

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra fyziologie živočichů**

# **Kortizol a jeho účast na regulaci energetického metabolismu.**

Bakalářská práce  
studijního oboru Biologie

V Praze červen 2009

Vypracovala: Jana Roubalová  
Školitelka: RNDr. Jara Nedvídková CSc.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití dále uvedené literatury pod vedením školitelky RNDr. Jary Nedvídkové CSc. z Endokrinologického ústavu v Praze.

V Praze dne: .....

Jana Roubalová

## **Abstrakt**

Kortizol je látka patřící do skupiny steroidních hormonů, konkrétně glukokortikoidů. Jeho hlavní úlohou je opětovné ustavení tělesné homeostázy po stresové reakci, ať už se jedná o stres fyzický nebo psychický. Jeho syntéza probíhá v kůře nadledvin a je řízena osou hypothalamus-hypofýza-nadledviny (osou HPA). V komunikaci mezi prvky této osy se uplatňuje adrenokortikotropní hormon (ACTH), corticotropin-releasing hormone (CRH) a arginin-vasopresin (AVP). V klidovém období je kortizol uvolňován v cirkadiálním rytmu řízeném suprachiasmatickým jádrem hypothalamu.

Kortizol jedná prostřednictvím svého receptoru GR, který je vzhledem k amfipatické povaze hormonu lokalizován v cytoplasmě. Po navázání kortizolu se GR přemístí do jádra, kde působí jako transkripční faktor, nebo ovlivňuje transkripci genů interakcí s jinými proteiny. Aktivita kortizolu může být modulována vazbou na plasmatickou bílkovinu corticosteroid-binding globulin (CBG), nebo činností enzymů 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáz 1. a 2. typu.

Při regulaci energetického metabolismu se kortizol uplatňuje především v játrech, svalech, pankreas a tukové tkáni. Jeho hlavním cílem je zvyšovat hladinu glukózy v krvi a inhibovat většinu anabolických procesů. Mobilizuje také tukové zásoby a zásoby aminokyselin ve svalech. Toho dosahuje stimulací glukoneogeneze v játrech, komplexní inhibicí aktivity inzulínu a rozkladem periferní tukové tkáně. S nadměrnou koncentrací kortizolu v krvi je spojena řada patologických stavů, které se souhrnně označují jako Cushingův syndrom. Ten vzniká následkem nadměrné aktivity osy HPA, poruchy některého z regulačních prvků, nebo také dlouhodobé léčby kortikoidy.

## **Abstract**

Cortisol is the steroid hormone coming under the group of human glucocorticoids. The main role of cortisol is the establishment of the body homeostasis disturbed by the physical or mental stress. The synthesis of cortisol takes place in the adrenal cortex. The synthesis is regulated by the hypothalamus-pituitary-adrenals axis (HPA axis). The communication between individual elements of this axis is facilitated by the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticotrophin-releasing hormone (CRH) and arginine-vasopressin (AVP). In basal conditions the suprachiasmatic nucleus regulates the circadian rhythm of the cortisol secretion.

The activity of cortisol is facilitated by the glucocorticoid receptor (GR). The GR is localised in the cytoplasm because of the amfipatic character of the hormone molecule. After the binding of cortisol GR is translocated to the nucleus to regulate the transcription of various genes. The activity of cortisol can be modulated by binding to the plasmatic

molecules of corticosteroid-binding globulin (CBG) or by the enzymatic activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2.

Target organs of the cortisol mediated regulation of the energetic metabolism are liver, muscles, pancreas and adipose tissue. Cortisol increases the blood glucose level and inhibits most of anabolic reactions. One of the main goals is the mobilisation of free fatty acids reserves in adipose tissue and amino-acids reserves in muscles. This can be achieved by the gluconeogenesis stimulation in liver, the insulin activity inhibition and the breakdown of the peripheral adipose tissue. The excessive concentration of cortisol leads to various metabolic and other disruptions known as the Cushing's syndrome disease.

**Klíčová slova:** kortizol, glukokortikoidy, osa HPA, energetický metabolismus, GR

**Keywords:** cortisol, glucocorticoids, HPA axis, energetic metabolism, GR

## Zkratky

Zkratka	Význam v češtině nebo český ekvivalent	Význam v angličtině
<b>11HSD</b>	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza	
<b>AC</b>	adenylátcykláza	
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropní hormon	
<b>AVP</b>	arginin-vasopresin	
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin monofosfát	cyclic adenosine monophosphate
<b>CBG</b>	kortikosteroidy vázající globulin	corticosteroid binding globulin
<b>CEH</b>	cholesteryl-ester hydroxyláza	
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava	
<b>CRH</b>	kortikoliberin	corticotrophin releasing hormone
<b>CRH-R1</b>	CRH receptor 1. typu	
<b>FFA</b>	volná mastná kyselina	free fatty acid
<b>GABA</b>	kyselina $\gamma$ -aminomáselná	gamma-Aminobutyric acid
<b>GLUT4</b>	glukózový transportér	
<b>GR</b>	glukokortikoidový receptor	
<b>GRE</b>	vazebné místo pro GR	glucocorticoid response element
<b>GRU</b>	není	glucocorticoid response unit
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát	
<b>H6PDH</b>	hexóza-6-fosfát dehydrogenáza	
<b>HER</b>	hladké endoplasmatické retikulum	
<b>HPA</b>	osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny	hypothalamus-pituitary-adrenals axis
<b>HSL</b>	hormon senzitivní lipáza	
<b>IGF-1</b>	růstový faktor podobný inzulinu	insulin-like growth factor 1
<b>LDL</b>	lipoprotein s nízkou hustotou	low-density lipoprotein
<b>LPL</b>	lipoprotein-lipáza	
<b>MAFbx</b>	není	muscle atrophy F-box
<b>MCR</b>	melanokortinový receptor	melanocortin receptor
<b>MR</b>	mineralokortikoidový receptor	
<b>MuRF1</b>	není	muscle ring finger 1
<b>NADP</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát	
<b>nGRE</b>	negativní vazebné místo pro GR	negative glucocorticoid response element
<b>NST</b>	nucleus tractus solitarius	
<b>PEPCK</b>	fosfoenolpyruvát karboxy-kináza	
<b>PKA</b>	protein kináza A	
<b>PKB</b>	protein kináza B	
<b>PLC</b>	fosfolipáza C	phospholipase c
<b>POMC</b>	proopiomelanokortin	pro-opiomelanocortin
<b>PVN</b>	paraventriculární jádro hypothalamu	paraventricular nucleus
<b>SNS</b>	sympatický nervový systém	
<b>TAG</b>	triacylglycerol	
<b>UbP</b>	Ubiquitin-proteasom	
<b>V1bR</b>	receptor pro adenin-vasopresin	
<b>VLDL</b>	lipoprotein s velmi nízkou hustotou	very low-density lipoprotein

Poznámka: Anglický význam je uveden pouze v případě, že se běžně používá zkratka, která z tohoto anglického názvu vychází (například GRE – glucocorticoid response element). Český ekvivalent je uveden, pokud existuje a běžně se používá.

## Obsah

1. Úvod .....	6
2. Biosyntéza .....	7
3. Sekrece – Nadledviny.....	9
4. Regulace sekrece .....	10
4.1. Osa Hypotalamus – Hypofýza – Nadledviny .....	10
4.2. Zpětnovazebná regulace osy HPA .....	15
5. Molekulární mechanismus působení.....	17
5.1. Glukokortikoidový receptor.....	17
5.2. Působení GR v buněčném jádře .....	18
6. Působení kortizolu na organismus.....	21
6.1. Postsekreční regulace působení kortizolu .....	21
6.2. Působení kortizolu na energetický metabolismus .....	23
6.2.1. Játra .....	25
6.2.2. Kosterní svalovina.....	28
6.2.3. Pankreas .....	31
6.2.4. Tuková tkáň.....	31
Závěr.....	34
Seznam použité literatury .....	35

# 1. Úvod

Kortizol je hormonem stresu. Když se ocitneme v akutním ohrožení, aktivují se během okamžiku mnohé mechanismy, které organismu pomohou vyrovnat se s nebezpečím. Okamžitou reakci na stresový podnět jistě každý zná. Studené zpcené ruce při vystoupení na veřejnosti, zrychlený tep, chvíle strachu, kdy se všechny zvuky zdají být hlasitější a bližší. Za těmito ději stojí především aktivace sympatického nervového systému (SNS), který produkuje jiné stresové hormony, adrenalin a noradrenalin. Reakce, kterou v angličtině nazýváme „fight or flight“ (bojů nebo uteč), sice zachraňuje životy, nicméně stojí organismus mnoho energie a narušuje jeho homeostázu. Naše tělo ale s takovou zátěží počítá a vedle SNS aktivuje hned od začátku další systém, osu hypotalamus – hypofýza – nadledviny (HPA). Na konci této postupně se aktivující kaskády stojí právě kortizol, steroidní hormon, který s malým zpožděním za adrenalinem a noradrenalinem zaplavuje náš krevní oběh a pomáhá tělu znovu ustavit ztracenou rovnováhu.

Hlavní úlohou kortizolu při stresové zátěži je připravit tělu dostatek rychle dostupných zdrojů energie. Zvyšuje hladinu glukózy v krvi, a to jak jejím čerpáním z buněčných zásob, tak nastartováním glukoneogeneze v játrech. Právě pro jeho zásadní roli v metabolismu glukózy řadíme kortizol mezi takzvané glukokortikoidy (kortizol je lidským glukokortikoidem, například u hlodavců pak plní stejnou funkci kortikosteron). Mobilizuje i naše tukové zásoby a inhibuje procesy, které by v kritické chvíli energii zbytečně vyčerpávaly. Na nějaký čas také oslabí naši imunitu a utlumí zánětlivé procesy. Pozastavuje růst kostí a svalů a působí dokonce i v mozku, kde reguluje tvorbu paměťových stop v hippocampu.

Všechny tyto děje jsou pro organismus přínosné, dokonce nezbytné, ovšem jen do určité míry. Když kořist prchá před predátorem, jsou regenerační mechanismy jistě na místě. Něco jiného ale je, když se příčinou aktivace všech těchto mechanismů stává například obyčejný civilizační stres, a to navíc opakovaně, popřípadě nepřetržitě. Z přirozené stresové reakce se pak stává dvojsečná zbraň, která může jak pomáhat, tak i škodit.

Dokonalé pochopení vlivu kortizolu na energetický metabolismus organismu nám může pomoci odpovědět na některé doposud nezodpovězené otázky, například proč někteří lidé při dlouhodobém stresu hubnou a jiní se přejídají. Navíc se stále více uvažuje o účasti kortizolu v nejrůznějších metabolických onemocněních a poruchách příjmu potravy. Cílem této bakalářské práce je vypracovat literární přehled, který by mohl sloužit pro výzkum právě této problematiky, tedy účasti kortizolu na poruchách příjmu potravy, jako jsou anorexia a bulimia nervosa, nebo současná pandemická metla lidstva, obezita, a s ní spojený metabolický syndrom.

## 2. Biosyntéza

Kortizol patří do rodiny steroidních hormonů. Jádro všech těchto látek je tvořeno kostrou z pěti aromatických jader, takzvaného steranu. Prekurzorem steroidních hormonů a tedy i kortizolu je cholesterol. Ten se do buněk kůry nadledvin dostane buď z krevního řečiště, nebo je přímo syntetizován *de novo* z acetátu. Transport cholesterolu krevním řečištěm probíhá v takzvaných LDL partikulích. To jsou lipoproteiny tvořené molekulami cholesteryl esteru, cholesterolu, různých fosfolipidů a apolipoproteinu B (apoB-100). Proteinová složka LDL partikule je zodpovědná za navázání na LDL receptor a následnou specifickou receptorem zprostředkovanou endocytózu<sup>(12)</sup>.

Enzymy, které molekulu cholesterolu přemění na kortizol, patří do rodiny cytochrom – P – 450 – oxidáz. Jedinou výjimkou je 3 $\beta$  – hydroxysteroid dehydrogenáza. Tyto enzymy jsou vždy vázané na některou z buněčných membrán. Může to být vnitřní mitochondriální membrána, nebo membrána endoplasmatického retikula<sup>(42)</sup>.

**Cholesterol side-chain cleavage enzyme** (jinak také cytochrom P-450<sub>SCC</sub>, SCC enzym nebo 20,22 – desmoláza) štěpí vazbu mezi 20 a 22 uhlíkem postranního řetězce cholesterolu. Nachází se na vnitřní mitochondriální membráně a právě prostřednictvím tohoto enzymu je regulováno množství syntetizovaného kortizolu. Produktem tohoto štěpení je pregnenolon.

**3 $\beta$  – hydroxysteroid dehydrogenáza** oxiduje hydroxylovou skupinu na třetím uhlíku steranové kostry. Enzym se nachází na membráně hladkého endoplasmatického retikula. Přeměňuje pregnenolon na progesteron.

**17 $\alpha$  – hydroxyláza** (jinak také cytochrom P-450<sub>C17</sub>) oxiduje vodík na 17. uhlíku steranové kostry na hydroxylovou skupinu. Tento enzym najdeme na membráně hladkého endoplasmatického retikula, ovšem pouze v buňkách zona fasciculata a zona reticularis, ve dvou ze třech vrstev kůry nadledvin. V první vrstvě, zona glomerulosa, chybí. Právě proto je kortizol sekretován pouze ve dvou výše zmíněných vrstvách.

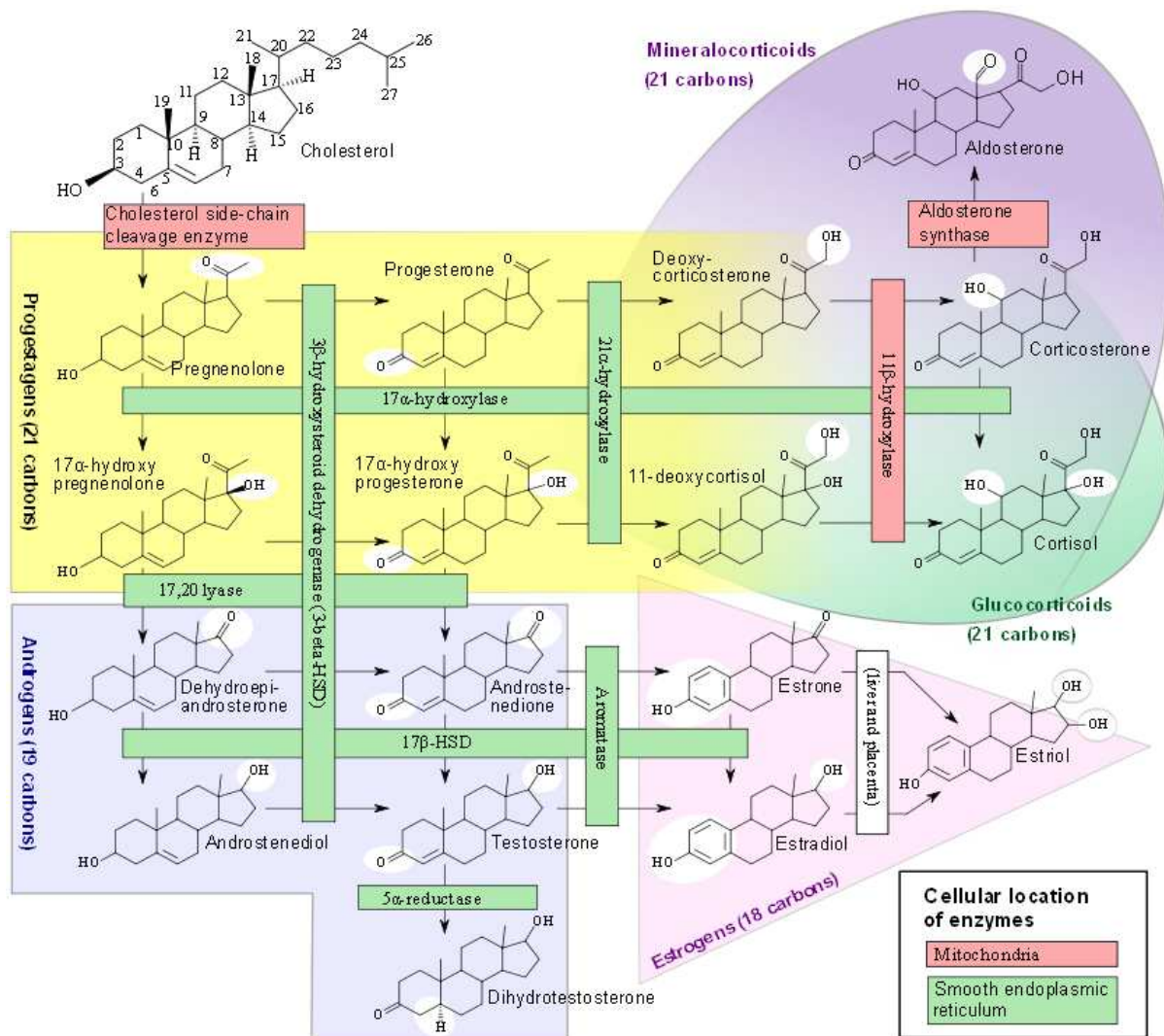
**21 $\alpha$  – hydroxyláza** (jinak také cytochrom P-450<sub>C21</sub>) oxiduje vodík na 21. uhlíku postranního řetězce. Nachází se taktéž na membráně hladkého endoplasmatického retikula.

**11 $\beta$  – hydroxyláza** (jinak také cytochrom P-450<sub>C11</sub>) oxiduje vodík na 11. uhlíku steranové kostry. Tento krok se odehrává na vnitřní mitochondriální membráně.

Jak naznačuje schéma biosyntézy steroidních hormonů, jednotlivé kroky se mohou odehrávat v různém pořadí za vzniku různých meziproduktů. Některé prekurzory má kortizol



společně s androgenními steroidy nebo s mineralokortikoidem aldosteronem. O tom, jaký produkt bude v danou chvíli syntetizován, rozhoduje jednak místní distribuce enzymů (například výše zmíněná 17 $\alpha$  – hydroxyláza) <sup>(42)</sup>, jednak exprese genů pro dané enzymy, ovlivněná signalizačními kaskádami z centrální nervové soustavy (viz 4. Regulace sekrece).



**Obr. 1: Syntéza steroidních hormonů**  
převzato z www.wikipedia.org

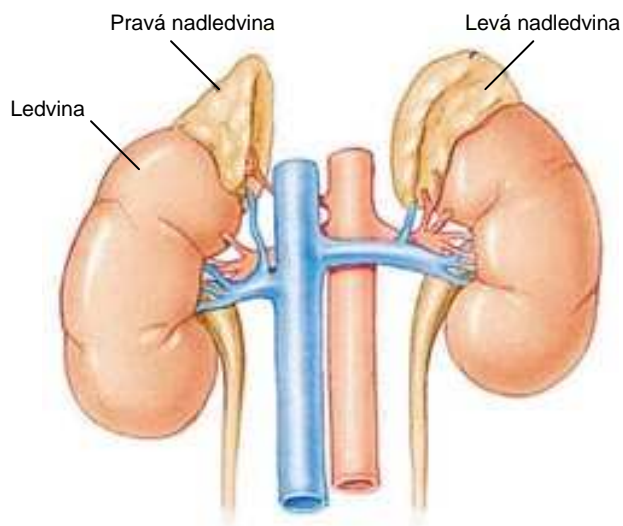
### 3. Sekrece - Nadledviny

Glandula suprarenalis, česky nadledviny, je párový endokrinní orgán přiléhající k hornímu pólu ledvin. Pravá nadledvina je trojhranná, levá má tvar poloměsíčitý. Obě se skládají ze dvou vývojově odlišných vrstev. Dřeň (medula) se vyvinula z neurální lišty. Její buňky jsou odvozené od sympatického nervového systému (SNS), kterým je také inervována. Jedná se v podstatě o vysoce modifikované postgangliové neurony sympatiku. Kůra (cortex) je původu mezodermálního. Vznikla proliferací buněk coelomu. Žláza je chráněna tukovým a vazivovým pouzdem (fascia renalis). Rychlý přenos produkovaných hormonů do krve zajistí krevní sinusoidy, kapiláry s četnými fenestracemi a póry, které prochází celým orgánem. Krev je do nadledvin přiváděna tepnami arteria phrenica inferior, a. renalis a aortou, které přechází do arteriae suprarenales superiores, mediae a inferiores. Ven vychází jediná žíla, vena suprarenalis<sup>(34)</sup>.

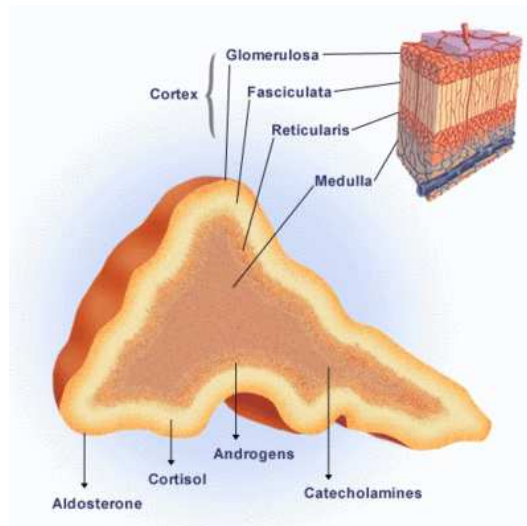
**Dřeň nadledvin** obsahuje buňky polyedrického tvaru s granulovanou cytoplasmou. Kromě těchto buněk tu můžeme najít četné sinusoidy, nervová vlákna a sympatická ganglia. Dřeň nadledvin produkuje hormony z rodiny katecholaminů: adrenalin a noradrenalin. Ty se, mimo jiné, účastní spolu s kortizolem stresové reakce organismu<sup>(34)</sup>.

**Kůra nadledvin** se dále dělí na tři vrstvy: zona glomerulosa, zona fasciculata a zona reticularis. Všechny tři vrstvy produkují steroidní hormony, proto v jejich cytoplasmě najdeme četné tukové kapénky. Ty slouží jako zásobárny cholesterolu, který je prekurzorem všech steroidních hormonů. Vrstvy se liší v tom, jaké hormony produkují, což záleží na jejich enzymatické výbavě. Zona glomerulosa produkuje převážně mineralokortikoidy, konkrétně hormon aldosteron, který se podílí na udržení iontové rovnováhy v krvi. Zona fasciculata a reticularis pak produkují především glukokortikoidy, u člověka právě kortizol, a malé množství androgenních hormonů, jako je dehydroepiandrosteron nebo androstenedion. Ty pak mohou být v dalších tkáních metabolizovány na známější a hlavně více potentní testosteron<sup>(12)</sup>.

Buňky kůry nadledvin nesou znaky typické pro syntézu steroidů. Jsou to již zmíněné tukové kapénky v cytoplasmě, silně rozvinuté hladké endoplasmatické retikulum (HER), které se prolíná s četnými mitochondriemi a nepřítomnost zásobních váček typických pro jiné sekreční buňky. Na HER a mitochondriích se nachází enzymy pro syntézu cholesterolu a jeho další úpravy na konkrétní hormony (viz 2. Biosyntéza). Proto se HER a mitochondrie nachází blízko u sebe. Zásobní váčky na syntetizované hormony nejsou potřeba. Steroidy jsou drobné amfipatické molekuly, které bez problémů prochází plasmatickou membránou. Syntetizují se v buňkách dle poptávky organismu, nikoliv do zásoby jako například inzulin nebo adrenokortikotropní hormon (ACTH)<sup>(59)</sup>.



**Obr. 2: Uložení nadledvin v těle**  
převzato z [www.voalikessalt.wordpress.com](http://www.voalikessalt.wordpress.com)



**Obr. 3: Průřez nadledvinou**  
převzato z [www.autismpaedia.org](http://www.autismpaedia.org)

## 4. Regulace sekrece

Kortizol je do krve uvolňován v pravidelném cirkadiálním rytmu s nejvyššími hodnotami v dopoledních hodinách a nejnižšími okolo půlnoci<sup>(54)</sup>. Bazální koncentraci kortizolu řídí hlavní biologické hodiny organismu, suprachiasmatické jádro hypotalamu, které spolupracuje ještě s periferními hodinami v kůře nadledvin<sup>(58)</sup>. Z hypotalamu je pod vlivem informací ze suprachiasmatického jádra uvolňován CRH, který řídí sekreci ACTH. Oba tyto hormony jsou uvolňovány v pravidelných pulzech a jejich koncentrace vykazují značné oscilace. Sekrece kortizolu je pak díky modulaci signálu ACTH periferními hodinami v kůře nadledvin plynulejší a vykazuje 3 hlavní maxima: jedno brzy po ránu, jedno přibližně v poledne a poslední v odpoledních hodinách okolo čtvrté až páté hodiny<sup>(54)</sup>. Cirkadiální rytmicita uvolňování kortizolu slouží lidskému organismu k regulaci metabolické aktivity některých orgánů, jako jsou játra, ledviny a mozek<sup>(58)</sup>. Stálá přítomnost kortizolu v krvi je také důležitá kvůli stimulačním účinkům na diferenciaci některých tkání (viz 6.2.4. Tuková tkáň). Akutní výlev kortizolu v návaznosti na stresovou reakci organismu řídí takzvaná osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny (osa HPA).

### 4.1. Osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny

Osa HPA (z angličtiny hypothalamus – pituitary – adrenals) je soubor sekretorických tkání, které se ve stresové situaci postupně vzájemně aktivují, čímž způsobí výlev kortizolu do krve. Tomuto ději říkáme také descendentní aktivace. Přenos informace se mezi jednotlivými úseky odehrává především na hormonální úrovni. Hypotalamus zpracovává

periferní vjemy. Mohou to být vjemy fyzické, ať už se jedná o zranění, nedostatek kyslíku nebo nadměrnou námahu, nebo vjemy psychické, například úlek, řešení obtížných úloh, pohled na něco nepříjemného nebo nervozita. Hypotalamus na takový stimul reaguje exocytózou CRH a arginin–vasopresinu (AVP) z neurosekrečních buněk. Oba hormony pak aktivují sekreční buňky předního laloku hypofýzy, které spustí exocytózu ACTH. Ten pak prostupuje stěnou kapilár, odkud je krevním oběhem zanesen až do cílového orgánu, kůry nadledvin. Zde vazbou na příslušný receptor spustí syntézu a sekreci kortizolu. Činnost osy HPA je regulována mnoha různými mechanismy. Zásadní je však zpětnovazebná inhibice vlastními produkty, především kortizolem samotným (viz 4.2. Zpětnovazebná regulace osy HPA).

**Aferentní signály hypotalamu** <sup>(podle přehledného článku 25)</sup>: Místem, kde dochází k integraci všech stresových signálů, je parvocelulární oblast paraventriculárního jádra hypotalamu (PVN). PVN je inervováno z mnoha různých mozkových center, které společně modulují výslednou stresovou reakci. Některá centra jsou s PVN propojena přímo. Na stresový podnět reagují výlevem neuropřenašeče, který buď spustí, nebo utlumí stresovou reakci. Napojují se na ně také aferentní dráhy vyšších mozkových center. I ty se pak nepřímo podílí na modulaci stresové odpovědi. V neposlední řadě i neurony samotného PVN mohou vzájemně ovlivňovat svou činnost a to jednak přímým kontaktem dendritů, jednak syntézou plyných neurotransmitterů, oxidu dusnatého (NO) a oxidu uhelnatého (CO). Výsledkem spolupráce této složité sítě je skutečnost, že dokážeme adekvátně reagovat jak na stresor fyzického charakteru (bolest, zranění, pokles tlaku a další), tak na stresor psychický, který může znamenat potenciální ohrožení (úlek, úzkost, závrať z výšky...). Jednotlivé stresové odpovědi dokážeme také modulovat podle typu stresoru.

**Přímá inervace:** Hlavním centrem spojeným s PVN přímo je nucleus tractus solitarius (NST) v mozkovém kmeni. Tato vývojově poměrně stará struktura získává informace o mnohých vegetativních funkcích organismu. Ústí sem neurony z kardiovaskulární nebo respirační soustavy, dochází zde i k vyhodnocování informací z chemoreceptorů, především pak z chuťových pohárků. NST hraje zásadní roli v regulaci autonomního nervového systému. Osu HPA aktivuje prostřednictvím mnoha neuropřenašečů, jako jsou adrenalin, noradrenalin, glucagon-like peptid 1 (GLP-1) a další. Některé neurony NST vylučují i neuropeptidy s inhibičním účinkem. Přímou aktivují buňky PVN také nuclei raphe prostřednictvím serotoninu, a některá další jádra thalamu a hypotalamu prostřednictvím glutamátu. Inhibiční účinek pak mají na PVN především GABAergní synapse z mnoha hypotalamických jader, nejvíce pak neurony z bezprostředního okolí PVN.

**Nepřímá inervace:** Nepřímo, prostřednictvím výše uvedených center, je s PVN propojen limbický systém a další jádra thalamu a hypotalamu. Především části limbického systému, hippocampus, amygdala a část prefrontální mozkové kůry, mají hlavní podíl na vyvolání stresové odpovědi psychickými podněty. Zpětně pak vytváří specifické

behaviorální odpovědi a uplatňují se při habituaci na určité stresory (útlum stresové reakce po opakovaném působení stresoru). Zatímco hippocampus a prefrontální kortex jsou napojeny především na inhibiční GABAergní neurony, amygdala je spíše aktivátorem osy HPA skrze aktivační glutamerní neurony.

**Hypotalamus:** Úlohou hypotalamu je centrální regulace stresové odpovědi. Po vyhodnocení aferentních signálů z mozku sekretuje dva typy hormonů: CRH a AVP, které působí jako stimulatory adenohipofýzy. Zatímco úloha CRH spočívá především v okamžité aktivaci osy HPA v návaznosti na stresový podnět, úloha AVP je poněkud složitější. Při krátkodobém působení stresoru může AVP umocnit aktivační funkci CRH v adenohipofýze (popsáno dále). Jeho hlavní význam však spočívá v regulaci stresové odpovědi při dlouhodobém působení stresorů (chronický stres). Dochází také k modulaci stresové odpovědi podle toho, jaký stresor reakci vyvolal <sup>(1)</sup>. Na regulaci osy HPA má podíl jak AVP sekretovaný z paraventriculárního jádra hypotalamu, tak AVP neurohypofyziálního původu <sup>(14)</sup>.

Exprese genu pro CRH je řízena signalizační kaskádou zahrnující tvorbu cAMP a aktivaci PKA. K aktivaci této kaskády vede zvýšená koncentrace forskolinu a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptidu (PACAP) v CNS. Protein PACAP stimuluje stejnou cestou také expresi genu pro AVP <sup>(35)</sup>.

Když aferentní dráhy z výše zmíněných oblastí mozku excitují neurosekreční buňky v paraventriculárním jádru hypotalamu, dojde k okamžitému výlevu CRH. CRH je totiž v buňkách na rozdíl od kortizolu syntetizován do zásoby a skladován v exocytických váčcích při zakončení nervových výběžků. Depolarizace membrány neurosekreční buňky způsobí vtok iontů  $Ca^{2+}$  do lumen buňky a rozpad multiproteinových komplexů, které doposud bránily splynutí membrány exocytického váčku s cytoplasmatickou membránou. CRH se vylévá do intersticiálního prostoru adenohipofýzy, kde se váže na CRH receptor 1. typu <sup>(12)</sup>.

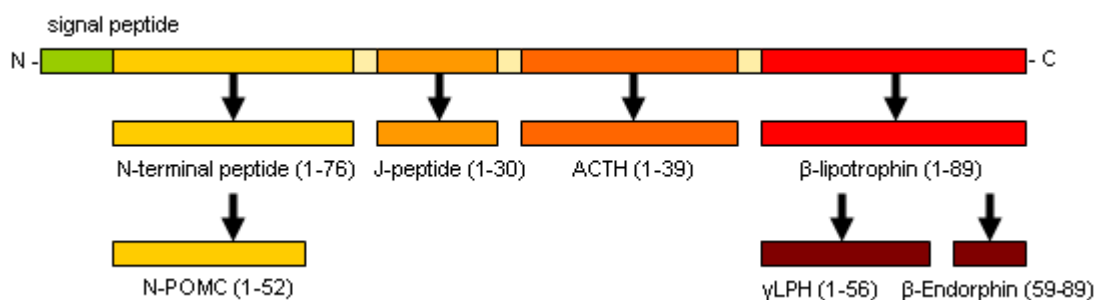
**Adenohipofýza:** V lidském těle najdeme hned několik izoform receptoru pro CRH. V základu se receptory dělí na dva podtypy kódované odlišnými geny, CRH-R1 a CRH-R2. Každý z nich má pak ještě několik modifikací. Jednotlivé typy se liší především distribucí v jednotlivých oblastech CNS i periferních tkání. Další odlišnosti spočívají v afinitě k nejrůznějším agonistům, takzvaným CRH-like peptides, a v signálních kaskádách, které receptory využívají <sup>(22)</sup>.

Pro přenos signálu v rámci osy HPA je však zásadní CRH-R1, který najdeme na takzvaných kortikotrofních buňkách předního laloku hypofýzy. Je to receptor spřažený s G-proteinem. Navázání ligandu aktivuje jednu z podjednotek G-proteinu, která spouští signalizační kaskádu vedoucí opět k otevření vápníkového kanálu a influxu iontů  $Ca^{2+}$  do buňky. Tato signální kaskáda zahrnuje klasicky aktivaci adenylátcyklázy, tvorbu cAMP a stimulaci aktivity PKA. Stejně jako v předchozím případě, vtok vápníkových iontů umožní výlev předem připravených exocytických váčků s ACTH, jen s tím rozdílem, že otevření

vápníkového kanálu vyvolá fosforylace zprostředkovaná PKA, nikoliv depolarizace membrány. ACTH je pak krevním oběhem dopraven k buňkám kůry nadledvin. Zde se váže na melanokortinový receptor 2. typu (MCR).

Jak již bylo zmíněno, na výlevu ACTH se podílí také AVP. Na povrchu kortikotrofních buněk adenohipofýzy najdeme kromě CRH-R1 také receptor pro AVP, V1bR. Je to opět receptor spřažený s G-proteinem. Signální kaskáda však tentokrát nevede přes zvýšenou koncentraci cAMP a aktivaci PKA, ale přes aktivaci fosfolipázy C (PLC)<sup>(1)</sup>.

Dalším účinkem vazby CRH na CRH-R1 v adenohipofýze je fosforylace, respektive aktivace transkripčních faktorů vedoucí ke zvýšené expresi genu pro proopiomelanokortin (POMC)<sup>(79, 36, 37)</sup>. Jedná se o dlouhý peptidický řetězec, jehož sestřihem vzniká hned několik signalizačních molekul, mezi nimi i ACTH. Sestřih molekuly probíhá během transportu z hrubého endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu za účasti enzymů prohormon-konvertáz (PC). Adenohipofýza je hlavním centrem syntézy POMC, nicméně stejnou schopnost mají i mnohé periferní tkáně a během těhotenství a fetálního období také intermediální lalok hypofýzy. Specifické PC zajistí, aby v každé tkáni došlo k sestřihu POMC na správné úseky. Adenohipofyzální POMC je takto sestřihán na molekuly NT (N-terminal peptide), JP (joining peptide), ACTH,  $\beta$ -lipotrophin ( $\beta$ LPH),  $\gamma$ -lipotrophin ( $\gamma$ LPH) a  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ end)<sup>(63)</sup>.



**Obr. 4: Sestřih pro-opiomelanokortinu v adenohipofýze** (upraveno podle Raffin-Sanson et al 2003)

Lineární peptid pro-opiomelanokortin (POMC) je prohormon konvertázami sestřihán na N-terminální peptid NT o délce 76 aminokyselin (AK), joining peptid (JP) o délce 30 AK, ACTH o délce 39 AK a  $\beta$ -lipotrophin ( $\beta$ LPH) o délce 89 AK. NT je pak v cílových buňkách upraven specifickou proteázou na aktivní N-POMC protein, který se uplatňuje v proliferaci adrenální tkáně.  $\beta$ LPH bývá v menším množství rozdělen na další dvě signalizační molekuly,  $\gamma$ -lipotrophin ( $\gamma$ LPH) o délce 56 AK a  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ end) o délce 30 AK. Tento sestřih je specifický pouze pro POMC produkovaný v adenohipofýze. Například POMC produkovaný v intermediálním laloku hypofýzy je sestřihán odlišně.

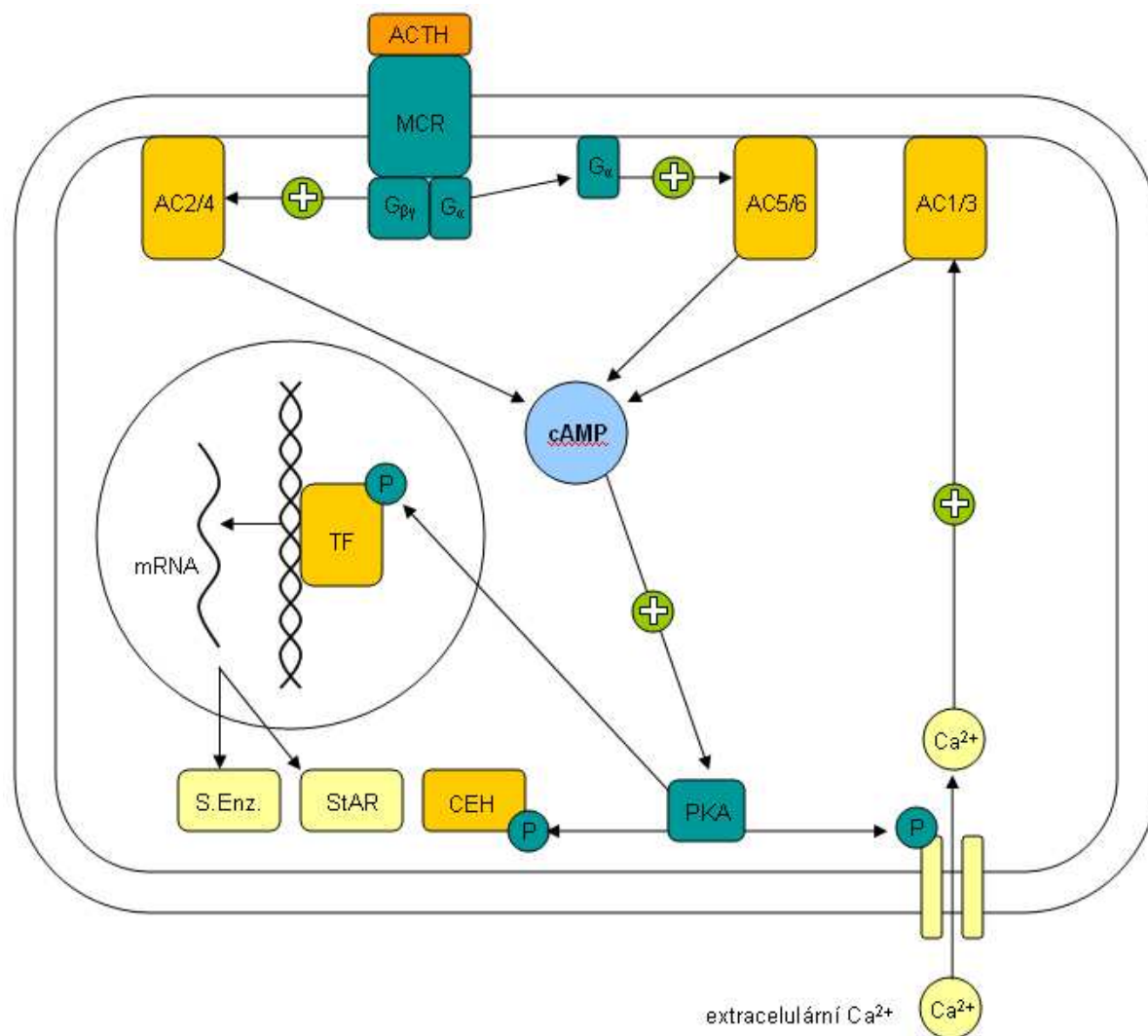
**Kůra nadledvin:** MCR je opět receptor spřažený s G-proteinem. Sekreci a syntézu steroidů řídí prostřednictvím několika druhých posílů, z nichž nejdůležitější jsou  $\text{Ca}^{2+}$  a cAMP.

Cesta k syntéze cAMP je poměrně složitá a dochází při ní k silné amplifikaci signálu prostřednictvím systému pozitivní zpětné vazby. Navázání ACTH na MCR vede klasicky k disociaci malé  $G_\alpha$  podjednotky, která aktivuje  $G_\alpha$  dependentní adenylátcyklázu (AC). V buňce však nacházíme celkem 3 typy adenylátcykláz: již zmíněnou  $G_\alpha$  dependentní adenylátcyklázu (AC5 a AC6),  $G_{\beta\gamma}$  dependentní adenylátcyklázu (AC2 a AC4) a nakonec

$\text{Ca}^{2+}$  senzitivní adenylátcyklázu (AC1 a AC3).  $G_{\beta\gamma}$  dependentní AC jsou aktivovány  $G_{\beta\gamma}$  podjednotkou G proteinu.  $\text{Ca}^{2+}$  senzitivní AC jsou aktivovány ionty vápníku, které se z extracelulárního prostoru do lumen buňky dostanou taktéž působením vazby ACTH na receptor, a to hned dvěma mechanismy. Prvním způsobem je fosforylace a následné otevření vápníkového kanálu prostřednictvím PKA, která se aktivuje pomocí cAMP z adenylátcykláz nezávislých na iontech  $\text{Ca}^{2+}$ . Druhou cestou je vyvolání slabé depolarizace membrány, čehož MCR dosáhne blokadí draslíkových kanálů a naopak otevřením chloridových kanálů. Po depolarizaci membrány se pak otvírají napětově řízené vápníkové kanály a  $\text{Ca}^{2+}$  opět proudí po svém gradientu do buňky <sup>(18)</sup>.

Vysoká koncentrace cAMP v buňce vede k aktivaci cAMP dependentní PKA. Tato kináza pak fosforylací aktivuje rozličné enzymy klíčové v syntéze a sekreci steroidů <sup>(18)</sup>. Prvním enzymem je cholesteryl-ester hydroxyláza, která uvolňuje z cholesteryl-esterů jednotlivé molekuly cholesterolu. Tyto molekuly jsou pak transportovány na vnitřní mitochondriální membránu, kde se nachází enzymy pro konverzi cholesterolu na prekurzory kortizolu. Transport cholesterolu zprostředkuje protein StAR (steroidogenic acute regulatory protein), jehož transkripční faktory jsou také fosforylovány PKA. V neposlední řadě, nicméně s mírným zpožděním, jsou prostřednictvím PKA fosforylovány také transkripční faktory pro syntézu steroidogenních enzymů (viz 2. Biosyntéza) <sup>(74)</sup>.

Jak již bylo zmíněno dříve, steroidní hormony se nesyntetizují do zásoby, jako předchozí signalizační hormony. Jejich sekrece je řízena až na úrovni DNA expresí genů pro jejich syntézu. V tomto místě proto nastává krátká prodleva. Zatímco zvýšenou koncentrací ACTH v plasmě naměříme již v prvních minutách stresové reakce, hladina kortizolu stoupá až později, rámcově v řádu desítek minut až hodin <sup>(12)</sup>.



**Obr. 5: Molekulární mechanismus přenosu signálu z ACTH do buňky kůry nadledvin**

Navázání ACTH na melanokortinový receptor (MCR) způsobí rozpad trimerního G proteinu a následnou aktivaci několika druhů adenylátcykláz (AC). Hromadí se cyklický adenosin monofosfát (cAMP) aktivuje protein kinázu A (PKA), která fosforyluje různé proteiny: Vápníkový kanál, který se otevře a umožní influx vápníkových iontů do buňky, cholesteryl-ester hydroxylázu (CEH) a různé transkripční faktory (TF) v jádru buňky. Tímto navodí transkripci genů pro syntézu steroidogenních enzymů (S.Enz.) a enzymu pro transport cholesterolu (StAR).

## 4.2. Zpětnovazebná regulace osy HPA

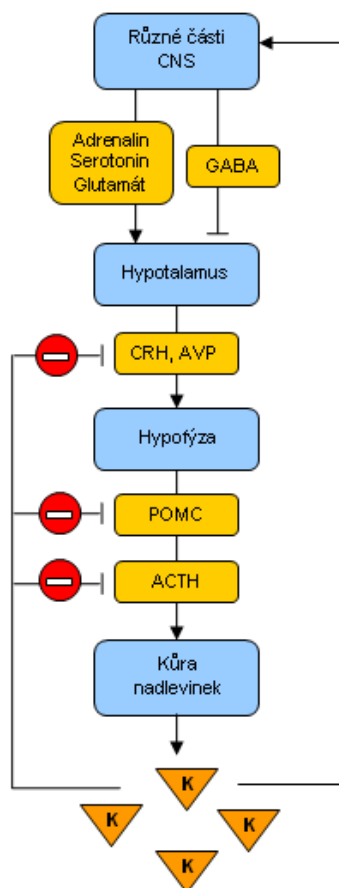
Zpětná vazba je pro organismus bezpochyby nejdůležitějším regulačním mechanismem. Uplatňuje se prakticky ve všech fyziologických procesech a nejinak je tomu i v regulaci osy HPA. V tomto případě se jedná o negativní zpětnou vazbu, kdy produkt určité reakce inhibuje svou vlastní syntézu a udržuje tak vlastní hladinu v pevně stanovených mezích. Konkrétně kortizol samotný inhibuje zásadní prvky hormonální signalizace v rámci osy HPA a za fyziologických podmínek tak účinně brání patologickému nárůstu vlastní koncentrace, který vede k poškození organismu (viz 6. Působení kortizolu na lidský organismus).



**Hypotalamus:** Na úrovni hypotalamu není zpětná vazba kortizolu tolik významná, jako v adenohipofýze, nicméně i zde kortizol působí a to hned na několika místech. Inhibuje transkripci genu pro CRH mechanismem, který nevyžaduje přímou interakci GR s DNA, tedy prostřednictvím meziproteinové interakce. Tato interakce se týká mnoha transkripčních faktorů, z nichž nejdůležitější je CREB (cAMP response element binding protein) <sup>(82)</sup>. Kortizol dále snižuje stabilitu mRNA pro CRH <sup>(44)</sup>. Podobným způsobem působí také na gen pro AVP, přičemž poměr inhibice genu pro CRH a AVP se liší podle toho, jak dlouho kortizol působí. Zatímco krátkodobé zvýšení hladiny kortizolu tlumí především syntézu AVP, při chronickém stresu se inhibice více soustředí na gen pro CRH <sup>(82)</sup>. Posledním krokem je blokáda výlevu exocytických váčků se zásobním CRH <sup>(12)</sup>.

**Adenohipofýza:** Zpětnovazebné působení kortizolu má pro regulaci osy HPA největší význam právě v adenohipofýze. Inhibice signální kaskády se tu odehrává v následujících krocích: potlačením transkripce příslušných genů se snižuje koncentrace receptorů pro CRH (CRH-R1) na membráně kortikotrofních buněk <sup>(30)</sup>. Dochází také k inhibici transkripce genu pro POMC, prekurzor ACTH, a to mechanismem transreprese, neboli přímou interakcí homodimeru GR s nGRE (negative glucocorticoid response element) <sup>(65)</sup>. Sekvence aminokyselin označovaná jako nGRE je vazebným místem pro GR, jehož obsazení má za následek zastavení transkripce příslušného genu. Interakce GR s DNA jsou podrobně popsány v 5. kapitole o molekulárním mechanismu působení kortizolu. K inhibici aktivity ACTH dochází, stejně jako v případě CRH, také na posttranslační úrovni blokováním výlevu exocytických váčků. Kortizolem indukované proteázy interferují s fosforylační aktivitou PKA, která by jinak umožnila influx vápníkových iontů do lumen buňky a následnou exocytózu <sup>(51)</sup>.

S narušenou funkcí negativní zpětné vazby v regulaci osy HPA je spojena řada závažných onemocnění a metabolických poruch. Nedávné výzkumy například odhalily poruchu zpětnovazebné regulace osy HPA u některých obézních pacientů <sup>(47)</sup>. V psychiatrii je pak tato porucha příčinou mnoha závažných depresivních stavů <sup>(60)</sup>. Navíc důvod, proč k depresím inklinují více ženy než muži, opět souvisí s kortizolem a jeho zpětnovazebným působením, které je výrazně zeslabováno přítomností hormonu estrogenu v hypotalamu <sup>(84)</sup>.



**Obr. 6: Osa HPA a její zpětnovazební regulace**

Centrem regulace sekrece kortizolu je hypotalamus, který získává informace z nadřazených mozkových center prostřednictvím aktivačních (adrenalin, serotonin, glutamát a jiné) nebo inhibičních (především GABA) neurotransmiterů. Hypotalamus pak sekretuje hormony CRH a AVP, které stimulují syntézu POMC a sekreci ACTH, jehož prekurzorem je právě POMC. ACTH nakonec stimuluje buňky kůry nadledvin, aby syntetizovaly a zároveň sekretovaly kortizol. Ten pak zpětnovazebně reaguje s vlastními receptory v buňkách hypotalamu a adenohipofýzy, kde inhibuje syntézu i sekreci CRH, AVP a ACTH. Kortizol také interaguje s buňkami různých částí mozku, především pak limbického systému, kde stimuluje tvorbu paměťových stop a různým způsobem moduluje stresové odpovědi.

## 5. Molekulární mechanismus působení kortizolu

### 5.1. Glukokortikoidový receptor

Kortizol působí na rozličné buňky v mnoha tkáních především prostřednictvím vazby na glukokortikoidový receptor GR. Ten patří spolu s receptorem pro mineralokortikoidy (MR), prolaktin (PR) a pro pohlavní hormony, estrogeny a androgeny (ER, AR) do rodiny receptorů interagujících s DNA. Všechny tyto receptory mají podobný mechanismus působení i podobnou strukturu.

GR ale není jediným receptorem vázajícím kortizol. Stejnou schopnost má i MR, dokonce má pro kortizol asi desetkrát větší afinitu než GR. K úplnému zasyčení MR by stačila bazální koncentrace kortizolu vytvořená v rámci cirkadiálního rytmu. Ve většině tkání se však kortizol a MR dohromady nedostanou. MR je exprimován především v epiteliálních buňkách ledvin, střeva a slinných žláz. V těchto buňkách je kortizol inaktivován pomocí enzymu  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 2 (11HSD2), aby MR zůstal volný a mohl regulovat fyziologické funkce těchto epitelů vazbou s mineralokortikoidy<sup>(17)</sup>. Výjimkou je hippocampus, kde se exprimují oba receptory současně a společně také zprostředkují specifickou odpověď na kortizol. MR jsou zde kortizolem vysyceny v podstatě nepřetržitě a zřejmě se podílejí na udržování homeostázy. Při zvýšení hladiny kortizolu, např.

při reakci na stres, se začnou obsazovat a vstupovat do jádra i GR. Tam ovlivňují expresi rozličných genů v součinnosti s MR<sup>(53)</sup>.

Kortizol je molekulou lipidické povahy a přes buněčnou membránu prochází bez pomoci membránových přenašečů. Proto je i GR situován až v cytoplasmě. V inaktivním stavu je zde vázán na proteinový komplex, který je tvořen dimerem heat-shock proteinu 90 (hsp90), proteinem p23 a jedním proteinem z rodiny tetratricopeptid repeat proteinů (TPR). Tato vazba stabilizuje GR a brání jeho předčasnému transportu do jádra a ovlivňování exprese genů bez přítomnosti ligandu<sup>(24)</sup>. Na GR je lokalizovaná jaderná signální sekvence (NLS), která je však ve vazbě na multiproteinový komplex stericky stíněná molekulami hsp90. Navázání kortizolu způsobí změnu konformace GR a jeho uvolnění z proteinového komplexu. Volný komplex GR-kortizol s odhalenou jadernou lokalizační sekvencí je pak transportován do jádra, kde působí jako transkripční faktor. Na transportu přes jaderný pór se podílí proteiny z rodiny importinů, importin  $\alpha$  a importin  $\beta$ <sup>(72)</sup>.

GR obsahuje následující důležité domény: doménu pro vazbu s DNA (DBD), která rozpoznává cílové sekvence a umožňuje nasednutí komplexu na DNA, doménu pro vazbu ligandu (LBD), na kterou se váže kortizol, a dvě aktivační domény –  $\tau 1$  (AF-1) a  $\tau 2$  (AF-2).

DBD má vysoce konzervativní strukturu, se kterou se setkáme také u dalších receptorů interagujících s DNA. Je tvořena dvěma útvary, takzvanými „zinc fingers“, pro které jsou charakteristické čtyři cysteiny tetrahedrálně uspořádané kolem jednoho atomu zinku. První DNA-vazebný motiv, lokalizovaný blíže N-konci proteinu, je skutečně zásadní pro vazbu GR na DNA. Najdeme na něm takzvaný P-box, sekvenci aminokyselin, která rozpoznává specifické sekvence DNA. Součástí druhého DNA-vazebného motivu, blíže k C-konci proteinu, je dimerizační smyčka (D-loop), která umožňuje GR tvořit homodimery<sup>(52)</sup>.

LBD je, jak už z názvu vyplývá, doménou která tvoří vazebné místo pro kortizol. Kromě toho se také podílí na dimerizaci receptoru a v nepřítomnosti kortizolu váže hsp90. Součástí LBD je také již zmíněná jaderná lokalizační sekvence.

Zbývající, takzvané aktivační domény, anglicky activation function domain (AF), jinak značené také  $\tau$ , jsou nejméně konzervativní a mezi jednotlivými receptory steroidních hormonů se mohou značně lišit. Jejich hlavní význam spočívá v interakci s dalšími transkripčními faktory a kofaktory<sup>(49)</sup>.

## 5.2. Působení GR v buněčném jádře

GR ovlivňuje expresi genů celkem čtyřmi způsoby: může transkripci stimulovat, nebo potlačovat, a obojího může dosáhnout přímou vazbou na DNA nebo bez ní. Studie těchto mechanismů jsou prováděny na GR<sup>dim</sup> myších, jejichž GR ztratily v důsledku bodové mutace v dimerizační smyčce (A458T) schopnost tvořit homodimery. Homodimerizace je klíčový krok v ovlivnění transkripce genu přímou vazbou GR na DNA, oproti tomu meziproteinová

interakce dimerizaci nevyžaduje. Receptory těchto myší si tedy stále zachovávají schopnost regulovat expresi genů nepřímo prostřednictvím interakce s jinými proteiny, zatímco interagovat s DNA již nemohou. Pokusy na těchto zvířatech pomohly určit, kterým mechanismem působí glukokortikoidy na jednotlivé geny. Zároveň přinesly další důležitý poznatek: Myši s nefunkčním GR umíraly hned po narození v důsledku nedokončeného vývoje plic, oproti tomu myši s mutací v dimerizační smyčce byly schopny normálního života. Působení glukokortikoidů přes přímou vazbu na DNA není tedy, narozdíl od nepřímého působení meziproteinovou interakcí, zásadní pro přežití organismu <sup>(64)</sup>.

**Stimulace transkripce prostřednictvím vazby na DNA (transaktivace)** je cesta, kterou kortizol využívá především při ovlivňování metabolismu. DBD rozpoznává specifickou cílovou sekvenci DNA, takzvaný GRE (glucocorticoid response element), který je součástí promotoru nebo enhanceru daného genu. Sekvence bazí má v tomto úseku palindromický charakter. Skládá se ze dvou identických úseků po šesti bazích, které jsou opačně kódované (například 1.úsek ATTACGC a 2. úsek TAATGCG) a oddělené třemi nezávislými bazemi. Proto se na ni GR váže ve formě homodimeru. Navázaný receptor pak umožní vazbu dalších transkripčních faktorů, např. enzymů pro remodelaci chromatinu, koaktivačních faktorů a dalších. Kortizol tak aktivuje například syntézu enzymů, které se uplatní při glukoneogenezi v játrech: tyrozin aminotransferáza (TAT) a fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK) <sup>(24)</sup>.

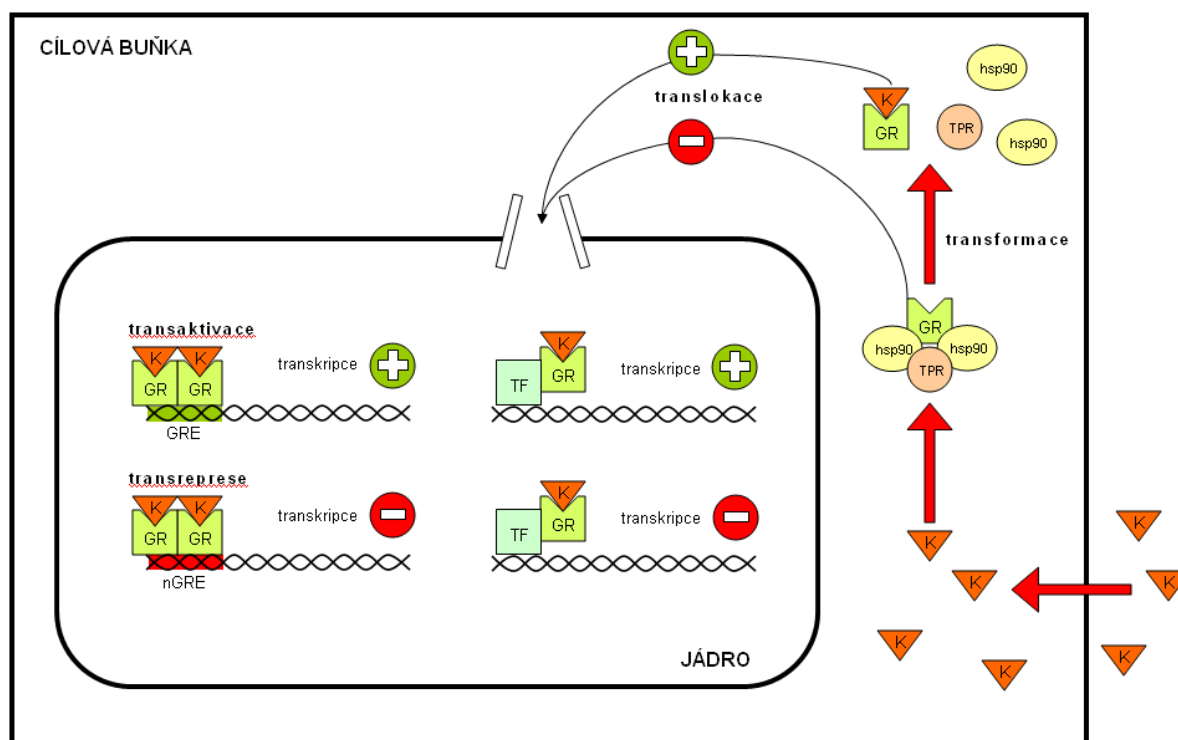
**Inhibice transkripce prostřednictvím vazby na DNA (transreprese)** se uplatňuje především ve zpětnovazebné regulaci osy HPA při blokování genu pro POMC, prekurzor ACTH (viz 4. Regulace sekrece). DBD tu rozpoznává jinou sekvenci, takzvaný nGRE (negativní GRE). Tato vazba transkripci neaktivuje, naopak ji inhibuje. Může se jednat o inhibici přímou, nebo kompetitivní, kdy navázaný komplex GR-kortizol brání nasednutí ostatních transkripčních faktorů <sup>(24)</sup>. Tímto způsobem je inhibován například gen pro osteokalcin. To mimo jiné vysvětluje, proč se z dlouhodobé terapie glukokortikoidy může vyvinout osteoporóza <sup>(48)</sup>.

Jak již bylo zmíněno výše, v některých buňkách působí GR společně s MR. Ukázalo se, že při zvýšených koncentracích kortizolu tvoří tyto receptory heterodimery a v této konformaci ovlivňují transkripci. Není však zatím zcela jasné, jestli takto působí stimulaci nebo represi transkripce, ani na které konkrétní geny takto působí <sup>(53)</sup>.

**Inhibice transkripce meziproteinovou interakcí** hraje hlavní roli v glukokortikoidy indukované imunosupresi. GR se váže na transkripční faktory jako je AP-1, NF-κB, nebo GATA-1 a tím snižuje expresi cytokinů a aktivitu T-lymfocytů. Podobným způsobem je také zpětnovazebně inhibována exprese CRH v hypotalamu. Obecně může GR utlumit expresi

genů bez vazby na DNA několika způsoby. Může se vázat na transkripční faktory a tím jim znemožnit vazbu s cílovou DNA, může s nimi soutěžit o klíčové kofaktory, nebo zablokovat aktivitu určité kinázy, která je potřebná k aktivaci daného transkripčního faktoru<sup>(52)</sup>.

**Stimulace transkripce meziproteinovou interakcí** je zatím nejméně probádaným mechanismem z výše uvedených. Je známo několik genů, při jejichž expresi působí GR jako synergista jiného transkripčního faktoru. Příkladem takového proteinu je Stat-5 $\alpha$ , který se uplatňuje například při diferenciaci pre-adipocytů<sup>(15)</sup> (Viz 6.2.4 Tuková tkáň).



**Obr. 7: Molekulární mechanismus působení glukokortikoidového receptoru**

Kortizol (K) volně prochází přes buněčnou membránu do cytoplasmy, kde se váže na glukokortikoidový receptor (GR). Po vazbě K na GR dochází k transformaci inaktivního komplexu GR, heat shock proteinu (hsp90) a příslušného tricopeptidu (TPR). Samotný GR je pak translokován do jádra, kde ovlivňuje transkripci genů buď přímou vazbou na DNA ve formě dimeru nebo prostřednictvím meziproteinové interakce s jinými transkripčními faktory (TF). Na DNA se nachází vazebná místa pro GR, takzvané Glucocorticoid response elements (GRE), která mohou zprostředkovat jak stimulaci transkripce (GRE), tak i její represi (nGRE).

Změnou transkripce genů dokáže kortizol vyvolat odpověď organismu řádově v hodinách. Jedná se tedy o pomalý, nicméně dlouhotrvající účinek. Existují však také mechanismy k vyvolání bleskových odpovědí v řádech minut i vteřin. V těchto případech působí kortizol přes vazbu na membránové receptory spřažené s G-proteiny nebo na nejrůznější kinázy či fosfatázy<sup>(45)</sup>.

## 6. Působení kortizolu na organismus

Kortizol je v pravém slova smyslu multipotentní hormon, který interaguje s mnoha typy buněk a tkání a ovlivňuje tak fyziologii lidského těla v mnoha bodech. Tento fenomén může mít v zásadě dvojí dopad. Působí-li kortizol ve správnou dobu a správném množství, umožní koordinaci mnoha rozličných mechanismů, které spolu zdánlivě nemusí vůbec souviset, což vede k efektivnímu a rychlému ustavení ztracené rovnováhy v organismu. Stejně množství mechanismů však může být narušeno, působí-li kortizol za patologických podmínek v nadbytku nebo nepůsobí-li vůbec.

Výzkum genů, na jejichž expresi se kortizol nějakým způsobem podílí, stále probíhá. Doposud byly nalezeny stovky takových genů a zdaleka ne u všech víme, z jakého důvodu jejich expresi reguluje právě kortizol <sup>(40)</sup>.

Vyjmenovat všechny procesy, které reguluje kortizol, je skutečně obtížné. Jeho hlavním úkolem je bezesporu komplexní regulace energetického metabolismu, která vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi, mobilizaci tukových zásob, odbourávání svalové hmoty a reorganizaci tukové tkáně. Kortizol dále působí jako protizánětlivý hormon. Mimo jiné vyvolává apoptózu T-lymfocytů a zabraňuje i jejich další proliferaci. Tlumí také syntézu mediátorů zánětu a komunikačních prostředků imunitních buněk, cytokinů <sup>(52)</sup>. Inhibuje mnoho procesů syntézy, například krvetvorbu, tvorbu kostní hmoty, nebo syntézu kolagenních vláken, to vše především za účelem úspory energie. Glukokortikoidové receptory najdeme i v centrálním nervovém systému, kde se kortizol podílí na tvorbě paměťových stop. Nezanedbatelná je úloha kortizolu v prenatálním období, například ve vývoji plic a mozku.

### 6.1. Postsekreční regulace působení kortizolu

V kapitole o regulaci sekrece bylo již popsáno, jakým způsobem organismus dosáhne toho, aby syntetizoval a posléze uvolnil do oběhu správné množství hormonu. Naše tělo má však k dispozici další mechanismy, které umožní jemně doladit koncentrace a aktivitu kortizolu i po jeho sekreci. Zásadní jsou v tomto směru plasmatické bílkoviny corticosteroid binding globulin (CBG) a dvě izoformy enzymu 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy, o kterých byla zmínka již v kapitole o molekulárním mechanismu působení kortizolu.

**CBG:** Corticosteroid binding globulin (CBG) je plasmatická bílkovina, která specificky váže glukokortikoidy a tím znemožňuje jejich přenos do buněk. Běžně vyváže tato bílkovina 90% cirkulujícího hormonu. Hladina CBG však není stálá. Mění se v závislosti na koncentraci pohlavních hormonů a syntézu CBG stimuluje také samotný kortizol. Značný vliv

na koncentraci CBG má například hormonální antikoncepce <sup>(38)</sup>. CBG je tedy bílkovina, která reguluje množství hormonu přístupného pro buňky.

**Aktivační a deaktivační enzym:** Kortizol se v těle vyskytuje ve dvou formách: jako aktivní kortizol, který se váže na GR, a neaktivní kortizon, který sice vstupuje do buněk, ale na GR se neváže. Převod z jedné formy na druhou zajišťují dva typy enzymu 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy (11HSD). Protože je kortizol multipotentním hormonem, který uplatňuje svou činnost na mnoha místech, je potřeba speciální regulace pro každou cílovou tkáň. Tuto možnost nabízí právě tkáňově specifická distribuce těchto enzymů.

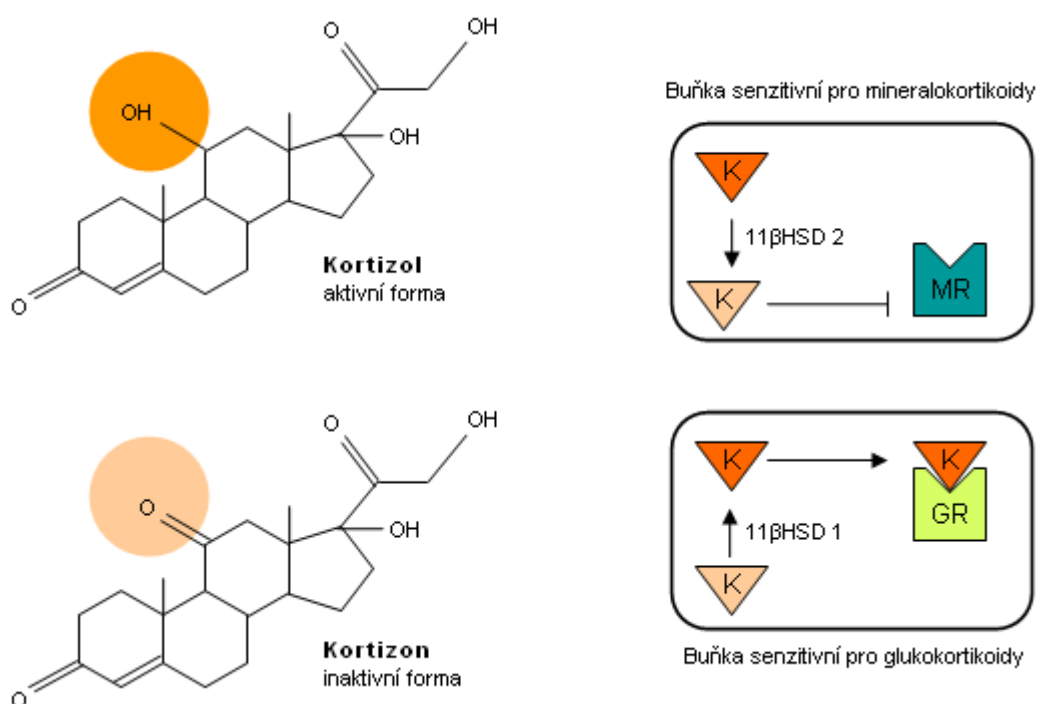
**11HSD typu 2** má oxidační účinky a katalyzuje přeměnu kortizolu na kortizon. Je to tedy deaktivující enzym, jehož hlavní funkcí je zachovat dostupnost neobsazených mineralokortikoidových receptorů pro vazbu s aldosteronem (viz 5. Molekulární působení kortizolu). Současně s MR se tedy exprimuje ve tkáních, jako jsou epitelové ledvinových kanálků, potních žláz nebo střeva. Během fetálního období se 11HSD2 exprimuje také v některých částech CNS, kde zajišťuje, aby byla regulace vývoje této tkáně kortizolem správně načasována <sup>(85)</sup>. V lidské populaci se vyskytuje několik polymorfismů genu pro 11HSD2. Někteří lidé mají 11HSD2 zcela nefunkční a trpí proto těžkou hypertenzí, iontovou nerovnováhou a sklony k závažným kardiovaskulárním onemocněním. Poměrně častá je pak částečná dysfunkce tohoto enzymu, která se projevuje zvýšenou citlivostí na sůl v potravě <sup>(80)</sup>.

**11HSD typu 1** má *in vitro* schopnost jak oxidovat, tak redukovat a může tudíž převádět kortizon na kortizol a naopak. *In vivo* se však chová převážně, snad i výhradně, jako aktivační enzym s reduktázovou aktivitou, jehož hlavní funkcí je regulovat tkáňově specifickou aktivitu kortizolu <sup>(80)</sup>.

11HSD1 je ukotvena v lumen endoplasmatického retikula. Nachází se zde společně s enzymem hexóza-6-fosfát dehydrogenázou (H6PDH), se kterým sdílí důležitý koenzym, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP). H6PDH konvertuje NADP na NADPH za současné oxidace glukóza-6-fosfátu (G6P) na 6-fosfoglukonát (6PG). Redukovanou formu koenzymu pak využije 11HSD1 ke konverzi kortizonu na kortizol. Spolupráce těchto dvou enzymů je důležitá z hlediska regulace činnosti 11HSD1. Míra aktivity tohoto enzymu totiž závisí na dostupnosti NADPH a tudíž i na aktivitě H6PDH. Aktivita H6PDH zase roste s extracelulární koncentrací glukózy. Souhrnně řečeno, zvýšená extracelulární koncentrace glukózy zvyšuje aktivitu 11HSD1 a tím i koncentraci aktivního kortizolu <sup>(11)</sup>.

Cílovými tkáněmi jsou pro 11HSD1 především játra, tuková tkáň, některé části CNS <sup>(85)</sup> a kosterní svalovina <sup>(31)</sup>. Aktivita 11HSD1 je tu regulována, jak již bylo zmíněno, jednak posttranslačně prostřednictvím H6PDH a extracelulární hladiny glukózy, jednak, a to především, regulací transkripce genu pro 11HSD1. Jako transkripční faktory tu působí značné množství látek, včetně několika hormonů regulujících energetický metabolismus, jako je inzulin nebo insulin-like growth factor 1 (IGF-1) <sup>(80)</sup>.

Regulovaná aktivita 11HSD1 slouží jako důležitý prvek v amplifikaci aktivity kortizolu. V klinické praxi se v poslední době dostává do popředí zájmu díky potenciálnímu využití jejích inhibitorů v léčbě onemocnění se zvýšenou hladinou kortizolu. Ukazuje se navíc, že některá onemocnění doprovází změněné koncentrace 11HSD1 v jednotlivých tkáních. Například u obeztních pacientů převládá aktivita 11HSD1 v tukové tkáni nad aktivitou enzymu v játrech <sup>(80)</sup>.



**Obr. 8: Rozdíl mezi kortizolem a kortizonem**

Kortizon je biologicky inaktivní forma kortizolu. Tyto dvě sloučeniny jsou mezi sebou převáděny prostřednictvím dvou typů enzymu 11β-hydroxysteroid dehydrogenázy. Typ 1 má redukující účinky a převádí kortizon na kortizol. Typ 2 má účinek opačný, tedy oxidativní, a převádí kortizol na kortizon. Právě tato inaktivující forma enzymu je přítomna v buňkách senzitivních pro mineralokortikoidy, aby se předešlo vysycení mineralokortikoidového receptoru (MR).

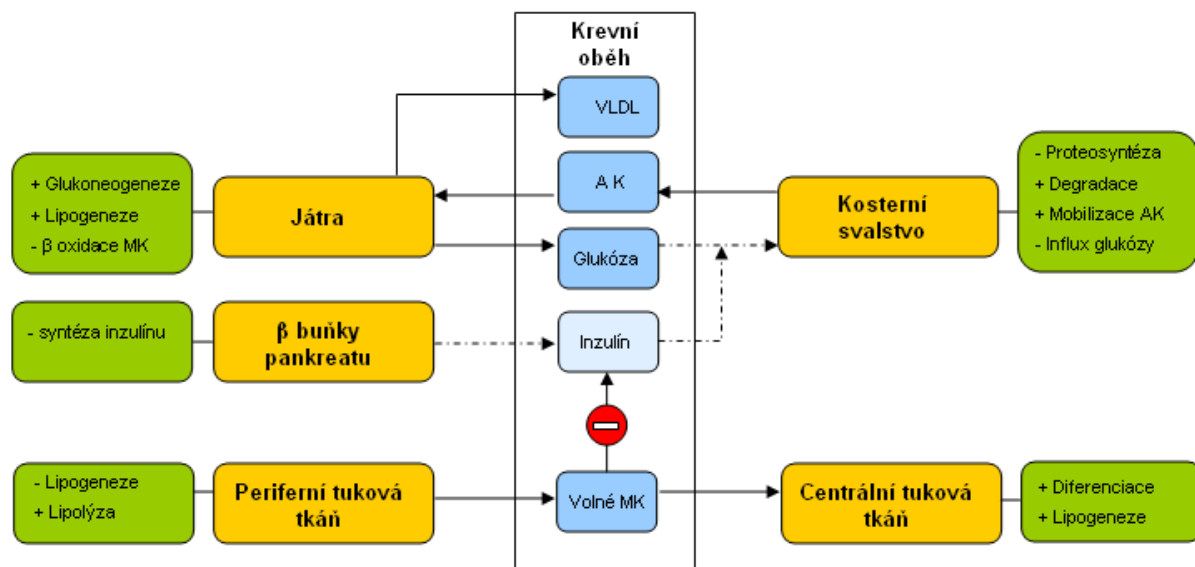
## 6.2. Vliv kortizolu na energetický metabolismus

V přirozených podmínkách se kortizol syntetizuje v návaznosti na stres, hladovění nebo zánět. Všechno jsou to děje, které značně narušují tělní rovnováhu a především vyčerpávají energii. Kortizol je tu proto, aby doplnil zásobu volné glukózy v krvi a ta se mohla dostat k životně důležitým orgánům, zvláště pak do mozku a k ledvinám. Glukokortikoidy indukované reakce tedy směřují k mobilizaci energetických zásob, blokování dějů, které by zbytečně energii vyčerpávaly, a k udržení vysoké koncentrace glukózy v krvi. Kortizol je obecně spíše hormon s katabolickými účinky a působí jako přímý antagonist inzulínu, který naopak podporuje reakce anabolické: tvorbu glykogenu, svalové hmoty a další <sup>(69)</sup>.



Z hlediska energetického metabolismu jsou cílovými orgány především játra, kosterní svalovina, tuková tkáň a pankreas. Za fyziologických podmínek působí kortizol krátkodobě a regulovaně. Je-li však regulace narušena, může docházet k těžkým systémovým poruchám právě proto, že působení kortizolu je tak komplexní. Jako příklad lze uvést Cushingův syndrom, který se vyvíjí právě následkem nadměrného působení kortizolu na organismus. Mezi symptomy tohoto onemocnění patří mimo jiné mnohočetné narušení energetického metabolismu: hyperglykémie s následným rozvojem cukrovky, inzulínová rezistence, svalová atrofie, centrální obezita a další <sup>(61)</sup>. Zvýšené hladiny kortizolu doprovází i mnoho dalších metabolických poruch: metabolický syndrom, diabetes 2. typu nebo viscerální obezitu jako takovou <sup>(2)</sup>. Zatím je však otázkou, jestli je zvýšená hladina kortizolu v těchto případech příčinou, nebo jen doprovodným jevem.

V následujících odstavcích bude podrobně popsáno, jak kortizol ovlivňuje energetický metabolismus v jednotlivých orgánech.



**Obr. 9: Přehled působení kortizolu na energetický metabolismus.**

Hlavním produktem této komplexní aktivity je zvýšení hladiny glukózy v krvi. Glukóza se do krve dostává z jater, kde je syntetizována z volných aminokyselin (AK) v procesu glukoneogeneze. Její zpětné vstřebávání do svalů by zprostředkoval hormon inzulín. Jeho aktivita je však inhibována přímým působením kortizolu v buňkách pankreatu i nepřímo vysokou koncentrací volných mastných kyselin. Volné mastné kyseliny jsou do krevního oběhu dodávány opět z jater, kde jsou syntetizovány v procesu lipogeneze, a dále pak z periferní tukové tkáně, kde kortizol aktivuje lipolýzu. Ukládání tuků je naopak podpořeno v centrální tukové tkáni. Do krve se také z jater dostávají partikule VLDL (very low-density lipoproteins). Ty slouží jako zdroj energie pro orgány, které nemohou z důvodu blokace inzulínu vstřebávat glukózu. Plné šipky vyznačují děje, které během působení kortizolu probíhají. Šipky přerušované naopak ukazují, které děje jsou působením kortizolu utlumeny.

### 6.2.1. Játra

**Metabolismus glukózy:** Volnou glukózu do krve dodává kortizol stimulací glukoneogeneze v hepatocytech. Při tomto procesu dochází k syntéze glukózy *de novo* z nejrůznějších substrátů, jako jsou aminokyseliny, prekuzory triglyceridů, laktát a další. První část této cesty se odehrává v mitochondriích, kam vstupují nejrůznější substráty pro glukoneogenezi poté, co byly metabolizovány na pyruvát, nebo na některý z meziproductů Krebsova cyklu. Prvním krokem glukoneogeneze je převod výchozí sloučeniny na oxalacetát. Pyruvát je konvertován pomocí enzymu pyruvát karboxylázy (PC), ostatní substráty jsou na oxalacetát převedeny v rámci Krebsova cyklu. Oxalacetát je pak potřeba transportovat z mitochondrie do cytoplasmy, kde jsou situovány ostatní enzymy pro glukoneogenezi. Oxalacetát jako takový však mitochondriální membránou neprochází, proto je nejprve redukován mitochondriální malát dehydrogenázou na malát, pak transportován a v cytoplasmě opět oxidován zpět na oxalacetát. Následuje krok, který je klíčový v regulaci míry glukoneogeneze. Oxalacetát je konvertován na fosfoenolpyruvát (PEP) pomocí PEP karboxykinázy (PEPCK). Tato reakce vyžaduje dodání energie a fosfátu z jedné molekuly GTP. V dalších krocích je PEP konvertován na glukózu sledem reakcí, který odpovídá reverzní glykolýze. Reakce jsou také katalyzovány příslušnými glykolytickými enzymy, výjimkou jsou pouze dva enzymy na konci celého řetězce. Jsou to fruktóza-1,6-bisfosfatáza (F16BPáza) a glukóza-6-fosfatáza (G6Páza), které hydrolyzují vazbu fosfátu na příslušný cukr. V těchto bodech opět dochází k regulaci míry glukoneogeneze prostřednictvím regulované syntézy těchto enzymů. G6Páza zároveň reguluje transport glukózy z hepatocytů do krve, protože glukóza narozdíl od glukóza-6-fosfátu může procházet přes buněčnou membránu<sup>(55)</sup>.

Míra glukoneogeneze je regulována jednak koncentrací jednotlivých substrátů, které mohou zvrátit průběh reakce směrem ke glykolýze, nebo nasměrovat oxalacetát zpět do Krebsova cyklu, jednak na úrovni transkripce genů pro potřebné enzymy. Kortizol se uplatňuje právě při regulované expresi příslušných genů, konkrétně genu pro syntézu PEPCK a G6Pázy<sup>(78)</sup>.

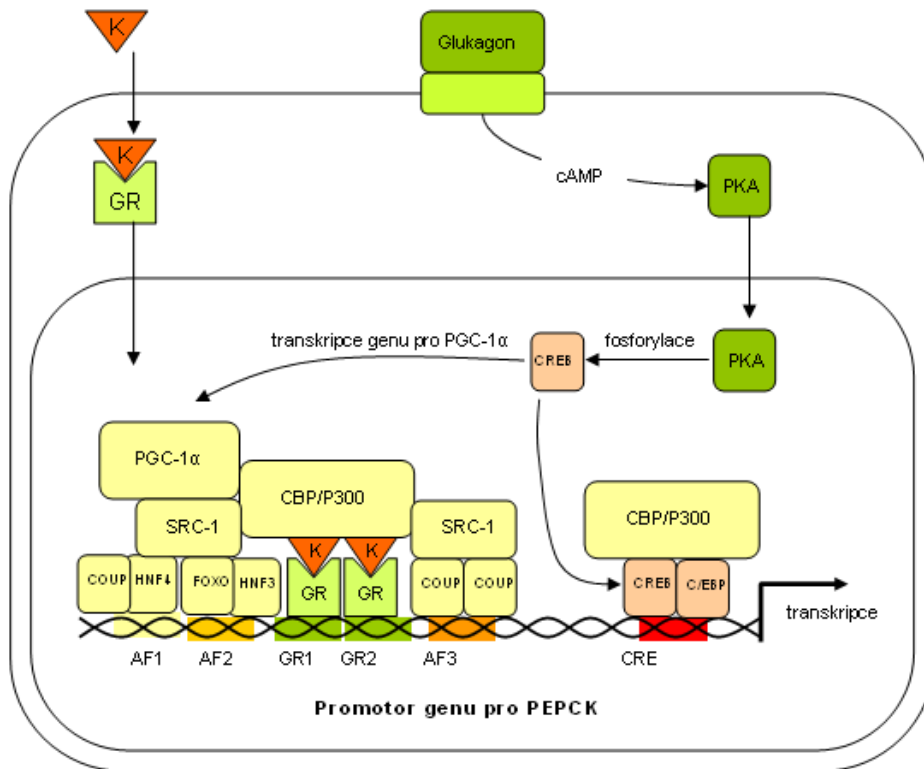
**PEPCK:** Syntézu tohoto enzymu synergisticky stimulují kortizol a glukagon. Naopak inhibítorem syntézy je inzulin. K transkripci genu pro PEPCK je nutná spolupráce obou stimulačních hormonů. Kortizol stimuluje expresi prostřednictvím svého receptoru GR coby transkripčního faktoru, zatímco glukagon prostřednictvím cAMP. Molekulární mechanismus působení těchto hormonů je poměrně dobře prozkoumán.

Receptor kortizolu, GR, aktivuje transkripci přímou vazbou na DNA. Ta však neprobíhá zcela obvyklým způsobem. Místo, kam se GR na DNA váže, není vysokoafinní GRE (glucocorticoid response element), jak bývá obvyklé u jiných takto regulovaných genů. Jedná se spíše o soustavu více vazebných míst pro nejrůznější transkripční faktory, mezi nimi

i pro GR, přičemž GR jako takový se na své místo neváže s nijak vysokou afinitou. V promotoru genu pro PEPCK najdeme následující vazebná místa: AF1 (accessory factor 1), kam se váží například transkripční faktory HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) nebo COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor). AF2 vážící například HNF-3 nebo FOXO-1. GR1 a GR2, které odpovídají jednotce GRE, nicméně ne tak přesně, aby vázaly GR dostatečně silně. Ve skutečnosti by bez účasti ostatních proteinů nevázaly GR téměř vůbec<sup>(83)</sup>. A nakonec AF3, který váže opět především transkripční faktory COUP. Celá tato soustava je označena jako GRU (glucocorticoid response unit)<sup>(29, 3)</sup>. Činnost GRU je navíc jak pozitivně tak negativně ovlivňována aktivitou dalších vazebných míst na DNA, vzdálených jednotek dAF1 a dAF2<sup>(3)</sup>. Na výše zmíněné transkripční faktory se pak váží další proteiny, například SRC-1 (steroid receptor co-aktivator 1) nebo CBP (p300/CREB binding protein). Všechny tyto proteiny tvoří dohromady ohromný multiproteinový komplex, který stabilizuje vazbu GR na DNA, interaguje s histony, váže další proteiny a takto umožňuje zahájení celého procesu transkripce. K plné aktivaci transkripce je potřeba účasti skutečně všech výše popsaných proteinů, jak již bylo mnohokrát dokázáno v nejrůznějších pokusech s knock-outy genů pro příslušné proteiny<sup>(78)</sup>.

Jak již bylo zmíněno, glukagon je pro syntézu PEPCK také nezbytný. Vazbou na membránový receptor aktivuje tvorbu cAMP, které pak cestou přes cAMP response element (CRE) na DNA a CRE binding protein (CREB) umožní syntézu jednak PEPCK samotného (Walter-Law 2002), jednak dalšího proteinu, který se zásadně podílí na stavbě proteinového komplexu, PGC-1 $\alpha$  (proliferator-activated receptor co-aktivator 1 $\alpha$ ). Tento protein sice není pro transkripci genu nezbytný, nicméně slouží jako důležitý regulační prvek a výrazně umocňuje míru transkripce<sup>(26)</sup>.

**G6Páza:** Také syntéza tohoto enzymu je řízena kortizolem. Tento fakt byl dokázán již dávno na základě pokusů, při kterých adrektomie (odstranění nadledvin) zcela zastavila tvorbu enzymu<sup>(56)</sup> a naopak přidání kortizolu do tkáňové kultury hepatocytů tvorbu stimulovalo. V promotoru genu pro G6Pázu byly nalezeny již tři GRE. Vazba GR jako takového však k plné aktivaci transkripce opět nestačí. Stejně jako v případě genu pro PEPCK, i zde GR spolupracuje s dalšími transkripčními faktory jako je HNF-4, FOXO-1<sup>(78)</sup> a především již zmíněný PGC-1 $\alpha$ <sup>(26)</sup>.



Obr. 10: Transkripce genu pro PEPCK

**Metabolismus tuků:** Ve chvíli, kdy kortizol vede veškeré možné metabolity do procesu glukoneogeneze a snaží se zvýšit hladinu glukózy v krvi, je potřeba efektivně blokovat činnost inzulínu, který by působil přesně opačně ve prospěch glykolýzy, glykogenogeneze a čerpání glukózy buňkami. Komplex GR-kortizol působí inhibičně na expresi genu pro inzulín prostřednictvím vazby na nGRE v promotoru tohoto genu <sup>(32)</sup>, nicméně nabízí se ještě další způsob inhibice, a tím je zvýšení koncentrace volných mastných kyselin (FFA – free fatty acid) v cytoplasmě. Přítomnost mastných kyselin aktivuje Protein Kinázu C-ε (PKCε) a NK1 (c-Jun-N-terminal Kinase 1), které pak interferují s tyrosin-fosforylační aktivitou enzymů IRS-1 a IRS-2. Právě tyto enzymy jsou zásadní součástí inzulínové signální kaskády, která se tímto stává nefunkční <sup>(70)</sup>. V játrech je proto metabolismus řízen tak, aby se minimalizovalo odbourávání FFA tak, že dochází k inhibici β-oxidaci mastných kyselin v mitochondriích <sup>(41)</sup>. Naopak je podpořena jejich syntéza stimulací exprese genů pro lipogenní enzymy, jako je FAS (fatty acid synthase) a acetyl-CoA karboxyláza (ACC). Následující fakt není podpořen žádnou citací literatury, nicméně nabízí se hypotéza, že syntéza mastných kyselin má kromě přímé inhibice inzulínové signální kaskády ještě další regulační význam. K syntéze FFA je totiž potřeba značného množství acetyl-CoA, který je jinak využit při převodu oxalacetátu na citrát v Krebsově cyklu. Vyčerpávání acetyl-CoA tedy vede k posunu reakční rovnováhy na stranu oxalacetátu, který tak může být efektivněji využíván pro proces glukoneogeneze.

**Patologické stavy:** Dlouhodobé působení kortizolu na játra, k jakému dochází například při léčbě glukokortikoidy nebo při nádorech nadledvin a hypofýzy, může způsobit vážné komplikace. Neustálá stimulace glukoneogeneze vede k hyperglykémii a hypertenzi. Hyperglykémie vede k neustálé stimulaci syntézy inzulínu a tedy i k hyperinsulinémii. Signalizace inzulínu je však blokována na mnoha úrovních a v organismu se následkem toho vyvíjí inzulínová rezistence, tedy stav, kdy ani vysoké koncentrace inzulínu na organismus nepůsobí <sup>(62)</sup>. Hyperglykémie spolu s inzulínovou resistencí pak mohou vést k rozvoji cukrovky.

Blokování  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a podpora lipogeneze spolu s hospodařením s tuky v periferní tukové tkáni (viz dále) může vést také k nadměrnému ukládání tuků v hepatocytech. To samozřejmě ohrožuje funkčnost jater a v extrémním případě to může vést až k rozvoji syndromu známého jako NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease), v češtině jaterní steatóza <sup>(70)</sup>.

### 6.2.2. Kosterní svalstvo

Ve chvíli, kdy organismus hladoví nebo potřebuje rychle nabýt ztracenou energii, představuje svalová hmota bohatý zdroj aminokyselin, které mohou posloužit při výrobě glukózy nebo při syntéze potřebných enzymů jinde v těle. Ve fázi regenerace organismus nepotřebuje přísun energie do svalů. Naopak, svaly samotné se stávají zdrojem energie pro orgány, které jsou pro regeneraci narušené homeostázy potřebnější: mozek, ledviny a játra.

Reakce, které v kosterní svalovině pod vlivem kortizolu zcela převládají, jsou tedy katabolické. Vedou k rozkladu svalové hmoty, utilizaci aminokyselin, blokování glykogenogeneze, proteosyntézy a vstřebávání glukózy do buněk.

**Blokování proteosyntézy.** Za příznivých podmínek jsou růst a diferenciace svalové hmoty podmíněny činností signální kaskády, na jejímž počátku stojí receptor pro IGF-1 (IGF1-R) <sup>(20)</sup>. Jedná se o receptor s tyrosin kinázovou aktivitou, který je funkcí i stavbou velmi podobný receptoru pro inzulín (IR). Také samotný IGF-1 je, jak už z názvu vyplývá, velmi podobný inzulínu, a proto se i inzulín může se slabší afinitou na IGF-1 receptor vázat <sup>(12)</sup>. Oba receptory (IGF1-R i IR) mohou navíc spustit stejné děje a tak se v literatuře často setkáme s pojmem „IGF-1/insulin pathway“ <sup>(20)</sup>. Vazba ligandu na IGF-1 receptor spouští tyrosin kinázovou aktivitu cytosolických domén receptoru, které pak fosforylují další kinázy a spouští tak řetězec fosforylací vedoucí až k aktivaci či deaktivaci mnoha transkripčních faktorů. Klíčovými enzymy jsou v tomto procesu PI3-K (phosphatidylinositol-3 kinase) a kináza Akt. Na konci kaskády pak stojí transkripční faktory, jako například p70S6K, který je fosforylací aktivován a stimuluje tvorbu svalové hmoty, nebo naopak PHAS-1 (známý též jako E4-BP) a Foxo, které jsou fosforylací inaktivovány a v aktivním stavu by tvorbu svalů inhibovaly <sup>(20)</sup>.

Kortizol coby inhibitor vstupuje do této signální kaskády hned na několika místech, ovšem přesný způsob, jakým působí, zatím nebyl zcela objasněn <sup>(78)</sup>. Pokusy na myších a buněčných kulturách však ukázaly, že agonista GR, dexamethason (Dex), inhibuje fosforylační aktivitu IGF-1 receptoru i inzulínového receptoru (IR) <sup>(19)</sup>, PI3K <sup>(68)</sup> i Akt <sup>(43)</sup>. To vede k zastavení nárůstu svalové hmoty, respektive k jejímu úbytku vlivem zvýšené degradace proteinů (viz dále).

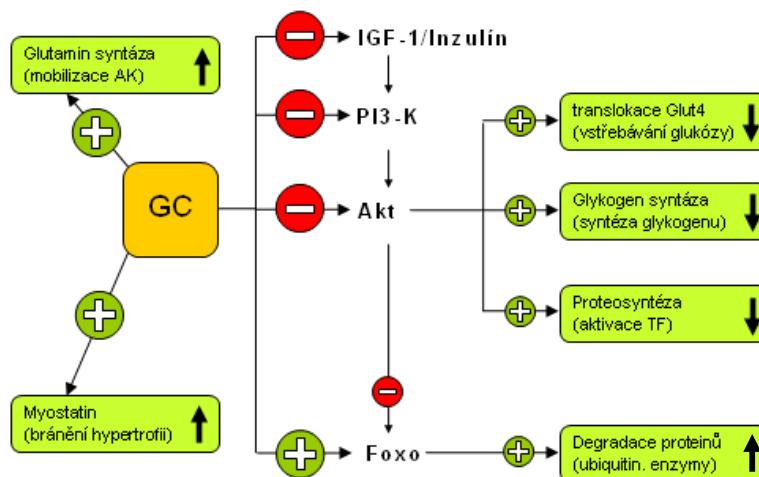
**Degradace proteinů.** Kortizol umocňuje tento proces hned několika mechanismy, z nichž nejdůležitější je aktivace ubiquitin-proteasomové cesty (UbP) <sup>(21)</sup>. Tato cesta představuje universální mechanismus pro degradaci nefunkčních nebo nadbytečných proteinů ve všech buňkách. Protein určený k degradaci je nejprve označen krátkým řetězcem molekul ubiquitinu (Ub) (polyubiquitinován), a poté dopraven do proteasomu, velkého bílkovinného komplexu soudkovitého tvaru. V jeho nitru se nachází podjednotky s proteolytickou aktivitou, které protein rozštěpí na malé části. Polyubiquitinace je proces vysoce specifický a probíhá ve třech krocích katalyzovaných třemi druhy ubiquitinačních enzymů: E1, E2 a E3. E1 jsou takzvané Ub-aktivující enzymy. Za spotřeby ATP vytvoří s Ub vysokoenergetickou thiol-esterovou vazbu a v tomto „energeticky nabitém“ stavu jej předají dále enzymům z rodiny E2. Tyto takzvané Ub-konjugační enzymy katalyzují přenos Ub na poslední enzymy z rodiny E3, Ub-ligázy. E3 jsou enzymy s vysokou specifitou, které zajistí, aby byly degradovány skutečně jen proteiny k tomu určené. Nejprve se na daný protein samy naváží a pak zprostředkují předání Ub z E2 na protein. V lidském těle již byly determinovány stovky členů této rodiny, některé z nich specifické pouze pro buňky svalových vláken. A právě tyto Ub-ligázy jsou klíčové v kortizolem řízené degradaci svalové hmoty <sup>(78)</sup>. Jedná se o dvě Ub-ligázy: Muscle Ring Finger 1 (MuRF1) a Muscle Atrophy F-box (MAFbx), známější jako atrogin-1. Transkripčními faktory, které stimulují transkripci jejich genů jsou již zmíněné Foxo1 a Foxo3. Ty jsou však po většinu času fosforylovány Akt kinázou, což zamezuje jejich přístupu do jádra a tak inhibuje jejich činnost. Ve chvíli, kdy kortizol inhibuje celou IGF-1/inzulín kaskádu, jsou však Foxo volné a umožní transkripci Ub-ligáz <sup>(71)</sup>. Míra degradace proteinů je pak přímo úměrná koncentraci těchto enzymů. Kortizol navíc stimuluje transkripci dalších enzymů degradačního řetězce, například ubiquitinu jako takového <sup>(46)</sup> nebo C3 S20 podjednotky proteasomu <sup>(10)</sup>. V těchto případech působí kortizol jako transaktivační faktor (viz 5. Molekulární mechanismus působení).

Kaskáda IGF-1/inzulín brání degradaci proteinů ještě jedním způsobem nezávislým na transkripčních faktorech Foxo. Jedná se o aktivní bránění apoptózy prostřednictvím kináz PI3K a Akt, které fosforylačně inhibují proapoptotické proteiny, například Bcl-2-related protein a BAD <sup>(9)</sup>. Dalším enzymem, který je činností IGF-1/inzulínové kaskády inhibován, je kaspáza-3 <sup>(27)</sup>. Kaspázy jsou obecně proteázy, které neselektivně štěpí buněčné proteiny na malé fragmenty a zahajují tak proces apoptózy. Fragmentované proteiny pak snáze a ochotněji podstupují degradaci cestou UbP. Ve chvíli, kdy kortizol utlumí činnost kaskády

IGF-1/inzulín, zvyšuje se i aktivita kaspázy-3 a dalších proapoptotických enzymů, což vede opět k intenzivní degradaci svalové hmoty. Toto bude nicméně vyžadovat další výzkum. *In vivo* byl totiž vztah mezi kaskádou IGF-1/inzulín a kaspázou-3 zatím prokázán jen u jiných tkání, například u epitelu v ledvinách <sup>(50)</sup>.

**Hospodaření s glukózou.** Působení kortizolu na svalovou hmotu vede obecně ke snížení vstřebávání glukózy do buněk a syntézy glykogenu, což odpovídá celkovému trendu: zvýšit koncentraci glukózy v krvi a přednostně zásobovat energií orgány klíčové pro obnovu homeostázy, mozek, ledviny a játra <sup>(78)</sup>.

Snížení vstřebávání glukózy z krve probíhá prostřednictvím snižování koncentrace glukózových kanálů GLUT4 na buněčné membráně <sup>(83)</sup>. Snížení tvorby glykogenu se děje prostřednictvím inhibice aktivity glykogen syntázy (GS) <sup>(13, 4)</sup>. Je zřejmé, že je těchto účinků dosaženo komplexní inhibicí inzulínové signální kaskády. Které konkrétní proteiny však hrají klíčovou roli, zatím není zcela objasněno. Experimentální údaje ukazují vztah mezi dvěma kinázami: protein kinázou B (PKB), která nepřímo aktivuje GS, a GS kinázou 3 (GSK-3), která naopak aktivitu GS inhibuje, není-li fosforylována PKB <sup>(67)</sup>. Inhibice PKB prostřednictvím kortizolu bude tedy znamenat nepřímou stimulaci GSK-3 a požadovanou inhibici GS. Také již zmíněná kináza Akt stimuluje aktivitu GS a transport GLUT4 na membránu <sup>(33)</sup>. Kortizolem stimulovaná inhibice tohoto enzymu by tedy také mohla mít velký význam.



**Obr. 11: Působení Glukokortikoidů ve svalu**

Protože většina těchto molekulárních mechanismů byla zatím prokázána pouze na myších modelech za použití umělého glukokortikoidu dexamethasonu, není v tomto schématu zařazen přímo kortizol, ale glukokortikoidy (GC) obecně. Ty působí stimulačně na syntézu glutamin syntázy, což vede k urychlenému transportu AK ven z buněk. Dále stimuluje syntézu myostatinu, který reguluje objem svalové hmoty. Hlavní působení však spočívá v komplexní regulaci kaskády IGF-1/inzulín > PI3-K > Akt, kde GC inhibují aktivitu všech uvedených prvků. To vede souhrnně k masivní inhibici aktivity Akt kinázy, která by jinak stimulovala syntézu proteinů, glykogenu a translokaci Glut4 (receptorů glukózy) na membránu, potažmo transport glukózy do svalové buňky. Všechny tyto aktivity jsou tedy působením GC utlumeny. Naopak podpořena je aktivita transkripčního faktoru Foxo, který stimuluje expresi genů pro enzymy, které jsou součástí ubiquitinačního řetězce. Nepřímo tak stimuluje degradaci svalové hmoty.

**Patologické stavy:** Zvýšená hladina kortizolu v krvi vede především k závažnému úbytku svalové hmoty (svalové atrofii). Tento stav bývá jedním z vedlejších projevů Cushingova syndromu. Vzniká také při rozsáhlé sepsi organismu a u pacientů trpících rakovinou. V prvních dvou případech stojí za vznikem svalové atrofie nezpochybnitelně kortizol. Při zánětlivých procesech je osa HPA přímo aktivována intermediátory zánětu, cytokiny a interleukiny. U pacientů trpících rakovinou je situace složitější, nicméně zdá se, že i kachexie, která pravidelně doprovází pokročilá stádia rakoviny a výrazně zvyšuje mortalitu a snižuje kvalitu života, může být způsobena nadměrnou aktivací osy HPA.

### 6.2.3. Pankreas

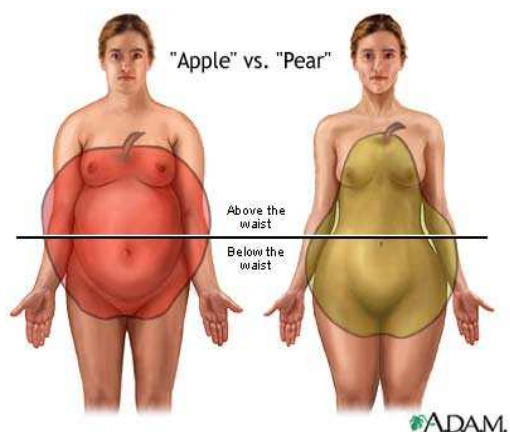
Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, kortizol působí jako antagonistu inzulínu. Ten musí být tedy účinně blokován, aby bylo působení kortizolu efektivní. Nejúčinnějším způsobem, jak blokovat funkci inzulínu, je zabránit jeho sekreci v  $\beta$ -buňkách pankreatu. To, že glukokortikoidy inhibují exocytózu váčků s inzulínem, bylo již mnohokrát dokázáno jak *in vitro* na buněčných kulturách<sup>(39)</sup>, tak *in vivo* na transgenních myších se zvýšenou expresí GR v  $\beta$ -buňkách pankreatu<sup>(6,7)</sup>. U těchto myší se následkem dlouhodobé aplikace dexamethasonu, agonisty GR, vyvinula intolerance glukózy, hyperglykémie a následně i diabetes 2. typu, stejně jako u pacientů, kteří mají z různých důvodů dlouhodobě zvýšenou hladinu kortizolu v krvi<sup>(78)</sup>. Snížení sekrece inzulínu v pankreatu probíhá jednak různými způsoby blokování jeho exocytózy, jednak kortizolem zprostředkovanou apoptózou pankreatických buněk<sup>(7)</sup>.

**Patologické stavy:** Jak bylo zmíněno, jedním z mechanismů inhibice sekrece inzulínu je i kortizolem zprostředkovaná apoptóza buněk. Z tohoto důvodu vede dlouhodobé působení kortizolu v buňkách pankreatu k rozvoji nevléčitelné cukrovky. Právě diabetes 2. typu představuje pro pacienty s Cushingovým syndromem největší nebezpečí<sup>(61)</sup>.

### 6.2.4. Tuková tkáň

Pacienty trpící Cushingovým syndromem lze poznat na první pohled podle charakteristického tvaru postavy. Tito lidé mají široké zakulacené obličejí (v angličtině se pro tento znak vžil výraz „moon-face“), vystouplé břicho a výrazně zvětšený obvod pasu. Oproti tomu jejich končetiny ani spodní partie hýždí znaky obezity vůbec nést nemusí. Jedná se o takzvanou centrální, nebo také abdominální obezitu, která je typickým průvodním znakem zvýšené hladiny kortizolu v krvi. Tato selektivní redistribuce tukových zásob je důsledkem odlišné aktivity kortizolu v centrální a periferní tukové tkáni.





**Obr. 12: Rozdíl mezi centrální a klasickou obezitou** převzato z [www.clarian.org](http://www.clarian.org)

„Jablko“ zde představuje centrální typ obezity, kdežto „hruška“ obezitu klasickou. Z lékařského hlediska je výskyt centrální obezity rizikovým faktorem především pro rozvoj cukrovky nebo onemocnění srdce.

**Periferní tuková tkáň.** V této oblasti dochází pod vlivem kortizolu k úbytku tukových zásob, kterou způsobuje především zvýšená lipolytická aktivita místních enzymů a naopak blokována lipogeneze. Důsledkem převládající lipolýzy v periferní tukové tkáni je uvolnění FFA, které poslouží orgánům k regeneraci po náročném výkonu. Zároveň jsou FFA vhodnou alternativou za glukózu, která je v takové situaci určena převážně pro CNS a ledviny, a do jiných orgánů se díky blokaci transportu glukózy nedostává. Jak již bylo zmíněno, FFA také přímo inhibují aktivitu inzulínu.

Hormon-senzitivní lipáza (HSL) je jedním z hlavních enzymů podílejících se na lipolýze v bílé tukové tkáni. Pokusy s transgenními myšmi, které postrádaly gen pro HSL, ukázaly, že tento enzym katalyzuje rozklad diacylglycerolů (DAG) na monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny (FFA). Ty se pak dostávají do krevního oběhu a slouží jako hlavní zdroj energie v lidském těle <sup>(75)</sup>. Výsledky nesčetných studií zároveň dokazují, že kortizol v periferní tukové tkáni zvyšuje lipolytickou aktivitu HSL <sup>(76, 8)</sup>. Děje se tak především prostřednictvím inhibice inzulínové signální kaskády. Právě inzulín totiž v době sytosti a dostatku energie inhibuje aktivitu HSL prostřednictvím fosforylace inzulín-dependentní PKA <sup>(28)</sup>.

Hlavními enzymy s lipogenní aktivitou jsou lipoprotein lipáza (LPL) a již dříve zmíněná PEPCK <sup>(78)</sup>. Ta dokáže *de novo* syntetizovat nejen glukózu v procesu glukoneogeneze, ale také glyceroltrifosfát v procesu glyceroneogeneze. Substrátem pro syntézu glyceroltrifosfátu jsou opět aminokyseliny a pyruvát. Glyceroltrifosfát pak velmi ochotně vytváří esterické vazby s volnými mastnými kyselinami za tvorby triacylglycerolu (TAG), který může být uložen v adipocytech <sup>(66)</sup>. LPL katalyzuje rozklad TAG obsaženého v lipoproteinových partikulích, jako jsou například VLDL (very low-density lipoprotein) nebo chylomikrony. Takto získané FFA jsou pak v adipocytech znovu esterifikovány na TAG a opět uloženy do zásoby <sup>(16)</sup>. V periferní tukové tkáni kortizol aktivitu obou enzymů inhibuje <sup>(78)</sup>. Inhibice aktivity PEPCK je realizována na úrovni transkripce interakcí s transkripčním faktorem C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) <sup>(57)</sup>.

**Centrální (abdominální) tuková tkáň.** Na tuto tkáň má kortizol přesně opačný účinek, než na tkáň periferní. Podporuje ukládání TAG a na nezralé adipocyty působí tak, že sice inhibuje jejich proliferaci, ale stimuluje jejich diferenciaci ve zralé adipocyty<sup>(78)</sup>. V těchto aktivitách hraje velmi důležitou roli zvýšená syntéza 11HSD1 specificky v tomto druhu tukové tkáně<sup>(77)</sup>.

Uplatnění kortizolu při dozrávání adipocytů je velmi široké. Reguluje expresi značného množství genů a působí i mimo úroveň transkripce. Následují jen některé příklady mechanismů, se kterými se můžeme v literatuře setkat. Nejčastější je pochopitelně působení komplexu kortizol-GR jakožto transkripčního faktoru nebo prostřednictvím meziproteinové interakce. Důležitá je například spolupráce s transkripčním faktorem Stat-5 $\alpha$  (signal transducer and activator of transcription)<sup>(15)</sup>. Tato interakce je navíc zajímavá z toho důvodu, že zde komplex kortizol-GR působí jako koaktivátor transkripce (viz 5.2 Působení GR v buněčném jádře), což je poměrně ojedinělé. Odlišným mechanismem působí kortizol na expresi hlavního spouštěče diferenciaci pre-adipocytů C/EBP $\alpha$ . Expresi tohoto proteinu indukuje transkripční faktor C/EBP $\beta$ . Ten je však blokován vazbou v komplexu s histon deacetylázou-1 (HD1). Kortizol dokáže HD1 označit pro degradaci v proteasomu a C/EBP $\beta$  z komplexu vyvázat<sup>(23)</sup>.

K diferenciaci pre-adipocytů centrální tukové tkáně dochází i v klidových podmínkách. Přispívá k tomu bazální koncentrace kortizolu v krvi, vytvářená na základě cirkadiálního rytmu. Glukokortikoidy se proto používají například pro stimulaci dozrávání adipocytů v tkáňových kulturách<sup>(23)</sup>. Krátkodobé fluktuace hladiny kortizolu například následkem stresové reakce organismu nemají na takto komplexní a dlouhodobý jev velký vliv. Oproti tomu dlouhodobě zvýšená koncentrace kortizolu způsobí nadměrný rozvoj centrální tukové tkáně, který se projeví jako již zmíněná centrální obezita.

**Patologické stavy:** Centrální obezita jako taková patologickým stavem být nemusí. S velkou pravděpodobností je však patologické to, co ji způsobilo. Výskyt centrální obezity je tedy varovným signálem, který může značit poruchu v regulaci sekrece kortizolu a ta představuje vždy značné riziko.

## Závěr

Kortizol je hormonem s neuvěřitelně širokým polem působnosti. Za fyziologických podmínek pomáhá našemu tělu vyrovnat se se stresem ať už fyzickým nebo psychickým. Jeho působení představuje pozoruhodnou souhru desítek enzymů, transkripčních faktorů, DNA, metabolických drah, buněk i celých tkání. Pokud se oprostíme od molekulárních analýz jednotlivých kroků a podíváme se na aktivitu kortizolu jako na celek, zjistíme, že spolu všechny ty drobné krůčky souvisí, vzájemně se doplňují a žádný z nich není zbytečný nebo samoučelný. O to více je tato skutečnost fascinující, že zde dochází k propojení energetického metabolismu s imunitním systémem, proliferací buněk a tkání, paměti i psychikou a to všechno dohromady dokáže bezchybně fungovat.

Stejně komplexní a rozsáhlé, jako je fyziologické působení kortizolu, jsou bohužel i škody způsobené poruchou regulace tohoto hormonu. Stačí si shrnout jen patologické stavy související s energetickým metabolismem, kterému byla tato práce věnována: centrální obezita, bytnění jater, zvýšené riziko infarktu v důsledku hypertenze, svalová atrofie, diabetes. Tento seznam se však netýká jen lidí, jejichž tělo produkuje z nějakého důvodu příliš velké množství kortizolu. Kortikoidy jsou stále často užívaným a u některých onemocnění dokonce jediným lékem. Cushingův syndrom, soubor poruch spojený s vysokou hladinou kortizolu v krvi, představuje riziko pro každého, kdo tyto léky musí dlouhodobě užívat.

Cílem této práce bylo vypracovat literární přehled pro účely výzkumu poruch příjmu potravy, jakou jsou například anorexia a bulimia nervosa. Díky již zmíněné komplexitě působení kortizolu je současným trendem hledat kortizol téměř za vším. Dá se konstatovat, že se také za leckterým problémem nachází. Porušená regulace jeho sekrece může způsobovat některé typy obezity, navyšuje procenta mortality u pacientů trpících rakovinou, u jiných lidí pak způsobuje deprese. Je možné, že s kortizolem budeme muset počítat i při výskytu poruchy v příjmu potravy. Vždyť anorexia nebo bulimia nervosa jsou onemocnění, která zásadně narušují homeostázu organismu, znamenají dlouhodobý stres a úzce souvisí i s metabolismem. Deregulace kortizolu jistě nebude příčinou tohoto problému, může ale být doprovodným jevem nebo důsledkem onemocnění. Každopádně může nějakým způsobem tento stav ovlivňovat a pokud tento vztah odhalíme, můžeme se naučit takovým pacientům účinněji pomáhat.

Rozhodně není divu, že se kortizol v endokrinologii drží v popředí zájmu. Je to látka, která má ohromný význam v klinické praxi, ať už jako příčina problému, nebo naopak lék. V této oblasti je stále co hledat. Potřebujeme alternativu ke kortikoidům se závažnými vedlejšími účinky. Potřebujeme způsob, jak udržet stálou hladinu hormonu, když je přirozená regulace organismu porušena. Pokud ještě o něco lépe pochopíme tu obdivuhodně složitou síť vztahů, na jejímž počátku stojí právě kortizol, možná, že budeme o něco blíže k zvládnutí některých problémů, které na své řešení zatím stále čekají.

## Seznam použité literatury

1. **Aguilera G., Subburaju S., Young S., Chen J.:** The Parvocellular Vasopressinergic System and Responsiveness of the Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis during Chronic Stress. *Prog Brain Res.* 170;29-39. 2008
2. **Björntorp P., Rosmond R.:** Obesity and Cortisol. *Nutrition.* 16;924-936. 2000
3. **Cassuto H., Kochan K., Chakravarty K., Cohen H., Blum B., Olswang Y., Hakimi P., Xu C., Massillon D., Hanson R.W., Reshef L.:** Glucocorticoids Regulate Transcription of the Gene for Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in the Liver via an Extended Glucocorticoid Regulatory Unit. *J Biol Chem.* 40;33873-33884. 2005
4. **Coderre L., Vallega G.A., Pilch P.F., Chipkin S.R.:** Regulation of glycogen concentration and glycogen synthase activity in skeletal muscle of insulin-resistant rats. 464;144-150. 2007
5. **Dahlman-Wright K., Wright A., Gustafsson J., Carlstedt-Duke J.:** Interaction of the Glucocorticoid Receptor DNA-binding Domain with DNA as a Dimer Is Mediated by a Short Segment of Five Amino Acids. *J Biol Chem.* 266;3107-3112. 1991
6. **Davani B., Portwood N., Bryzgalova G., Reimer M.K., Heiden T., Ostenson C., Okret S., Ahren B., Efendic S., Khan A.:** Aged Transgenic Mice With Increased Glucocorticoid Sensitivity in Pancreatic  $\beta$ -Cells Develop Diabetes. *Diabetes.* 53; 51-59. 2004
7. **Delaunay F., Khan A., Cintra A., Davani B., Ling Z., Andersson A., Ostenson C., Gustafsson J., Efendic S., Okret S.:** Pancreatic  $\beta$  Cells Are Important Targets for the Diabetogenic Effects of Glucocorticoids. *J Clin Invest.* 100;2094-2098.
8. **Djurhuus C.B., Gravholt H., Nielsen S., Pedersen S.B., Moeller B., Schmitz O.:** Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286;488-494. 2004
9. **Downward J.:** PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* 15;177-182. 2004
10. **Du J., Mitch W.E., Wang X., Price S.R.:** Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B. *J Biol Chem.* 275;19661-19666. 2000
11. **Dzyakanchuka A.A., Balazsa Z., Nasheva L.G., Amreinb K.E., Odermatta A.:**  $11\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP<sup>+</sup> and is stimulated by extracellular glucose. *Mol Cell Endocrinol.* 301;137-141. 2009
12. **Barrett E.J.:** The Adrenal Gland. in: Boron W.F., Boulpaep E.L.: *Medical Physiology.* Philadelphia. Elsevier. 1049-1058. 2004
13. **Ekstrand A., Schalin-Jäntti C., Löfman M., Parkkonen M., Widén E., Franssila-Kallunki A., Saloranta C., Koivisto V., Groop L.:** The effect of (steroid) immunosuppression on skeletal muscle glycogen metabolism in patients after kidney transplantation. *Transplantation.* 61;889-893. 1996
14. **Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T.:** The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25;132-149. 2004
15. **Floyd Z.E., Stephens J.M.:** STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes.* 52;308-314. 2003
16. **Fried S.K., Russell C.D., Grauso N.L., Brodin R.E.:** Lipoprotein Lipase Regulation by Insulin and Glucocorticoid in Subcutaneous and Omental Adipose Tissues of Obese Women and Men. *J Clin Invest.* 92;2191-2198. 1993
17. **Funder J.W., Pearce P.T., Smith R., Smith A.I.:** Mineralocorticoid action: Target Tissue Specificity is Enzyme, not Receptor, Mediated. *Science.* 28;583. 1988
18. **Gallo-Payet N., Payet M.D.:** Mechanism of Action of ACTH: Beyond cAMP. *Microsc Res Tech.* 61;275-287. 2003

19. **Giorgino F., Almahfouz A., Goodyear L.J., Smith R.J.:** Glucocorticoid Regulation of Insulin Receptor and Substrate IRS-1 Tyrosine Phosphorylation in Rat Skeletal Muscle In Vivo. *J Clin Invest.* 91;2020-2030. 1993
20. **Glass D.J.:** Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 37;1974-1984. 2005
21. **Glickman M.H., Ciechanover A.:** The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev.* 82;373-428. 2009
22. **Grammatopoulos D.K., Chrousos G.P.:** Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab.* 13;436-444. 2002
23. **Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S.:** Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev.* 78;783-809. 1998
24. **Heitzer M.D., Wolf I.M., Sanchez E.R., Witchel S.F., DeFranco D.B.:** Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 8; 321-330. 2007
25. **Herman J.P., Figueiredo H., Mueller N.K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M.M., Choi D.C., Cullinan W.E.:** Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24;151-180. 2003
26. **Herzog B., Hall R.K., Wang X.L., Waltner-Law M., Granner D.K.:** PGC-1 $\alpha$ , As A Transcription Amplifier, Is Not Essential for Basal and Hormone-Induced PEPCK Gene Expression. *Mol Endocrinol.* 18;807-819. 2004
27. **Heszele M.F.C., Price S.R.:** Insulin-Like Growth Factor I: The Yin and Yang of Muscle Atrophy. *Endocrinology.* 145;4803-4805. 2004
28. **Holm C.:** Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans.* 31;1120-1124. 2003
29. **Imai E., Stromstedt P., Quinn P.G., Carlstedt-Duke't J., Gustafsson J., Granneri D.K.:** Characterization of a Complex Glucocorticoid Response Unit in the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene. *Mol Cell Biol.* 9;4712-4719. 1990
30. **Iredale P.A., Duman R.S.:** Glucocorticoid Regulation of Corticotropin-Releasing Factor1 Receptor Expression in Pituitary-Derived AtT-20 Cells. *Mol Pharmacol.* 51;794-799. 1997
31. **Jang C.,Obeyesekere V.R., Dilley R.J., Alford F.P., Inder W.J.:** 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is expressed and is biologically active in human skeletal muscle. *Clin Endocrinol.* 65;800-805. 2006
32. **Jang W.G., Kim E.J., Park K., Park Y.B., Choi H., Kim H., Kim J.D., Kim K., Lee K., Lee I.:** Glucocorticoid receptor mediated repression of human insulin gene expression is regulated by PGC-1 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 352;716-721. 2006
33. **Jiang Z.Y., Zhou Q.L., Coleman K.A., Chouinard M., Boese Q., Czech M.P.:** Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100;7569-7574. 2003
34. **Junqueira L.C., Carneiro J.:** Adrenal glands. in Junqueira L.C., Carneiro J.: *Basic Histology:Text and atlas.* New York. McGraw-Hill Professional. 400-406. 2005
35. **Kageyama K., Suda T.:** Regulatory Mechanisms Underlying Corticotropin-Releasing Factor Gene Expression in the Hypothalamus. *Endocrinol J.* 2009
36. **Karalis K.P., Venihaki M., Zhao J., van Vlerken L.E., Chandras C.:** NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem.* 279;10837-10840. 2004
37. **Kovalovsky D., Refojo D., Liberman A.C., Hochbaum D., Pereda M.P., Coso O.A., Stalla G.K., Holsboer F., Arzt E.:** Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol.* 16;1638-1651. 2002

38. **Kumsta R., Entringer S., Hellhammer D.H., Wüst S.:** Cortisol and ACTH responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinolog.* 32;1153-1157. 2007
39. **Lambillotte C., Gilon P., Henquin J.C.:** Direct Glucocorticoid Inhibition of Insulin Secretion: An In Vitro Study of Dexamethasone Effects in Mouse Islets. *J Clin Invest.* 99;414-423. 1997
40. **Le P.P., Friedman J.R., Schug J., Brestelli J.E., Parker J.B., Bochkis I.M., Kaestner K.H.:** Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLOS Genet.* 2;159-170. 2005
41. **Letteron P., Brahimi-Bourouina N., Robin M.A., Moreau A., Feldmann G., Pessayre D.:** Glucocorticoids inhibit mitochondrial matrix acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid beta-oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 272;1141-1150. 1997
42. **Lisurek M., Bernhardt R.:** Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol.* 215;149-159. 2004
43. **Long W., Barrett E.J., Wei L., Liu Z.:** Adrenalectomy enhances the insulin sensitivity of muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284;102-109. 2003
44. **Ma X.M., Camacho C., Aguilera G.:** Regulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) transcription and CRH mRNA stability by glucocorticoids. *Cell Mol Neurobiol.* 21; 465 – 475. 2001
45. **Makara G.B., Haller J.:** Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system: Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol.* 65;367-390. 2001
46. **Marinovic A.C., Zheng B., Mitch W.E., Price S.R.:** Ubiquitin (UbC) Expression in Muscle Cells Is Increased by Glucocorticoids through a Mechanism Involving Sp1 and MEK1. *J Biol Chem.* 277;16673–16681. 2002
47. **Mattsson C., Reynolds R.M., Simonyte K., Olsson T., Walker B.R.:** Combined receptor antagonist stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis test identifies impaired negative feedback sensitivity to cortisol in obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 94;1347-1352. 2009
48. **Mazziotti G., Giustina A., Canalis E., Bilezikian J.P.:** Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Clinical and Therapeutic Aspects. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 51;1404-1412. 2007
49. **McEvan I.J., Wright A.P.H., Dahlman-Wright K., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.:** Direct Interaction of the  $\tau 1$  Transactivation Domain of the Human Glucocorticoid Receptor with the Basal Transcriptional Machinery. *Mol Cell Biol.* 13;399-407. 1992
50. **Meier M., Nitschke M., Hocke C., Kramer J., Jabs W., Steinhoff J., Schutt M.:** Insulin inhibits caspase-3 activity in human renal tubular epithelial cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem.* 21;279-286. 2008
51. **Min M.C., Shipston M.J., Antoni F.A.:** Posttranslational Modulation of Glucocorticoid Feedback Inhibition at the Pituitary Level. *Endocrinology.* 143;3796-3801. 2002
52. **Newton R.:** Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* 55;603-613. 2000
53. **Nishi M., Kawata M.:** Dynamics of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor: Implications from Live Cell Imaging Studies. *Neuroendocrinology.* 85;186-192. 2007
54. **Nomura S., Fujitaka M., Sakura N., Ueda K.:** Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone / cortisol ratio. *Clin Chim Acta.* 266;83-91. 1997
55. **Nuttall F.Q., Ngo A., Gannon M.C.:** Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev.* 24; 438-458. 2008

56. **Oishi K., Amagai N., Shirai H., Kadota K., Ohkura N., Ishida N.:** Genome-wide Expression Analysis Reveals 100 Adrenal Gland-dependent Circadian Genes in the Mouse Liver. *DNA Res.* 12;191-202. 2005
57. **Olswang Y., Blum B., Cassuto H., Cohen H., Biberman Y., Hanson R.W., Reshef L.:** Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem.* 278;12929-12936. 2003
58. **Oster H., Damerow S., Kiessling S., Jakubcakova V., Abraham D., Tian J., Hoffmann M.W., Eichele G.:** The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* 4;163-173. 2006
59. **Hall P.F.:** Cellular Organisation for Steroidogenesis. *Int Rev Cytol.* 86;53. 1984
60. **Pariente C.M., Lightman S.L.:** The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 31;464-468. 2008
61. **Pivonello R., De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A.:** Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37;135-149. 2008
62. **Qi D., Rodrigues B.:** Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292;654-667. 2006
63. **Raffin-Sanson M.L., de Keyser Y., Bertagna X.:** Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol.* 149;79-90. 2003
64. **Reichardt H.M., Kaestner K.H., Tuckermann J., Kretz O., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schütz G.:** DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 93;531-541. 1998
65. **Reichardt H.M., Schütz G.:** Glucocorticoid signalling - multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol.* 146;1-6. 1998
66. **Reshef L., Olswang Y., Cassuto H., Blum B., Croniger C.M., Kalhan S.C., Tilghman S.M., Hanson R.W.:** Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *J Biol Chem.* 278;30413-30416. 2003
67. **Ruzzin J., Wagman A.S., Jensen J.:** Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia.* 48;2119-2130. 2005
68. **Saad M.J., Folli F., Kahn J.A., Kahn C.R.:** Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest.* 92;2065-2072. 1993
69. **Saltiel A.R., Kahn R.C.:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414;799-806. 2001
70. **Samuel V.T., Liu Z., Qu X., Elder B.D., Bilz S., Befroy D., Romanelli A.J., Shulman G.I.:** Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem.* 279;32345-32353. 2004
71. **Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L.:** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117;399-412. 2004
72. **Savory J.G.A., Hsu B., Laquian J.R., Griffin W., Reich T., Hache R.J.G., LeFebvre Y.A.:** Discrimination between NL1- and NL2-Mediated Nuclear Localization of the Glucocorticoid Receptor. *Mol Cell Biol.* 19;1025-1037. 1999
73. **Scott D.K., Stromstedt P., Wang J., Granner D.K.:** Further Characterization of the Glucocorticoid Response Unit in the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene. The Role of the Glucocorticoid Receptor-Binding Sites. *Mol Endocrinol.* 12;482-491. 1998

74. **Sewer M.B., Waterman M.R.:** ACTH Modulation of Transcription Factors Responsible for Steroid Hydroxylase Gene Expression in the Adrenal Cortex. *Microsc Res Tech.* 61;300-307. 2003
75. **Schweiger M., Schreiber R., Haemmerle G., Lass A., Fledelius C., Jacobsen P., Tornqvist H., Zechner R., Zimmermann R.:** Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism. *J Biol Chem.* 281;40236-40241. 2006
76. **Slavin B.G., Ong J.M., Kern P.A.:** Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res.* 35;1535-1541. 1994
77. **Tomlinson J.W., Sherlock M., Hughes B., Hughes S.V., Kilvington F., Bartlett W., Courtney R., Rejto P., Carley W., Stewart P.M.:** Inhibition of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity in Vivo Limits Glucocorticoid Exposure to Human Adipose Tissue and Decreases Lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 92;857-864. 2007
78. **Vegipoulos A., Herzig S.:** Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 275;43-61. 2007
79. **Vila G., Papazoglou M., Stalla J., Theodoropoulou M., Stalla G.K., Holsboer F., Paez-Pereda M.:** Sonic hedgehog regulates CRH signal transduction in the adult pituitary. *Faseb J.* 19; 281-283. 2005
80. **Walker B.R., Andrew R.:** Tissue Production of Cortisol by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Metabolic Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1083;165-184. 2006
81. **Waltner-Law M., Duong D.T., Daniels M.C., Herzog B., Wang X.L., Prasad R., Granner D.K.:** Elements of the Glucocorticoid and Retinoic Acid Response Units Are Involved in cAMP-mediated Expression of the PEPCK Gene. *J Biol Chem.* 277;10427-10435. 2002
82. **Watts A.G.:** Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol.* 26;109-130. 2005
83. **Weinstein S.P., Wilson C.M., Pritsker A., Cushman S.W.:** Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism.* 47;3-6. 1998
84. **Weiser M.J., Handa R.J.:** Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience.* 159;883-895. 2009
85. **Yau J.L., Seckl J.R.:** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I in the brain; thickening the glucocorticoid soup. *Mol Psychiatry.* 6;611-614. 2001



## **Poděkování**

Na závěr bych ráda poděkovala paní školitelce RNDr. Jaře Nedvídkové CsC., která mě vedla při psaní této práce a poskytla mi cenné rady i zkušenosti. Poděkování patří také panu Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi CsC., který byl mým garantem v rámci fakulty.