



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie

Porovnání účinků protizánětlivých léčiv na endotelových buňkách

in vitro

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Josef Cileček
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Josef Cileček
Název práce	Porovnání účinků protizánětlivých léčiv na endotelových buňkách <i>in vitro</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra experimentální biologie
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývá porovnáním účinků protizánětlivých léčiv na endotelových buňkách HUVEC <i>in vitro</i>. Buňky HUVEC jsou lidské buňky pupečnickové žíly. Teoretická část shrnuje poznatky o zánětu, protizánětlivých léčivech, mechanismu a expresi účinku těchto léčiv a signálních molekulách, jež slouží jako mediátory zánětu.</p> <p>V praktické části byly stanovovány a srovnávány protizánětlivé účinky zkoumaných léčiv na endotelové buňky HUVEC ovlivněné cytokinem TNFα. Určení protizánětlivé aktivity probíhalo pomocí metod western blotting, ELISA a imunofluorescence. Tyto metody byly provedeny za účelem studia vlivu protizánětlivých léčiv na cytokinem TNFα indukovaný stav v buňkách.</p>
Klíčová slova	Zánět, protizánětlivá léčiva, mediátory zánětu, western blotting, nukleární faktor kappa B, ELISA, imunofluorescence
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Josef Cileček
Title of thesis	Comparison of effects of anti-inflammatory drugs on endothelial cells <i>in vitro</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>The Bachelor thesis deals with comparing the effects of anti-inflammatory drugs on HUVEC endothelial cells <i>in vitro</i>. HUVEC cells are human umbilical cord vein cells. The theoretical part summarizes knowledge about inflammation, anti-inflammatory drugs, the mechanism and expression of action of these drugs and signaling molecules that serve as mediators of inflammation.</p> <p>In the practical part, the anti-inflammatory effects of the studied drugs on HUVEC endothelial cells affected by the cytokine TNFα were determined and compared. The determination of anti-inflammatory activity was made using western blotting, ELISA and immunofluorescence. These methods were applied for the study of anti-inflammatory properties of drugs on the cytokine TNFα-induced state in cells.</p>
Keywords	Inflammation, anti-inflammatory drugs, mediators of inflammation, western blotting, nuclear factor kappa B, ELISA, immunofluorescence
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

/vlastnoruční podpis/

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lucii Rárové Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále děkuji kolektivu Katedry experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za vstřícnost a příjemné pracovní prostředí. Má bakalářská práce vznikla za podpory grantu IGA_PrF_2023_012.

OBSAH

Cíle práce.....	8
1 Úvod.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Zánět.....	10
2.2 Molekulární mechanismus chronického zánětu	11
2.3 Zánět jako předchůdce rakoviny	12
2.4 Mediátory zánětu.....	12
2.4.1 NF- κ B.....	13
2.4.2 IKB α	13
2.4.3 Cyklooxygenáza (COX-2).....	14
2.4.4 Prostaglandiny	15
2.4.5 IL-6.....	15
2.4.6 Glukokortikoidní receptor	16
2.4.7 TNF α	17
2.5 Protizánětlivá léčiva	18
2.5.1 Kortikosteroidy.....	19
2.5.2 NSAID.....	20
2.5.3 Prednisolon.....	21
2.5.4 Dexamethason	21
2.5.5 Testosteron a androgenový receptor	22
2.5.6 Kyselina acetylsalicylová.....	23
2.5.7 Ibuprofen	24
2.5.8 Nimesulid	24
2.6 Endotelové buňky.....	25
2.6.1 Reakce endotelu na zánět a rolování	26
2.6.2 Endotelové buňky lidské pupečnickové žíly (HUVEC)	26
3. Experimentální část.....	29
3.1 Materiály	29
3.1.1 Přístrojové vybavení.....	29
3.1.2 Použité chemikálie	29
3.1.3 Použité roztoky.....	30
3.1.4 Použité protilátky	31
3.1.5 Použité buňky	32
3.2 Metody	33
3.2.1 Ovlivnění buněk a sklizení	33
3.2.2 Lyzování buněk	33

3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů	34
3.2.4 ELISA.....	35
3.2.5 Imunofluorescence	36
4. Výsledky.....	38
4.1 Western Blotting	38
4.2 ELISA.....	41
4.3 Imunofluorescence	43
5. Diskuse	45
6. Závěr.....	50
7. Použitá literatura	52

Cíle práce

1. Provedení literární rešerše a shromáždění relevantního textu ohledně problematiky zánětu, protizánětlivých léčiv, mechanismu a exprese účinku těchto léčiv a signálních molekul, jež slouží jako média pro aktivace zánětu
2. Provedení a následné vyhodnocení výsledků laboratorních metod: western blotting, enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), imunofluorescence
3. Zhodnocení mechanismu účinku sledovaných protizánětlivých léčiv používaných v medicíně, na endotelových buňkách (HUVEC) *in vitro*

1 Úvod

Zánět je přirozenou odpovědí organismu na poškození tkáně, kterou je imunitní systém schopen rozeznat, odstranit škodlivé a cizí podněty a začít léčebný proces. Zánět, zvláště pak chronický, může však být i patologický a vést k trvalému poškození tkáně, výskytu vážného onemocnění nebo i smrti. Proto hrálo zmírnění nebo úplné potlačení stavu zánětu vždy významnou roli v medicíně. Za tímto účelem byly vyvinuty různá protizánětlivá léčiva (tzv. antiflogistika), s různým mechanismem a efektivností účinku. Srovnání těchto parametrů (mechanismus, účinek) je předmětem této bakalářské práce.

V této bakalářské práci se budu zabývat porovnáním účinku protizánětlivých léčiv, běžně užívaných v medicíně (prednisolon, dexamethason, testosteron, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, nimesulid) na endotelových buňkách pupečnickové žíly (HUVEC), a to v laboratorních podmínkách *in vitro*. K tomuto účelu byly použity metody western blotting (WB), ELISA a imunofluorescence.

2 Teoretická část

2.1 Zánět

Zánět je odpovědí organismu na poškození tkáně. Tímto způsobem je imunitní systém schopen rozeznat a odstranit škodlivé a cizí podněty a začít léčebný proces. Čtyři významné příznaky projevu zánětu (*rubor, tumor, calor, dolor*) popsal již v 1. století římský lékař Cornelius Celsus (Medzhitov, 2010). Pátý významný příznak *functio laesa*, tedy zráta funkce byl přidán Rudolphem Virchowem roku 1858 v jeho knize *Cellularpathologie* (Majno, 1975). Zánět rozdělujeme na zánět akutní nebo zánět chronický.

Zánět akutní je počáteční stav zánětu, který je mediován aktivací imunitního systému, tento stav pomáhá tělu vypořádat se s infekcemi, trvá krátkou dobu a obecně je považován za léčebný zánět (Aggarwal et al., 2009). Jestliže však zánět přetrvává delší dobu, spouští se sekundární stádium zánětlivé odpovědi, tedy zánět chronický (Lin, Karin 2007).

Chronický zánět byl spojen s většinou chronických onemocnění, zahrnující rakovinu (tumorigenezi), kardiovaskulární onemocnění, diabetes, obezitu, plicní a neurologické onemocnění (Aggarwal et al., 2006). Vzhledem k tomu suprese chronického zánětu (přesněji prozánětlivých drah, jež zánět způsobují) může poskytnout možnosti prevence či léčby rakoviny a jiných onemocnění spojených s chronickým zánětem (Aggarwal et al., 2009).

Typická zánětlivá odpověď spočívá ve čtyřech komponentech, ty jsou: spouštěče zánětu, senzory, jež je detekují, mediátory zánětu vyvolané senzory a cílová tkáň, která je ovlivněna mediátory zánětu (Medzhitov, 2010).

Zánět, ke kterému dochází v reakci na poškození působícího stimulu, je považován za obecně zdraví prospěšnou událost, která vede k odstranění poškozujícího faktoru z těla, a k obnovení struktury a funkce tkáně. Charakteristickým znakem úspěšné zánětlivé reakce tak není jen vymizení škodlivých podnětů, ale také obnova normální fyziologie.

Vymizení podnětů je zprostředkováno celou řadou signálů, které řídí zánětlivou reakci systematickým způsobem, při němž dochází například ke zvýšení regulace buněčných adhezních molekul a chemokinů, což má za následek nahromadění zánětlivých leukocytů v místě poranění tkáně. Poté, co byl zánětlivý stimul neutralizován, zánět může polevit. Toto zmírnění zánětu však nenastává pasivním způsobem, jak bylo původně chápáno. Naopak, zmírnění zánětlivé reakce je dnes popisováno jako aktivní událost řízená zvyšujícím se počtem rozpustných mediátorů. Mediátory zapojí mechanismy, které vyvrcholí vypnutím zánětu a

navrátí stromální tkáň, která byla hostitelem reakce do jejího fyziologického stavu (Nathan, 2002, Serhan, Savill, 2005).

Lze proto předpokládat, že selhání imunitního systému adekvátně vyřešit v těle stav akutního zánětu, může předcházet autoimunitním onemocněním, chronickému zánětu a nadměrnému poškození tkáně (Manderson et al., 2004).

2.2 Molekulární mechanismus chronického zánětu

Chronická zánětlivá onemocnění, jako je astma, revmatoidní artritida, chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a zánětlivé střevní onemocnění, zahrnují infiltraci a aktivaci mnoha zánětlivých a imunitních buněk, které uvolňují více zánětlivých mediátorů, jež interagují a aktivují strukturální buňky v místě zánětu. Charakter zánětu se zřetelně liší mezi těmito nemocemi, se zapojením mnoha různých buněk a mediátorů (Barnes et al., 1998, Barnes, 2004), ale všechny se vyznačují zvýšenou expresí mnohočetných zánětlivých proteinů, z nichž některé jsou společné pro všechna zánětlivá onemocnění, zatímco jiné jsou specifitější pro konkrétní onemocnění.

Zvýšená exprese většiny těchto zánětlivých proteinů je regulována na úrovni genové transkripce aktivací prozánětlivých transkripčních faktorů, jako je jaderný faktor κ B (NF- κ B) a aktivační protein-1 (AP-1). Tyto prozánětlivé transkripční faktory jsou aktivovány u všech zánětlivých onemocnění a hrají zásadní roli při zesilování a udržování zánětlivého procesu. NF- κ B se tak aktivuje v dýchacích cestách astmatických pacientů a pacientů s CHOPN (Hart et al., 1998; Di Stefano et al., 2002) a je aktivován v kloubech pacientů s revmatoidní artritidou (Muller-Ladner et al., 2002) a cévách pacientů s aterosklerózou (Monaco, Paleolog, 2004).

Pro hlubší pochopení problematiky zánětu je tedy třeba alespoň částečně porozumět problematice mediátorů možného zánětu, jimiž jsou částice přítomné v krevním řečišti, které bychom z chemického hlediska nazvali proteiny. Z hlubšího poznání struktury, funkce a biochemických drah zánětlivých mediátorů v lidském organismu je taktéž možné získat velmi významné informace pro vývoj protizánětlivých léčiv, a to jak klasických antiflogistik, které můžeme rozdělit na látky steroidní (obsahující steroidní strukturu, primárně tedy kortikosteroidy) a látky nesteroidní (NSAIDs), tak i látek, které primárně plní jinou biologicky významnou roli, ale současně vykazují možnou protizánětlivou aktivitu. Mezi tyto látky může patřit například testosteron (Kanda et al., 1996).

2.3 Zánět jako předchůdce rakoviny

Jak bylo výše naznačeno, výzkum za účelem léčby chronického zánětu současně slouží jako výzkum prevence rakoviny, neboť růstu nádoru většinou předchází právě chronický zánět (Aggarwal et al., 2009). Bronchitida, kolitida, cervicitida, gastritida, a hepatitida, například, odrážejí zánět průdušek, tlustého střeva, děložního čípku, žaludku a jater. Zdá se, že většině nádorů, (zejména solidních), předchází zánět daného orgánu. Například u lidí, kteří pravidelně kouří cigaretu, dochází běžně k rozvinu bronchitidy a u 15 až 20 % těchto lidí se objeví rakovina plic (Wingo et al. 1999). Podobně jsou lidé, kteří mají kolitidu, vystaveni vysokému riziku vzniku rakoviny tlustého střeva (Itzkowitz , Yio, 2004). Podobně gastritida, vyvolaná infekcí bakterie *Helicobacter pylori* (Marshall, Warren, 1982), může ve své chronické formě vést až k rakovině žaludku (Peter, Beglinger, 2007).

Bylo prokázáno, že prozánětlivé stimuly (taktéž tkzv. mediátory zánětu) jako TNF α , IL-1, IL-6, cyklooxygenáza-2 a 5-lipoxygenáza, všechny regulované NF- κ B dráhou, jsou exprimovány v průběhu bronchitidy, kolitidy, cervicitidy, gastritidy nebo hepatitidy. Nadměrná exprese cyklooxygenázy-2 byla prokázána například u kolitidy, bronchitidy a gastritidy (Dannenberg et al., 2005). Bylo taktéž prokázáno, že TNF je nadměrně exprimován v oblasti spinocelulárního karcinomu hlavy a krku a zprostředkovává proliferaci nádorových buněk (Jackson-Bernitsas et al., 2007). Podobně byla exprese TNF a její proliferativní role prokázána u lymfomu z plášťových buněk (Shishodia et al., 2005), akutní myeloidní leukémie (Estrov et al., 1993), kožního T-buněčného lymfomu (Giri, Aggarwal, 1998) a glioblastomu (Aggarwal et al., 1996). Následně bylo taktéž prokázáno, že IL-6, jehož exprese je regulována transkripčním faktorem NF- κ B, indukuje proliferaci buněk mnohočetného myelomu aktivací STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) dráhy (Akira, Kishimoto, 1992).

2.4 Mediátory zánětu

Jedná se o látky, jež regulují průběh vzniklé zánětlivé reakce organismu. Patří zde jak enzymy a cytokiny, tak i transkripční faktory. Ve své práci se budu zaměřovat na právě ty mediátory zánětu, jež hrály roli v pozorování vztahu vlivu testovaných protizánětlivých léčiv na dané proteiny (viz experimentální část), a to jsou: cyklooxygenáza-2 (COX-2), inhibitor kappa B alfa (I κ B α), interleukin-6 (IL-6), glukokortikoidní receptor (GR), nukleární faktor kappa B (NF- κ B) a tumor nekrotizující faktor α (TNF α).

2.4.1 NF- κ B

Transkripční faktor NF- κ B byl objeven v roce 1986 jako jaderný faktor, který se váže na zesilovací oblast κ B řetězce imunoglobulinu v B buňkách. Od doby objevu se však ukazuje, že se jedná o všudypřítomný transkripční faktor, který je přítomný ve všech typech buněk. Ve svém klidovém stadiu tento faktor spočívá v cytoplazmě jako heterotrimeru skládajícímu se z p50, p65 a I κ B α . Při aktivaci projde protein I κ B α , který je inhibítoem NF- κ B, fosforylací, ubikvitinací a degradací, p50 a p65 se následně uvolní k translokaci do jádra, navážou se na specifické sekvence DNA přítomné v promotérech různých genů a zahájí transkripci (Aggarwal et al., 2009).

NF- κ B hraje zásadní roli v řadě klíčových fyziologických procesů. Ačkoli je nejvíce studován pro svou ústřední roli ve vývoji, homeostáze a aktivaci imunitního systému, NF- κ B je také důležitý ve svalovém a kosterním systému a je důležitým regulátorem epiteliální homeostázy (Ghosh, Hayden, 2012). Na buněčné úrovni hraje NF- κ B důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, proliferace a buněčné smrti a byl označen za klíčový faktor stárnutí (Hayden, Ghosh, 2012). Tyto fyziologické funkce NF- κ B jsou doprovázeny stejně důležitou rolí u onemocnění, během kterého je často zjištěna dysregulace aktivity NF- κ B. NF- κ B tak hraje kritickou patologickou roli u zánětlivých onemocnění včetně onemocnění autoimunitních a aterosklerózy, stejně jako u rakoviny a neurodegenerace.

Terapeutické zacílení NF- κ B je důležitým cílem současného výzkumu NF- κ B, ale dosavadní úsilí bylo výrazně zkomplikováno významem NF- κ B pro normální tkáňovou homeostázu a imunitu (Gasparini, Feldmann, 2012). Klíč k vyřešení těchto komplikací však může spočívat v pochopení regulačních procesů, které kontrolují funkci NF- κ B, zejména tedy fosforylací.

Bylo zjištěno, že kyselina acetylsalicylová i salicylát sodný tlumí aktivaci NF- κ B (Kopp, Ghosh, 1994). Novější studie dokazují, že k mechanismu inhibice kyselinou acetylsalicylovou i salicylátem sodným dochází prostřednictvím vazby a blokování vazebného místa ATP I κ B kinázy (Yin et al., 1998). Zajímavé je, že exprese genu kódujícího COX-2, která je pravděpodobně zodpovědná za masivní produkci prostaglandinů na místech zánětu, je transkripčně regulována transkripčním faktorem NF- κ B (D'Acquisto et al., 1997).

2.4.2 I κ B α

Transkripční faktory NF- κ B jsou regulovány prostřednictvím interakcí s I κ B, které plní roli inhibičních proteinů v buňce (Beg, Baldwin, 1993; Gilmore, Morin, 1993). S výjimkou zralých B-lymfocytů, kde jsou konstitutivně nukleární, se ve všech ostatních typech buněk drží dimery

NF- κ B v cytoplazmě díky spojení s I κ B, které maskují jejich jadernou lokalizační sekvenci (Beg, Baldwin, 1993; Gilmore, Morin, 1993).

V reakci na rozmanité extracelulární podněty, včetně prozánětlivých cytokinů, virové infekce, oxidantů, esterů forbolů a ultrafialového ozařování, jsou I κ B rychle fosforylovány při dvou serinech ve svých amino-koncových regulačních oblastech. Ve dvou I κ B proteinech identifikovala na místě řízená mutagenese (Brockman et al., 1995; DiDonato et al., 1996; Traenckner et al., 1995) a biochemické mapování (DiDonato et al., 1996) tyto seriny jako S32 a S36 v I κ B α a S19 a S23 v I κ B β .

Tři proteiny I κ B (alfa, beta, epsilon) mají odlišné vlastnosti rozkladu a syntézy, a proto mají odlišnou úlohu při formování dynamiky aktivity NF- κ B (Basak et al., 2012; O'Dea et al., 2009). Na podněty reaguje I κ B α nejen nejrychleji (Beg et al., 1993; Henkel et al., 1993), ale také zprostředkovává silnou negativní zpětnovazebnou smyčku, která může z DNA (Dembinski et al., 2017) odstranit NF- κ B a vyústit v oscilační NF- κ B aktivitu (Hoffmann et al., 2002).

NF- κ B se skládá z heterodimerních a homodimerních komplexů p65 (RelA), p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), RelB a c-Rel proteinů (Blank et al., 1992; Goldberg, 1995) a váže se na místo κ B, což je 10 párových bázeových konsenzuálních sekvencí (Hoffmann et al., 2003). V cytoplazmě se vážou a uchovávají tři inhibiční κ B (I κ B α , I κ B β a I κ B ϵ). Po stimulaci TNF jsou fosforylovány a degradovány, což umožňuje, aby se NF- κ B dostal do jádra, navázal na DNA a aktivoval transkripci (Hoffmann et al., 2002).

Bylo také prokázáno, že aktivace transkripčního faktoru NF- κ B mediátorem TNF α je nutná pro transkripční aktivaci adhezních molekul endotelových buněk (HUVEC) *in vitro* (Collins et al., 1995). Je tedy známo, že NF- κ B hraje důležitou roli v regulaci zánětlivé reakce. Aktivace NF- κ B je přímo spojena s fosforylací a degradací I κ B- α a s transportem proteinu p65 do jádra (Pahl, 1999).

2.4.3 Cyklooxygenáza (COX-2)

Cyklooxygenáza (COX), známá také jako prostaglandin (PG) H syntáza, katalyzuje krok omezující rychlost tvorby zánětlivých PG. Cyklooxygenáza hraje významnou regulační roli v biosyntéze PG. Aktivitu cyklooxygenáz indukují růstové faktory, cytokiny a nádorové stimulatory (Hla, Neilson, 1992)

COX-1 a COX-2 jsou izoenzymy (Fu et al., 1990). Vzhledem k tomu, že izoenzymy jsou geneticky nezávislé bílkoviny, geny u člověka pro tyto dva enzymy se nacházejí na různých chromozomech a vykazují různé vlastnosti (Tazawa et al., 1994). COX-1 je vyjádřen konstitutivně v mnoha tkáních a zprostředkovává „úklidové“ funkce, jako je cytoprotekce

žaludeční sliznice, regulace průtoku krve ledvinami a agregace krevních destiček. Naopak COX-2 není detekován ve většině normálních tkání, ale jeho exprese je rychle indukována podněty, jako jsou prozánětlivé cytokiny (IL-1 β , TNF α), lipopolysacharidy, mitogeny a onkogeny (estery forbolu), růstové faktory (fibroblastový růstový faktor, růstový faktor krevních destiček, epidermální růstový faktor), hormony (luteinizační hormon) a poruchy hemostázy vodních elektrolytů. Indukovatelný izoenzym byl tedy zapleten do patologických procesů, jako jsou záněty a různé druhy rakoviny (Williams, Dubois, 1996; Konturek et al., 2005).

Nedávné studie však ukázaly, že vztah mezi oběma izoformami není tak přímočarý. COX-1 může skutečně přispívat k zánětlivým procesům, zatímco COX-2 je konstitutivně exprimován v několika tkáních a orgánech, jako je mozek (Yamagata et al., 1993), ledviny (Ferreri et al., 1999) a pohlavní orgány (Kniss, 1999).

2.4.4 Prostaglandiny

Prostaglandiny (PG) jsou hormonům podobné bioaktivní látky zprostředkovávající autokrinní a parakrinní signalizaci na krátké vzdálenosti a účastníci se mnoha fyziologických a patologických procesů. Působí prostřednictvím receptorů s vysokou afinitou spřažených s G proteinem (Hata, Breyer 2004). Účastní se imunitních a zánětlivých procesů.

2.4.5 IL-6

IL-6 je rozpustný mediátor zánětu s pleiotropním účinkem na zánět, imunitní odpověď a hematopoézu. V minulosti byly studovány různé funkce IL-6, které dostaly odlišná jména na základě jejich biologické aktivity, bylo však zjištěno, že molekuly s různými názvy zkoumané různými vědeckými skupinami jsou ve skutečnosti identické, což vedlo k jedinému názvu IL-6 (Kishimoto, 1989). Lidský IL-6 se skládá z 212 aminokyselin, včetně 28-aminokyselin dlouhého signálního peptidu, a jeho gen byl mapován na chromozom 7p21. Ačkoli v jádru je protein o hmotnosti cca 20 kDa, díky glykosylaci tvoří hmotnost přirozeného IL-6 21–26 kDa.

Poté, co je IL-6 syntetizován v lokálním místě poškození (lézi) v počátečním stadiu zánětu, přesouvá se krevním řečištěm do jater, po čemž následuje rychlá indukce rozsáhlého spektra proteinů akutní fáze, jako je C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A (SAA), fibrinogen, haptoglobin a α 1-antichymotrypsin (Heinrich et al., 1990). Na druhou stranu však IL-6 snižuje produkci fibronektinu, albuminu a transferinu. Tyto biologické účinky na hepatocyty byly zprvu zkoumány jako účinky patřící k HSF (heat-shock factor). Když vysoké

koncentrace SAA přetrvávají po dlouhou dobu, vede to k vážné komplikaci několika chronických zánětlivých onemocnění prostřednictvím vzniku amyloidní A amyloidózy (Gillmore et al. 2001). Výsledkem je depozice amyloidu fibrilu, která způsobuje postupné zhoršování stavu různých orgánů. IL-6 se rovněž podílí na regulaci sérových hladin železa a zinku prostřednictvím kontroly jejich transportérů. U sérového železa indukuje IL-6 tvorbu hepcidinu, který blokuje působení transportéru železa feroportinu 1 na střeva a tím snižuje hladinu železa v séru (Nemeth et al., 2004). To znamená, že osa IL-6-hepcidin je zodpovědná za hypoferrémii a anémii spojenou s chronickým zánětem. IL-6 také zvyšuje expresi přenašeče zinku ZIP14 na hepatocytech, a tak indukuje hypozinkemii pozorovanou při zánětu (Liuzzi et al., 2005). Když se IL-6 dostane do kostní dřeně, podporuje zrání megakaryocytů, což vede k uvolňování krevních destiček (Ishibashi et al., 1989). Tyto změny hladin proteinů akutní fáze a počtu erytrocytů a krevních destiček se používají pro hodnocení zánětlivé závažnosti při běžných klinických laboratorních vyšetřeních.

V nedávné studii (Kandhaya-Pillai et al., 2022) byly endotelové buňky (HUVEC) vystavené působení samotného IL-6, *in vitro*. Tyto buňky nezaznamenaly žádnou zásadní změnu exprese sledovaných SARS-CoV-2 receptorů, což ukazuje, že IL-6 vyžaduje kombinaci s TNF- α /IFN- γ pro zvýšení exprese SARS-CoV-2 receptorů.

2.4.6 Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní receptor (GR) je transkripční faktor zodpovědný za řízení vývojových a metabolických procesů v reakci na glukokortikoidy (Buckingham, 2006; Yamamoto, 1995). Dále také GR hraje roli při koordinaci velkých stresových reakcí včetně imunitní odpovědi (Sapolsky et al., 2000). Před vázáním ligandu je GR převážně cytoplazmatický a je navázán na heat shock protein 90-p23 chaperon komplex (Segnitz, Gehring, 1997; Picard, 2006), o kterém se předpokládá, že inaktivuje vázací a transkripční regulační funkce GR DNA, a to vše při zachování receptoru schopného pro vazbu ligandů s vysokou afinitou (Picard et al., 1990; Hutchison et al., 1992).

Kortikoidy se snadno rozptylují buněčnými membránami a vážou se na glukokortikoidní receptory v cytoplazmě. Existuje jediný gen kódující lidský GR, ale v současnosti je rozpoznáno několik variant jako výsledek alternativního splicingu transkriptu a alternativní iniciace překladu (Rhen, Cidlowski, 2005).

Stejně jako mnoho jiných regulátorů je i GR fosfoprotein (Dalman et al., 1988; Bodwell et al., 1991). Receptor bez ligandů je fosforylovaný, další fosforylace se objevují ve spojení s vazbou ligandu (Ismaili, Garabedian, 2004).

GR se nachází v cytoplazmě v komplexu s heatshockovými proteiny (Pratt, Toft, 1997) a po navázání ligandu prochází receptor konformačními změnami, odhaluje nukleární lokalizační signály (Kauppi et al., 2003) a posttranslační modifikace na ligandové vazbě. Aktivovaný receptor je hyperfosforylovaný a translokuje se do jádra (Krstic et al., 1997), kde se váže na chromatin nebo vytváří interakce protein-protein za účelem přímé i nepřímé regulace transkripce.

Represe zánětlivých genů pomocí glukokortikoidů je terapeuticky žádoucí; proto bylo vynaloženo značné výzkumné úsilí na určení, jak k ní dochází. Současné uvažování je takové, že odlišné sekvence DNA se vážou na GR, který v reakci na toto zaujímá jinou konformaci, ve které je buď receptor samotný nebo s jinými místně vázanými transkripčními faktory. Nová konformace GR podporuje odlišný multiproteinový komplex s transkripční represivní funkcí (Hudson et al., 2013). Existují také rychlé, negenomické účinky glukokortikoidů prostřednictvím interakcí s intracelulárními signálními drahami (Stahn et al., 2007). Navzdory snahám mnohých zůstávají detaily těchto účinků nejisté, což brání vývoji nových, více specifických léků zaměřených na zánět.

Protein GR se skládá ze tří domén. N-terminálová transaktivační doména zahrnuje aktivační doménu AF-1 potřebnou pro transkripční vylepšení a spojení receptoru s bazálními transkripčními faktory (Kumar, Thompson, 2003). Centrální, vazebná doména DNA, je konzervována mezi jadernými receptory. Skládá se ze dvou oblastí zinkových prstů (zinc finger region), které jsou kritické pro dimerizaci receptoru a cílovou vazbu. C-terminál je místem hormonální vazby a slouží také jako vazebné místo pro bílkoviny tepelného šoku. Tato doména vazby hormonů obsahuje jaderné lokalizační signály a také doménu aktivační funkce závislou na ligandu (AF-2) (Kumar, Thompson, 1999; Coghlan et al., 2003).

2.4.7 TNF α

Jedná se o cytokin (označení pro skupinu menších signálních proteinů, účastnících se významně v imunitní odpovědi) odvozený od makrofágů a T lymfocytů, který je rozpoznán jako významný agonista ve velkém množství zánětlivých a imunologicky mediovaných odpovědí (Larrick, Kunkel, 1988; Tracy, 1988).

Je to endogenní pyrogen, patřící mezi tzv. proteiny akutní fáze (jako protein akutní fáze je označován jakýkoliv protein, jehož koncentrace stoupá o alespoň 25 % během tzv. akutní fáze, tedy během zánětu, po vážném zranění nebo během nádorového bujení). Tento cytokin produkuje zaznamenané změny v srdci (Natanson et al., 1989), plicích (Simpson, Casey, 1989), centrálním nervovém systému (Kimball, 1991), játrech (Shedlofsky, McClain, 1991), střevech

(Tracy et al., 1986), ledvinách (Moritz et al., 1989), a kosterním systému (Mundy, 1992). TNF byl taktéž implikován v patogenezi velkého výběru neinfekčních onemocnění, zahrnující revmatoidní artritidu (Saxne et al., 1988), systémový lupus erythematosus (Maury, Teppo, 1989), alkoholická hepatitida (Bird et al., 1990), billiární cirhóza (Miller, Kaplan, 1992), nekróza střev (Sun, Hsueh, 1988) a roztroušená skleróza (Sharief, Hentges, 1991). Zvýšené hodnoty TNF v oběhu byly nalezeny u pacientů s městnavým srdečním selháním (Levine et al., 1990) a jedná se o marker zvýšené mortality pro pacienty jež přežili kardiopulmonální resuscitaci (Basha et al., 1991). Existuje i domněnka, že zvýšené množství TNF může předpovídat dřívější smrt u starších pacientů (Mooradian et al., 1991).

Při nízké produkci je však TNF zodpovědný za udržení fyziologické homeostázy a reguluje množství obvyklých fyziologických dějů jako je cirkadiánní rytmus tělesné teploty, spánek a apetit (Kunkel et al., 1989).

První látkou inhibující TNF α schválenou FDA byl Etanercept, který byl původně určen k léčbě revmatoidní artritidy. V souvislosti s tímto schválením existuje pět různých anti-TNF látek a pokračují expanze v jejich indikacích a použití u různých onemocnění (Meroni et al., 2015; Komaki et al., 2017). Používají se taktéž jako neznačené látky u různých onemocnění, včetně reakce štetu proti hostiteli, pustulární psoriázy, sarkoidózy a Behcetovy choroby.

2.5 Protizánětlivá léčiva

Historicky měly protizánětlivé léky svůj původ v objevu blahodárných účinků některých rostlin a jejich extrakty byly aplikovány na úlevu od bolesti, horečky a zánětu. Když byly v polovině 19. století objeveny salicyláty jako aktivní složky vrby, umožnilo to syntetizovat tyto sloučeniny a z nich byla vyvinuta kyselina acetylsalicylová. Stejně tak chemický pokrok 19. - 20. století vedl k vývoji nesteroidních protizánětlivých léků (NSAID), z nichž většinu zpočátku tvořily organické kyseliny, ale později byly objeveny i nekyselá sloučeniny (Rainsford, 2007).

NSAID byly tradičně klasifikovány na základě svých chemických vlastností, přičemž většina populárních NSAID je kategorizována jako hlavní deriváty kyseliny salicylové, kyseliny octové, kyseliny enolové, kyseliny anthranilové nebo kyseliny propionové. S pokrokem vědeckých poznatků však byla klasifikace také posunuta na základě jejich selektivity k potlačení enzymů cyklooxygenázy/prostaglandin-endoperoxidsyntázy (PGHS), které jsou hlavním cílem těchto léků. Kromě toho byl také vypracován klasifikační systém pro kategorizaci NSAID na základě jejich poločasu rozpadu. Navzdory rozmanitosti mezi třídami jsou si nicméně jejich funkce poměrně podobné. NSAID se většinou používají k léčbě pacientů

trpících bolestmi a zánětlivými stavy, jako jsou chronické bolesti, osteoartróza, revmatoidní artritida, pooperační chirurgické stavy, menstruační křeče, a dokonce se ve velké míře používají jako analgetika a antipyretika (Gupta, Bah, 2016; Budoff, 1979).

2.5.1 Kortikosteroidy

Kortikosteroidy (známé taky jako glukokortikosteroidy nebo glukokortikoidy) patří k nejpoužívanějším lékům na světě a jsou účinné u mnoha zánětlivých a imunitních onemocnění. Nejčastější použití kortikosteroidů je při léčbě astmatu, kde se inhalované kortikosteroidy staly terapií první volby a zdaleka nejúčinnějším protizánětlivým prostředkem léčby (Barnes, 2006).

V posledních letech došlo k významnému pokroku v pochopení molekulárních mechanismů, kterými kortikosteroidy tak účinně potlačují zánět při astmatu i jiných zánětlivých onemocněních, a to na základě nedávného vývoje chápání základních mechanismů genové transkripce a buněčné signalizace při zánětech (Barnes, Adcock, 2003; Rhen, Cidlowski, 2005). Toto nové chápání těchto molekulárních mechanismů také pomáhá vysvětlit, jak mohou kortikosteroidy vypnout množství zánětlivých signálních cest, a stále zůstat bezpečným léčivem. Také to poskytuje vhled do situací, kdy kortikosteroidy nefungují u pacientů s určitým zánětlivým onemocněním, jako je chronická obstrukční plicní nemoc a cystická fibróza (Barnes et al., 2004).

Mezi kortikosteroidy se řadí i některé z léčiv užitých v praktické části mé bakalářské práce. Jedná se o dexamethason a syntetický kortikosteroid prednisolon.

Během zánětu sekretují aktivované lymfocyty nebo makrofágy zánětlivé cytokiny, jako jsou TNF α nebo IL-1 β . Tyto cytokiny následně nejen aktivují složky zánětlivého systému, ale také indukují expresi a uvolňování hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH). CRH následně zvyšuje produkci adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který stimuluje buňky kůry nadledvin k syntéze a vylučování glukokortikoidů. Glukokortikoidy zase mají protizánětlivé účinky na mnoho typů buněk včetně T buněk, makrofágů, eosinofilů, neutrofilů, žírných buněk, endotelových a epitelových buněk, čímž vytvářejí klasickou endokrinní zpětnovazební smyčku. Glukokortikoidy dosahují těchto účinků především přerušením prozánětlivých signálních drah zprostředkovaných cytokiny a také indukci apoptózy v určitých buňkách imunitního systému.

Glukokortikoidy se taktéž díky své lipofilní povaze snadno pasivním procesem difundují plazmatickou membránou a vážou se na intracelulární GR α , která se v cytoplazmě zřejmě izoluje jako neaktivní komplex, skládající se z bílkovin tepelného šoku 90 (hsp90), hsp70,

hsp56, hsp40, bílkovin s nízkou molekulovou hmotností (p23) a několika imunofilinů (Dittmar et al., 1997, 1998). Po navázání na ligand (glukokortikoid) se GR α stává aktivovaným transkripčním faktorem, který se disociuje od proteinů multimerního komplexu, zejména hsp90, čímž umožňuje rychlou translokaci do jádra. Zde komplex ligand-receptor moduluje (stimuluje nebo potlačuje) transkripční reakce zánětlivých genů buď přímo vazbou na DNA, nebo protein-proteinovými interakcemi, o nichž se do značné míry předpokládá, že odrážejí interakce s jinými transkripčními faktory, které regulují prozánětlivé geny.

Kortikosteroidy jsou taktéž známé svými nežádoucími účinky, které se mohou lišit mezi krátkodobým užíváním kortikosteroidů a dlouhodobou léčbou. Mezi nežádoucí účinky krátkodobého užívání těchto látek patří: hypokalémie, myopatie, glukózová intolerance, pankreatitida, hypertenze a ovlivnění psychiky pacienta. Mezi nežádoucí účinky dlouhodobého užívání těchto látek patří: osteoporóza, hyperlipidémie, potlačení růstu a mírné vrozené malformace u dětí matek, jež užívaly tyto látky (Buchman, 2001).

Studie (Logie et al., 2010) dospěla k závěru, že glukokortikoidy přímo interagují s glukokortikoidovými receptory na cévních endotelových buňkách (HUVEC) *in vitro* za účelem potlačení tvorby tubulů.

2.5.2 NSAID

Nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID) jsou léky, které se široce používají k úlevě od bolesti, snížení zánětu a snížení vysoké teploty. Často se používají k úlevě od příznaků bolesti hlavy, bolestivé menstruace, výronů, nachlazení a chřipky, koronaviru (COVID-19) a onemocnění jako artritida, která může způsobit dlouhodobé bolesti.

Popularita NSAID trvá už od izolace salicylátu z vrbové kůry kolem roku 1830, následované objevem aspirinu Felixem Hoffmanem v roce 1897 (Montinari et al., 2019). V dnešní době patří NSAID mezi nejpobulárnější volně prodejné léky po celém světě, tvořící 5 % všech předepsaných léků (Tsutsumi et al., 2004).

NSAID byly tradičně klasifikovány na základě svých chemických vlastností, přičemž většina populárních NSAID je kategorizována jako deriváty kyseliny salicylové, kyseliny octové, kyseliny enolové, kyseliny anthranilové nebo kyseliny propionové. S pokrokem vědeckých poznatků však byla klasifikace také posunuta na základě jejich selektivity k potlačení enzymů cyklooxygenázy / prostaglandin-endoperoxidsyntázy (PGHS), které jsou hlavním cílem těchto léků. Kromě toho byl také vypracován klasifikační systém pro kategorizaci NSAID na základě jejich poločasu rozpadu. Navzdory rozmanitosti mezi třídami jsou si nicméně jejich funkce poměrně podobné. NSAID se většinou používají k léčbě pacientů,

kteří trpí bolestmi a zánětlivými stavy, jako jsou chronické bolesti, osteoartróza, revmatoidní artritida, pooperační chirurgické stavy, menstruační křeče, a taktéž se ve velké míře používají jako analgetika a antipyretika (Gupta, Bah, 2016; Budoff, 1979).

Nadřazenost typických NSAID (se silným protizánětlivým účinkem) nad acetaminofenem (atypickým NSAID postrádajícím jakýkoli protizánětlivý účinek, ale se slabým, nespecifickým cyklooxygenázou/ PGHS inhibičním a antipyretickým účinkem) (Furst, Prakash, 2012; Grosser, Fitzgerald, 2018) a dalšími antipyretickými analgetiky, jako jsou opioidy, byla klinicky prokázána. Slepé, náhodné kontrolní studie prokázaly účinnost NSAID oproti acetaminofenu (Ong et al., 2007). Problém s užíváním analgetik na bázi opioidů tkví v otázce bezpečnosti. Množství problémů se závislostí na opioidech ve skutečnosti začíná terapeutickým užíváním léků proti bolesti na bázi opioidů. Proto je léčba opioidy mnohem nebezpečnější než léčba NSAID vzhledem k návykové povaze těchto léčiv (Dhalla, 2012).

2.5.3 Prednisolon

Prednisolon je antiflogistikum, jež tlumí imunitní reakci organismu. Jedná se o syntetický glukokortikoid, který je široce užíván k řízení množství klinických stavů, mezi které patří kongenitální adrenální hyperplazie, těžké astma a určité hematologické, revmatické, gastrointestinální a život ohrožující nemoci (Pickup, 1979).

Byla provedena studie (Bratt, Heimbürger, 1999) za účelem zjištění, zda glukokortikoid prednisolon může snižovat adhezi neutrofilů i poranění lidských endotelových buněk zprostředkované neutrofily, když byly polymorfonukleární neutrofilní granulocyty stimulovány různými agonisty. V rámci studie bylo prokázáno, že prednisolon v závislosti na dávce snižuje N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalaninem indukovanou adhezi polymorfonukleárních neutrofilů na HUVEC. Prednisolon navíc inhiboval endotelové poranění navozené N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalaninem a fyziologicky se vyskytujícím produktem lipoxygenázy kyseliny arachidonové, lipoxinem A₄, svými účinky na efektorovou buňku, tj. neutrofil, ale také účinky regulace transkripce vazbou na glukokortikoidní receptor v cílové buňce HUVEC (Bratt, Heimbürger, 1999).

2.5.4 Dexamethason

Dexamethason je potentní glukokortikoid, s mizivou mineralokortikoidní aktivitou (nezasahuje tedy negativně do metabolismu minerálů v organismu) (Brinks et al., 2018). Dexamethason má

široké využití v oblasti medicíny, jako léčivo byl využit při léčbě akutní exacerbace roztroušené sklerózy, alergií, mozkového otoku, zánětu i šoku (Johnson et al., 2018).

Jeho efekt na organismus spočívá v supresi migrace neutrofilů, snížení proliferace kolonií lymfocytů, snížení prostupnosti membrán kapilár a zvýšení stability membrán lyzozomů, inhibici některých cytokinů (IL-1, IL-12, IL-18, TNF) a zvýšení množství surfaktantu v plicích, jakožto i celkové zlepšení plicní aktivity (Johnson et al., 2018). Látka je metabolizována v játrech a vylučována převážně močí (Johnson et al., 2018).

Dexamethason taktéž působí protizánětlivě zeslabením kostimulační dráhy receptoru CD28, čímž silně potlačuje proliferaci a diferenciaci T buněk (Giles et al., 2018).

V nedávné studii (Langendorf et al., 2021) zkoumající efekt tohoto léčiva na endotelové buňky bylo zjištěno, že dexamethason v buněčné kultuře HUVEC *in vitro* způsobuje represi angiogenních genů a proteinů, a v důsledku toho v těchto buňkách potlačuje angiogenezi.

2.5.5 Testosteron a androgenový receptor

Testosteron (T) je steroidní hormon ze skupiny androgenů. Řadí se mezi anabolické steroidy a je to mužský pohlavní hormon (androgen). Androgeny byly prokázány jako supresory produkce IL-6 monocyty a stromálními buňkami (odvozenými od kostní dřene) (Kanda et al., 1996). K tomu byly testosteron i dihydrotestosteron prokázány jako inhibitory genové exprese IL-6 (Bellido et al., 1995).

Androgenový receptor (AR) je ligandem zprostředkovaný transkripční faktor, který patří do skupiny jaderných receptorů (Zilliacus et al., 1995), a jež se aktivuje navázáním jakýchkoli androgenních hormonů, včetně testosteronu a dihydrotestosteronu (Roy et al., 1999). Androgeny se v cytoplasmě buňky vážou na androgenový receptor. Aktivace AR je spojena jak se sexuálním vývojem u mužů, tak i s lidskou karcinogenezí (Chen et al., 2004). Zajímavostí je, že krom androgenů taktéž cytokin IL-6 ovlivňuje signální dráhu AR. Při absenci androgenu může být totiž AR aktivován alternativními cestami, mezi které patří mimo jiné i zmíněný interleukin-6 (Chen et al., 2000). Taktéž je zkoumán vztah možné souvislosti mezi signalizací androgenního receptoru a karcinogenezí ve slinivce břišní (Okitsu et al., 2010). U pacientů s karcinomem slinivky břišní byly taktéž pozorovány vyšší hladiny cytokinu IL-6.

Nízké hodnoty testosteronu u mužů jsou významně asociovány s vysokým množstvím zánětlivých markerů v různých klinických podmínkách jako je např. obezita (Tremellen et al., 2018). Rozvoj a postup chronických onemocnění koreluje s nízkou hladinou T a zánětlivými biomarkery, ale jejich specifické mechanismy zůstávají nedokonale pochopeny. T deficit (známý také jako hypogonadismus) byl u staších mužů spojován s metabolickým syndromem

(Bianchi, 2015), neurodegeneraci (Kurth et al., 2014), zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění a mortality ze všech příčin (Araujo et al., 2011) nezávisle na dalších četných rizikových faktorech (Haring et al., 2010). Podobné výsledky pozorování byly hlášeny i u mladých mužů (Sinclair et al., 2016). I mimo jakékoliv souběžné projevy kardiovaskulárního onemocnění nebo jiných systémových onemocnění koreluje nízká hladina T se zvýšenou hladinou C-reaktivního proteinu (CRP) (Kaptoge et al., 2010), makrofágového zánětlivého proteinu 1- α , makrofágového zánětlivého proteinu 1- β a TN- α u mladých i starších mužů (Bobjer et al., 2013). CRP je citlivým ukazatelem zánětu produkovaného játry (Pepys, Hirschfield, 2003) a koreluje s ischemickou chorobou srdeční a předčasným úmrtím z jiných příčin (Kaptoge et al., 2010).

Ve velkém množství studií byla zjištěna negativní korelace mezi nízkými hladinami T a CRP, zatímco korelaci mezi T a IL-6 (Tremellen et al., 2018; Maggio et al., 2006) nebo TNF α (Bobjer et al., 2013; Hall et al., 2002) zkoumalo jen několik studií. Během studie skupiny Haring a kol., 2012, byla zjištěna negativní korelace mezi plazmatickou hladinou pohlavních steroidů u mužů a hladinou markerů zánětu (Haring et al., 2012).

Taktéž bylo potvrzeno (Xie et al., 2017), že fyziologická koncentrace testosteronu u endotelových buněk HUVEC zmírňuje apoptózu, oxidační stres a záněty navozené produkty pokročilé glykace.

2.5.6 Kyselina acetylsalicylová

Dalším srovnávaným léčivem byla kyselina acetylsalicylová (mezi jejíž komerční názvy patří *Aspirin*, *Acylpyrin*, *Anopyrin* aj.). Tato aromatická, karboxylová kyselina je známým antiflogistikem, analgetikem a antipyretikem. Snižování bolesti, zánětu a horečky pomocí salicylátů obsahujících rostlinných extraktů je možné sledovat skrz lidskou historii (Dinarello, 2010).

Kyselina acetylsalicylová je také nejčastěji předepisovaným lékem v kategorii zabránění agregace krevních destiček (Berg et al., 2012). Kyselina působí ireverzibilní acetylací serinového zbytku cyklooxygenázy 1 (COX-1), čímž inhibuje uvolňování tromboxanu A (TXA $_2$), silného mediátoru agregace krevních destiček. Tento klinicky významný účinek dal kyselině acetylsalicylové primární roli v prevenci kardiovaskulárních chorob (Berg et al., 2012).

Nicméně prospěšné účinky kyseliny acetylsalicylové nejsou omezené pouze na inhibici krevních destiček, mezi její další užití patří mechanismy jako je inhibice vazokonstrikce (Mehta, 2009), zmírnění zánětu a formace prostaglandinu F $_{2\alpha}$ (Helmersson et al., 2005).

Příznivé účinky kyseliny acetylsalicylové na snížení oxidativního stresu mohou být také využity na léčbu vazokonstrikce a zánětu (Kvietys, Granger, 2012), zmíněné množství možností užití tohoto léku vyvolaly stále rostoucí zájem o tuto látku (Bhatt, 2008).

Bylo prokázáno (Park et al., 2007), že kyselina salicylová, snižuje přilnavost a invazivitu *S. aureus* k lidským vaskulárním endotelovým buňkám *in vitro* (HUVEC) a snižuje produkci IL-6 endotelovými buňkami.

2.5.7 Ibuprofen

Ibuprofen je široce užíván k léčbě poruch pohybového ústrojí a jiných poruch, způsobující mírnou až střední bolest (Pohjolainen et al., 2000). Působí symptomaticky rušením bolesti, snižováním zánětu, a to jak v kloubech (Goldlust, Rich, 1981), tak i v měkké tkáni a snižováním horečky. Klinicky může tato aktivita vést ke zvýšení funkční činnosti s následným zlepšením v kvalitě života pacientů s chronickým revmatickým onemocněním (Busson, 1986).

Ibuprofen se také ukázal v epidemiologických studiích jako bezpečný a dobře tolerovaný (Henry, 1996). Mimo jiné, byl ibuprofen prokázán jako účinný při úlevě od symptomů během akutní bolesti dolní části zad (Hosie, 1994).

Během studie protizánětlivého efektu ibuprofenu na endotelové buňky *in vitro* byly využity buňky HUVEC. Ukázalo se, že dvoutýdenní perorální podávání 600 mg ibuprofenu denně snižuje adhezi monocytů na klidové a TNF α stimulované endotelové buňky. Navíc ibuprofen inhibuje metabolickou aktivaci monocytů měřenou jako intracelulární produkce O $_2$ a H $_2$ O $_2$ (Zapolska-Downar et al., 2000).

Hlavním mechanismem účinku ibuprofenu je neselektivní, reverzibilní inhibice enzymů cyklooxygenázy COX-1 a COX-2 (Davies, 1998).

2.5.8 Nimesulid

Nimesulid je nesteroidní protizánětlivé léčivo (NSAID), vykazující protizánětlivé, analgetické a antipyretické vlastnosti s preferenční inhibicí cyclooxygenasy (COX) – 2. typu (Davis, 1994). Společně s jinými farmakologickými počiny (Davis, 1994) tato selektivita vůči COX-2 má za výsledek ekvivalentní účinnost proti bolesti a zánětu jako ostatní NSAID, ale s vyšší bezpečností, specificky na gastrointestinální úrovni (Vago, 1995). Doporučená denní dávka Nimesulidu je 100-300 mg rozdělena do dvou dávek (Pohjolainen et al., 2000).

Polymorfonukleární leukocyty (PMN) reagují na materiály bakteriálního nebo virového původu respiračním výbojem, který vytváří toxické metabolity kyslíku (Roos, 1991). V těle tak

mohou leukocyty poškodit okolní tkáň tím, že uvolňují kyslíkové radikály, které unikají z fagolyzomu. Nadměrná nebo nevhodná odpověď leukocytů proto může vyústit v bolestivý zánět, bronchiální hyperreaktivitu a poškození tkáň (Weiss, 1989).

Inhibice respiračního výboje leukocytů a snížení uvolňování zánětlivých mediátorů může být dosaženo podáním látek, které zvyšují cyklický adenosin monofosfát (cAMP) (Nielson et al., 1990). Specifického účinku na hladinu leukocytárního cAMP lze navíc dosáhnout inhibicí hlavního enzymu zodpovědného za jeho degradaci v těchto bílých krvinkách: fosfodiesterázy (PDE) typu IV (Nielson et al., 1990; Schudt et al., 1991).

Nimesulid v téměř terapeutických koncentracích potlačuje produkci superoxidových aniontů (Bevilacqua et al., 1988; Capsoni et al., 1987) a vykazuje inhibiční účinek na PDE typ IV (Bevilacqua et al., 1991).

2.6 Endotelové buňky

Téměř všechny tkáň jsou závislé na krevním zásobení a krevní zásobení závisí na endotelových buňkách, které tvoří výstelky krevních cév. Endotelové buňky mají schopnost upravit svůj počet a uspořádání tak, aby vyhovovaly místním požadavkům. Vytvářejí adaptabilní systém podpory života, rozšiřující se migrací buněk téměř do všech oblastí těla. Nebýt endotelových buněk rozšiřujících a remodelujících síť krevních cév, růst a náprava tkání by byla nemožná. Rakovinná tkáň je závislá na krevním zásobení stejně jako normální tkáň, což vedlo k nárůstu zájmu o biologii endotelových buněk. Vzhledem k možnosti, že blokováním tvorby nových cév pomocí léků, které působí na endotelové buňky, by mohlo být možné blokovat růst nádorů (Alberts, Johnson, 2002).

Stěny krevních cév tvoří selektivní bariéru pro transport molekul mezi krví a tkáněmi. Endotelová vrstva představuje velkou plochu pro tuto výměnu materiálů mezi krví a tkáněmi (Baldwin, Thurston, 2001). Endotel je tedy spojitá vrstva tvořená buňkami navzájem propojenými různými typy adhezivních struktur nebo mezibuněčných spojů. Jedná se o složité struktury tvořené transmembránovými adhezivními molekulami napojenými na síť cytoplazmatických/cytoskeletálních proteinů. Na základě morfologické a funkční charakterizace byly v endotelových buňkách popsány tři typy spojení (Dejana et al., 1995; Schnittler, 1998): těsná spojení, adhezivní spojení a skulinové spojení.

Těsná spojení uzavírají buněčnou vrstvu endotelu a jsou tvořeny těsně protilehlými sousedními plazmatickými membránami, které se zdají být částečně spojené. Hlavní transmembránovou složkou těsných spojení jsou okcludiny, které jsou spojeny s několika cytosolickými proteiny, ale podrobná struktura tohoto komplexu není dosud určena (Bazzoni

et al., 1999; Vestweber, 2000). Adhezní spojení jsou tvořena kadheriny. VE-kadherin je přítomen na povrchu endotelových buněk. Kadheriny jsou buněčné adhezní molekuly, které jsou se svým cytoplazmickým ocasem ukotveny k síti intracelulárních cytoplazmatických proteinů, kateninů, které jsou napojeny na systém aktinových mikrofilamentů (Dejana, 1996).

2.6.1 Reakce endotelu na zánět a rolování

Endotel se také účastní rozvoje a regulace zánětu. Leukocyty během imunitní odpovědi migrují z krve do tkání. V místě zánětu migrují přes aktivovaný endotel leukocyty vrozeného imunitního systému jako první. Zatímco neaktivované lymfocyty (dosud se neseťkaly s příslušným antigenem) migrují do drenážních periferních mízních uzlin prostřednictvím specializovaných endotelových buněk složených z buněk s velkým množstvím endotelových venul. V periferních lymfatických uzlinách jsou aktivovány antigenově specifické lymfocyty. Tyto lymfocyty se dostávají do míst zánětu, kde migrují přes aktivované endotel exprimující adhezní molekuly.

Adhezní molekuly regulují adhezi leukocytů a migraci leukocytů do tkáně. Během tohoto procesu se endotelová buňka aktivně podílí na regulaci migrace leukocytů. Po interakci mezi leukocyty a endotelovými buňkami, podporuje endotelová buňka migraci leukocytů prostřednictvím signálů „outside-in“ z adhezních molekul nebo odstraňuje leukocyty, které jsou v počátečním stádiu apoptózy. Kromě toho křížové propojení některých adhezních molekul endotelových buněk stimuluje signály, které jsou v souladu s potenciálem zvýšeného připojení k bazálnímu povrchu endotelových buněk nebo indukci exprese genů.

Infiltrace tkání cirkulujícími leukocyty je třífázový proces zahrnující rolování endotelu, připojení k endotelu, následované transmigrací přes endoteliální buňky lemující stěny krevních cév. Migrace leukocytů z krve je iniciována leukocytem valícím se na lumenální straně endotelu, zprostředkovanou selektiny a adresiny nízkoafinitních receptorů (McEver, 2002; Vestweber, 2003). Zdravé endotelové buňky jsou také místem deaktivace mnohých zánětlivých mediátorů. Endotel tedy hraje důležitou roli při imunitní odpovědi organismu na cizorodé látky zprostředkováním regulace migrace leukocytů.

2.6.2 Endotelové buňky lidské pupečnickové žíly (HUVEC)

Endotelové buňky lidské pupečnickové žíly (angl. human umbilical vein endothelial cells - HUVEC) jsou endotelové buňky z endotelu žíly pupečníku. Jsou široce užívány jako laboratorní model pro studium funkce, regulace a patologie endotelových buněk *in vitro* (Park

et al., 2006). I v této bakalářské práci bylo užito těchto buněk ke studiu vlivu různých protizánětlivých léčiv na endotel a následné srovnání.

Pupečník je jedním z nejvýznamnějších zdrojů cévních endotelových buněk. Dostupnost těchto buněk hrála významnou roli v oblasti cévní biologie. Výsledkem perfuze lidské pupečníkové žíly s kolagenásou je čistá vrstva endotelových buněk, které tuto cévu vystylají (Gimbrone et al., 1976). Počáteční pasáže těchto buněk, pěstovaných v přítomnosti heparinu a hypofyzárního extraktu, si zachovávají téměř všechny funkce nativních, vaskulárních, endotelových buněk, zahrnující expresi markerů pro endotelové buňky specifické, jaké jsou například tumor nekrotizující faktor (TNF) – α , cytokiny, Willebrandův faktor, angiotensin 2 a endotelový růstový faktor (Goldberger et al., 1994; Muscella et al., 1997).

HUVEC poskytují významný *in vitro* model, pro průlomové objevy v molekulární medicíně. Výzkum na těchto buňkách dopomohl získat zásadní poznatky ohledně buněčných a molekulárních dějů v patofyziologii aterosklerózy a také mechanismů pro kontrolu angiogeneze nebo neovaskularizace jako odpověď na hypoxii a zánět v nádorech, ischemické tkáni a během embryogeneze (Burns et al., 2005; Zhang et al., 2003).

Výsledky studie (Chen et al., 2020) ukázaly, že exprese NF- κ B a aktivačního proteinu-1 byla v buňkách HUVEC výrazně zvýšena indukci cytokinem TNF α v porovnání s kontrolní skupinou. Syntetický kortikosteroid prednisolon byl i dříve užíván k inhibici sekrece mediátorů zánětu v endotelových buňkách HUVEC indukovaných cytokinem TNF α (Heimbürger et al., 2000), čímž inhibuje cytokinem navozené adhezivní a cytotoxické interakce mezi endotelovými buňkami a neutrofily *in vitro*. Ve studii (Yamamoto et al., 2004) byl taktéž využit kortikosteroid dexamethason na endotelové buňky HUVEC ovlivněné cytokinem TNF α , za účelem určit účinky kortikosteroidů na vaskulární endotelové buňky *in vitro*, které se nacházejí v podmínkách uměle indukovaného stavu zánětu. Vliv androgenu testosteron na endotelové buňky HUVEC *in vitro*, ovlivněné cytokinem TNF α byl taktéž stanovován ve studii Zhang a kol., 2002. Výsledkem této studie bylo zjištění, že testosteron může zvyšovat expresi E-selektinu a vaskulární buněčné adhezivní molekuly-1 (VCAM-1) u endotelových buněk ovlivněných TNF α . Tyto skutečnosti by mohly naznačovat mechanismus, kterým může tento hormon nepřímo posilovat imunitní reakce v buňce (Zhang et al., 2002). Taktéž při zkoumání vlivu kyseliny acetylsalicylové na endotelové buňky HUVEC *in vitro*, ovlivněné cytokinem TNF α , bylo zjištěno, že kyselina acetylsalicylová inhibuje v těchto buňkách expresi mediátorů zánětu, specificky pak enzymu COX-2 (Jiang et al., 2009). Léčivý vliv sločeniny ibuprofen na

endotelové buňky HUVEC *in vitro*, ovlivněné cytokinem TNF α je opačný, než zmíněný vliv hormonu testosteron. Ibuprofen se totiž ukázal jako potentní inhibitor vaskulární buněčná adhezní molekuly-1 (VCAM-1) u endotelových buněk ovlivněných TNF α , avšak nebyl zjištěn žádný vliv ibuprofenu na expresi E-selektinu (Kapiotis et al., 1996). Vliv protizánětlivé sloučeniny nimesulid na endotelové buňky HUVEC *in vitro* ovlivněné cytokinem TNF α byl zkoumán. Nimesulid se ukázal jako účinné léčivo pro inhibici transmigrace a přilnavosti neutrofilů na endotelové buňky (Dapino et al., 1994).

3. Experimentální část

3.1 Materiály

3.1.1 Přístrojové vybavení

Aparatura pro vertikální elektroforézu	Bio-Rad (USA)
Aparatura pro western blotting	Bio-Rad (USA)
Centrifuga	Thermo Fischer (USA)
CO ₂ inkubátor MCO-17AIC	Sanyo (Japonsko)
Chemiluminiscenční kamera LAS4000	Fujifilm (Japonsko)
Kývačka	Biosan (Lotyšsko)
Magnetická míchačka VELP	Scientifica (Itálie)
Termoblok	Thermo Fischer (USA)
Ultrazvukový homogenizátor	Bandelin (Německo)
UV-VIS spektrofotometr UV-1800	Shimadzu (Japonsko)
Vakuová pumpa Vacusafe	Integra Biosciences (Švýcarsko)
Vodní lázeň	GFL (Německo)
Vortex	Heidolph Instruments (Německo)
Zdroj napětí PowerPac Basic	Bio-Rad (USA)
ELISA plate reader Infinite M200 Pro	Tecan (Švýcarsko)
inverzní fluorescenční mikroskop	Olympus (Japonsko)
3.1.2 Použité chemikálie	
Akrylamid	Sigma-Aldrich (USA)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (USA)
Bis akrylamid	Sigma-Aldrich (USA)
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich (USA)
Butanol	Lach-ner (ČR)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (USA)

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (USA)
Dodecylsírán sodný (SDS)	Lach-ner (ČR)
Ethanol 96 %	Penta (ČR)
Fluorid sodný (NaF)	Sigma-Aldrich (USA)
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (USA)
Chemiluminiscenční činidlo luminol-peroxid (1:1)	Thermo Scientific (USA)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (USA)
Ponceau S	Serva (Německo)
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific (USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (USA)
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)	MP Biomedicals (USA)
Tween 20	MP Biomedicals (USA)
Fluorsave reagent	Merck (Německo)
Prednisolon	Sigma-Aldrich (USA)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (USA)
Testosteron	Sigma-Aldrich (USA)
Kyselina acetylsalicylová	Sigma-Aldrich (USA)
Ibuprofen	Cayman Chemical (USA)
Nimesulid	Sigma-Aldrich (USA)

3.1.3 Použité roztoky

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4

RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4); těsně před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin, 2 mM NaF

Činidlo Bradford: 0,01 % Coomassie brilliant blue; 95% ethanol; 85% kyselina *o*-fosforečná

AA+Bis: 30% Akrylamid (AA) + 0,8% Bisakrylamidu (Bis AA): 58,4 g AA + 1,6 N'N Bis AA/200ml

1 M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/ 400 ml pH 8,8

1 M TRIS/ HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/ 200 ml pH 6,8

10 % SDS: 5 g SDS / 50 ml H₂O

10 % APS: 0,1 g / 1 ml H₂O

Elektroforetický pufr: 37,8 g TRIS, 180 g Glycin, 12,5 g SDS / 2,5 l H₂O

5x SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS pH 6,8; 10 % SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř; 5% 2-Merkaptoethanol

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS pH 6,8

TBS s 0,1 % Tweenem 20: 500 ml TBS + 500 ml 0,1 % Tween 20

Blokovací roztok a: 5 % BSA v TBS s Tweenem 20: 2,5 g BSA / 50 ml TBS s Tweenem 20

Blokovací roztok b: 5 % mléko v TBS s Tweenem 20: 2,5 g sušené mléko / 50 ml TBS s Tweenem 20

Blotovací pufr: 30,3 g TRIS, 144 g Glycin/ 1 litr H₂O

Ponceau S: 0,2 % v 1 % kyselině octové

Promývací pufr: 0,05 % Tween 20 v PBS

Blokovací pufr: 1 % BSA v PBS

Diluent: 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA v PBS

ABTS substrát: ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), (2mg/ml) + citrátový pufr, 5,5ml + 30 % H₂O₂, 5 µl

Permeabilizační rotok: 0,2 % Triton v PBS

3.1.4 Použité protilátky

Primární protilátky

Tabulka 1 – přehled primárních protilátek

protilátka	klon	zdroj	ředění	výrobce
COX-2	D5H5	králík	1:500	Cell Signaling
IκBα	L35A5	myš	1:500	Cell Signaling

pI κ B α	14D4	králík	1:500	Cell Signaling
IL-6	D5W4V	králík	1:500	Cell Signaling
pNF- κ B	93H1	králík	1:500	Cell Signaling
pGR	D9D3V	králík	1:100	Cell Signaling
GR	NR3C1	myš	1:100	Santa Cruz Biotechnologies
β -aktin	C4	myš	1:50	Santa Cruz Biotechnologies
α -tubulin	DM1A	myš	1:100	Sigma Aldrich
pIKK α/β	16A6	králík	1:500	Cell Signaling
IKK α	3G12	myš	1:500	Cell Signaling
TNFR1	H-5	myš	1:250	Santa Cruz Biotechnologies
NF- κ B p65	D14E12	myš	1:500	Cell Signaling

Sekundární protilátky

RAM/Px (králíčí proti-myší, ředění 1:1000), Sigma-Aldrich

SwAR/Px (prasečí proti-králíčí, ředění 1:1000), Cell Signaling

RAM Alexa fluor 488 (králíčí proti-myší, ředění 1:500), Thermo Fischer

3.1.5 Použité buňky

HUVEC – lidské endotelové buňky z pupečnickové žíly

HeLa – lidské epitelové buňky odvozené z karcinomu děložního hrdla

3.2 Metody

3.2.1 Ovlivnění buněk a sklizení

Za účelem přípravy vhodných vzorků pro následné experimenty, byly buňky během svého růstu ovlivněny příslušnými látkami a sklizeny. Byla taktéž provedena variace ve způsobu ovlivnění buněčné linie (rozdíl v čase ovlivnění cytokinem TNF α – 24 h / 30 min). První varianta ovlivnění a sklizení buněčné linie probíhala následovně:

Buňky HUVEC byly kultivovány v Petriho miskách (100 mm, 8 misek celkem) při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého a 100% vlhkost, po dobu 24 hodin. Po ukončení inkubace byly k buňkám přidány látky (sledovaná léčiva) v dané koncentraci (všechny o uniformní koncentraci = 10 μ M, pouze koncentrace Dexamethasonu = 1 μ M) po dobu 30 minut. Následně bylo k buňkám (s výjimkou negativních kontrolních buněk Ko – TNF) přidáno TNF α (c = 10 ng/ml) indukující v buňkách zánět a aktivující NF-kB. Do kontrolních vzorků (pozitivní, negativní), bylo taktéž přidáno DMSO (totožná koncentrace jako přidané látky). Po další 24hodinové kultivaci bylo odebráno kultivační médium pro danou analyzovanou metodu (ELISA) a buňky sklizeny pro použití během metody western blotting.

Druhá varianta ovlivnění buněk měla téměř totožný postup, lišila se pouze v čase ovlivnění buněk TNF α (c = 10 ng/ml), které bylo v tomto případě 30 minut. Tyto buňky byly použity jak pro metodu western blotting tak i pro metodu imunofluorescence (za tímto účelem byly buňky zafixovány 10% formaldehydem).

3.2.2 Lyzování buněk

Buňky pupečnickové žíly (HUVEC) byly lyzovány za účelem přípravy na provedení metody western blotting. Pro resuspendaci peletu byl použit lyzační pufr RIPA (před použitím bylo k peletu taktéž přidáno: DTT, leupeptin, aprotinin, PMSF a NaF). Do zkumavek obsahující pelet bylo přidáno adekvátní množství lyzačního pufru (v rozmezí 30–50 μ l – určeno na základě velikosti peletu). Následně byly vzorky sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (základní nastavení: 3 cykly, 10 sekund, 30 % max.). Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut při otáčkách 14 000 \times rpm a teplotě 4 °C. Supernatant (definovaný objem, maximum) byl následně přepipetován do připravených a popsaných zkumavek. Do připravených skleněných zkumavek bylo odměřeno Bradfordovo činidlo (1 ml) a k tomu byl přidán 1 μ l vzorku. Zkumavky byly ponechány inkubovat (10 min) při laboratorní teplotě. Po inkubaci došlo ke stanovení koncentrace celkových proteinů ve vzorku metodou Bradford (Bradford,

1976) při 595 nm na UV-VIS spektrofotometru. Následně byly vzorky naředěny lyzačním pufrům, a to tak, aby dosahovaly stejné koncentrace proteinů. Následně bylo ke vzorkům přidáno vypočtené množství 5x SDS, aby proteiny získaly negativní náboj a byly denaturovány. Poté byly lyzáty zahřáty při teplotě 96 °C po dobu 2 minut, za účelem denaturace proteinů a naředění struktury vzorku a uschovány pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blotting v mrazáku o teplotě -80°C.

3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů

Separace proteinů proběhla pomocí vertikální polyakrylamidové elektroforézy v 12,5% (10%) dělicím gelu a 5% zaostřovacím gelu (složení – viz tabulka 2). Do jamek bylo napipetováno příslušné množství (35 µg na jamku – výpočet µl na základě zjištěné koncentrace) vzorku proteinu a do boční jamky bylo napipetováno 3 µl standardu molekulových hmotností proteinů (markeru). Na zdroji elektrického napětí (PowerPac Basic, Bio-Rad) bylo nastaveno 80 V po dobu vertikálního postupu vzorků a molekulového markeru v zaostřovacím gelu. Následný postup vzorků a markeru v dělicím gelu pokračoval při napětí 120 V. Po tom, co molekulový marker postoupil na konec dělicího gelu, byla elektroforéza ukončena (elektroforetická komora odpojena od zdroje). Gel byl vyjmut z komory, zaostřovací gel byl oddělen od gelu dělicího (příprava na gelu) a gel dělicí byl přenesen na nitrocelulosovou membránu.

Následně probíhal western blotting a přenos proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu. Přenos probíhal při proudu 270 mA po dobu 3 hodin při stálém míchání a chlazení blotovacího pufru v blotovací komoře. Poté byla membrána obarvena v roztoku Ponceau po dobu 5 minut, aby došlo k nabarvení přeblovaných proteinů, následně opláchnuta destilovanou vodou a usušena na filtračním papíře. Membrána byla následně nařezána na menší proužky v závislosti na velikosti (molekulové hmotnosti) sledovaných proteinů a proužky byly následně odbarveny v roztoku TBS. Následovalo zablokování nespecifických vazeb proteinů v 5% roztoku BSA s TBS a Tweenem 20 (nebo v 5% roztoku mléka s TBS a Tweenem 20) po dobu 1 hodiny na kývačce při laboratorní teplotě. Poté byly membrány propláchnuty v TBS. Imunologická detekce sledovaných proteinů probíhala ve dvou krocích nanesením specifických protilátek (primární a sekundární). Primární protilátky byly naředěny v 5% roztoku BSA s TBS a Tweenem 20 (nebo v 5% roztoku mléka v TBS s Tweenem 20, v závislosti na roztoku užitého k blokaci). Následně byly proužky s nanesenými primárními protilátkami ponechány inkubovat přes noc při teplotě 4 °C. Další den byly proužky promyty, aby byly odmyty nežádoucí zbytkové primární protilátky, a to způsobem 5 minut v TBS, 5 minut v TBS s 0,1% Tweenem

20, 5 minut v TBS a poté 10 minut v TBS. Poté byly příslušné sekundární protilátky (RAM/Px – králičí proti-myši, od firmy Sigma-Aldrich a SwAR/Px – prasečí proti-králičí, od firmy Cell Signaling) naředěny blokovacím pufrém a nanесeny na proužky membrán. Následovala hodinová inkubace proužků při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly proužky znovu promyty, nyní 10 minut v TBS, 5 minut v TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 minut v TBS a 10 minut v TBS.

Jako poslední byla provedena detekce pomocí chemiluminiscence, za použití substrátu činidla peroxidu vodíku a luminolu v poměru 1:1. Detekovaný signál byl zaznamenán CCD kamerou a snímky byly následně analyzovány v programu Image reader.

Tabulka 2 – příprava gelu (dělicí, zaostřovací) na elektroforézu

Chemikálie	12,5% dělicí gel, 2 gely	10% dělicí gel, 2 gely	5% zaostřovací gel, 2 gely
AA+Bis	3,9 ml	3,125 ml	840 µl
H ₂ O	1,94 ml	2,67 ml	3,51 ml
TRIS pH 8,8	3,5 ml	3,5 ml	630 µl
SDS 10 %	94 µl	94 µl	50 µl
TEMED	6,25 µl	6,25 µl	5 µl
APS	37,5 µl	37,5 µl	30 µl

3.2.4 ELISA

Byla provedena imunoanalytická analýza vlivu daných léčiv na aktivitu cytokinu IL-6. Vybranou metodou byla standartní sendvičová ELISA (angl. zkratka enzyme-linked immunosorbent assay). K provedení byl využit kit a návod použití společnosti Peprotech, „Human IL-6 ELISA development kit“.

Nejprve byla do destičky nanесena protilátka, která se váže na polystyrenovou matici (koncentraci 1 µg/ml). Poté byla 96jamková deska uzavřena parafilmem (jako prevence vysychání jamek) a ponechána inkubovat přes noc.

Další den (po ukončení inkubace) byly jamky třikrát promyty roztokem k tomu určeným – tzv. promývací pufr (PBS + Tween-20 0,05%). Následně bylo přidáno 300 µl blokovací pufr (1% BSA + PBS) do každé jamky a 96jamková deska byla ponechána inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly jamky opět promyty promývacím pufrém (3x). Do prvních 2 řádků desky byly nanесeny vzorky (100 µl). Poté byla v 3. a 4. řádku vytvořena koncentrační řada roztoku IL-6 (standard) + diluent (0,05% Tween 20, 0,1% BSA

v PBS), v každé jamce bylo opět 100 µl roztoku. Jamky koncentrační řady měly následnou koncentraci IL-6: 3000 pg/ml, 1500 pg/ml, 750 pg/ml, 375 pg/ml, 187,5 pg/ml, 93,75 pg/ml, 46,88 pg/ml, 23,44 pg/ml, 11,72 pg/ml. Celkově tedy koncentrační řadu tvořilo 9 jamek. Deska byla následně ponechána inkubovat po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly jamky opět promyty promývacím pufrem (3x). Poté bylo do každé jamky napipetováno 100 µl roztoku detekčních protilátek + diluent a 96jamková deska byla opět ponechána inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace byly jamky opět promyty promývacím pufrem (3x). Do každé jamky bylo následně napipetováno 100 µl roztoku Avidin-HRP (HRP – horseradish peroxidase) konjugát + diluent (v poměru 1:2000) a deska byla ponechána inkubovat po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Během inkubace byl připraven ABTS (2,2'-azino-bis - [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] - diammonium salt) substrát (viz tabulka 3). Po ukončení inkubace byly jamky opět promyty promývacím pufrem (3x). Do každé sledované jamky bylo přidáno 100 µl připraveného ABTS substrátu a deska byla ponechána inkubovat při laboratorní teplotě, až do vývoje zbarvení substrátu (zelené, cca 15 min).

Zbarvení bylo následně pozorováno, měřeno a vyhodnoceno pomocí přístroje ELISA plate reader při vlnové délce 405 nm. Výsledky byly vyhodnoceny a zaneseny do grafu (viz graf 1).

Tabulka 3 – složení ABTS substrátu

	Objem (na 4 řádky jamek)
ABTS (2 mg/ml)	0,5 ml
Citrátový pufr	5,5 ml
30% H ₂ O ₂	5 µl

3.2.5 Imunofluorescence

Nádorové buňky HeLa byly ovlivněny danými protizánětlivými léčivy (prednisolon - P, dexamethason - D, testosteron - T, kyselina acetylsalicylová - A, ibuprofen - I, nimesulid – N, v koncentracích: D = 1 µmol; P, T, A, I, N = 10 µmol) po dobu 30 minut, následně pak TNFα po dobu 30 minut. Poté byly buňky zafixovány v roztoku 10 % formaldehyd a zafixované buňky připravené na imunofluorescenci byly uloženy do lednice.

Před samotnou imunodetekcí byla nejprve odstraněna fixace (fixační roztok – 10% formaldehyd), poté byly zavodněny skla slidu (se zafixovanými, ovlivněnými a kontrolními buňkami na dně jamek) roztokem PBS, o objemu 250 µl po dobu 3 minut. Následně byly jamky

zablokovány roztokem 1 % BSA v PBS + Tween 20 po dobu 30 minut (v každé jamce opět 250 μ l roztoku). Po dokončení blokace byly jamky slidu promyty roztokem PBS + Tween 20 (250 μ l, 3 minuty). Následně byla aplikována primární protilátka (rozpuštěná v roztoku 1% BSA v PBS+ Tween 20) v objemu 150 μ l na jamku. Slid byl následně uložen do lednice a ponechán inkubovat přes noc při teplotě 4 °C. Po dokončení inkubace (další den) byly jamky opět promyty roztokem PBS + Tween 20 (250 μ l, promytí proběhlo 5x po dobu 3 minut). Poté byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou (rozpuštěná v roztoku 1% BSA v PBS + Tween 20) v objemu 150 μ l na jamku a jamky byly ponechány promývat na kývačce za tmy po dobu 90 minut. Od tohoto bodu byly další kroky prováděny za tmy vzhledem k neporušení fluorescenční značky přítomné v sekundární protilátce, jejíž neporušení je nutné pro správné provedení metody. Následně byly jamky opět promyty roztokem PBS + Tween 20 (250 μ l na jamku, promytí proběhlo 5x po dobu 3 minut) a potom byly jamky promyty destilovanou vodou (250 μ l na jamku promytí 2x po dobu 3 minut). Nakonec byla do každé jamky nakapáno činidlo Fluorsave reagent za účelem zabránění vysvícení fluorescenční značky přítomné v sekundární protilátce během další manipulace se slidem a jamky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem pod UV výbojkou, fluorescenční značka v buňkách byla excitována při vlnové délce 488 nm.

4. Výsledky

Protizánětlivá aktivita zkoumaných protizánětlivých léčiv (prednisolon, dexamethason, testosteron, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, nimesulid), byla porovnáována na endotelových buňkách pupečníkové žíly HUVEC pomocí metody western blotting. Taktéž byl zkoumán efekt zmíněných protizánětlivých látek na cytokin IL-6 pomocí imunoanalytické metody ELISA. Pomocí metody imunofluorescence byla také pozorována translokace transkripčního faktoru NF- κ B z cytoplazmy do jádra, na epitelových buňkách HeLa.

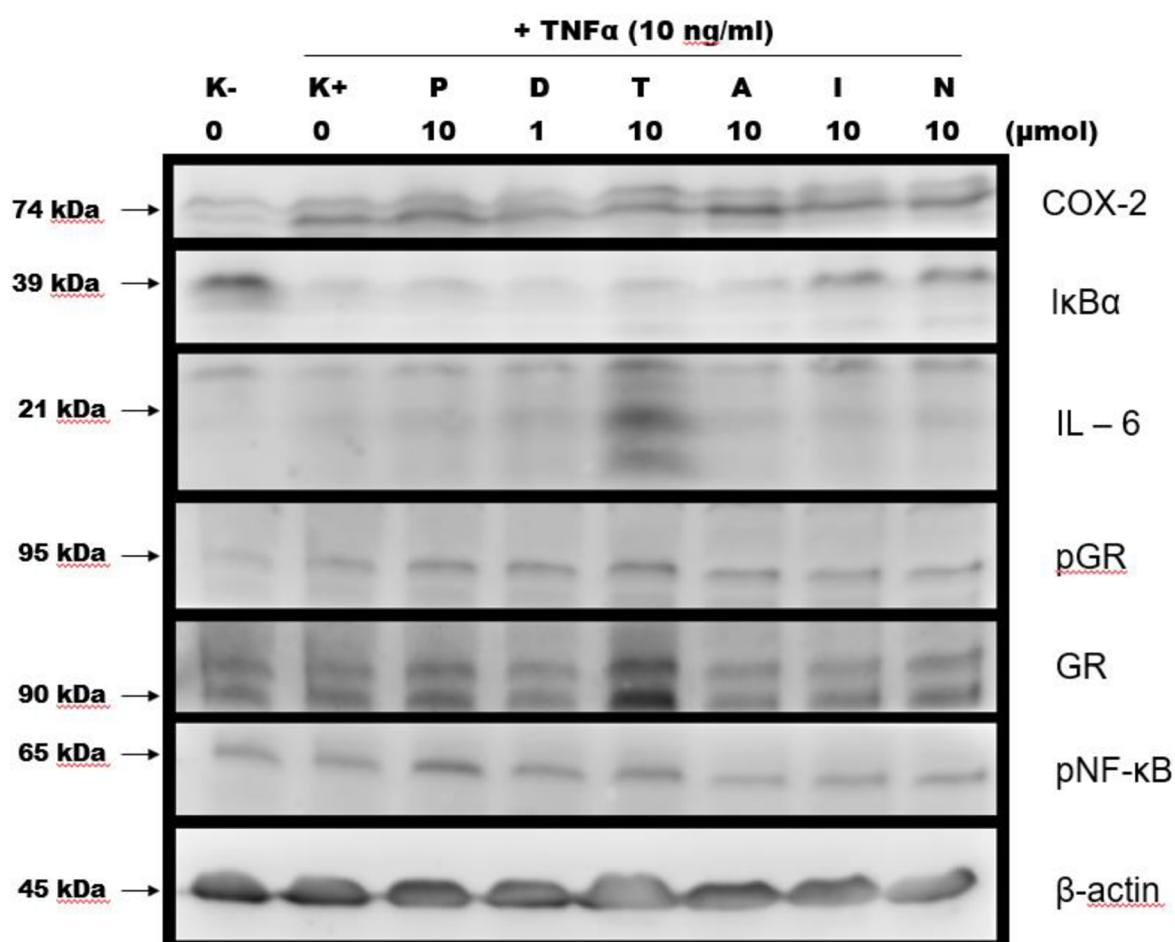
4.1 Western Blotting

Metoda Western blotting (WB) byla využita za účelem porovnání efektu sledovaných protizánětlivých léčiv na sledované mediátory zánětu (COX-2, I- κ B α , pI- κ B α , IL-6, GR, pGR, pNF κ B, pIKK α/β , IKK α , TNFR1) v endotelových buňkách, *in vitro*. Látky byly aplikovány uniformně v koncentraci 10 μ M, pouze dexamethason byl aplikován v nižší koncentraci než ostatní látky, a to 1 μ M. Rozdíly ve vlivu látek na sledované proteiny byly porovnány s kontrolními buňkami (kontrolní neovlivněné/ovlivněné buňky), které byly označeny jako K. Kontrolní buňky byly rozděleny jako: K-, kontrolní buňky + DMSO bez přidaného TNF α , tedy negativní kontrolní buňky a K+, kontrolní buňky + DMSO s přidaným TNF α , tedy kontrolní buňky pozitivní. U všech buněk s výjimkou negativních kontrolních buněk (K-) byl proveden pre-treatment protizánětlivými standardy po dobu 30 minut a následně ovlivnění (24 h nebo 30 min) cytokinem TNF α , jež v endotelových buňkách spouští sekreci mediátorů zánětu (Mackay et. al, 1993) a efektivně tak v buňkách vyvolává zánět.

Výsledky metody WB buněk ovlivněných standardy protizánětlivých léčiv po dobu 30 minut + indukovaných cytokinem TNF α po dobu 24 hodin (obrázek 1) byly následující: nejnižší hladina exprese enzymu COX-2, tedy nejvyšší inhibice léčivem, byla detekována v buňkách ovlivněných léčivem dexamethason, naopak nejvyšší exprese byla detekována v buňkách ovlivněných kyselinou acetylsalicylovou. Nejvyšší exprese proteinu I κ B α byla detekována v negativních kontrolních buňkách, vzhledem k absenci indukovaného stavu zánětu v těchto buňkách, následně pak v buňkách ovlivněných léčivy ibuprofen a nimesulid. Při stanovování cytokinu IL-6 byla nejvyšší hladina exprese detekována v buňkách ovlivněných hormonem testosteron, tento výsledek koreluje s výsledkem následného experimentu (viz graf 1). U glukokortikoidních receptorů, a to jak GR, tak i pGR (Ser226) byla nejvyšší hladina exprese detekována taktéž v buňkách ovlivněných hormonem testosteron. Nejvyšší exprese pNF- κ B byla detekována v buňkách ovlivněných léčivy prednisolon a testosteron. Jako protein

kontrolující rovnoměrné nanesení vzorků do gelu při provedení metody WB byl využit globulární strukturní protein β -aktin.

Detekovaný rozdíl exprese mezi negativními a pozitivními kontrolními buňkami (K-/K+) byl zřejmý u těchto mediátorů zánětu: enzym COX-2, kde bylo možné detekovat vyšší expresi tohoto enzymu v pozitivních kontrolních buňkách. Naopak při stanovení proteinu I κ B α byla vyšší exprese v kontrolních buňkách negativních, protože negativní kontrolní buňky jako jediné nebyly ovlivněny cytokinem TNF α , nedošlo zde tedy k degradaci proteinu I κ B α . Při stanovení fosforylovaného receptoru pGR byla vyšší exprese v kontrolních buňkách pozitivních. U ostatních sledovaných mediátorů zánětu nebyl detekovaný rozdíl exprese mezi negativními a pozitivními kontrolními buňkami (K-/K+) dostatečně zřejmý.

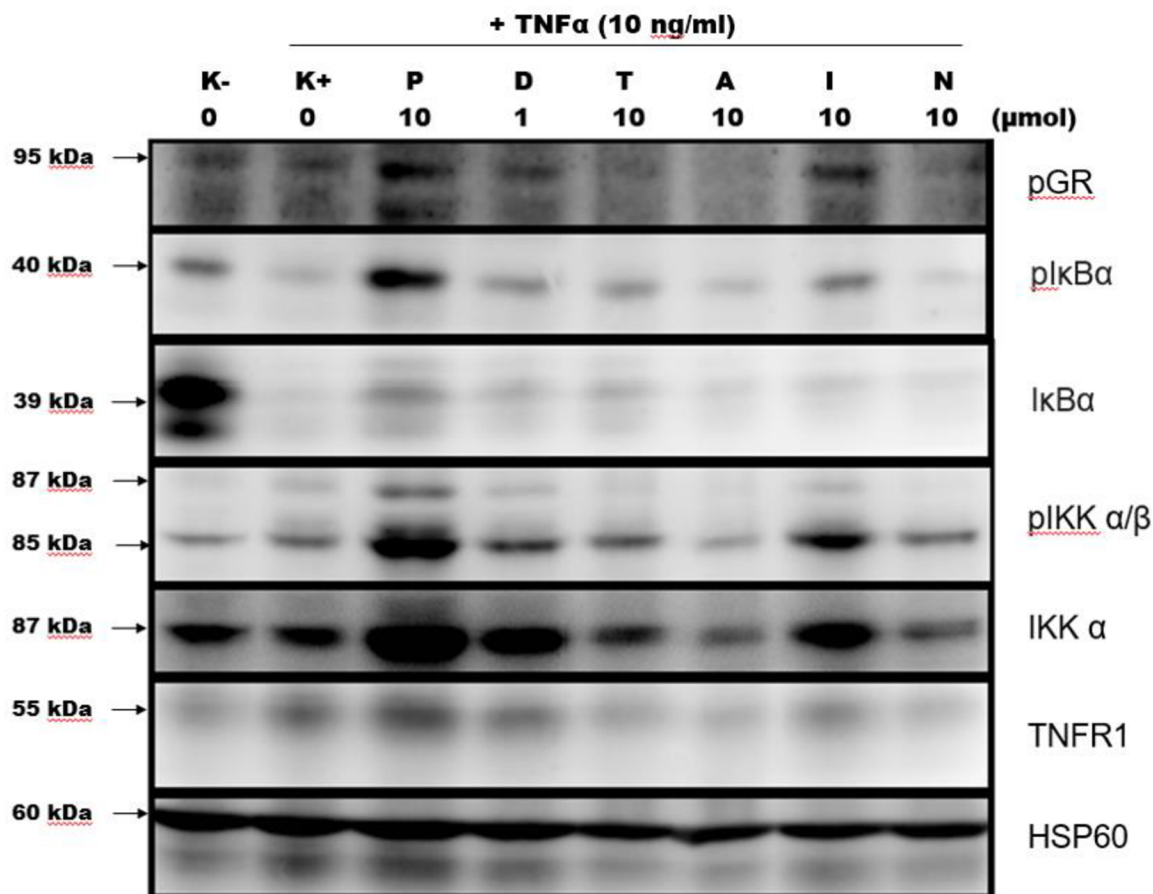


Obrázek 1: Imunodetekce protizánětlivé aktivity sledovaných léčiv na vybraných mediátorech zánětu. Buňky HUVEC: pre-treatment 30 minut sledovanými léčivy (P-prednisolon, D-dexamethason, T-testosteron, A-kys. acetylsalicylová, I-ibuprofen, N-nimesulid), v koncentracích: D = 1 μ mol, P, T, A, I, N = 10 μ mol + ovlivnění 24 hodin cytokinem TNF α v koncentraci: 10 ng/ml.

Výsledky metody WB buněk ovlivněných standardy protizánětlivých léčiv po dobu 30 minut + indukovaných cytokinem TNF α po dobu 30 minut (obrázek 2) byly následující: nejvyšší exprese receptoru pGR (Ser226) byla detekována v buňkách, které byly ovlivněny sloučeninami prednisolon a ibuprofen, klesající exprese (nižší než u kontrolních buněk) byla naopak detekována v buňkách ovlivněných kyselinou acetylsalicylovou, testosteronem a látkou nimesulid. Rozdíl exprese v kontrolních buňkách byl v tomto případě zanedbatelný. Při stanovení proteinu I κ B α a fosforylovaného proteinu pI κ B α byla detekována nejvyšší exprese těchto proteinů v buňkách ovlivněných látkou prednisolon, menší exprese pak v buňkách ovlivněných sloučeninami ibuprofen, testosteron a dexamethason. Při stanovení fosforylované kinázy pIKK α/β byla nejvyšší hladina exprese v buňkách ovlivněných látkou prednisolon, menší exprese této kinázy pak byla v buňkách ovlivněných sloučeninami ibuprofen, dexamethason a nimesulid, naopak v buňkách ovlivněných kyseliny acetylsalicylovou je exprese této kinázy nižší než v negativních kontrolních buňkách. U celkové kinázy IKK α byla nejvyšší hladina exprese taktéž pozorována v buňkách ovlivněných látkou prednisolon následovanou sloučeninami dexamethason a ibuprofen. I u receptoru TNFR1 byla nejvyšší hladina exprese detekována v buňkách ovlivněných látkou prednisolon. Jako protein kontrolující rovnoměrné nanesení vzorků do gelu při provedení metody WB byl použit heat shock protein 60 (HSP60).

Detekovaný rozdíl mezi negativními a pozitivními kontrolními buňkami (K-/K+) byl zřejmý u těchto mediátorů zánětu: u celkového proteinu I κ B α i fosforylovaného proteinu pI κ B α byla vyšší exprese v buňkách negativní kontroly. U receptoru TNFR1 byla exprese vyšší v pozitivních kontrolních buňkách. Méně zřejmý detekovaný rozdíl mezi negativními a pozitivními kontrolními buňkami (K-/K+) byl u těchto mediátorů zánětu: u fosforylovaného receptoru pGR nebyl detekován rozdíl mezi expresí v kontrolních buňkách. U fosforylované kinázy pIKK α/β byla exprese mírně vyšší v kontrolních buňkách pozitivních. U kinázy IKK α nebyl detekován rozdíl mezi expresí v kontrolních buňkách.

Celkově byla nejvýraznější ze všech sledovaných standardů látka prednisolon, exprese proteinů v buňkách ovlivněných touto sločeninou byla nejvyšší u všech sledovaných mediátorů zánětu. Z tohoto výsledku není jednoduché určit jednoznačný závěr o působení sloučeniny prednisolon. Vzhledem k výrazné expresi fosforylovaného receptoru pGR (Ser226), proteinu I κ B α a fosforylovaného proteinu pI κ B α se účinky prednisolonu jeví jako protizánětlivé. Na druhou stranu exprese kinázy IKK α , fosoforylované kinázy pIKK α/β a receptoru TNFR1 mohou nasvědčovat, že prednisolon má taktéž účinky regulující, nebo případně aktivující signální dráhu transkripčního faktoru NF- κ B.



Obrázek 2: Imunodetekce protizánětlivé aktivity sledovaných léčiv na vybraných mediátorech zánětu. Buňky HUVEC: pre-treatment 30 minut sledovanými léčivy (P-prednisolon, D-dexamethason, T-testosteron, A-kys. acetylsalicylová, I-ibuprofen, N-nimesulid), v koncentracích: D = 1 μ mol, P, T, A, I, N = 10 μ mol + ovlivnění 30 minut cytokinem TNF α v koncentraci: 10 ng/ml.

4.2 ELISA

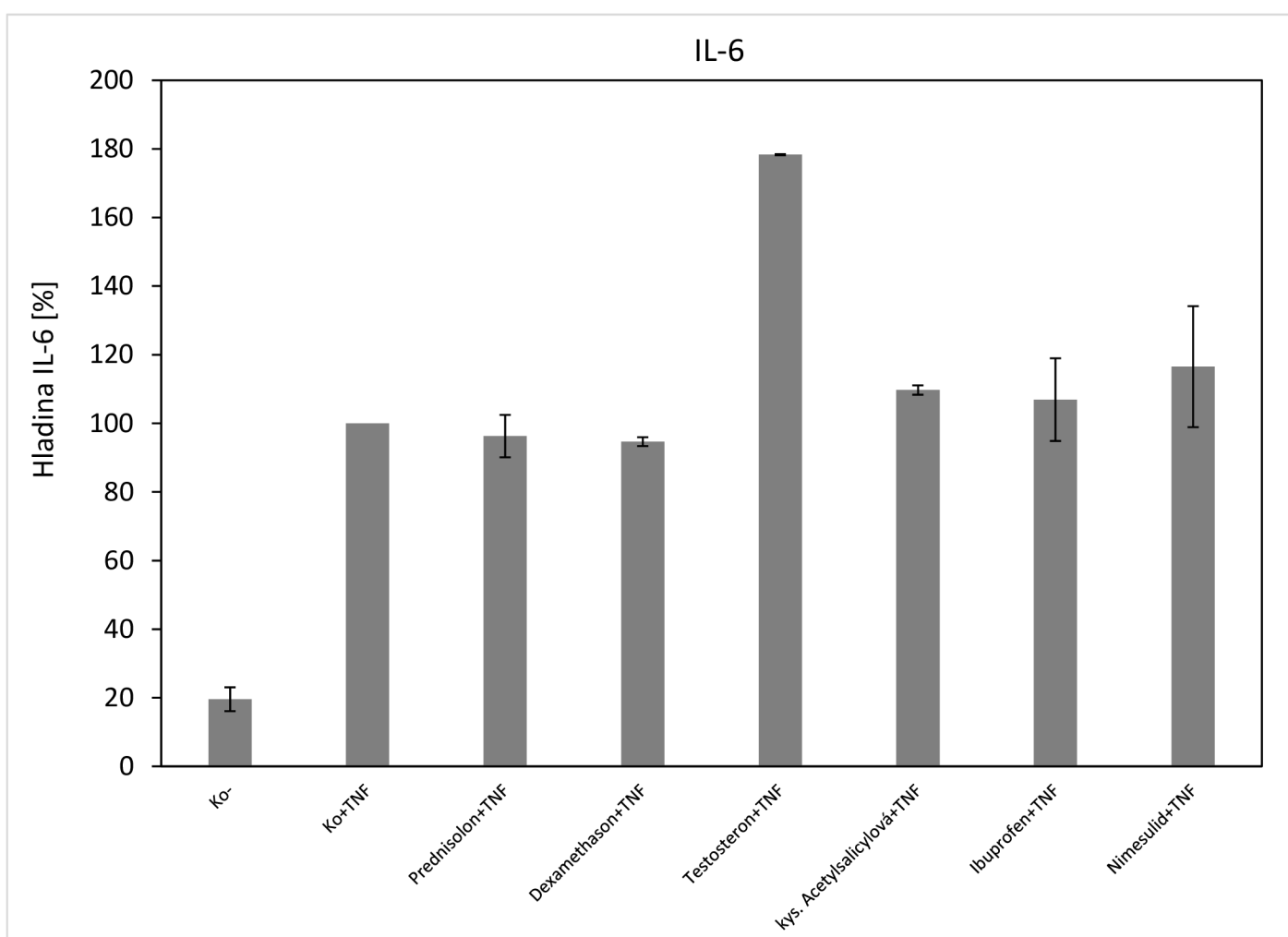
Pro ověření účinků standardů byla provedena imunoanalytická metoda kompetitivní enzymové imunoanalýzy, standardní „sendvičová“ ELISA, za účelem potvrzení předešlých výsledků získaných metodou WB, specificky potvrzení vlivu pozorovaných protizánětlivých léčiv (viz výše) na významný mediátor zánětu, cytokin IL-6. Jamky byly po provedení experimentu spektrofotometricky měřeny pomocí přístroje ELISA plate reader při vlnové délce 405 nm.

Byla měřena hladina cytokinu IL-6 v kultivačním médiu lidských endotelových buněk pupečnickové žíly (HUVEC), ovlivněných protizánětlivými léčivy: prednisolon, dexamethason, testosteron, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen a nimesulid *in vitro*.

U všech buněk s výjimkou negativních kontrolních buněk (Ko-) byl proveden pre-treatment standardy sledovaných protizánětlivých sloučenin po dobu 30 minut, a následně ovlivnění po dobu 24 hodin cytokinem TNF α , jež v endotelových buňkách spouští sekreci mediátorů zánětu (Mackay et. al, 1993) a efektivně tak v buňkách vyvolává zánět.

Z naměřených hodnot absorbance, vztažených k hodnotě pozitivních kontrolních buněk (Ko+TNF, indukovaný zánět; hodnota 100 %) byl sestrojen graf (graf 1). V negativních kontrolních buňkách (Ko-), je dle očekávání hladina IL-6 minimální (fyziologická norma). Rozdíl hladiny IL-6 mezi kontrolními buňkami (negativní/pozitivní) je tedy zřejmý, indukce zánětu pomocí TNF α (buňky ovlivněny po dobu 24 h) byla tedy účinná.

Výraznou změnu hladiny IL-6 bylo možné pozorovat pouze v médiu buněk ovlivněných hormonem testosteron, kde byl nárůst hladiny IL-6 až na 178 %, produkce IL-6 byla v buňkách působením testosteronu tedy pravděpodobně zvýšena, tento výsledek taktéž odpovídá předchozím výsledkům metody WB (pre-treatment 30 min standardy + ovlivnění 24 hodin TNF α , obrázek 1). Testosteron v tomto případě tedy projevuje spíše prozánětlivé účinky (minimálně IL-6 sekreci indukující účinky). U ostatních pozorovaných látek, tedy prednisolonu, dexamethasonu, kyseliny acetylsalicylové, ibuprofenu a nimesulidu nebylo možné pozorovat signifikantní změny vůči vztažené hodnotě Ko+TNF.



Graf 1 - hladina IL-6 [%] 15 min od vyvolání reakce, Buňky HUVEC: pre-treatment 30 minut sledovanými léčivými (P-prednisolon, D-dexamethason, T-testosteron, A-kys. acetylsalicylová, I-ibuprofen, N-nimesulid), v koncentracích: D = 1 μ mol, P, T, A, I, N = 10 μ mol + ovlivnění 24 hodin cytokinem TNF α v koncentraci: 10 ng/ml.

4.3 Imunofluorescence

Metoda imunofluorescence a následného pozorování fluorescenčním mikroskopem byla provedena za účelem porovnání efektu sledovaných protizánětlivých léčiv na transkripční faktor NF- κ B, specificky jeho transport z cytoplazmy do jádra buňky. V cytoplazmě jsou za normálního stavu inaktivní části tohoto proteinu od sebe odděleny působením inhibičních proteinů – primárně I κ B α (Sun, 2011). Tato metoda byla provedena na buněčné linii epitelových buněk HeLa, jež podobně jako v předchozích experimentech použité endotelové buňky HUVEC, reagují na ovlivnění cytokinem TNF α (Rajmani et al., 2016). Jedná se o nádorovou buněčnou linii odvozenou od karcinomu děložního hrdla.

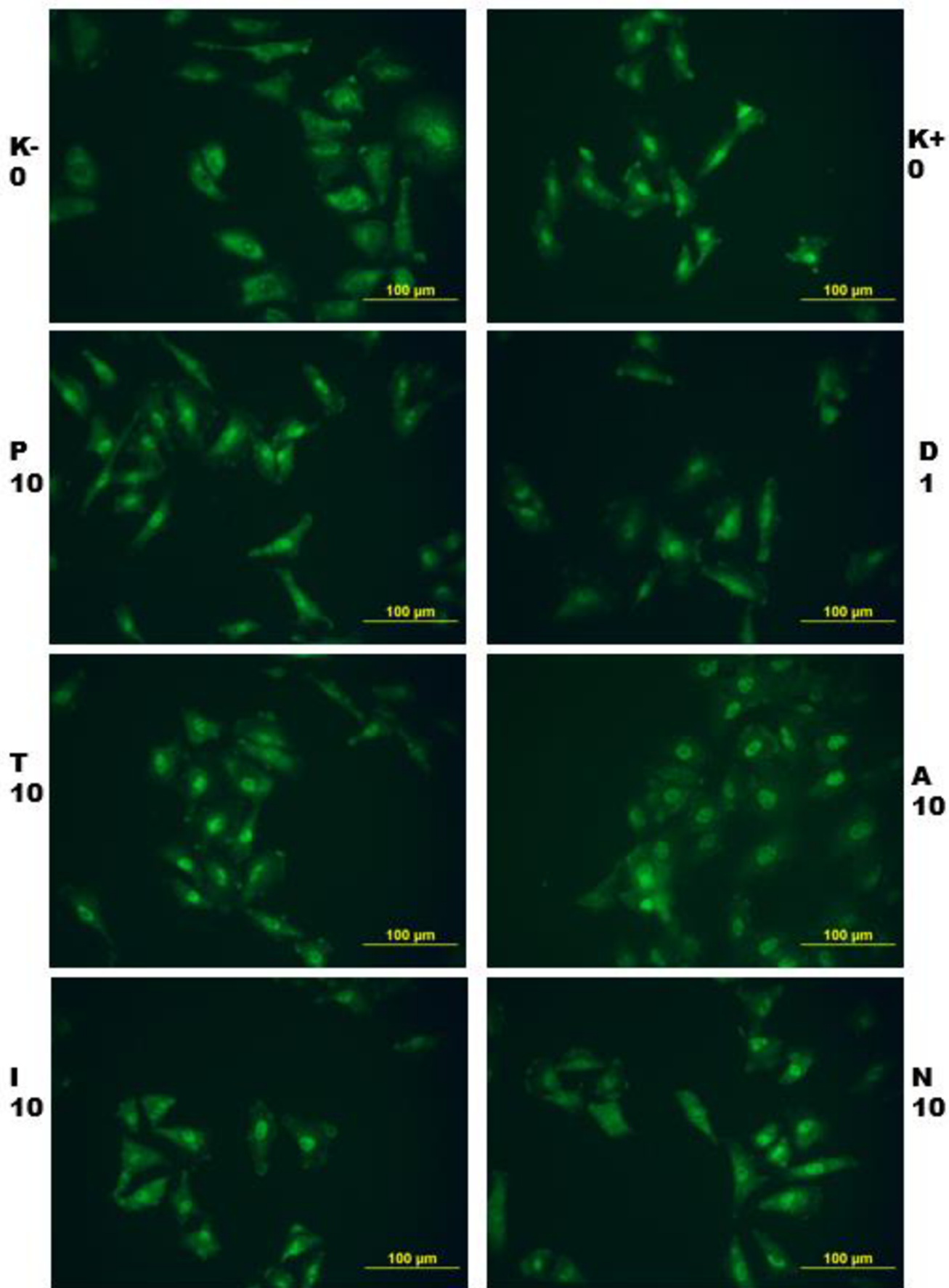
Rozdíly ve vlivu látek na translokaci transkripčního faktoru NF- κ B byly porovnány s kontrolními buňkami, které byly označeny jako K. Kontrolní buňky byly rozděleny jako: K-, kontrolní buňky + DMSO bez přidaného TNF α , tedy negativní kontrolní buňky a K+, kontrolní buňky + DMSO s přidaným TNF α , tedy kontrolní buňky pozitivní.

Ve všech buňkách s výjimkou negativních kontrolních buněk (K-) byl proveden pre-treatment sledovanými protizánětlivými standardy po dobu 30 minut a následně ovlivnění po dobu 30 minut cytokinem TNF α , za účelem indukce zánětlivého stavu (primárně aktivace NF- κ B) v těchto buňkách a pozorování možné inhibice tohoto stavu zkoumanými léčivy.

V negativních kontrolních buňkách (K-) je možné pozorovat transkripční faktor NF- κ B volně v cytoplazmě. V pozitivních kontrolních buňkách (K+) můžeme pozorovat transkripční faktor NF- κ B translokovaný v jádře nádorových buněk.

Transkripční faktor NF- κ B přítomný volně v cytoplazmě, jehož přítomnost indikuje inhibici propuklé zánětlivé reakce způsobené ovlivněním cytokinem TNF α (30 min) nebylo možné pozorovat u žádných buněk ovlivněných sledovanými protizánětlivými léčivy (30 min).

Naopak fosforylovaný transkripční faktor NF- κ B přítomný v jádře buňky, indikující stav zánětu v postižené buňce, bylo možné pozorovat v buňkách ovlivněných těmito protizánětlivými léčivy: prednisolon (P), dexamethason (D), testosteron (T), kyselina acetylsalicylová (A), ibuprofen (I) a nimesulid (N). Zkoumaná protizánětlivá léčiva neměla tedy detekovatelný vliv na inhibici zánětlivé reakce indukované v epitelových buňkách ovlivněných cytokinem TNF α .



Obrázek 3 - imunofluorescence za účelem detekce transkripčního faktoru NF- κ B a jeho transportu z cytoplazmy do jádra, pomocí sekundární protilátky RAM Alexa fluor 488 s fluorescenční značkou; Buňky HeLa: pre-treatment 30 minut sledovanými léčivými (P-prednisolon, D-dexamethason, T-testosteron, A-kys. acetylsalicylová, I-ibuprofen, N-nimesulid), v koncentracích: D = 1 μ mol, P, T, A, I, N = 10 μ mol + ovlivnění 30 minut cytokinem TNF α v koncentraci: 10 ng/ml.

5. Diskuse

Cílem experimentální části mé bakalářské práce bylo porovnání protizánětlivé aktivity léčiv na endotelových buňkách (HUVEC), *in vitro* metodou western blotting a ELISA. A následné stanovování odpovědi epitelových buněk linie HeLa na tyto látky při sledování transkripčního faktoru NF- κ B a jeho transportu z cytoplazmy do jádra, jakožto indikátoru degradace proteinu I κ B α a propuknutí zánětu, pomocí metody imunofluorescence.

Zmíněná léčiva mají široké spektrum farmakologických účinků, mezi něž patří vlastnosti analgetické i imunosupresivní, v rámci této bakalářské práce jsem se však zabýval pouze účinky protizánětlivými a následnému porovnání těchto účinků mezi sebou.

Jak během metody WB (viz obrázek 1), tak během metody ELISA (viz graf 1) je možné pozorovat korelaci mezi ovlivněním buněk HUVEC (pre-treatment 30 min + ovlivnění TNF α 24 h) sloučeninou testosteron a detekovanou zvýšenou expresí či hladinou cytokinu IL-6 v těchto buňkách. Tyto výsledky naznačují prozánětlivou povahu testosteronu specificky ve spojitosti se zvýšeným množstvím IL-6, protože ostatní sledované mediátory zánětu (s výjimkou GR) nejsou působením tohoto androgenu nijak zvlášť ovlivněny. Tato skutečnost může plynout ze stále zkoumaného vztahu mezi androgenovým receptorem a cytokinem IL-6. Androgenový receptor (AR) je ligandem zprostředkovaný transkripční faktor, který patří do skupiny jaderných receptorů (Zilliacus et al., 1995), jež se aktivuje navázáním jakýchkoli androgenních hormonů, včetně testosteronu a dihydrotestosteronu (Roy et al., 1999). Při absenci androgenu může být AR aktivován alternativními cestami, mezi které patří růstové faktory, interleukin-6 (IL-6) a zvýšení intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) (Chen et al., 2000).

V endotelových buňkách, ve kterých proběhlo ovlivnění látkou testosteron (30 min) a indukce cytokinem TNF α (24 h) je tedy předpokládána aktivace tohoto receptoru. Jako jedna z mnoha funkcí cytokinu IL-6 byla taktéž popsána regulace androgenového receptoru (Ueda et al., 2002). Vliv cytokinu IL-6 na AR může vyvolat stimulační, nebo inhibiční reakce na proliferaci buněk (Culig et al., 2012). Je tedy možné, že detekovaná zvýšená exprese u metody WB či hladina u metody ELISA byla determinována tímto vztahem. Androgeny byly v literatuře popsány jako supresory produkce IL-6 monocyty a stromálními buňkami (Kanda et al., 1996) a taktéž jako inhibitory genové exprese IL-6 ve stromálních buňkách myši kostní dřeně (Bellido et al., 1995). Při zkoumání vlivu na endotelové buňky HUVEC ovlivněných cytokinem TNF α byl však testosteron v literatuře popsán jako látka, která může zvyšovat expresi E-selektinu a vaskulární buněčné adhezní molekuly-1 (VCAM-1) u těchto buněk. Tyto

skutečnosti by mohly naznačovat mechanismus, kterým může zmíněný hormon nepřímo posilovat imunitní reakce v buňce (Zhang et al., 2002).

Dále si můžeme povšimnout, že exprese I κ B α ve výsledcích metody WB byla nejvyšší v negativních kontrolních buňkách (K-), a to u obou provedení metody (pre-treatment protizánětlivými standardy – 30 min + ovlivnění TNF α – 24 h/30 min; obrázek 1/obrázek 2). Tento výsledek odpovídá literatuře, neboť ostatní vzorky buněk byly ovlivněny cytokinem TNF α , jež byl v endotelových buňkách prokázán jako spouštěč sekrece mediátorů zánětu (Mackay et. al, 1993) zvláště pak NF- κ B (Chen et al., 2020). Faktor NF- κ B, působí jako transkripční aktivátor mediátorů zánětu a je nejznámější pro svou funkci regulace zánětu a vrozené imunity (Nennig, Schank, 2017). NF- κ B je sám regulován prostřednictvím interakcí s I κ B, které plní roli inhibičních proteinů v buňce (Beg, Baldwin, 1993; Gilmore, Morin, 1993). Ve svém klidovém stadiu tento faktor spočívá v cytoplazmě ve formě heterotrimeru skládajícímu se z p50, p65 a I κ B α . Při aktivaci projde protein I κ B α , který je inhibitorem NF- κ B, fosforylací, ubikvitinací a degradací, p50 a p65 se následně uvolní k translokaci do jádra, naváží se na specifické sekvence DNA přítomné v promotérech různých genů a zahájí transkripci (Aggarwal et al., 2009). Výše uvedeným údajům z literatury odpovídá výsledek mého experimentu, a to, že negativní kontrolní buňky, jež jako jediné nebyly vystaveny ovlivnění TNF α , vykazují nejvyšší expresi proteinu I κ B α (inhibujícího aktivaci NF- κ B), který je přítomný v cytoplazmě a nedochází zde k degradaci. Méně výrazná, avšak stále znatelná exprese proteinu I κ B α byla taktéž detekována v buňkách (pre-treatment standardy – 30 min + ovlivnění TNF α – 30 min; obrázek 2) ovlivněných léčiv prednisolon, dexamethason, testosteron a ibuprofen a taky v buňkách (pre-treatment standardy – 30 min + ovlivnění TNF α – 24 h; obrázek 1) ovlivněných léčiv ibuprofen a nimesulid. Pro stanovení exprese proteinu I κ B α je však relevantní sledovat buňky ovlivněné TNF α v kratších časech (tedy pre-treatment standardy – 30 min + ovlivnění TNF α – 30 min; obrázek 2), protože po ovlivnění TNF α po dobu 24 hodin (obrázek 1) může být efekt sledovaných léčiv na tento protein zkreslený. Ve výsledcích mé práce můžeme tedy pozorovat, že i buňky s indukovaným zánětem (ovlivnění cytokinem TNF α), ovlivněné léčiv prednisolon, dexamethason, testosteron, ibuprofen a nimesulid (v závislosti na čase treatmentu), vykazují inhibici degradace proteinu I κ B α – a tedy propuknutí zánětu. V literatuře se taktéž uvádí, že glukokortikoidy indukují expresi I κ B, cytoplazmického inhibitoru NF- κ B (Scheinman et al., 1995), to je relevantní pro glukokortikoidní protizánětlivá léčiva užitá během této bakalářské práce, tedy prednisolon a dexamethason. Výsledky získané v mé bakalářské práci týkající se funkce glutokortikoidů indukovat expresi I κ B tedy odpovídají dříve získaným uveřejněným poznatkům.

Při stanovení výsledků metody WB při ovlivnění buněk TNF α po dobu 30 min (obrázek 2) byla určena nejvyšší detekovaná exprese těchto mediátorů zánětu: pGR, pI κ B α , pIKK α/β , IKK α , TNFR1, a to vše v buňkách ovlivněných syntetickým glukokortikoidem prednisolon (pre-treatment – 30 min). Můžeme tedy předpokládat, že prednisolon inhiboval zánětlivý stav v těchto buňkách, to může být zapříčiněno například imunosupresivními účinky tohoto kortikosteroidu, které mohou být využity i u transplantace orgánů (Vethe et al., 2011). Je tedy možné, že byla alespoň částečně inhibována imunitní odpověď v buňkách jako taková, zahrnující akutní zánět. Taktéž tento výsledek odpovídá literatuře, neboť prednisolon byl i v minulosti pozorován jako účinné protizánětlivé léčivo na endotelových buňkách (HUVEC) *in vitro* (Bratt, Heimbürger, 1999).

V průběhu mého experimentu byl taktéž zkoumán efekt protizánětlivého léčiva kyseliny acetylsalicylové na expresi nebo hladinu cytokinu IL-6 v endotelových buňkách HUVEC, a to během metody western blotting i ELISA. Korejská studie (Park et al., 2007) na vliv kyseliny acetylsalicylové na endotelové buňky HUVEC *in vitro* po řízené infekci bakterií *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) poukázala na fakt, že produkce cytokinu IL-6 v endotelových buňkách ovlivněných kyselinou acetylsalicylovou byla nižší oproti buňkám HUVEC infikovaným klinickými izoláty *S. aureus*, které nebyly vystaveny tomuto protizánětlivému léčivu. V průběhu mého experimentu však nebyl pozorován žádný signifikantní efekt na expresi IL-6 v buňkách, či na hladinu IL-6 v kultivačním médiu endotelových buněk. To může být zapříčiněno rozdílným mechanismem vyvolání imunitní odpovědi v buňkách. Zatímco v průběhu mého experimentu byla v buňkách indukována sekrece mnohých mediátorů zánětu pomocí TNF α , tak během zmíněné studie (Park et al., 2007) byla sekrece IL-6 výsledkem reakce endotelových buněk na infekci bakterií *S. aureus*. Je však možné, že ani v tomto případě neměla kyselina acetylsalicylová přímý vliv na produkci IL-6 v buňkách HUVEC, protože detekovaný útlum produkce IL-6 kyselinou salicylovou byl pravděpodobně způsoben sníženým počtem internalizovaných bakterií *S. aureus* (Soderquist et al., 2006), jelikož kyselina mimo jiné výrazně ovlivňuje jak adhezi a invazi bakterie do endotelové buňky, tak i množství bakteriálních produktů vytvořených v buňce.

Při diskusi výsledků WB (pre-treatment protizánětlivými standardy - 30 min + ovlivnění cytokinem TNF α - 24 h; obrázek 1) si můžeme dále povšimnout při stanovování COX-2 nejnížší exprese tohoto enzymu v buňkách ovlivněných látkou dexamethason. Exprese enzymu COX-2 v buňkách ovlivněných sloučeninou dexamethason je taktéž zjevně nižší než exprese

tohoto enzymu v pozitivních kontrolních buňkách, v nichž byla indukována zánětlivá reakce ovlivněním cytokinem TNF α (24 h). V tomto případě tedy došlo vlivem glukokortikoidu dexamethason ke snížené produkci enzymu COX-2 v endotelových buňkách HUVEC. V literatuře byl tento glukokortikoid popsán jako látka, jež v epitelových buňkách (HeLa) tlumí expresi COX-2 proteinu a destabilizuje mRNA kódující COX-2 skrze inhibici kinázy p38 (Lasa et al., 2001). Dále byl popsán efekt dexamethasonu v plicních epitelových buňkách, kde byla indukce genu kodující enzym COX-2 blokována dexamethasonem na transkripční a posttranskripční úrovni (Newton et al., 1998). Dexamethason se v souvislosti s endotelovými buňkami HUVEC užívá nejen při studiu jeho protizánětlivých vlastností, ale také pro jeho schopnost ovlivňovat angiogenezi v těchto buňkách. Dexamethason byl popsán jako látka, jež tlumí angiogenezi, a to mechanismem snížení sekrece vaskulárního endotelového růstového faktoru v endotelových buňkách (Cenciarini et al., 2019). Dále se také glukokortikoidy užívají za účelem inhibice TNF α indukované apoptózy endotelových buněk (Meßmer et al., 1999), a to i specificky glukokortikoidní látky dexamethason a prednisolon, jež byly zkoumány v experimentální části mé bakalářské práce.

Při další diskusi výsledků WB (pre-treatment protizánětlivými standardy - 30 min + ovlivnění cytokinem TNF α - 24 h; obrázek 1) si můžeme taktéž povšimnout nejvyšší exprese glukokortikoidního receptoru (GR) v endotelových buňkách ovlivněných látkou testosteron. Ačkoliv nižší množství testosteronu v organismu je obvykle spojené se zvýšenou expresí mediátorů zánětu (Bianchi, 2018), byly pozorovány stavy, kdy je větší množství testosteronu spojené se silnějším zánětlivým stavem, a to především u žen (Di Stasi et al., 2022).

Výsledek ovlivnění GR androgenním hormonem testosteron však odpovídá informacím získaným při studii von Langen a kol., 2005, která se zabývala interakční specificitou GR. Při zmíněné studii bylo zjištěno, že kortisolu chemicky podobné ligandy jako estradiol, testosteron a progesteron se taktéž mohou vázat na lidský GR, avšak nejsou schopny vytvořit stabilní, transkripčně aktivní konformaci receptoru (von Langen et al., 2005).

Při sledování vlivu protizánětlivých léčiv na aktivaci a translokaci transkripčního faktoru NF- κ B bylo v rámci mého experimentu pomocí metody imunofluorescence zjištěno, že žádná ze sledovaných látek neměla výrazný vliv na inhibici aktivace tohoto transkripčního faktoru. V buňkách byl pozorován aktivovaný NF- κ B přítomný v jádře, a to v případě ovlivnění všemi protizánětlivými léčivy (30 min), které byly při experimentu použity. Jedinou výjimkou byly, dle očekávání, neovlivněné negativní kontrolní buňky (K-). Tato metoda byla provedena na buněčné linii epitelových buněk HeLa odvozené od karcinomu děložního hrdla.

V literatuře je možné najít informace, kdy nesteroidní antiflogistika potlačují indukci NF- κ B v buněčných liniích karcinomu tlustého střeva, a to mechanismem inhibice aktivity kinázy IKK β , která je potřebná k aktivaci dráhy NF- κ B (Yamamoto et al., 1999). Nelze však jednoznačně říct, zda výsledek experimentu odpovídá výsledkům z odborné literatury, jelikož experiment mé bakalářské práce probíhal na epitelových buňkách Hela, odvozených od karcinomu děložního hrdla a endotelových buňkách pupečnickové žíly HUVEC, zatímco citovaný výzkum probíhal na buněčných liniích karcinomu tlustého střeva.

6. Závěr

V této bakalářské práci byla studována a porovnáována protizánětlivá aktivita vybraných léčiv (prednisolon, dexamethason, testosteron, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, nimesulid) na endotelových buňkách HUVEC *in vitro* a v případě metody imunofluorescence na epitelových buňkách HeLa, odvozených od karcinomu děložního hrdla. Tyto buňky byly ovlivněny zmíněnými léčivy v daných koncentracích (všechny látky kromě dexamethasonu = 10 μ M, dexamethason = 1 μ M) po dobu 30 minut (pre-treatment). Taktéž byla v buňkách indukována sekrece mediátorů zánětu ovlivněním buněk cytokinem TNF α po dobu 24 hodin nebo 30 minut. Aktivita těchto látek byla zkoumána na množství proteinů regulujících zánět (tzv. mediátorů zánětu), a to COX-2, I-KB α , pI-KB α , IL-6, GR, pGR, pNFkB, pIKK α/β , IKK α , TNFR1.

Experimentální část byla provedena za použití tří experimentálních metod, a to WB, ELISA a imunofluorescence za účelem zjištění protizánětlivé aktivity a vlivu vybraných látek na zkoumané mediátory zánětu v endotelových buňkách. Z výsledků metody WB je patrné, že exprese protizánětlivých léčiv se liší v závislosti na zvoleném času ovlivnění buněk cytokinem TNF α . Pro většinu látek byla však pozorována jednoznačná aktivita nasvědčující inhibici aktivity transkripčního faktoru NF- κ B, alespoň částečnou inhibici degradace proteinu I κ B α .

Při stanovení výsledků metody ELISA, bylo zjevné, že významný vliv na hladinu IL-6 v kultivačním médiu endotelových buněk měl ze všech sledovaných léčiv pouze androgenní hormon testosteron. To bylo pravděpodobně zapříčiněno vztahem testosteronem aktivovaného androgenového receptoru a cytokinu IL-6.

Posledním provedeným experimentem byla metoda imunofluorescence. Tato metoda byla provedena na epitelových buňkách HeLa odvozených od karcinomu děložního hrdla. Při pozorování aktivace a translokace transkripčního faktoru NF- κ B do jádra nebylo možné detekovat zjevnou inhibici aktivace transkripčního faktoru u žádného ze zkoumaných protizánětlivých léčiv.

Nejpodstatnějšími výsledky mé bakalářské práce jsou za prvé detekovaná indukce sekrece cytokinu IL-6 (možná prozánětlivá aktivita) androgenního hormonu testosteron v endotelových buňkách HUVEC indukovaných TNF α , jež může souviset s aktivací AR cytokinem IL-6. Za druhé je to výrazná protizánětlivá aktivita syntetického kortikosteroidu prednisolon, jež na endotelových buňkách HUVEC indukovaných TNF α , vykazoval účinky ovlivňující imunitní odpověď v buňce, zvláště pak signální dráhu transkripčního faktoru NF- κ B.

Výsledky mohou posloužit jako doprovodná informace při dalších studiích protizánětlivé aktivity léčiv, či při zkoumání vybraných mediátorů zánětu. Studie jsou

prováděny za účelem zvýšení efektivity nebo redukce vedlejších účinků léčiv, zvláště pak u kortikosteroidů, jejichž vedlejší účinky mohou představovat při dlouhodobém užívání vážné zdravotní problémy. Takové studie jsou atraktivní vzhledem k významnému postavení zánětu jako patologického stavu v medicíně. Vývoj léčiv předcházejících nebo symptomaticky řešících zánětlivý stav, zvláště pak ten chronický představují velice perspektivní oblast výzkumu, a to jak z vědeckého, tak i finančního hlediska.

7. Použitá literatura

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1605-21.

Aggarwal BB, Schwarz L, Hogan ME, Rando RF. Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res.* 1996 Nov 15;56(22):5156-64.

Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 15;15(2):425-30.

Ahmed N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2005 Oct 31;4:17.

Akira S, Kishimoto T. The evidence for interleukin-6 as an autocrine growth factor in malignancy. *Semin Cancer Biol.* 1992 Feb;3(1):17-26.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Blood vessels and endothelial cells. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science 2002.

Appleton I, Tomlinson A, Mitchell JA, Willoughby DA. Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future antiinflammatory therapy. *J Pathol* 1995; 176:413–420

Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Wittert GA. Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(10):3007–3019.

Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 2001; 29: 247–278.

Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev.* 1998 Dec;50(4):515-96.

Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev.* 2004 Dec;56(4):515-48.

Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann. Intern. Med.* 2003; 139, 359–370.

Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. A mechanism of corticosteroid resistance in COPD: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* 2004; 363, 731–733.

Basak S, Behar M, Hoffmann A. Lessons from mathematically modeling the NF- κ B pathway. *Immunol. Rev.* 2012; 246, 221–238.

Bazzoni G, Martinez Estrada O, Dejana E, Schnittler HJ. Molecular structure and functional role of vascular tight junctions. *Trends Cardiovasc Med.* 1999; 9:147–152.

Beg AA, Baldwin AS. Jr. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes Dev.* 1993; 7, 2064–2070.

Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13, 3301–3310.

- Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 1995; 95:2886–2895.
- Berg K, Langaas M, Ericsson M, Pleym H, Basu S, Nordrum IS, Vitale N, Haaverstad R. Acetylsalicylic acid treatment until surgery reduces oxidative stress and inflammation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Jun;43(6):1154-63.
- Bevilacqua M, Vago T, Baldi G, Bertora P, Chebat E, et al. Nimesulide inhibits cyclic nucleotide specific phosphodiesterase (PDE; Type IV) in human neutrophils: a clue for its inhibitory effect on O₂ production? Abstract. 4th Interscience World Conference on Inflammation, Geneva, 1991 April; 15-18.
- Bevilacqua M, Vago T, Beretta A. Nimesulide is an inhibitor of superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. In Genezzani et al. (Eds) Pain and reproduction, Parthenon Publishing Group, New Jersey 1988; pp. 265-272.
- Bhatt DL. Anti-inflammatory agents and antioxidants as a possible "third great wave" in cardiovascular secondary prevention. *Am J Cardiol*. 2008 May 22;101(10 A):4D-13D.
- Bianchi VE. The Anti-Inflammatory Effects of Testosterone. *J Endocr Soc*. 2018 Oct 22;3(1):91-107.
- Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020 Oct; 180:114147.
- Blank V, Kourilsky P, Israël A. NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem. Sci*. 1992; 17, 135–140.
- Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, Lundberg Giwercman Y, Giwercman A. Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. *PLoS One*. 2013;8(4): e61466.
- Bodwell JE, Orti E, Coull JM, Pappin DJ, Smith LI, Swift F. Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1991; 266:7549–7555
- Bratt J, Heimbürger M. Prednisolone interferes with neutrophil adhesion and neutrophil mediated endothelial injury. *Scand J Rheumatol*. 1999; 28(5):308-13.
- Brockman, J. A. et al. Coupling of a signal response domain in I κ B to multiple pathways for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol*. 1995; 15, 2809–2818.
- Budoff PW. Use of mefenamic acid in the treatment of primary dysmenorrhea. *JAMA*. 1979 Jun 22;241(25):2713-6.
- Buchman AL. Side effects of corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol*. 2001 Oct;33(4):289-94.
- Burns MP, DePaola N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H194-204.
- Busson M. Update on ibuprofen: review article. *J Int Med Res*. 1986;14(2):53-62.
- Capsoni F, Venegoni E, Minonzio F, Ongari AM, Maresca V, et al. Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by nimesulide. *Agents and Actions*, 1987, 21: 121-129.
- Cenciarini M, Valentino M, Belia S, Sforza L, Rosa P, Ronchetti S, et al. Dexamethasone in glioblastoma multiforme therapy: mechanisms and controversies. *Front Mol Neurosci*. 2019; 12:65.

Coghlan, MJ, Elmore SW, Kym PR, Kort ME. The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003; 3 (14), 1617–1635.

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF κ B and cytokine inducible enhancers. *FASEB Journal* 1995; 9, 899–909.

Culig Z, Pühr M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Sep 5;360(1-2):52-8.

D'Acquisto F, Iuvone T, Rombola Y, Sautebin L, Di Rosa M, Carnuccio R. Involvement of NF κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett.* 1997; 418, 175–178.

Dalman FC, Sanchez ER, Lin AL, Perini F, Pratt WB. Localization of phosphorylation sites with respect to the functional domains of the mouse L cell glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1988; 263:12259–12267

Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 10;23(2):254-66.

Dapino P, Ottonello L, Dallegrì F. The anti-inflammatory drug nimesulide inhibits neutrophil adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells. *Respiration.* 1994; 61(6):336-41.

Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet.* 1998; 34:101–154.

Davis R, Brogden RN. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1994; 48:431–54.

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB* 1995; J 9:910–918.

Dejana E. Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996; 98:1949–1953.

Dembinski HE. et al. Functional importance of stripping in NF κ B signaling revealed by a stripping-impaired I κ B α mutant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2017; 114, 1916–1921.

Dhalla IA, Gomes T, Mamdani MM, Juurlink DN. Opioids versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs in noncancer pain. *Can Fam Physician.* 2012 Jan;58(1):30.

Di Stasi V, Rastrelli G, Inglese F. et al. Higher testosterone is associated with increased inflammatory markers in women with SARS-CoV-2 pneumonia: preliminary results from an observational study. *J Endocrinol Invest* 45, 2022; 639–648.

Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J.* 2002 Sep;20(3):556-63.

Di Donato JA. et al. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16, 1295–1304.

- Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):935-50.
- Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (13), 7358–7366.
- Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P, Pratt WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor. hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (34), 21213–21220.
- Estrov Z, Kurzrock R, Pocsik E, Pathak S, Kantarjian HM, Zipf TF, Harris D, Talpaz M, Aggarwal BB. Lymphotoxin is an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-infected B cell lines. *J Exp Med.* 1993 Mar 1; 177(3):763-74.
- Ferreri NR, An SJ and McGiff JC. Cyclooxygenase-2 expression and function in the medullary thick ascending limb. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: F360-F368.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 16737-16740.
- Gasparini C, Feldmann M. Nf-Kappab as a Target for Modulating Inflammatory Responses. *Curr. Pharm. Design.* 2012; 18:5735–5745.
- Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 Years of Nf-Kappab Research. *Immunol. Rev.* 2012; 246:5–13.
- Giles AJ, Hutchinson MND, Sonnemann HM, Jung J, Fecci PE, Ratnam NM, Zhang W, Song H, Bailey R, Davis D, Reid CM, Park DM, Gilbert MR. Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2018 Jun 11;6(1):51.
- Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet* 2001; 358: 24–29.
- Gilmore TD, Morin PJ. The I κ B proteins: members of a multifunctional family. *Trends Genet.* 1993; 9, 427–433.
- Gimbrone MA Jr. Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb.* 1976; 3:1-28.
- Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):14008-14.
- Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* 1995; 268, 522–523.
- Goldberger A, Middleton KA, Oliver JA, Paddock C, Yan HC, DeLisser HM, Albelda SM, Newman PJ. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J Biol Chem.* 1994 Jun 24;269(25):17183-91.
- Goldlust MB, Rich LC. Chronic immune synovitis in rabbits. II. Modulation by anti-inflammatory and anti-rheumatic agents. *Agents Actions.* 1981 Dec;11(6-7):729-35.
- Gupta A, Bah M. NSAIDs in the Treatment of Postoperative Pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2016 Nov;20(11):62.

- Hall J, Pugh PJ, Jones RD, Corlett G, Channer KS, Jones TH. Testosterone and pro-inflammatory cytokines in men with chronic heart failure. *Endocrine Abstracts*. 2002; 3:350.
- Haring R, Baumeister SE, Volzke H, Dörr M, Kocher T, Nauck M, Wallaschofski H. Prospective inverse associations of sex hormone concentrations in men with biomarkers of inflammation and oxidative stress. *J Androl*. 2012; 33(5):944–950.
- Haring R, Volzke H, Steveling A, Krebs A, Felix SB, Schöfl C, Dörr M, Nauck M, Wallaschofski H. Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20-79. *Eur Heart J*. 2010; 31(12):1494–1501.
- Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1585-92.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* 2004; 103: 147-166.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the First Quarter-Century: Remarkable Progress and Outstanding Questions. *Genes Dev*. 2012; 26:203–234.
- Heimbürger M, Lärfors G, Bratt J. Prednisolone inhibits cytokine-induced adhesive and cytotoxic interactions between endothelial cells and neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol*. 2000 Mar;119(3):441-8.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990; 265: 621–636.
- Helmerson J, Vessby B, Larsson A, Basu S. Cyclooxygenase-mediated prostaglandin F₂alpha is decreased in an elderly population treated with low-dose aspirin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Apr;72(4):227-33.
- Henkel, T. et al. Rapid proteolysis of I κ B- α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature* 1993; 365, 182–185.
- Henry D, Lim LL, Garcia Rodriguez LA, Perez Gutthann S, Carson JL, Griffin M, Savage R, Logan R, Moride Y, Hawkey C, Hill S, Fries JT. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ*. 1996 Jun 22;312(7046):1563-6.
- Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1992 Aug 15;89(16):7384-8.
- Hoffmann, A, Leung TH. Genetic analysis of NF κ B/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J*. 2003; 22, 5530–5539.
- Hoffmann, A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002; 298, 1241–1245.
- Hosie G, Bird H. The topical NSAID felbinac versus oral NSAIDs: a critical review. *Eur J Rheumatol Inflamm*. 1994; 14(4):21-8.
- Hudson, WH, Youn C, Ortlund EA. The structural basis of direct glucocorticoid mediated transrepression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013; 20, 53–58.

Hutchison KA, Czar MJ, Pratt WB. Evidence that the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor directly represses DNA binding activity in a major portion of receptors that are “misfolded” after removal of hsp90. *J Biol Chem.* 1992; 267:3190–3195.

Chen T, Zhang X, Zhu G, Liu H, Chen J, Wang Y, He X. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine (Baltimore).* 2020 Sep 18;99(38): e22241.

Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kishimoto T, Takatsuki F, Akiyama Y. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* 74: 1989; 1241–1244.

Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1024:86–101.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Jul;287(1):G7-17.

Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, Myers JN, Lin XL, Darnay BG, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1- IKK pathway mediates constitutive NF- κ B activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2007 Mar 1;26(10):1385-97.

Jiang DQ, Liu H, Zhang SB, Zhang XL. Aspirin inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated fractalkine expression in human umbilical vein endothelial cells. *Chin Med J (Engl).* 2009 May 20; 122(10):1147-53.

Johnson DB, Lopez MJ, Kelley B. Dexamethasone. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 May 15.

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 9049–9054.

Joost Brinks, Elon HC, van Dijk, Mahmoud Habeeb, Aikaterini Nikolaou, Roula Tsonaka, Hendrika A. B. Peters, Hetty C. M. Sips, Arjanneke F. van de Merbel, Eiko K. de Jong, Robbert G. E. Notenboom, Szymon M. Kielbasa, Silvère M. van der Maarel, Paul H. A. Quax, Onno C. Meijer, Camiel J. F. Boon; The Effect of Corticosteroids on Human Choroidal Endothelial Cells: A Model to Study Central Serous Chorioretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59(13):5682-5692.

Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 1996 Nov;106(2):410-5.

Kandhaya-Pillai R, Yang X, Tchkonja T, Martin GM, Kirkland JL, Oshima J. TNF- α /IFN- γ synergy amplifies senescence-associated inflammation and SARS-CoV-2 receptor expression via hyper-activated JAK/STAT1. *Aging Cell.* 2022 Jun;21(6):e13646.

Kapiotis S, Sengoelge G, Sperr WR, Baghestanian M, Quehenberger P, Bevec D, Li SR, Menzel EJ, Mühl A, Zapolska D, Virgolini I, Valent P, Speiser W. Ibuprofen inhibits pyrogen-dependent expression of VCAM-1 and ICAM-1 on human endothelial cells. *Life Sci.* 1996; 58(23):2167-81.

Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J; Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet.* 2010; 375(9709):132–140.

- Kauppi, B, Jakob C, Farnegardh M. et al. The threedimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278, 22748–22754.
- Kniss DA. Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology – The role of estradiol and progesterone. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 1999; 6: 285–292.
- Komaki Y, Yamada A, Komaki F, Kudravalli P, Micic D, Ido A, Sakuraba A. Efficacy, safety and pharmacokinetics of biosimilars of anti-tumor necrosis factor- α agents in rheumatic diseases; A systematic review and meta-analysis. *J Autoimmun.* 2017 May; 79:4-16.
- Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG and Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 56: S57-73.
- Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265, 956-959.
- Krstic MD, Rogatsky I, Yamamoto KR. et al. Mitogen-activated and cyclin dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 1997; 17, 3947–3954.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 12866–12872.
- Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 1999; 64 (5), 310–319
- Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the Nterminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 2003; 17 (1), 1–10.
- Kurth F, Luders E, Sicotte NL, Gaser C, Giesser BS, Swerdloff RS, Montag MJ, Voskuhl RR, Mackenzie-Graham A. Neuroprotective effects of testosterone treatment in men with multiple sclerosis. *Neuroimage Clin.* 2014; 4:454–460.
- Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb 1;52(3):556-592.
- Langendorf EK, Rommens PM, Drees P, Ritz U. Dexamethasone Inhibits the Pro-Angiogenic Potential of Primary Human Myoblasts. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 26;22(15):7986.
- Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(3):771-80.
- Lee K-Y, Barnes PJ, Adcock IM. NF-kB and AP-1 response elements and the role of histone modifications in IL-1-induced TGF- β 1 gene transcription. *J. Immunol.* 2006; 176, 603–615.
- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1175-83.
- Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 6843–6848.

- Logie JJ, Ali S, Marshall KM, Heck MM, Walker BR, Hadoke PW. Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration. *PLoS One*. 2010 Dec 31;5(12):e14476.
- Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med*. 1993 May 1;177(5):1277-86.
- Maggio M, Basaria S, Ble A, Lauretani F, Bandinelli S, Ceda GP, Valenti G, Ling SM, Ferrucci L. Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(1):345–347.
- Majno G. The healing hand. Man and wound in the ancient world. *Med Hist*. 1976 Oct;20(4):461.
- Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu. Rev. Immunol*. 2004; 22, 431–456.
- McEver, RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2002; 14, 581–586.
- Medzhitov R. Inflammation: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):771-6.
- Mehta SR. Aspirin for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2009 Mar 17;150(6):414-6.
- Meroni PL, Valentini G, Ayala F, Cattaneo A, Valesini G. New strategies to address the pharmacodynamics and pharmacokinetics of tumor necrosis factor (TNF) inhibitors: A systematic analysis. *Autoimmun Rev*. 2015 Sep;14(9):812-29.
- Meßmer UK, Winkel G, Briner VA, Pfeilschifter J. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor- α -and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *British journal of pharmacology*, 127(7), 1999; 1633-1640.
- Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res*. 2004 Mar 1;61(4):671-82.
- Montinari MR, Minelli S, De Caterina R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascul Pharmacol*. 2019 Feb;113:1-8.
- Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Role of nuclear factor kappaB in synovial inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. 2002 Jun;4(3):201-7.
- Muscella A, Marsigliante S, Carluccio MA, Vinson GP, Storelli C. et al. *J Endocrinol* 1997;155(3):587–593.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1271–1276.
- Nennig SE, Schank JR. The Role of NFkB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol*. 2017 Mar 9;52(2):172-179.
- Nielson CP, Vestal RE, Sturm RJ, Heaslip R. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1990; 86: 801-808.

- Newton R, J Seybold, LM Kuitert, M Bergmann, PJ Barnes. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:32312–32321.
- O’Dea E, Hoffmann A. NF- κ B signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2009; 1, 107-115.
- Okitsu K, Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Ray RB, Chang C, Yokosuka O. Involvement of interleukin-6 and androgen receptor signaling in pancreatic cancer. *Genes Cancer.* 2010 Aug;1(8):859–67.
- Ong CK, Lirk P, Tan CH, Seymour RA. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Med Res.* 2007 Mar;5(1):19-34.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18, 6853–6866.
- Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev.* 2006; 2(2):93-102.
- Park WB, Kim SH, Cho JH, Bang JH, Kim HB, Kim NJ, Oh MD, Choe KW. Effect of salicylic acid on invasion of human vascular endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Feb;49(1):56-61.
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003; 111(12): 1805–1812.
- Peter S, Beglinger C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion.* 2007; 75(1):25-35.
- Picard D, Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab.* 2006; 17:229–235.
- Picard D, Khursheed B, Garabedian MJ, Fortin MG, Lindquist S, Yamamoto KR. Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 1990; 348:166–168.
- Pickup ME. Clinical Pharmacokinetics of Prednisone and Prednisolone. *Clin-Pharmacokinet* 1979; 4, 111–128.
- Pohjolainen T, Jekunen A, Autio L, Vuorela H. Treatment of acute low back pain with the COX-2-selective anti-inflammatory drug nimesulide: results of a randomized, double-blind comparative trial versus ibuprofen. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000 Jun 15;25(12):1579-85.
- Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews,* 1997; 18, 306–360.
- Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440:653–666. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 91:2046–2050.
- Rainsford K. Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. In: et al. *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases. Subcellular Biochemistry* 2007; vol 42. Springer, Dordrecht.
- Rajmani RS, Gupta SK, Singh PK, Gandham RK, Sahoo AP, Chaturvedi U, Tiwari AK. HN protein of Newcastle disease virus sensitizes HeLa cells to TNF- α -induced apoptosis by downregulating NF- κ B expression. *Arch Virol.* 2016 Sep;161(9):2395-405.

Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *New Engl. J. Med.* 2005; 353, 1711–1723.

Römer D. Pharmacological evaluation of mild analgesics. *Br J Clin Pharmacol.* 1980 Oct;10 Suppl 2(Suppl 2):247 S-251 S.

Roos D. The respiratory burst of phagocytic leukocytes. *Drug Investigation* 3 (Suppl.2): 1991; 48-53.

Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B. Regulation of androgen action. *Vitam Horm.* 1999; 55:309-52.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. *Endocrine Reviews*, 2000; 21, 55–89.

Segnitz B, Gehring U. The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem.* 1997; 272:18694–18701.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 2005; 6, 1191–1197.

Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol.* 2005 Sep 1;70(5):700-13.

Scheinman R I, PC Cogswell, AK Lofquist, AS Baldwin Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 1995; 270:283–286.

Schnittler HJ. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 1998; 93:30–39.

Schudt C, Winder S, Forderkunn S, Hatzelmann A, Ulbrich V. Influence of selective phosphodiesterase inhibitors on human neutrophils functions and levels of cAMP and Cai. *NaunynSchmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1991; 344: 682-690.

Sinclair M, Grossmann M, Angus PW, Hoermann R, Hey P, Scodellaro T, Gow PJ. Low testosterone as a better predictor of mortality than sarcopenia in men with advanced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016; 31(3):661–667.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996; 271, 33157–33160.

Soderquist B, Alriksson I, Kallman J & Kihlstrom E. The influence of adhesive and invasive properties of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins on secretion of interleukin-6 by human endothelial cells. *APMIS*, 2006; 114:112–116.

Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007; 275, 71–78.

Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 2011; 21: 71–85.

Taosheng Chen, Li Hua Wang, William L. Farrar; Interleukin 6 Activates Androgen Receptor-mediated Gene Expression through a Signal Transducer and Activator of Transcription 3-dependent Pathway in LNCaP Prostate Cancer Cells1. *Cancer Res* 15 April 2000; 60 (8): 2132–2135.

- Tazawa R, Xa XM, Wu KK, Wang LH. Biochemical characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin h synthase-2 gene. *Biophys. Res. Commun.* 1994; 203: 190–199.
- Tomlinson A, Appleton I, Moore AR, Gilroy DW, Willis D, Mitchell JA, Willoughby DA. Cyclo - oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br J Pharmacol* 1994; 113:693–698
- Traenckner EB. et al. Phosphorylation of human I κ B on serines 32 and 36 controls I κ B proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995; 14, 2876–2883.
- Tremellen K, McPhee N, Pearce K, Benson S, Schedlowski M, Engler H. Endotoxin-initiated inflammation reduces testosterone production in men of reproductive age. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018 Mar 1;314(3):E206-E213.
- Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang HJ, Takenaka H, Tsuchiya T, Mori M, Mizushima T. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2004 Sep;11(9):1009-16.
- Ueda T, Bruchovsky N, Sadar MD. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7076-85. doi: 10.1074/jbc.M108255200. Epub 2001 Dec 19.
- Vago T, Bevilacqua M, Norbiato. Effect of nimesulide action time dependence on selectivity toward prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase activity. *Drug Res* 1995; 45:1096–98.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Mar 15;91(6):2046-50.
- Vestweber D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* 2000; 190:281–291.
- Vestweber, D. Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33, 1361–1364.
- Vethe NT, Midtvedt K, Asberg A, Amundsen R, Bergan S. "[Drug interactions and immunosuppression in organ transplant recipients]". *Tidsskrift for den Norske Laegeforening.* 2011; 131 (20): 2000–3.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine* 1989; 320: 365-376.
- Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am. J. Physiol.* 1996; 270: G393-400.
- Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr 21;91(8):675-90.
- Von Langen J, Fritzeimer KH, Diekmann S, Hillisch A. Molecular basis of the interaction specificity between the human glucocorticoid receptor and its endogenous steroid ligand cortisol. *Chembiochem.* 2005 Jun;6(6):1110-8.
- Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B, Rao Z. 3D structure of human FK506- binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101, 8348–8353.

- Xie Y, Yu D, Wu J, Li L. Protective effects of physiological testosterone on advanced glycation end product-induced injury in human endothelial cells. *Mol Med Rep*. 2017 Mar;15(3):1165-1171.
- Yamagata K, Andreasson KA, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371–386.
- Yamamoto Y, Ishizu A, Ikeda H, Otsuka N, Yoshiki T. Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor-alpha. *Pathobiology*. 2004; 71(6):295-301.
- Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF- κ B pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(38), 27307-27314.
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; 396, 77–80.
- Zapolska-Downar D, Naruszewicz M, Zapolski-Downar A, Markiewski M, Bukowska H, Millo B. Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and non-smokers. *Eur J Clin Invest*. 2000 Nov;30(11):1002-10.
- Zhang W, DeMattia JA, Song H, Couldwell WT. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J Neurosurg*. 2003 Apr;98(4):846-53.
- Zhang X, Wang L, Dou Y, Zhao J, Jiang T, Qiao Z, Qiao J. Testosterone and estradiol modulate TNF alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002 Apr;24(3):125-30.
- Zilliacus J, Wright AP, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol*. 1995 Apr;9(4):389-400.