytov (PBMC) s etiocholanolonom v rôznych koncentráciách	18
3.2. Meranie akútnej spotreby leukocytov (PBMC) s 60% metanolom v rôznych koncentráciách	18

3.3. Meranie spotreby kyslíku leukocytov (PBMC) po 18 hodinovej inkubácii s etiocholanolonom	19
4. Diskusia	21
5. Záver	23
6. Zoznam skratiek	24
7. Zoznam použitej literatúry	25

1. Literárny prehľad

1.1. Termogenéza

Termogenéza je dej, pri ktorom dochádza k vzniku tepelnej energie a ktorý pomáha zaistiť termoreguláciu organizmu. Tento dej umožňuje organizmu vyrovnáť sa so zmenami teploty okolia, predovšetkým s ich znížením.

Možnosť adaptácie na chlad je hneď niekoľko, od zvýšenia tepelnej izolácie tela, zvýšenie vazokonstrikcie až po metabolické prispôbenie sa. To spočíva vo zvýšenej produkcii tepla pomocou triasovej a netriasovej termogenézy (Janský, 1994b).

Keďže skoro všetky priečne pruhované svaly v tele majú schopnosť trasu, je tento primárnym mechanizmom obrany proti chladu. Dochádza pri ňom ku krátkym kontrakciám kostrových svalov a to vedie k produkcii tepla, ktorá sa zvýši až 3-krát oproti normálu. Iný spôsob produkcie tepla zabezpečuje netriasová, inak tiež nazývaná hormonálna termogenéza. Je založená na termogénnom účinku hormónov, predovšetkým noradrenalínu, ktorý sa uvoľňuje z nervových zakončení sympatického nervového systému. Ide o fyziologický dej dôležitý predovšetkým pre novonarodené cicavce, vrátane človeka, pri ktorom dochádza k pôsobeniu katecholamínov na adrenergické receptory. Tie sprostredkujú tvorbu tepla v hedom tukovom tkanive odpriahnutím fosforylácie od oxidácie prostredníctvom špeciálnych mitochondriálnych proteínov (UCP) na vnútornej membráne mitochondrií (Eagan, 1963; Janský, 1973).

Kým u zvierat je hormonálna termogenéza podmienená prítomnosťou hnedého tukového tkaniva a β_3 a α_1 adrenergických receptorov (Zhao et al, 1998), jej mechanizmus u ľudí je odlišný.

Keďže ľudia nemajú hnedé tukové tkanivo, prebieha netriasová termogenéza v iných tkanivách, predovšetkým v bunkách kostrových svalov, v adipocytoch bieleho tukového tkaniva a môže byť tiež sprostredkovaná špeciálnymi receptormi v lymfocytoch (Janský, 1995). Predpokladom je práve výskyt β_1 a β_2 adrenoreceptorov, ktoré hormonálnu termogenézu u ľudí sprostredkovávajú (Blaak et al, 1993).

1.1.1. Hormóny a termogenéza

Hormonálna termogenéza je dôležitá predovšetkým v období tesne po narodení a jej intenzita postupne klesá. Znovu sa môže vyvíjať behom dlhodobého pôsobenia znížených teplôt okolia, ktorým sa organizmus postupne prispôsobuje a jej veľkosť v tom prípade závisí

na telesnej hmotnosti. U niektorých malých cicavcov môže prevyšovať hodnoty bazálneho metabolizmu až osemkrát. Jej podstatou je totiž maximálne využívanie metabolizovanej energie k tvorbe tepla (Janský, 1994b).

Termogénny účinok je pripisovaný hneď niekoľkým skupinám hormónov. Medzi nimi sú v prvom rade katecholamíny, peptidy ako glukagón, inzulín či adrenokortikotrópny hormón, tyroidné hormóny (vytvárajú podmienky pre rozvoj termogenézy tým, že stimulujú rast hnedého tukového tkaniva) a glukokortikoidy (Janský, 1994b).

1.1.2. *Metódy merania hormonálnej termogenézy*

K určení veľkosti hormonálnej termogenézy sa používa niekoľko vzájomne sa dopĺňajúcich metód, keďže neexistuje jediná, ktorá by netriasovú termogenézu mohla kvantitatívne zmerať.

Medzi tieto metódy teda patrí meranie produkcie tepla či spotreba kyslíku u jedincov vystavených nízkym teplotám tesne pod termoneutrálnu zónu, ďalej sa termogenéza u živočíchov vystavených miernemu chladu blokuje vhodnými liečivami, a najvhodnejšou metódou sú intravenózne injekcie so stúpajúcimi koncentráciami noradrenalínu u cicavcov v termoneutralnej zóne. Používa sa pre meranie veľkosti netriasovej termogenézy noradrenalínového typu a umožňuje zostaviť dose-response krivku medzi jednotlivými dávkami liečiva a metabolickou odpoveďou živočicha a tým stanoviť hodnoty zodpovedajúce kapacity hormonálnej termogenézy (Janský, 1994a).

Avšak tieto štandardné testy založené na intravenózných infúziach adrenomimetík predstavujú pre človeka zdravotné riziko. Bol teda potreba nájsť vhodný modelový systém, na ktorom by mohlo meranie prebiehať. Vďaka tomu, že ľudské mononukleárne bunky majú špecifické adrenergické receptory (Brodde et al, 1986) a UCP proteíny (Fleury et al, 1997; Gimeno et al, 1997), a môžu byť ľahko izolované, boli tieto bunky určené ako vhodný modelový systém na určenie veľkosti hormonálnej termogenézy meraním ich spotreby kyslíku (Janský, 2005).

1.2. *Hormóny*

Hormóny sú chemické regulátory spájajúce činnosť rôznych buniek mnohobunkových organizmov v jeden celok. Ovládajú pestrý súbor fyziologických funkcií organizmu a buď stimulujú, alebo brzdia až zastavujú rôzne metabolické dráhy. Možno ich rozdeliť do rôznych skupín podľa chemickej stavby, miesta vzniku či charakteru účinku (Vodrážka, 1992).

Niektoré hormóny sa okrem iných funkcií podieľajú aj na termogenéze organizmu a patria medzi ne:

1.2.1. Tyroidné hormóny

Tyroidné hormóny patria spolu s katecholamínmi medzi deriváty tyrozínu a tvoria sa v štítnej žľaze. Ich účinok na termogenézu je pomalý, pretože ako väčšina hormónov, tvoriacich sa v endokrinných žľazách majú vzdialené miesta účinku. Preto sa ich účinok prejaví až po niekoľkých hodinách po podaní (Vodrážka, 1992). Samotné tyroidné hormóny zvyšujú pokojový metabolizmus o 10-50% a okrem mozgu pôsobia na všetky orgány v tele. Ich účinok je však lepší v spolupráci s inými hormónmi. Jednak stimulujú rast hnedého tukového tkaniva a tiež zvyšujú katecholamínovú termogenézu tým, že zvyšujú počet β adrenergických receptorov (Janský, 1994a; 1995)

1.2.2. Glukagón

Glukagón je peptid tvoriaci sa v endokrinnej žľaze, pankrease a jeho primárnou úlohou je regulácia glukózy v krvi. Okrem tejto úlohy sa môže podieľať aj na regulácii iných fyziologických procesov, napríklad termogenézy (Vodrážka, 1992).

Termogénny účinok tohto hormónu sa prejaví zhruba po hodine od podania a je lokalizovaný predovšetkým v kostrových svaloch a pečeni vtákov. Glukagón dokáže zvýšiť pokojovú potrebu kyslíku o 50% (Janský, 1994a; 1995).

1.2.3. Inzulín

Rovnako ako jeho antagonista, glukagón, sa tvorí v pankrease, žľaze s vnútornou sekréciou a patrí do skupiny najznámejších hormónov peptidickej povahy (Vodrážka, 1992).

Inzulín vo fyziologickej koncentrácii má len malý termogénny účinok, pretože napriek tomu, že inzulín metabolizmus zvyšuje, časť tejto odpovede je pripisovaná nervovému systému. V prípade jeho zvýšenej produkcie dochádza k inhibícii adrenalínovej termogenézy (Janský, 1994a; 1995).

1.2.4. Katecholamíny

Do tejto skupiny hormónov patrí napríklad adrenalín a noradrenalín, ktoré sú derivátmi tyrozínu a patria k látkam tvoriacim sa v endokrinnom tkanive drene nadobličiek. Pôsobia v organizme katabolicky a ovplyvňujú metabolizmus tým, že sprostredkovávajú premenu dôležitých enzýmov na ich aktívne formy. Katecholamínmi sprostredkovaná

termogenéza je lokalizovaná v bunkách hnedého tukového tkaniva, ktoré sa vyskytuje predovšetkým u novorodených cicavcov, vrátane človeka. Tento typ termogenézy v období po narodení postupne zaniká a môže sa znovu vyvíjať pri adaptácii na zníženie teploty. U drobných cicavcov sa vyskytuje medzi lopatkami, na hrudnej kosti a pozdĺž rebier a chrbtice (Janský, 1994a; 1995).

1.2.4.1. Mechanizmus katecholamínovej termogenézy

Bunky hnedého tukového tkaniva sú charakteristické prítomnosťou termogenínu-UCP1 v mitochondriách, ktorý funguje ako protónový kanál. Okrem tohto špeciálneho proteínu je pre indukciu katecholamínovej termogenézy u živočíchov potrebná prítomnosť β 3- adrenergného receptora v plazmatickej membráne. To umožňuje premenu všetkej energie protónového gradientu, uvoľnenej pri spaľovaní substrátu, na teplo práve vďaka termogenínu.

Homologický proteín termogenínu, UCP2, je veľmi rozšírený v iných tkanivách ľudského tela (Fleury et al, 1997; Gimeno et al, 1997), predovšetkým v kostrových svaloch, pľúcach, srdci, obličkách a tkanivách imunitného systému. Jeho úlohou je čiastočne odpriahnuť oxidáciu od syntézy ATP (Negre-Salvayre et al, 1997). Iný homológ, UCP3, bol objavený v bunkách kostrových svalov potkanov (Boss et al, 1997) a u ľudí sa zdá byť taktiež obmedzený len na kostrové svaly (Millet et al, 1997; Shrauwen et al, 1999). U zvierat boli zistené spojenia rôznych variant UCP proteínov s adrenergnými agonistami, predovšetkým s agonistami β 3- adrenergných receptorov (Janský, Janský 2002).

Zo skupiny katecholamínov je to práve noradrenalín, ktorý sprostredkuje štiepenie tukov v adipocytoch hnedého tukového tkaniva. Hormón uvoľnený zo zakončenia sympatických nervov vyvolá prostredníctvom β receptorov syntézu cAMP a tým aktivuje proteínkinázu A. Aktivovaná hormón-senzitívna lipáza hydrolyzuje triacylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny, ktoré sú následne oxidované β oxidáciou v mitochondriách (Janský, 1973; 1988; 1995).

Hlavným substrátom pre termogenézu v hnedom tukovom tkanive sú mastné kyseliny, respektíve ich acetylCoA, vznikajúce β -oxidáciou. Tie navyše interagujú priamo s termogenínom na vnútornej strane mitochondriálnej membrány, ktorý funguje ako protónový kanál a obchádza tak funkciu ATP- syntázy. Táto interakcia je signálom pre iniciáciu termogenézy. Pre správnu funkciu UCP1 je dôležitá topologická oblasť, ktorá viaže GDP. Tá môže inhibovať permeabilitu kanálu pre protóny, čo znamená, že mastné kyseliny a acetyl-CoA fungujú ako alosterické aktivátory UCP1 (Strunecká, Janský, 2006).

Protóny uvoľnené pri β oxidácii, v cykle kyseliny citrónovej a v reťazci oxidačných enzýmov sú pumpované von z mitochondrií, kde sa vytvára elektrochemický gradient na mitochondriálnej membráne. Následne cez otvorené UPC1 prechádzajú späť protóny, pričom v dôsledku zmeny entropie systému sa uvoľňuje energia priamo vo forme tepla (Strunecká, Janský, 2006).

Hnedého tukové tkanivo u ľudí je vyvinuté len v prvých mesiacoch života, netriasová termogenéza však u nich prebieha aj v neskoršom veku. Je však lokalizovaná v iných tkanivách a sprostredkovávajú ju hlavne $\beta 1$ a $\beta 2$ adrenoreceptory (Blaak et al, 1993).

1.2.5. Steroidné hormóny

Steroidy sú látky lipofilného charakteru, ktoré po uvoľnení z transportnej bielkoviny v cieľovom tkanive prechádzajú lipidovou dvojvrstvou bunkovej membrány a interagujú s receptormi v bunke. Patria medzi ne hormóny kôry nadobličiek - kortikoidy a pohlavné hormóny. Ich účinok spočíva v indukcii biosyntézy špecifických bielkovín a konečný efekt regulačného účinku sa prejaví až po dlhšej dobe (Vodrážka, 1992).

Termogénne účinky niektorých steroidov boli pozorované u potkanov, vtákov a niektorých hibernantov (Hampl et al, 2006). Avšak okrem termogénnych účinkov sú steroidom pripisované aj pyrogénne účinky, teda účinky vyvolávajúce horúčku (Baullieu, 1961).

Glukokortikoidy patria do skupiny katabolicky pôsobiacich hormónov a okrem kľúčovej úlohy v glukoneogenéze stimulujú lipolýzu v adipocytoch a sú zapojené do regulácie enzýmov oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách (Scheller, Sekeris, 2003). Taktiež bolo dokázané, že účinky glukokortikoidov súvisia s produkciou cytokínov vyvolávajúcich horúčku (Roth et al, 2004).

Pokiaľ ide o hormóny pohlavných žliaz, u potkanov bol demonštrovaný termogénny účinok progesterónu (Freeman et al, 1970), ale tak ako iné steroidy aj tento pohlavný hormón a jeho deriváty sa vyznačujú svojimi pyrogénnymi účinkami (Abramov et al, 1998).

Pyrogénne účinky vykazuje aj derivát mužského pohlavného hormónu, testosterónu. Je ním 17-oxo steroid nazývaný etiocholanolón.

1.2.5.1. Etiocholanolón

Etiocholanolón je metabolit testosterónu. Tento 17-oxo steroid, 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-on (Hampl et al, 2006) je tiež stereoizomérom 5 α -H androsterónu v konfigurácii trans (Sheldon et al, 1967).

Etiocholanolón a niekoľko iných 5 β - redukujúcich C₁₉ steroidov je známym tým, že vyvolávajú horúčku u ľudí (Baullieau, 1961; Kimball et al, 1966; Reimann, 1968). Bolo zistené, že za svoje termogénne účinky vďaka tieto steroidy interleukínu-1 a ďalším horúčku vyvolávajúcim cytokínom, uvoľneným z leukocytov mobilizovaných v dôsledku steroidnej stimulácie (Steinetz et al, 1998).

Hoci je odvodený čiastočne od adrenálnych a testikulárnych androgénov, nevykazuje etiocholanolón žiadnu hormonálnu aktivitu. Oba steroidy sa objavujú v moči ako 17-ketosteroidy, zvyčajne konjugované s kyselinou glukorónovou, pričom je to práve etiocholanolón ktorý je vylučovaný viac než androsterón. Aby sa však prejavili jeho pyrogénne účinky, musí byť voľný, nekonjugovaný, pričom počas rozpadu po intravenóznom či intramuskulárnom podaní je 15-20 minút. Na rozdiel od iných endogénnych pyrogénov vyvoláva horúčku iba u ľudí a maximálnu teplotu vyvoláva až po 12-16 hodinovom pôsobení (Sheldon et al, 1967).

Trvanie latentnej periódy látky vyvolávajúcej horúčku bolo zisťované pomocou porovnávaní zvyšovania teplotnej aktivity izolovaných ľudských leukocytov s etiocholanolónom, po 4-hodinovej a 18-hodinovej inkubácii (Sheldon et al, 1967). Pyrogénne účinky sa prejavili po 18- hodinovej inkubácii leukocytov s etiocholanolónom v koncentrácii 30 μ g/ml (Bodel, Dillard, 1968).

Výška telesnej teploty po podaní etiocholanolónu sa zvýši u mužov i žien, pričom pri podaní nižších dávok, rovnako ako pri štandardnej dávke na kilogram telesnej váhy je stále teplota u žien nižšia než u mužov (Kimball, 1966). Tieto rozdiely vznikajú zrejme preto, že etiocholanolón u mužov okrem horúčky silne podnecuje leukocytózu (Sheldon et al, 1967).

1.3 Cieľ práce

Úlohou tejto práce bolo zistiť, aký vplyv na spotrebu kyslíku izolovaných leukocytov má metabolit testosterónu, nazývaný etiocholanolón. Jeho účinky boli sledované dvoma spôsobmi, a to:

- Meraním akútnej spotreby kyslíku leukocytov po pridaní etiocholanolónu
- Meraním spotreby kyslíku leukocytov po 18 hodinovej inkubácii s etiocholanolónom

2. Materiál a metódy

2.1. Materiál

Ako materiál slúžili ľudské leukocyty (PBMC) izolované zo žilnej krvi, odoberanej z predlaktia zdravých darcov do sterilných heparizovaných skúmaviek (Vacuette, Grenier Laborortechnik, Austria).

Darcami boli zdravé ženy vo veku 20-23 rokov a odber zaisťovala profesionálna zdravotná sestra.

2.2. Izolácia ľudských leukocytov (PBMC)

K izolácii ľudských lymfocytov bola používaná metóda hustotnej gradientovej centrifugácie s použitím roztoku Ficoll-Paque (Boyum, 1968) a manipulácia s materiálom prebiehala asepticky v digestore (Jouan MSC 12).

Po odbere 12 ml krvi do heparizovaných skúmaviek bola táto ďalej riedená v sterilných skúmavkách s objemom 15 ml (GAMA, a.s. České Budějovice). Krv sme riedili 6 ml Hanksovho roztoku (lekárne VFN, Praha) v pomere 1:1. Následne bolo potom 6 ml takto riedenej krvi opatrne, aby nedošlo k premiešaniu, navrstvených na 3 ml roztoku Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala Sweden) v ďalších štyroch sterilných skúmavkách.

Takto pripravené skúmavky boli centrifugované pri laboratórnej teplote po dobu 40 minút pri 1200 otáčkach za minútu v centrifúge Univerzal 32 R (HETTICH Zentrifugen, Dánsko). Červené krvinky a granulocyty vytvorili sediment na dne skúmavky a monocytárne bunky, medzi ktoré patria lymfocyty a monocyty, utvorili prstencovú vrstvu na rozhraní plazmy a separovanej kvapaliny (Boyum, 1968). Tento prstenec bol pipetou odobratý do sterilnej skúmavky a premytý 10 ml Hanksovho roztoku, a bunky boli sedimentované v centrifúge pri 1200 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Premývanie bolo opakované dvakrát. Po odstránení supernatantu bol stanovený počet izolovaných buniek a tieto boli následne použité k meraniu akútnej spotreby kyslíku, alebo k inkubácii.

Použité roztoky boli skladované pri teplote 4 °C a pred použitím boli vytemperované na laboratórnu teplotu.

2.3. Stanovenie počtu leukocytov

Počet vyizolovaných lymfocytov bol stanovovaný pred každým meraním, v prípade inkubácie pred ňou i po nej, pomocou Burkerovej komôrky. Pred samotným počítaním sme riedili 10 µl izolovaných buniek s 90 µl trypanovej modrej (0,5% roztok vo vode) kvôli kontrastu a potom sme ich počítali v 25 štvorcoch.

Celkový počet buniek /ml = počet buniek v 25 štvorcoch * 10^4 .

2.4. Inkubácia buniek (PBMC)

Vyizolované mononukleárne bunky, ktoré neboli použité k meraniu akútnej spotreby boli inkubované s etiocholanolónom na kultivačných doštičkách v 1 ml kultivačného média v pomere 1:1. Použité médium RPMI-1640 Whittakertm bolo obohatené o penicilín, streptomycín a tepelne inaktivované fetálne telacie sérum tak, aby výsledné 10% sérum bolo vhodné pre inkubáciu.

Inkubácia prebiehala po dobu 18 hodín pri teplote 37°C a 3,5% CO₂ v atmosfére, v kultivačnom termostate.

2.5. Meranie spotreby kyslíku

2.5.1. Clarkova kyslíková elektróda

Clarkova kyslíková elektróda je prístroj používaný na meranie spotreby kyslíku, ktorý sa šíri tenkou blanou, pokrývajúcou vrstvu elektrolytu a jednu z dvoch kovových elektród (katódu). Sonda používaná pri tomto meraní (firma RNDr. Viktor Dvořák, Praha, ČR) je tvorená argent-chloridovou anódou a platinovou katódou, ktorá je zatavená do sklenej trubičky. Koniec trubičky odhaľuje malú časť platiny o priemere asi 0,2mm. Práve táto časť je pokrytá polyetylénovou membránou upevnenou kovovým krúžkom k obalu z teflónu, ktorý chráni celú elektródu pred poškodením. Vnútorň priestor medzi puzdrom a elektródou vyplňa elektrolyt (0,1M KCl a 0,1M KHCO₃ v pomere 1:1). Ten je plnený otvorom v puzdre sondy a umožňuje prenos elektrónov a rozloženie elektrického poľa medzi elektródami.

2.5.2. Meracia komôrka

Samotné meranie pomocou kyslíkovej elektródy prebiehalo v meracej komôrke s objemom 3,6 ml, chránenej skleneným plášťom. Tým pretekala voda temperovaná prietokovým termostatom (Techne TE-10D Tempunit, Cambridge) na teplotu 37°C. Na dne komôrky bolo umiestnené miešadlo poháňané elektromagnetickou miešačkou a roztoky boli do komôrky pridávané injekčnou striekačkou cez zabrúsený uzatvárací kohútik.

2.5.3. Prevod nameraných dát

Nameraný signál z elektródy bol zaznamenávaný a prevedené dáta boli spracovávané v dátovej matici programu DIAdem™ 8.00.

2.5.4. Princíp merania spotreby kyslíku

Toto meranie je založené na polarografickom princípe.

Po vložení vzorky do meracej komôrky začne membránou prechádzať kyslík k elektróde. Rozpustený kyslík sa začne redukovať na povrchu katódy, ak je na platinovú katódu vyvinutý dostatočný potenciál voči referenčnej argént-chloridovej anóde. Následkom redukcie začne elektródami prechádzať prúd. Jeho veľkosť je určená rýchlosťou transportu kyslíku z objemu tekutiny v komôrke cez membránu k povrchu katódy a celkovou stechiometriou redukcie kyslíku na katóde.

Závislosť prechádzajúceho prúdu na vloženom potenciáli znázorňuje polarogram. Jeho tvar závisí od hrúbky a materiálu membrány, materiálu katód a úpravy ich povrchu, teploty a zloženia elektrolytu a preto by mal byť vložený potenciál pre každú sondu stanovovaný experimentálne, a to pomocou volt ampérovej charakteristiky. Pričom čím je vyšší potenciál, tým rýchlejšia je elektrochemická redukcia kyslíku až do stavu kedy je vzhľadom k rýchlosti transportu kyslíku nekonečne rýchla. Jeho koncentrácia na povrchu katódy je potom nulová a vznikajúci prúd je limitovaný rýchlosťou difúzie. Vzniká tak oblasť limitného difúzneho prúdu (OLDP), kde je ustálený prúd lineárnou funkciou koncentrácie či parciálneho tlaku O_2 v médiu. Intenzita prúdu je teda tým vyššia, čím vyššia je koncentrácia kyslíku v okolí polarizovanej platinovej elektródy.

Na tejto úmernosti je založené kvantitatívne stanovenie koncentrácie difundovaného plynu, zatiaľ čo kvalitatívne stanovenie je založené na fakte, že každá látka má svoje typické rozkladné napätie, pri ktorom sa začne vylučovať a redukovať.

Pred použitím sondy je potrebné nastaviť také podmienky, aby pracovala v OLDP (Linek et al., 1987).

2.5.5. Kalibrácia elektródy

Dôležitým krokom pred a po každom meraní je kalibrácia, pri ktorej je použitá maximálna a nulová koncentrácia kyslíku.

K stanoveniu maximálnej koncentrácie kyslíku bola použitá destilovaná voda okysličovaná pomocou akvarijnej vzduchovej pumpy po dobu cca 30 minút.

Pre stanovenie nulovej koncentrácie kyslíku sú vhodné dve metódy. Jednou z nich je nechať destilovanú vodu intenzívne presycovať plynným dusíkom po dobu cca 30 minút, alebo druhou a po predošlom uvážení vhodnejšou metódou je pridanie dithioničitanu sodného do meraného média.

Vlastná kalibrácia prebiehala tak, že sa do meracej komôrky pridala voda nasýtená vzduchom alebo plynným dusíkom (prípadne bol pridaný dithioničitan) a po 3-5 minútach sa ustálilo výstupné napätie na novej hodnote. Tieto hodnoty v arbitárnych jednotkách, countoch, boli použité k vyhodnoteniu dvojbodovej kalibrácie a bol zostrojený graf časového priebehu. Pomocou programu MS Excel boli určené rovnice lineárnej regresie, ktoré spolu s časovou závislosťou hodnôt meraní umožnili prepočítať jednotky v countoch do jednotiek vyjadrujúcej koncentráciu kyslíku v $\mu\text{mol/ml}$.

Základným predpokladom kalibrácie je, že voda nasýtená vzduchom obsahuje pri teplote 37°C práve $0,217 \mu\text{mol O}_2/\text{ml}$ (Zhao et al, 1997). Ak teda vieme, aký je obsah kyslíku, odvodený od teploty a objemu, môžeme presne určiť koľko kyslíku bolo spotrebovaného.

2.5.6.Priebeh vlastného merania

Vlastné meranie kyslíkovou elektródou prebiehalo dvoma spôsobmi, v závislosti od toho, či bola meraná akútna spotreba kyslíku leukocytov, alebo jeho spotreba po 18 hodinovej inkubácie.

Na začiatku každého merania bola meracia komôrka vytemperovaná na teplotu 37°C a potom do nej bolo pridané kultivačné médium RPMI-1640, taktiež zohriate na danú teplotu. Samotné médium bolo merané cca 30 minút, kým nedošlo k ustáleniu signálu.

Potom bol do komôrky pridaný 1 ml vyizolovaných leukocytov resuspendovaných v médiu. Ich počet v tomto objeme bol v rozpätí 7-10 miliónov buniek. Po dobu ďalších asi 15 minút bola meraná ich pokojová spotreba.

Ak išlo o práve vyizolované leukocyty, určené k meraniu akútnej spotreby, bol k nim pridávaný etiocholanolón v rôznych koncentráciách zo zásobného roztoku 10 mg/ml . V rozmedzí cca 10 minút bol do meracej komôrky s objemom 3,6 ml, v ktorej bol 1 ml leukocytov, pridávaný etiocholanolón v malých objemoch (1,5; 1,5; 3; 3 a 9 μl), čím sme získali rôzne koncentrácie od najnižšej $4,16 \mu\text{g/ml}$ po najvyššiu $50 \mu\text{g/ml}$. Práve táto koncentrácia je takmer dvojnásobkom účinnej koncentrácie, teda $60 \mu\text{g/ml}$. Cca 10 minút po podaní najvyššej koncentrácie etiocholanolónu bola pridaná jedna dávka noradrenalínu vo výslednej koncentrácii 10^{-4} M .

Akútna spotreba kyslíku bola meraná v siedmych pokusoch. Z toho dva pokusy boli merané tak, že pred jednotlivými dávkami etiocholanolónu boli leukocyty stimulované prídavkom noradrenalínu v koncentrácii 10^{-4} M. V ostatných piatich prípadoch bol noradrenalín pridávaný až po pridaní najvyššej koncentrácie etiocholanolónu.

Z toho dôvodu boli z týchto dvoch pokusov v štatistickom vyhodnotení použité len spotreby čistých leukocytov a leukocytov po podaní najvyššej koncentrácie etiocholanolónu i noradrenalínu.

Keďže roztok etiocholanolónu bol pripravený rozpustením steroidu v 60% metanole, bolo toto meranie použité ako kontrola, aby sme vylúčili, že vplyv etiocholanolónu v predošlých pokusoch bol ovplyvnený rozpúšťadlom.

V prípade leukocytov inkubovaných 18 hodín s etiocholanolónom bol postup nasledovný: v jednej jamke, ktorá slúžila ako kontrola bolo pridaných 6 μ l 60% metanolu, a v druhej 6 μ l roztoku etiocholanolónu, ktorého účinok mal byť meraný. Zásobný roztok o koncentrácii 10 mg/ml bol pripravený rozpustením 3mg etiocholanolónu v 300 μ l 60% metanolu. Výsledná koncentrácia roztoku etiocholanolónu v jamke s 1ml lymfocytov a 1ml inkubačného média bola teda 30 μ g/ml, čo zodpovedá účinnej dávke tejto látky (Bodel & Dillard, 1968).

Po inkubácii bola meraná ich pokojová spotreba, spotreba po pridaní noradrenalínu v rovnakej koncentrácii ako pri meraní akútnej spotreby.

2.6. Spracovanie nameraných dát

Celé meranie bolo zaznamenávané pomocou programu DIAdem™ verzia 8.00 modul DAC, slúžiaci k ovládaniu merania a záznamu dát.

Modul TDM umožňuje takto získané dáta spracovať. Hodnoty v countoch boli najprv prepočítané na jednotky μ mol/ml O_2 , skopírované do DIAdem TDM modulu a ďalej upravované.

Z krivky merania boli vyňaté 5 minútové oblasti zodpovedajúce koncentrácii kyslíku v každom meranom úseku. U všetkých dátových intervalov bola urobené stobodová lineárna regresia a dáta boli exportované do programu MS Excel, kde sa jednotlivé spotreby kyslíku prepočítali na štandardizovanú jednotku nmol O_2 /min/milión buniek.

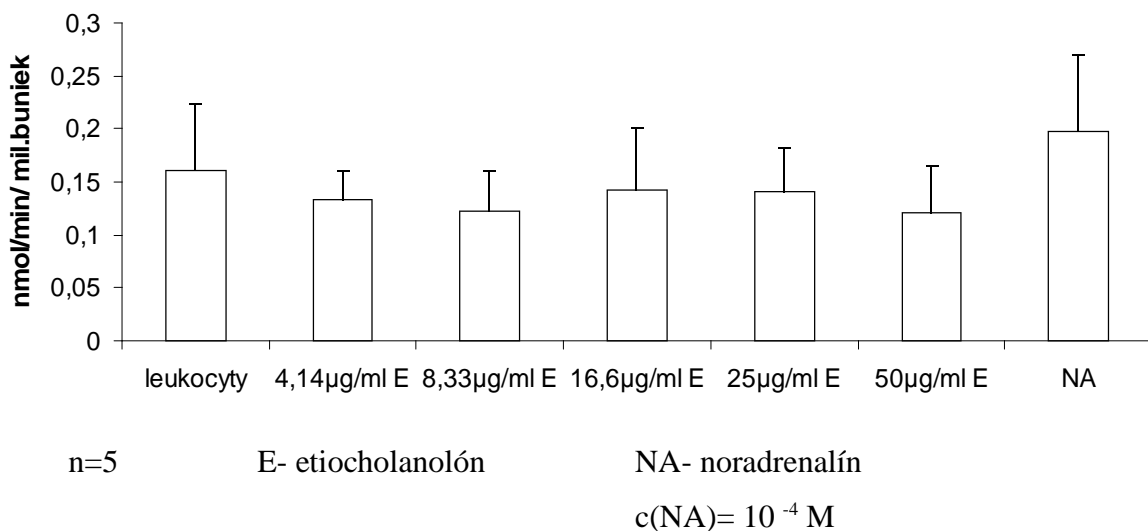
Následne boli dáta vyhodnotené neparametricky použitím Wilcoxonovho párového testu .

3. Experimentálne výsledky

7.1. Meranie akútnej spotreby kyslíku leukocytov (PBMC) s etiocholanolónom v rôznych koncentráciách - merané Clarkovou kyslíkovou elektródou

Čistá pokojová spotreba leukocytov sa pohybovala v rozmedzí od 0,162-0,266 nmol O₂/10⁶ buniek * min⁻¹, priemer činil 0,184 nmol O₂/10⁶ buniek * min⁻¹.

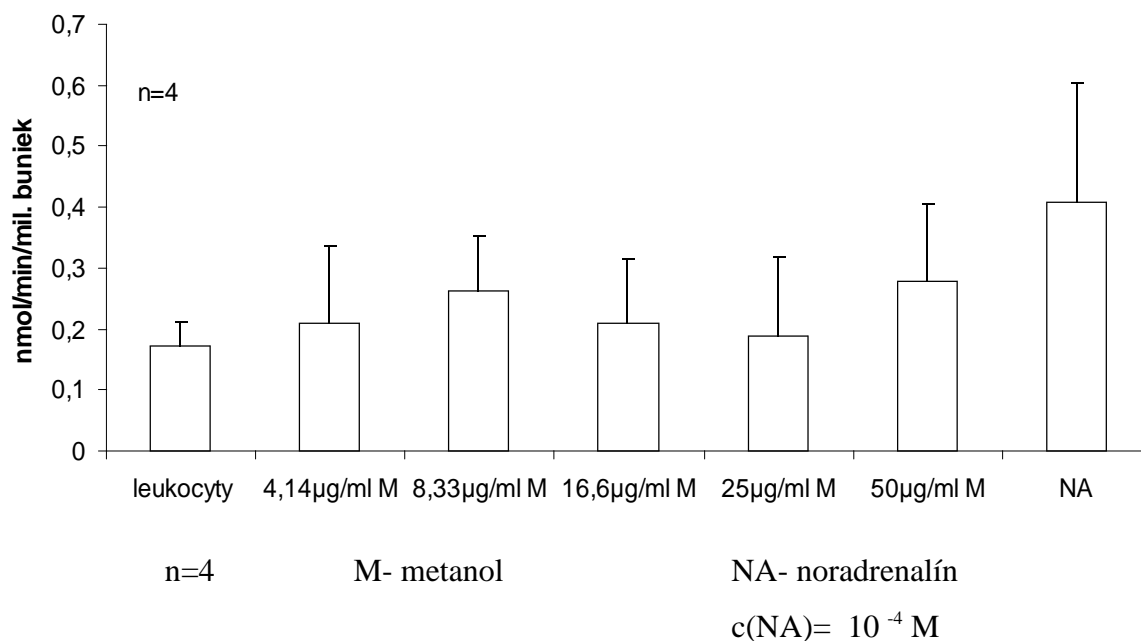
Vplyv etiocholanolónu na akútnu spotrebu leukocytov sa nepodarilo štatisticky dokázať v dôsledku veľkej variability hodnôt v jednotlivých meraniach. Uvedené grafy na obr. 1 však naznačujú, že by etiocholanolón mohol znižovať akútnu spotrebu leukocytov.



Obr. 1: Akútna spotreba čistých leukocytov, leukocytov po prídavkoch etiocholanolónu a po následnej stimulácii noradrenalínom v jednotkách nmol O₂/10⁶ buniek * min⁻¹. Jednotlivé stĺpce grafu sú doplnené o smerodajnú odchýlku.

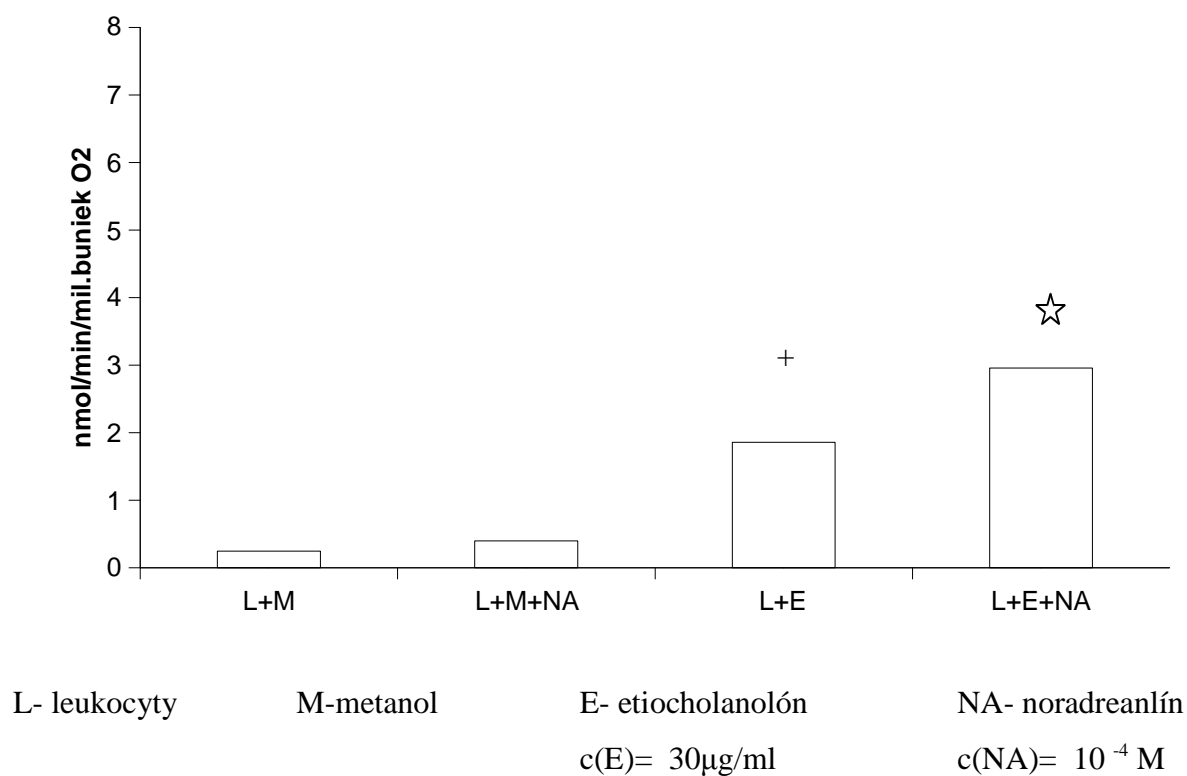
7.2. Meranie akútnej spotreby leukocytov (PBMC) s 60% metanolom v rôznych koncentráciách- kontrola

Podľa nasledujúceho grafu na obr. 2 je vidieť, že metanol má tendenciu mierne zvyšovať a stimulovať spotrebu kyslíku leukocytov, aj keď v dôsledku veľkej variability hodnôt nie je toto zistenie štatisticky preukázateľné.



Obr. 2: Meranie spotreby kyslíku čistých leukocytov, leukocytov po prídavkoch metanolu a po stimulácii noradrenalinom v jednotkách nmol O₂/10⁶ buniek * min⁻¹. Stĺpce grafu opäť doplnené o smerodajnú odchýlku.

7.3. Meranie spotreby kyslíku leukocytov (PBMC) po 18 hodinovej inkubácii s etiocholanolonom



Obr. 3: Spotreba kyslíku leukocytov po 18 hodinovej inkubácii: leukocyty s metanolom ako kontrolou a leukocyty s etiocholanolómom, oboje pred a po stimulácii noradrenalínom v jednotkách $\text{nmol O}_2/10^6 \text{ buniek} \cdot \text{min}^{-1}$. V grafe sú opäť znázornené smerodajné odchýlky

Podľa obr.3 je zrejmé, že po niekoľko hodinovej inkubácii sa spotreba kyslíku zvyšuje v prípade stimulácie etiocholanolómom aj v prípade stimulácie etiocholanolómom s noradrenalínom. V oboch prípadoch sa spotreba kyslíku zvýšila oproti kontrole asi o 92%. Toto zvýšenie je štatisticky preukázateľné Wilcoxonovým neparametrickým párovým testom, kde je v prípade leukocytov inkubovaných s etiocholanolómom $p= 0,01796$ a po stimulácii noradrenalínom je $p= 0,0425$.

4. Diskusia

Úlohou tejto práce bolo zistiť, akým spôsobom vplýva etiocholanolón na spotrebu kyslíku izolovaných ľudských leukocytov a rozhodnúť, či je tento vplyv dôsledkom termogénneho účinku alebo iného fyziologického procesu. Dáta boli získané pomocou Clarkovej kyslíkovej elektródy, kedy bola meraná jednak akútna spotreba kyslíku pri rôznych koncentráciách sledovanej látky, a tiež spotreba po niekoľko hodinovej inkubácii leukocytov s danou látkou v účinnej koncentrácii.

Pokožové spotreby kyslíku čistých leukocytov bez akýchkoľvek prídavných látok sa pohybovali v rozmedzí 0,16- 0,27 nmol O₂/10⁶ buniek *min⁻¹, priemer činil 0,184 nmol O₂/10⁶ buniek *min⁻¹. V porovnaní s bakalárskou prácou Mikulky (2005), ktorý uvádza rozpätie 0,042- 0,361 nmol O₂/10⁶ buniek *min⁻¹, je to o niečo vyššia hodnota, ale na rozdiel od Štefkovej (2007), ktorá uvádza ako priemernú hodnotu 0,197 nmol O₂/10⁶ buniek *min⁻¹ je to naopak hodnota nižšia. Teoretická hodnota čistej spotreby leukocytov, uvedená v práci Janský et al 2006, bola stanovená na 1,16 nmol O₂/10⁶ buniek *min⁻¹. Tieto rozdiely môžu byť dôsledkom veľkej variability hodnôt, ktoré sú uvedené v práci Janského et al 2006, alebo sú výsledkom technických nedostatkov (časová nestabilita signálu a jeho šum), ktoré namerané hodnoty negatívne skresľujú.

Meranie akútnej spotreby kyslíku leukocytov s etiocholanolónom v rôznych koncentráciách nepreukázalo žiaden významný účinok, ktorý by bolo možné podložiť štatisticky. Podľa obr. 1 by sa dalo usudzovať, že etiocholanolón má tendenciu znižovať spotrebu kyslíku. Keďže etiocholanolón je rozpustný v metanole, bolo otázne, či za týmto znižovaním spotreby nestojí účinok metanolu na leukocyty, ale obr.2 ukazuje, že metanol v uvedených koncentráciách má skôr tendenciu leukocyty stimulovať, takže jeho vplyv v prípade merania akútnej spotreby etiocholanolónu možno vylúčiť. V dôsledku veľkej variability hodnôt v meraní akútnej spotreby po prídavkoch etiocholanolónu však nie je možné štatisticky dokázať zníženie spotreby kyslíku.

V prípade merania spotreby kyslíku až po 18 hodinovej inkubácii bolo výsledné zvýšenie spotreby viditeľné na prvý pohľad, ako dokazuje obr.3. Etiocholanolón zvýšil spotrebu kyslíku leukocytov asi o 92%. Takéto zvýšenie by mohlo svedčiť o termogénnom účinku tohto steroidného hormónu v prípade, žeby nedošlo k ďalšiemu zvýšeniu po pridaní noradrenalínu. Ten je jedným z najvýznamnejších hormónov zo skupiny katecholamínov, ktorý sa podieľa na netriasovej termogenéze (Janský, 1994b). Jeho účinok je sprostredkovaný

adrenergými receptormi a UCP, a pokiaľ by rovnakou cestou účinkoval aj etiocholanolón, k ďalšiemu zvýšeniu spotreby kyslíku by nedošlo.

Otázkou zostáva, ako pôsobí etiocholanolón na leukocyty a zvyšuje ich spotrebu kyslíku. Tento steroidný hormón má pyrogénne účinky, tieto sa však prejavujú s rozdielnou intenzitou u mužov a žien (Kimball et al, 1966). Dôvodom tohto rozdielneho pôsobenia je pravdepodobne fakt, že u mužov podnecuje etiocholanolón leukocytózu (Sheldon et al, 1967) a to by umožňovalo produkovať väčšie množstvo cytokínov vyvolávajúcich horúčku. Avšak vplyv etiocholanolónu na zvýšenú produkciu cytokínov IL- 1 β , IFN- γ a TNF- α sa nepodarilo dokázať v bakalárskej práci Jeníková 2008.

Pre merania v tejto bakalárskej práci boli používané leukocyty izolované z krvi žien, u ktorých sa zvýšená leukocytóza nespomína. Je však možné, že aj u nich dochádza k zvýšenej produkcii leukocytov, hoci nie v takej miere, aby došlo k zvýšeniu telesnej teploty a vyvolaniu horúčky. Možno však predpokladať, že zvýšená leukocytóza aj u žien by mohla súvisieť so zvýšenou spotrebou kyslíku leukocytov. Okrem tejto jednej možnosti však existujú ďalšie, ktoré by mohli vysvetliť toto zvýšenie spotreby kyslíku lepšie. Napríklad zvýšenie metabolizmu v dôsledku urýchleného rastu buniek, či predčasná bunková smrť leukocytov v dôsledku oxidačného stresu, ktorému boli bunky vystavené počas inkubácie. Tomu však odporuje fakt, že počet buniek odumretých po inkubácii v kontrolnom meraní s metanolom bol približne zhodný s počtom buniek odumretých v tom istom meraní s etiocholanolónom. Hľadanie ďalších, tak ako overovanie týchto možností by mohlo byť námetom k ďalším výskumom.

5. Záver

V tejto bakalárskej práci boli sledované zmeny spotreby kyslíku izolovaných ľudských leukocytov (PBMC) po aplikácii steroidného hormónu - etiocholanolónu.

Jeho vplyv na akútnu spotrebu leukocytov sa dokázať nepodarilo, avšak po 18 hodinovej inkubácii leukocytov s hormónom v koncentrácii 30µg/ml bolo zistené zvýšenie spotreby kyslíku o 92%.

Spotreba kyslíku sa navyše zvýšila aj po aplikácii noradrenalínu v koncentrácii 10⁻⁴M.

6. Zoznam skratiek

PBMC - izolované ľudské monocytárne bunky

OLDP - oblasť limitného difúzneho prúdu

UCP- uncoupling proteíny, odpriahujúce fosforyláciu od oxidácie

cAMP - cyklický adenosín monofosfát

NA - noradrenalín

E - etiocholanolón

M - metanol

7. Zoznam použitej literatúry

Abramov Y, Elchalal U, Schenker J G, 1998: Febrile morbidity in severe and critical ovarian hyperstimulation syndrome: a multicentre study. *Human Reproduction* 13: 3128-3131

Baullieu E E, 1961: Fever, etiocholanolone, pyrogenic steroids and „periodic disease“. *Rev Fr Etud Clin Biol* 6: 533-536 in Hampl R, Stárka L, Janský L, 2006

Blaak E E, Saris W M H, Van Blaak M A, 1993: Adrenoreceptor subtypes mediating catecholamine- induced thermogenesis in man. *International Journal of Obesity* 17: 78-81

Bodel P, Dillard M, 1968: Studies on steroid fever: Production of leukocyte pyrogen *in vitro* by etiocholanolone. *The Journal of Clinical Investigation* 47: 107-117

Boss O, Samec S, Pailini- Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino P J, 1997: Uncoupling protein- 3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue- specific expression. *FEBS Letters* 408: 39-42

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

Brodde O E, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski H R, Reidemeister J C, 1986: Human β -adrenoreceptors: relation of myocardial and lymphocyte β - adrenoreceptor density. *Science* 231: 1584-1585

Eagan C J, 1963: Local vascular adaptations to cold in man. *Federation Proc.* 22: 947-952

Fleury C H, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi- Meyruesis C, Bouillard F, Seldin M F, Surwit R S, Ricquier D, Warden C H, 1997: Uncoupling protein- 2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics* 15: 269-272 in Janský P, Janský L, 2002

Freeman M E, Crissman J K, Louw G N, Buchter R L, Inskeep E K, 1970: Thermogenic action of progesterone in the rat. *Endocrinology* 86: 717-720 in Hampl R, Stárka L, Janský L, 2006

Gimeno R E, Dembski M, Weng X, 1997: Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46: 900-906

Hampl R, Stárka L, Janský L, 2006: Steroids and thermogenesis. *Physiological Research* 55: 123-131

Janský L, 1973: Nonshivering termogenesis and its thermoregulatory significance. *Biological Reviews* 48: 85-132

Janský L, 1988: Cold- induced thermogenesis. In: *High Altitude Medical Science*, edited by Ueda G, Kusama S, Voelkel N F, Matsumoto: Shinshu University: 349-360

Janský L, 1994a: Hormonální termogeneze. *Československá fyziologie*, 1-2: 58-63

Janský L, 1994b: Netřesová termogeneze. *Vesmír* 73: 628-630

Janský L, 1995: Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiological Reviews* 75: 237-259

Janský P, Janský L, 2002: Sites and cellular mechanisms of human adrenergic thermogenesis- a review. *Journal of Thermal Biology* 27: 269-277

Janský L, Matoušková E, Stránska E, 2006: Thermogenic action of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Thermal Biology* 31: 50-52

Jeníková M, 2008: Vliv etiocholanolonu na produkci cytokínů izolovanými lidskými lymfocyty, Bakalářská diplomová práce, Jihočeská Univerzita

Kimball H R, Wolff S M, Vogel J M, Perry S, 1966: Experimental etiocholanolone fever: febrile reactivity in men and women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 26: 222-224

Linek V, Vacek V, Sinkule J, Beneš P, 1987: Měření koncentrace kyslíku membránou pokrytými kyslíkovými sondami. *Academia*: 10-141

Mikulka A, 2005: Úloha různých adrenergických receptorů v termogenezi lidských lymfocytů. Diplomová práce, Jihočeská Univerzita

Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou P J, Ricquier D, Laville M, Langin D, 1997: Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *Journal of Clinical Investigation* 100: 2665-2670

Negre- Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, Castreilla L, 1997: A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB Journal* 11: S47-51

Reimann H A, 1968: Etiocholanolone and fever. *Annals of Internal Medicine* 68: 495-496

Roth J, Zeisberger E, Vybíral S, Janský L, 2004: Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Frontiers in Bioscience* 9: 816-826

Sheldon M, Wolff M, M D, F A C P, 1967: Clinical Staff Conference: The Biological properties of etiocholanolone. *Annals of Internal Medicine* 6: 1268-1295

Scheller K, Sekeris C E, 2003: The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Experimental Physiology* 88: 129-140

Schrauwen P, Walder K, Ravussin E, 1999: Human uncoupling proteins and obesity. *Obesity Research* 7: 97-105

Steinetz B G, Randolph C, Werner R, Mahoney C J, 1998: Pyrogenicity of etiocholanolone and interleukin-1 in New and Old World Monkeys. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 435-438

Strunecká A, Janský L, 2006: Hibernace a sezónní afektivní porucha.
Psychiatrie 4: 220-223

Štefková K, 2007: Vliv 7-oxo-dehydroepiandrosteronu na spotřebu kyslíku izolovaných lidských leukocytů. Diplomová práce, Jihočeská Univerzita

Vodrážka Z, 1992: Biochemie, Academica Praha

Zhao J, Cannon B, Nedergaard J, 1997: α 1-adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of β 3-adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells. The Journal of Biological Chemistry 272: 32847-32856

Zhao J, Cannon B, Nedergaard J, 1998: Thermogenesis is β 3- but not β 1- adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. American Journal of Physiology 257: R2002-R2011