

Biologická fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích



**VLIV 7-OXO-DEHYDROEPIANDROSTERONU NA
SPOTŘEBU KYSLÍKU IZOLOVANÝCH LIDSKÝCH
LEUKOCYTŮ (PBMC)**

Bakalářská diplomová práce

Kristýna Štefková

2007

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ladislav Janský, DrSc

Bakalářská diplomová práce

Štefková K., 2007: Vliv 7-oxo-dehydroepiandrosteronu na spotřebu kyslíku izolovaných lidských leukocytů. [Effect of 7-oxo-dehydroepiandrosterone on oxygen consumption of human PBMC. Bc. Thesis, in Czech.] – 28p.

Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Effect of 7-oxo-dehydroepiandrosterone (7-oxo-DHEA) on resting and noradrenaline stimulated oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), isolated by gradient centrifugation, was studied using Clark oxygen electrode. It was found that, the 7-oxo-DHEA in concentration 10 $\mu\text{mol/l}$ has a thermogenic effect and increase resting metabolic rate of PBMC by more than 80 %. Oxygen consumption stimulated by noradrenaline was potentiated by 7-oxo-DHEA in concentration 0,1 $\mu\text{mol/l}$ by 39 %.

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

.....
Kristýna Štefková

V Českých Budějovicích 6.5.2007

Poděkování

Ráda bych na této stránce poděkovala všem lidem, kteří mi pomohli k uskutečnění této práce. Miladě Zemanové za darování krve, Mgr. Janu Okrouhlíkovi za cenné rady při práci v laboratoři a v neposlední řadě mému školiteli prof. Ladislavu Janskému za vedení v průběhu celé mé práce.

Obsah

1	ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
1.1	Hormonální termogeneze	6
1.1.1	Třesová termogeneze.....	6
1.1.2	Hormonální (netřesová) termogeneze	6
1.1.2.1	<i>Hormonální termogeneze u zvířat</i>	6
1.1.2.2	<i>Hormonální termogeneze u lidí</i>	7
1.1.2.3	<i>Receptory pro katecholaminy</i>	7
1.1.2.4	<i>Lokalizace mechanismu působení hormonální termogeneze</i>	7
1.1.2.5	<i>Metody měření hormonální termogeneze</i>	8
1.2	Steroidní termogeneze	8
1.2.1	Termogenní účinek různých hormonů	8
1.2.2	Dehydroepiandrosteron (DHEA)	9
1.2.2.1	<i>7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA)</i>	11
1.3	Cíl práce.....	11
2	MATERIÁL A METODY	12
2.1	Materiál a jeho odběr	12
2.2	Izolace lidských leukocytů (PBMC).....	12
2.3	Kultivace buněk (PBMC)	12
2.4	Stanovení počtu leukocytů (PBMC).....	13
2.5	Měření spotřeby kyslíku	13
2.5.1	Popis měřícího vybavení	13
2.5.1.1	<i>Clarkova kyslíková elektroda</i>	13
2.5.1.2	<i>Měřící komůrka</i>	13
2.5.1.3	<i>Převodník napětí</i>	13
2.5.1.4	<i>Registrační zařízení - datalogger</i>	14
2.5.2	Princip měření spotřeby kyslíku.....	14
2.5.3	Kondicionování elektrody	15
2.5.4	Kalibrace	15
2.5.5	Průběh vlastního měření.....	16
2.6	Zpracování naměřených dat.....	16
2.7	Nedostatky měření	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY	18

3.1	Klidová spotřeba kyslíku lymfocytů (PBMC) měřená Clarkovou kyslíkovou elektrodou.....	18
3.2	Ovlivnění spotřeby kyslíku PBMC použitím 7-oxo-DHEA.....	19
3.2.1	Vliv doby inkubace na klidovou spotřebu kyslíku PBMC.....	19
3.2.2	Vliv různých koncentrací 7-oxo-DHEA na klidovou spotřebu kyslíku PBMC.	20
3.2.3	Vliv různých koncentrací 7-oxo-DHEA na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC	22
4	DISKUZE.....	23
5	ZÁVĚR.....	25
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	26

1 ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Hormonální termogeneze

Při vystavení homoiotermního organismu chladu klesá jeho tělesná teplota. Organismus se proto snaží zabraňovat ztrátám tepla a znovu ustanovit teplotní rovnováhu mezi tělem a vnějším prostředím, což znamená, že usiluje o to, aby nedošlo k podchlazení a tělesná teplota zůstala stálá. Tepelné ztráty z těla jsou kompenzovány třesovou a netřesovou (hormonální) termogenezí.

1.1.1 Třesová termogeneze

Při třesové termogenezi dochází ke krátkým kontrakcím kosterní svaloviny, což vede ke tvorbě tepla. Třes je hlavní mechanismus obrany proti chladu. Schopnost třesové produkce mají skoro všechny svaly v těle, kromě svalů lícních, okulárních, rektálních a svalů středního ucha.

1.1.2 Hormonální (netřesová) termogeneze

Hormonální termogeneze (HT) není založena na kontrakcích svaloviny, ale na termogenním účinku hormonů. Může být rozdělena do dvou skupin: obligatorní a fakultativní. Obligatorní HT je nezbytná pro život všech buněk těla a může být definována také jako velikost klidového metabolismu. Hlavní hormonální modulátory obligatorní termogeneze jsou thyroïdní hormony.

Fakultativní termogeneze je řízena působením katecholaminů, především noradrenalinu, který je vyléván z nervových zakončení sympatického nervového systému. Obligatorní HT zahrnuje produkci tepla všech orgánů a tkání těla, zatímco fakultativní HT může být rychle zapnuta nebo vypnuta jako reakce na aktuální situaci (Hampl a ost.,2005). HT je aktivovaná dříve než dojde ke třesu, vstupuje v činnost bezprostředně pod termoneutrální zónou (u nahých lidí teplota kolem 28 °C), představuje tedy první linii obrany proti chladu (Janský, 1994a).

1.1.2.1 Hormonální termogeneze u zvířat

U zvířat je hormonální termogeneze indukovaná katecholaminy (zejména noradrenalinem a adrenalinem). HT je produkována buňkami hnědé tukové tkáně (BAT), která je umístěna mezi lopatkami, v axile a podél páteře. BAT má více než stokrát větší kapacitu produkce tepla než jiné orgány. HT je důležitá u novorozených savců, kdy výskyt hnědého tuku mezi lopatkami umožňuje rychlé prohřátí mozku. Intenzita HT je však

v okamžiku porodu u různých druhů rozdílná. Druhy, které se rodí nezralé např. potkan, mají HT vyvinutou v malé míře. Její vývoj se však stupňuje až k dosažení termoregulační zralosti. Potom intenzita netřesové termogeneze opět klesá. U zvířat, která se rodí ve zralém stavu např. morče a člověk, velikost hormonální termogeneze dosahuje maxima v okamžiku porodu a s postupující hmotností její velikost klesá a u druhů, které jsou těžší než 10 kg, je intenzita netřesové termogeneze noradrenalinového typu velmi malá, až zanedbatelná. U dospělých živočichů může být znovu vyvolána dlouhodobou chladovou adaptací (Janský, 1988; 1994a; 1994b; Janský a Janský, 2002).

1.1.2.2 Hormonální termogeneze u lidí

U lidí byla HT recentně také prokázána. Vzhledem k tomu, že lidé nemají hnědou tukovou tkáň, (úloha hnědého tuku je významná pouze v prvních měsících života), dá se předpokládat, že HT je založena na jiném principu než u zvířat. Předpokládá se, že u lidí probíhá v jiných tkání (buňkách kosterní svaloviny, v adipocytech bílé tukové tkáně a v lymfocytech) (Janský, 1973; 1995). Molekulárně biologická podstata HT u lidí není dosud u lidí přesně známa.

1.1.2.3 Receptory pro katecholaminy

HT noradrenalinového typu se realizuje prostřednictvím α a β adrenergických receptorů. U lidí je HT zprostředkována hlavně β_1 a β_2 adrenoreceptory (Blaak a ost., 1993). Zdá se, že úloha β_1 adrenoreceptorů hraje v HT významnější úlohu než β_2 a α_2 adrenoreceptorů. U zvířat, kde se termogeneze vyskytuje v hnědém tuku, se uplatňují hlavně β_3 a α_1 specifické receptory (Zhao a ost., 1997; 1998).

1.1.2.4 Lokalizace mechanismu působení hormonální termogeneze

V hnědé tukové tkáni je obcházena tvorba ATP, je odpřažena oxidace od fosforylace. Noradrenalin prostřednictvím membránových beta-adrenergických receptorů umístěných na membránách tukových buněk vyvolá syntézu cAMP, který aktivuje lipázy hydrolyzující neutrální tuky na glycerol a mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou dále oxidovány beta oxidacemi v mitochondriích. Na vnitřní mitochondriální membráně je umístěna specifická bílkovina, která je označovaná jako uncoupling protein (UCP) neboli termogenin, která funguje jako vodíkový kanál, takže obchází úlohu ATP – syntázy. Nevzniká tedy na energii bohatá molekula ATP, ale energie je uvolňovaná přímo ve formě tepla. Velikost látkové přeměny tedy závisí na dodávce substrátu (volných mastných kyselin) a ne na koncentraci ADP. V klidové buňce se protonový kanál UCP váže na purinové

nukleotidy. Když dojde k aktivaci mitochondrií volnými mastnými kyselinami, odpojí se termogenin od nukleotidů v membráně mitochondrií, která se tak stane propustnou pro vodíkové ionty (Janský, 1988; 1994a; 1994b; Janský a Janský, 2002; Strunecká a Janský, 2006).

1.1.2.5 Metody měření hormonální termogeneze

Přímé měření velikosti HT je obtížné, poněvadž neexistuje jediná metoda, jak ji přesně kvantitativně změřit. Používají se proto následující metody, které se vzájemně doplňují.

- 1) Měří se produkce tepla nebo spotřeba kyslíku u jedinců vystavených nízkým teplotám těsně pod termoneutrální zónou.
- 2) Blokuje se termogeneze živočichů vystavených mírnému chladu vhodnými farmaky.
- 3) Nejvhodnější metodou pro měření velikosti HT noradrenalinového typu jsou intravenózní injekce stoupajících koncentrací noradrenalinu u savců v termoneutrální zóně. Tímto způsobem je možno sestavit dose-response křivku mezi různými dávkami noradrenalinu a metabolickou odpovědí živočicha a stanovit tak hodnoty odpovídající kapacitě HT (Janský, 1994a).

Studium HT u člověka je komplikováno skutečností, že nelze bez větších potíží využít noradrenalinového testu pro kvantitativní stanovení HT, poněvadž podávání této látky vede k zvýšení krevního tlaku, tachykardii a představuje tudíž určité zdravotní riziko. Z těchto důvodů je v této práci studován účinek termogenních látek in vitro na modelovém systému, jaký představují izolované lidské leukocyty.

Vědecké práce dokazují, že lidské mononukleární leukocyty periferní krve, zejména lymfocyty, mají na svém povrchu hlavně β_2 adrenergní receptory (De Blasi a ost., 1985; Haen a ost., 1991), dále pak α_1 a α_2 adrenergní receptory. (Ricci a ost., 1999; Titinchi a ost., 1984; Goin a ost., 1991). Expres adrenergních receptorů se mění po fyzické zátěži, kde je pozorován nárůst β_2 adrenergních receptorů (Graafsma a ost., 1990).

1.2 Steroidní termogeneze

1.2.1 Termogenní účinek různých hormonů

Vedle noradrenalinu mají termogenní účinek i jiné hormony: adrenalin, thyroïdní hormony, peptidy (glukagon, inzulin, adrenokortikotropní hormon) a steroidní hormony (glukokortikoidy).

- Adrenalin vyvolává termogenní účinek u mnoha druhů obratlovců od žab až po primáty. Zvyšuje produkci tepla prakticky ve všech tělních orgánech. Největší množství adrenalinové termogeneze vzniká především ve svalech.
- Thyroidní hormony působí především na obligatorní termogenezi. Zvyšují klidový metabolismus o 10 – 50 % a působí téměř na všechny orgány v těle s výjimkou mozku. Termogeneze vyvolaná thyroidními hormony je pomalá a obvykle se projeví až po několika hodinách po podání hormonu. Předpokládá se, že účinek thyroidních hormonů spíše vytváří podmínky pro rozvoj termogeneze jiných hormonů, mimo jiné i tím, že stimuluje růst hnědé tukové tkáně.
- Glukagonová termogeneze zvyšuje spotřebu kyslíku o 50 % po 1 hodině po podání glukagonu. Vyskytuje se hlavně u ptáků a je lokalizovaná v kosterní svalovině a játrech.
- Adrenokortikotropní hormon zvyšuje metabolismus u chladově adaptovaných potkanů o 24 %. Termogenní efekt insulínu ve fyziologických koncentracích je malý. U lidí infuze inzulínu metabolismus zvyšovala, ale část této odpovědi (24 – 35 %) se přičítá sympatickému nervovému systému.
- Účinek kortikosteroidů je velmi různorodý. Kortikosteroid zvyšoval spotřebu kyslíku u sýkorky, ale u holuba tento efekt nebyl zaznamenán.

Existuje řada údajů, které naznačují, že se hormony ve svém účinku vzájemně potencují (Svedmyr, 1966a, 1966b). Např. tyroidní hormony zvyšují adrenalinovou a noradrenalinovou termogenezi tím, že zvyšují počet β adrenergních receptorů na membránách buněk. Detailní fyziologické podmínky, za kterých se uplatňuje termogeneze jiných hormonů než katecholaminů, nejsou zatím známy (Janský, 1994a; 1995).

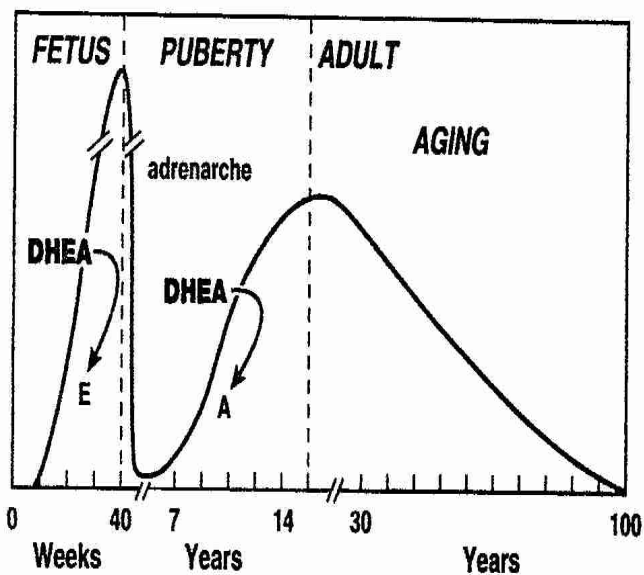
1.2.2 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

DHEA patří mezi androgeny. Spolu s mineralokortikoidy a glukokortikoidy patří do skupiny hormonů, které se syntetizují v kůře nadledvin (Murray a ost., 2002). V kůře nadledvin se ale tvoří jen 50 % DHEA, zbytek pochází z gonád, tukové tkáně a z mozku (Celest a Stárka, 2002). DHEA je považován za silný neuroaktivní steroid (Hampl a ost., 2006).

Prekurzorem DHEA je cholesterol. Cholesterol je přeměněn na pregnenolon, ten dále na 17α -hydroxypregnenolon. 17α -hydroxypregnenolon je v posledním kroku konvertován na DHEA (Murray a ost., 2002). DHEA je vedle cholesterolu nejrozšířenějším

steroidem v lidském těle a je prekurzorem pro všechny pohlavní hormony (Kroboth a ost., 1999).

Člověk má nejvyšší hladinu DHEA ve stádiu zárodka, jeho hladina dramaticky klesá po narození a znovu začíná stoupat mezi 6-8 rokem (období rychlého růstu). Mezi 25 – 30 rokem života dosahuje koncentrace hormonu v krvi vrcholu a poté začíná rovnoměrně klesat asi o 2 % každý rok. Rovnoměrný pokles hladiny hormonu končí mezi 70 – 80 rokem života, kdy hladina dosahuje 10 – 15 % maxima z mládí (obr. 1.1) (Labrie, 2005; Steel, 1999; Arlt a ost., 2001).



Obr. 1.1 DHEA – změny během života

(převzato z Labrie, 2005)

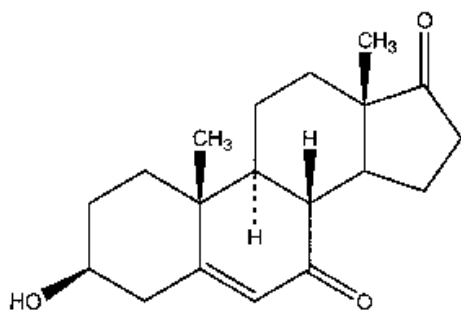
Člověk má mnohem vyšší hladinu DHEA než jakýkoli jiný druh. Dokonce ani ostatní primáti nemají více než 10 % množství, které se obvykle nachází u člověka (Celec a Stárka, 2003).

DHEA je nazýván také „hormonem mládí“ a je znám svými různými blahodárnými účinky. Předpokládá se, že má protirakovinotvorné, protisklerotické, protidiabetické a protiobezitní účinky (Celec a Stárka, 2003). Pokusy na dobrovolnících ukázaly, že po týdenní aplikaci tento steroid příznivě ovlivnil řadu endokrinních parametrů: byly sníženy hladiny testosteronu, estradiolu a „celkového cholesterolu“, zvláště LDL, a zvýšeny hladiny HDL-cholesterolu a lipoproteinů. Zdá se, že všechny pozitivní efekty mají dva základní kořeny: schopnost 7-oxo-DHEA ovlivnit hospodaření s lipidy (kardiovaskulární efekty, obezita, imunita) a schopnost modifikovat činnost mozku (Kasal, 2003).

Dodnes nebyl nalezen specifický receptor pro DHEA, což naznačuje, že je spíše metabolickým prekurzorem, než opravdovým hormonem anebo, že soupeří s jinými hormony o jejich vlastní receptory (Kalimi a Regelson, 2000).

Předpokládá se, že DHEA hraje důležitou roli ve fakultativní termogenezi. DHEA mohónásobně zvyšuje expresi UCP1 v hnědé tukové tkáni a počet β 3 adrenergických receptorů (Hampl et al., 2005).

1.2.2.1 7-oxo-dehydroepiandrosteron (7-oxo-DHEA)



Obr. 1.27-oxo- dehydroepiandrosteron (převzato z Kasal, 2003)

Silného efektu dosahuje metabolit DHEA, který nese skupinu 7-oxo. Celkově se tyto látky nazývají ergosteroidy (látky, které stimulují metabolismus přijaté potravy bez ukládání rezerv) (Kasal, 2003). Hlavní zástupce ergosteroidů je 3 β -hydroxy-5-androstene-7,17-dione (7-oxo-DHEA) (obr. 1.2), který je zastoupen v lidské krvi v subnanomolárních koncentracích (Marwah a ost., 1999).

Po mnoho let byl 7-oxo-DHEA považován za inaktivní metabolit DHEA, ale poslední desetiletí je mu přisuzován silný lokální imunochranný účinek, který je zodpovědný za mnoho imunomodulačních a antiglukokortikoidních účinků, které byly až dosud přisuzovány DHEA (Morfin, 2002).

7-oxo-DHEA je ve svých účincích silnější, než jeho příbuzné steroidy (Lardy et al., 1995). 7-oxo-DHEA vyvolává zvýšení toku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu (Bobyleva et al., 1997), podobně jako thyroïdní hormony (Brand, 1990). Zdá se, že 7-oxo-DHEA má silné termomodulační účinky a ovlivňuje převážně obligatorní termogenezi. Celkově účinek 7-oxo-DHEA, zvláště jeho působení na expresi UCP in vivo, není přesně znám (Hampl a ost., 2005).

V některých zemích je 7-oxo-DHEA dostupný bez předpisu a je prodáván pod obchodní značkou 7-keto DHEA. Výhodou 7-oxo-DHEA je skutečnost, že není v těle konvertován na testosteron a nakonec na estradiol jako je tomu u DHEA, který se tak nehodí k dlouhodobému podávání. (Šulcová et al., 2005). 7-oxo-DHEA byl navržen jako prevence proti Raynaudově nemoci (abnormální vazokonstrikce při odpovědi na chlad) (Ihler a Chami-Stemman, 2003)

1.3 Cíl práce

Vzhledem k tomu, že v literatuře se vyskytují práce (Hampl et. al., 2006), které naznačují, že různé steroidy mohou mít termogenní účinek, bylo mým úkolem za použití izolovaných PBMC prokázat, do jaké míry se 7-oxo-epiandrosteron (7-oxo-DHEA) podílí na termogenním účinku izolovaných leukocytů. Měření byly prováděna Clarkovou kyslíkovou elektrodou. Byly studovány změny ve spotřebě kyslíku lymfocytů po aplikaci různých koncentrací 7-oxo-DHEA. Účinek byl sledován u klidových a noradrenalinem stimulovaných leukocytů.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Materiál a jeho odběr

Odebíráno bylo vždy 24 ml žilní krve z předloktí od zdravých dárců do sterilních heparizovaných zkumavek (Vacuette, Grenier Laborortechnik, Austria). Odběr krve prováděla zdravotní sestra. Krev byla vždy do 20 min zpracována.

2.2 Izolace lidských leukocytů (PBMC)

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

Ve sterilních zkumavkách o objemu 15 ml (GAMA, a.s. České Budějovice) bylo naředěno 6 ml odebrané krve s 6 ml Hanksova roztoku (lékárna VFN, Praha). Do dalších čtyřech sterilních zkumavek bylo napipetováno po 3 ml roztoku Ficoll-Paque (Pharmacia. Uppsala Sweden). Na tento roztok bylo opatrně navrstveno 6 ml zředěné krve tak, aby nedošlo k vzájemnému promíchání vrstev. Poté byly zkumavky vloženy do centrifugy Univerzal 32 R (HETTICH Zentrifugen, Denmark), kde se po dobu 40 minut centrifugovaly při 1200 otáčkách za minutu, při laboratorní teplotě. Po vyjmutí se krev rozdělila do tří vrstev: sediment, supernatant a prstencovou vrstvu mononukleárních buněk, mezi než patří lymfocyty a monocyty. Tato vrstva se nalézala vždy uprostřed sloupce supernatantu. Vzniklý prstenec mononukleárních buněk byl přepipetován do sterilní zkumavky a dvakrát promyt 10 ml Hanksova roztoku při 1200 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Po slítí supernatantu byly získané izolované lymfocyty počítány v Bürkerově komůrce a použity buď k měření spotřeby kyslíku nebo k inkubaci.

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

2.3 Kultivace buněk (PBMC)

Získané vyizolované leukocyty byly inkubovány na destičkách určených ke kultivaci buněk v kultivačním médiu RPMI-1640 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA) obohaceného o penicilin, streptomycin a 10% tepelně inaktivované fetální telecí sérum.

Polovina vzorku sloužila jako kontrola, k druhé polovině byl přidán steroid - 7-oxo-dehydroepiandrosteron o koncentraci 0,1 a 10 $\mu\text{mol/l}$ (dar prof. R. Hampla z Endokrinologického ústavu v Praze). Výše zmíněný steroid jsem obdržela v prášku. Prášek byl rozpuštěn v 1 dílu metanolu a poté bylo přidáno 9 dílů vody. Tímto byl připraven zásobní

roztok, v mém případě o koncentraci 10^6 nmol/l. Kultivace byla prováděna při teplotě 37° C a 3,5% CO₂ v kultivačním termostatu po dobu 24 hodin.

2.4 Stanovení počtu leukocytů (PBMC)

Počet leukocytů byl před každým měření stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Leukocyty se nejdříve nabarvily pomocí trypanové modře (0,5% roztok ve vodě) a poté se počítaly ve 25 čtvercích. Jejich počet byl stanoven pomocí výpočtu:

$$\text{počet buněk ve 25 čtvercích} * 2 * \text{ředění} * 10^4 \text{ objem} = \text{počet buněk / ml}$$

2.5 Měření spotřeby kyslíku

2.5.1 Popis měřícího vybavení

2.5.1.1 Clarkova kyslíková elektroda

Pro měření spotřeby kyslíku byla použita Clarkova kyslíková elektroda (firma RNDr. Viktor Dvořák, Praha, Česká republika). Vlastní tělo sondy se skládá ze dvou elektrod, referenční argent-chloridové anody a platinové katody. Platinová katoda je zatavena ve skleněné trubičce, která na konci odhaluje malou část platiny o průměru 0,2 mm. Na tuto část se nasazuje pomocí kroužku polyetylenová membrána. Membrána odděluje katodu od okolního prostředí, chrání povrch před znečištěním a zajišťuje reprodukovatelné podmínky transportu kyslíku ke katodě. Membrána musí splňovat požadavky jako je: malá permeabilita při vysoké difuzivitě kyslíku, mechanická odolnost, chemická inertnost, nízká permeabilita pro CO₂, H₂O a jiné interferující plyny.

Elektroda je zašroubována do plexisklového pouzdra. Prostor mezi elektrodou a pouzdrem je vyplněn elektrolytem (0,1 M KCl a 0,1 M KHCO₃ v poměru 1:1). Elektrolyt je plněn otvorem v pouzdře elektrody.

2.5.1.2 Měřící komůrka

Vlastní měření probíhá pomocí kyslíkové elektrody v měřící komůrce o objemu 3,6 ml. Komůrka je umístěna ve skleněném plášti, jímž protéká voda o teplotě 37°C, která je ohřívána průtokovým termostatem (Techne TE-10D Tempunit, Cambridge). V komůrce je umístěno míchadélko, poháněné elektromagnetickou míchačkou. Roztoky se přidávaly do měřící komůrky pomocí stříkačky hamilton přes zabroušený uzavírací kohout.

2.5.1.3 Převodník napětí

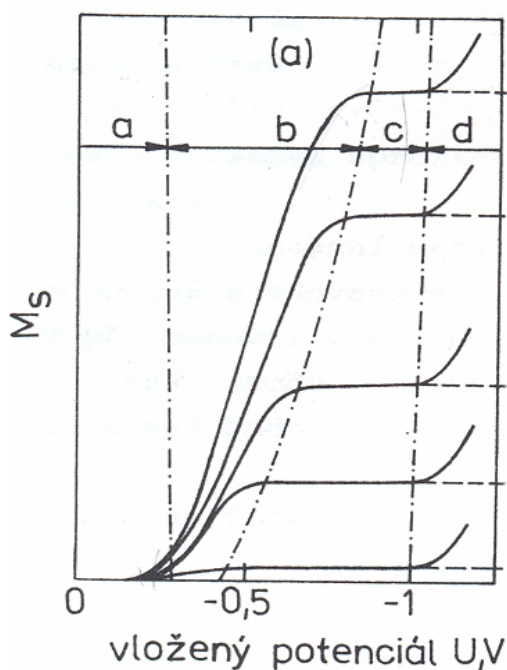
Jedná se o vnější elektronický obvod, který převádí signál z elektrody v podobě elektrického proudu na napětí. Převodník obsahuje tři regulační prvky:

- potenciometr pro nastavení referenčního potenciálu elektrody (v rozmezí 0 až -1200mV)
 - potenciometr pro nastavení zesílení výstupního signálu elektrody
 - potenciometr pro nastavení offsetu výstupního signálu elektrody
- Hodnota referenčního napětí byla zvolena, po proměření polarografické křivky (viz 2.5.2 Princip měření spotřeby kyslíku), na -700 mV.

2.5.1.4 Registrační zařízení - datalogger

Signál z převodníku napětí je přes koaxiální kabel poslán do dataloggeru (firma RNDr. Viktor Dvořák, Praha, Česká republika), kde je 8-bitově digitalizován na číselné hodnoty. Ty jsou následně poslána do počítače a zpracována v datové matici programu DIAdem 8.00.

2.5.2 Princip měření spotřeby kyslíku



Obr. 2.1 Polarogram
(převzato z Linek a ost., 1987)

Měření spotřeby kyslíku je založeno na polarografickém principu. Při vložení vzorku do měřící komůrky začne kyslík membránou difundovat k elektrodě.

Je-li na platinovou katodu vložen dostatečně vysoký záporný potenciál vůči referenční argent-chloridové anodě, rozpuštěný kyslík se na povrchu katody začne redukovat. Následkem toho začne mezi elektrodami procházet proud. Velikost el. proudu je určena dvěma procesy: rychlostí transportu kyslíku z hlavního objemu tekutiny přes membránu k povrchu katody a celkovou stechiometrií katodické redukce kyslíku.

Na obrázku 2.1 je zakreslen polarogram, který vyjadřuje závislost proudu procházejícího mezi elektrodami na vloženém potenciálu. Jsou zde schématicky zakresleny polarogramy pro různé koncentrace kyslíku. Čím je koncentrace látky v okolí polarizovatelné elektrody vyšší, tím je vzestup intenzity proudu větší. V oblasti A je řídicím dějem elektrochemická redukce kyslíku, přitom pokud není dosaženého rozkladného napětí kyslíku, jeho redukce prakticky neprobíhá. Ve smíšené oblasti B je proud určován rychlostí obou procesů ve srovnatelné míře. Rychlost katodické reakce kyslíku záleží na

vloženém potenciálu a na elektrokatalytické aktivě materiálu katody. Se zvyšujícím se potenciálem katody se urychluje elektrochemická redukce kyslíku až do stavu, kdy je vzhledem k rychlosti transportu kyslíku nekonečně rychlá, viz oblast C. Koncentrace kyslíku je pak na povrchu katody nulová, a je tak dosaženo druhé limitní situace, kdy proud je limitován rychlostí difúze kyslíku k povrchu katody. Oblast C je oblastí limitního difúzního proudu (OLDP). Další zvyšování proudu je způsobeno vylučováním vodíku při dosažení rozkladného potenciálu vody, viz. oblast D.

V OLDP je ustálený proud lineární funkcí koncentrace či parciálního tlaku kyslíku v měřeném médiu. Na této úměrnosti je založeno kvantitativní stanovení koncentrace kyslíku. Základním předpokladem smysluplného používání sond je nastavení takových podmínek, aby sonda pracovala v OLDP (Linek a ost., 1987).

2.5.3 Kondicionování elektrody

Před přípravou elektrody bylo tělo sondy vyjmuta z pouzdra. Starý povlak AgCl na povrchu stříbrného drátu byl odstraněn pomocí NH_4OH , vatových tampónů a pinzety. Bylo však nutno postupovat opatrně, aby se mechanicky nepoškodil stříbrný drát. Poté byla elektroda omyta destilovanou vodou a aplikovala se kys. dusičná (ředěná destilovanou vodou v poměru 1:10), aby se zdrsnil povrch anody. Sonda se opláchla destilovanou vodou a ponořila se do zkumavky s redestilovanou vodou s 3 kapkami HCl. Přes noc se aplikoval proud 9,2 mA. Poté se opět sonda opláchla destilovanou vodou, smontovala a naplnila elektrolytem pomocí injekční stříkačky s teflonovou trubičkou na konci jehly. Poté se na konec sondy pomocí kroužku upevnila polyetylenová membrána a elektroda se nechala ekvilibrovat přes noc ve vodě, aby získala stabilitu. Takto připravená sonda je použitelná po dobu několika týdnů.

2.5.4 Kalibrace

Před každým měřením kyslíkovou elektrodou byla provedena kalibrace. Ta se prováděla těsně před a po vlastním měření.

Ke stanovení maximální koncentrace kyslíku byla použita destilovaná voda, která byla intenzivně probublávána vzduchem po dobu nejméně 30 minut pomocí akvarijní vzduchovací pumpy.

Ke stanovení nulové koncentrace kyslíku byly použity dvě metody, jejíž výstupy nebyly vždy srovnatelné. Jako první možnost byla použita destilovaná voda, která byla intenzivně probublávána plynným N_2 po dobu nejméně 30 minut. Druhou možností je přidání dithioničitanu sodného do měřeného média. Ten reaguje s rozpuštěným kyslíkem podle

vzorce: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ následkem čehož je kyslík v komůrce spotřebován. Dle vlastní zkušenosti považují druhou metodu za přesnější.

Vlastní měření bylo provedeno tak, že se do komůrky přidala nasycená voda vzduchem nebo plynným N_2 (případně přidán dithioničitan), po 3 – 5 minutách se výstupní napětí ustálilo na nové hodnotě. Takto určené hodnoty byly použity pro dvoubodovou kalibraci.

Z hodnot dvoubodové kalibrace byl sestrojen graf časového průběhu a s pomocí programu MS Excel byly určeny rovnice lineárních regresí proložených těmito body. S pomocí těchto rovnic a časové závislosti hodnot měření byly hodnoty v countech (softwarové jednotky DIAdemu) přepočítány do jednotek vyjadřující koncentraci kyslíku v $\mu\text{mol/ml}$.

Při kalibraci vycházíme z předpokladu, že nasycená voda vzduchem při teplotě 37°C obsahuje $0,217 \mu\text{mol O}_2/\text{ml}$ (Zhao a ost., 1997). Víme-li jaký je obsah kyslíku, odvozený od teploty a objemu, můžeme přesně určit, kolik kyslíku bylo spotřebováno.

2.5.5 Průběh vlastního měření

Vlastní měření kyslíkovou elektrodou mělo vždy následující průběh: před počátkem pokusu byla komůrka vytemperovaná na 37°C . Do vytemperované komůrky byl pomocí stříkačky hamilton vstříknut etanol, aby se zabránilo zkontaminování vzorku. Poté byla komůrka vymyta a naplněna kultivačním médiem RPMI-1640. Proběhlo měření samotného média po dobu cca 30 minut, než došlo k ustálení signálu. Poté byly do komůrky pomocí stříkačky hamilton přidány vyizolované leukocyty (kontrola nebo 7-oxo-DHEA stimulované PBMC) resuspendované ve 0,2 ml měřicího média. Následně byla měřena spotřeba kyslíku leukocytů po dobu asi 20 minut. Poté byl k buňkám přidán noradrenalin (NA) tak, aby výsledná koncentrace v komůrce byla 10^{-4}M .

Měření bylo prováděno v programu DIAdem verze 8.00 v modulu DAC (slouží k ovládání měření a zaznamenávání dat posílaných z dataloggeru).

2.6 Zpracování naměřených dat

K vyhodnocení dat naměřených kyslíkovou elektrodou byl použit program DIAdem, verze 8.00 modul TDM. Tento modul umožňuje získaná data zpracovávat.

Hodnoty v countech byly nejdříve pomocí znalostí rovnic lineární regrese získané z kalibrace a znalostí časové závislosti hodnot měření přepočítány na $\mu\text{mol/ml O}_2$. Tyto data byla dále převedena do modulu TDM, kde byla následně upravována.

Z křivky získané během měření byly vyseknuty 15 minutové oblasti odpovídající koncentraci kyslíku v jednotlivých úsecích měření. Data byla dále převedena do MS Excelu, kde se jednotlivé spotřeby kyslíku přepočítaly na standartizovanou jednotku nmol O₂/min./mil.buněk.

Data byla dále staticky zpracovávána v programu Statistica párovým T-testem. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD.

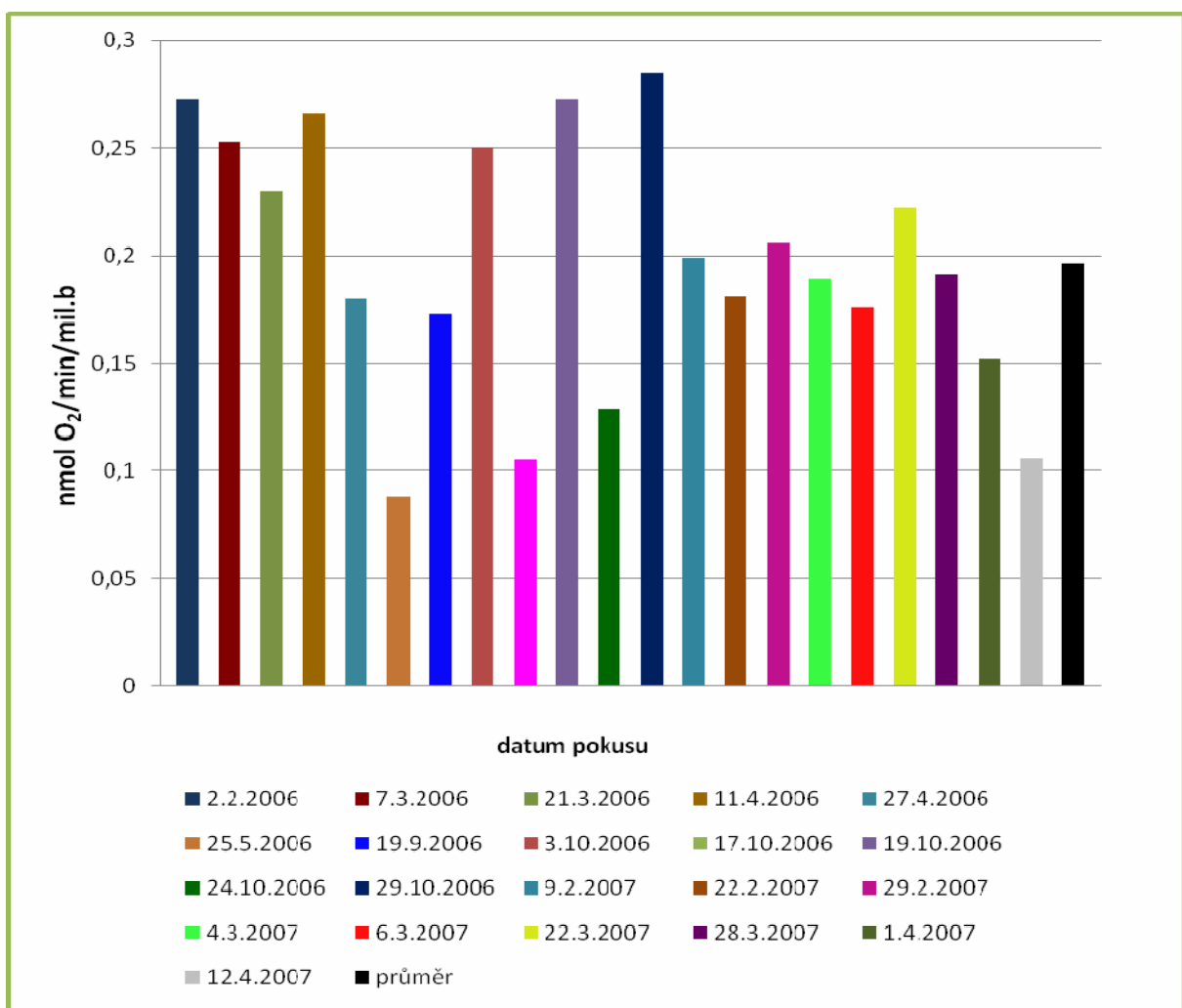
2.7 Nedostatky měření

Během měření se vyskytla řada technických nedostatků. Jedna z nich je časová nestabilita signálu sondy. Dalším z nedostatků měření byl poměrně velký šum signálu. Ten může negativně zkreslovat výsledky naměřených dat.

3 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

3.1 Klidová spotřeba kyslíku lymfocytů (PBMC) měřená Clarkovou kyslíkovou elektrodou

Klidová spotřeba kyslíku PBMC byla měřena ve 21 pokusech (obr. 1). Hodnoty klidových spotřeb kyslíku se pohybovaly v rozmezí 0,085 – 0,285 nmol O₂/10⁶ buněk * min⁻¹, průměr činil 0,197 nmol O₂/10⁶ buněk * min⁻¹. Vysokou variabilitu hodnot lze připisat k obtížnému odečtu přesného počtu buněk použitých k měření.



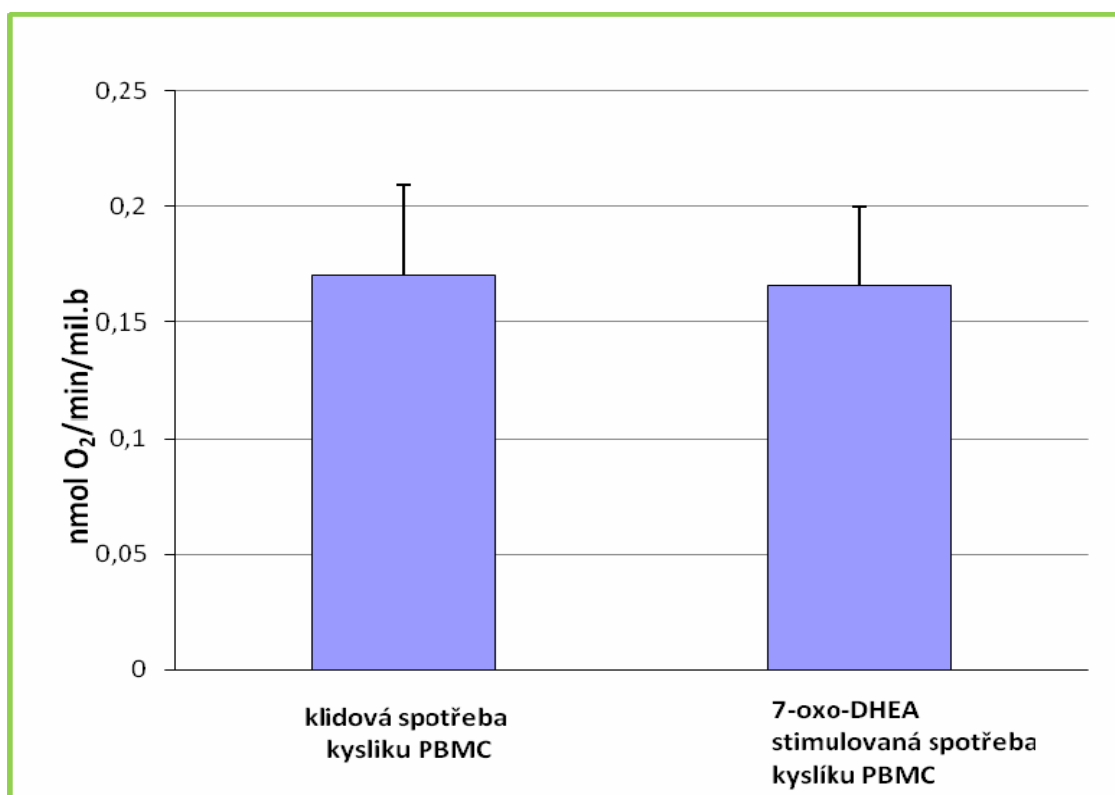
Obr. 1 Klidová spotřeba O₂ PBMC v různých pokusech

3.2 Ovlivnění spotřeby kyslíku PBMC použitím 7-oxo-DHEA

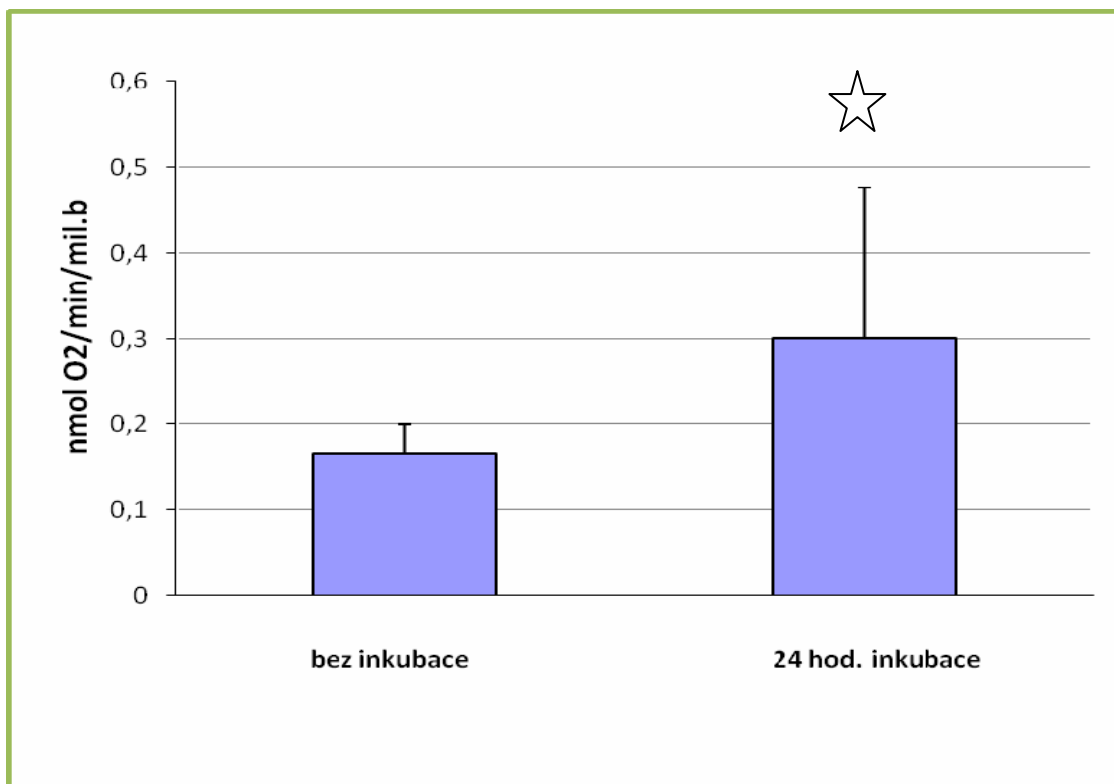
3.2.1 Vliv doby inkubace na klidovou spotřebu kyslíku PBMC

Po aplikaci 7-oxo-DHEA o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ v akutním pokuse (měření bez inkubace) nebyla klidová spotřeba kyslíku PBMC ovlivněna (obr. 2). Proto byly další pokusy provedeny po 24 hodinové inkubaci.

Po 24 hodinové inkubaci s 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ se klidová spotřeba kyslíku PBMC zvýšila o 81 %. Absolutní hodnoty ukazují, že se průměrná spotřeba kyslíku zvýšila z hodnoty 0,167 $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mil.buněk}$ na hodnotu 0,301 $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mil.buněk}$. Zvýšení spotřeby kyslíku PBMC stimulovaných steroidem po 24 hodinové inkubaci je statisticky průkazné $p = 0,0235$ (obr.3).



Obr. 2 Spotřeba kyslíku po aplikaci 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$, v akutním pokusu (bez inkubace), $n = 3$



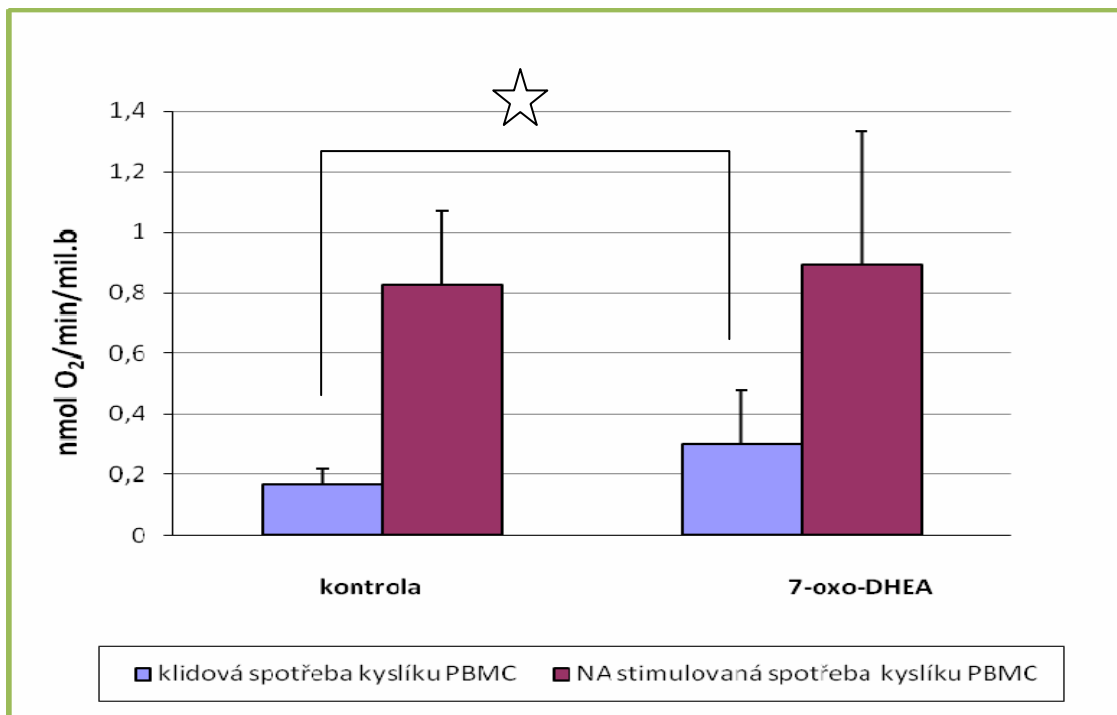
Obr. 3 Vliv 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 μ mol/l v akutním pokusu (bez inkubace) a po 24 hodinové inkubaci na spotřebu kyslíku PBMC. Bez inkubace n = 3, 24 hodinová inkubace n = 8.

☆ označuje signifikantní rozdíl. Svislé úsečky označují SD.

3.2.2 Vliv různých koncentrací 7-oxo-DHEA na klidovou spotřebu kyslíku PBMC

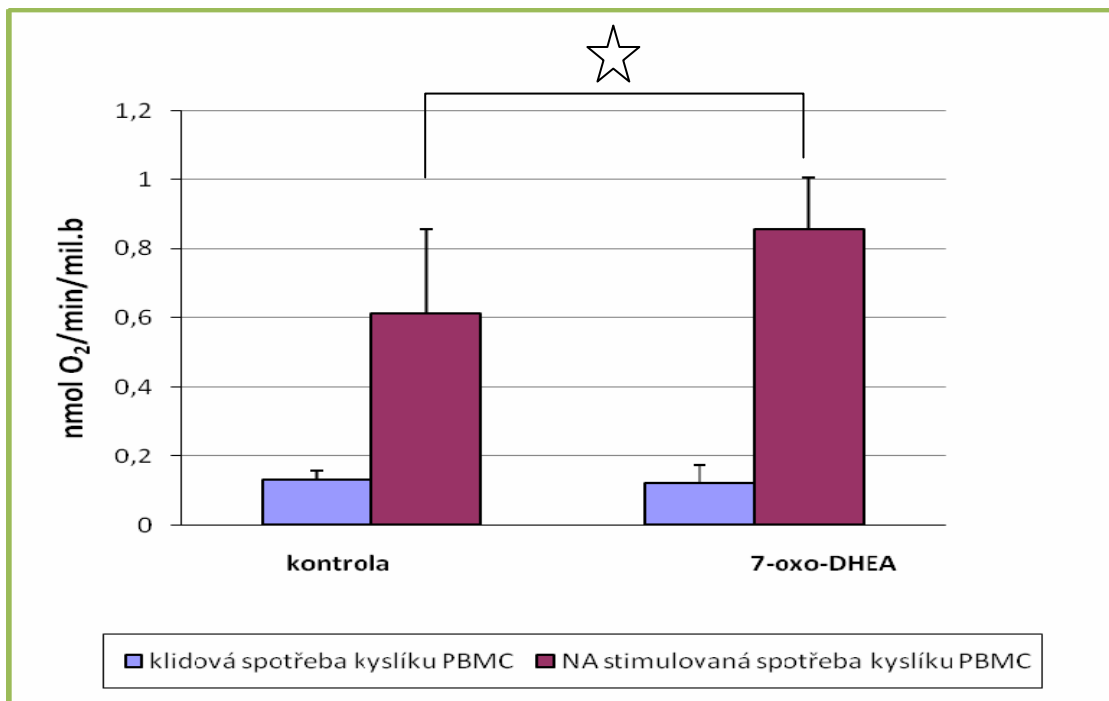
Klidová spotřeba kyslíku PBMC se po 24 hodinové inkubaci s 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 μ mol/l zvýšila o 81 %. Absolutní hodnoty ukazují, že průměrná spotřeba kyslíku se zvýšila z hodnoty 0,166 nmol O₂/min/mil.buněk na hodnotu 0,301 nmol O₂/min/mil.buněk. Zvýšení spotřeby kyslíku PBMC stimulovaných steroidem je statisticky průkazné p = 0,0274 (obr.4).

Klidová spotřeba kyslíku po 24 hodinové inkubaci s 7-oxo-DHEA v koncentraci 0,1 μ mol/l nejevila známky zvýšení (obr.5).



Obr. 4 Klidová a NA stimulovaná spotřeba kyslíku u kontrolních a 7-oxo-DHEA stimulovaných PBMC. Koncentrace 7-oxo-DHEA 10 µmol/l, n = 8.

☆ označuje signifikantní rozdíl. Svislé úsečky označují SD.



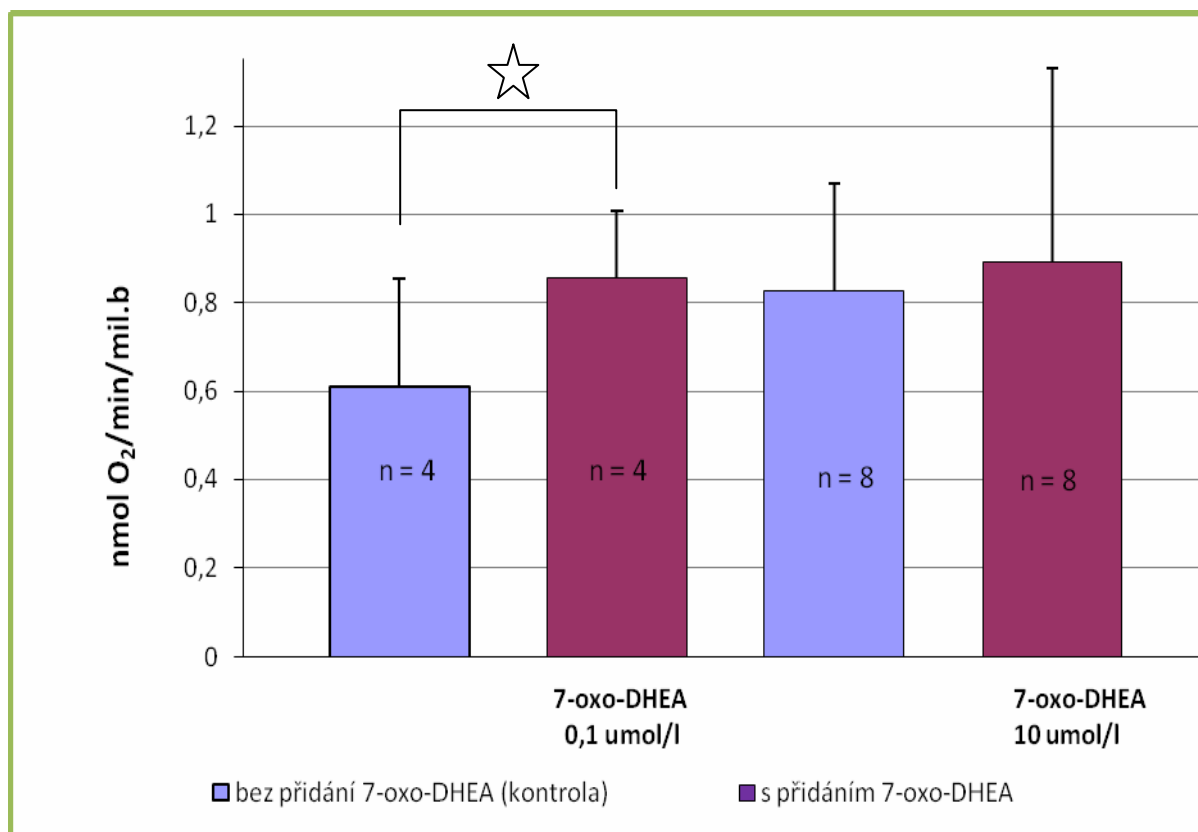
Obr.5 Klidová a NA stimulovaná spotřebu kyslíku u kontrolních a 7-oxo-DHEA stimulovaných PBMC. Koncentrace 7-oxo-DHEA 0,1 µmol/l, n = 4.

☆ označuje signifikantní rozdíl. Svislé úsečky označují SD

3.2.3 Vliv různých koncentrací 7-oxo-DHEA na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC

V tomto pokuse byly PBMC kultivovány 24 hodin se 7-oxo-DHEA. Během měření byl k buňkám přidán noradrenalin (NA) o koncentraci 10^{-4} M. Noradrenalin zvyšoval spotřebu kyslíku PBMC stimulovanou 7-oxo-DHEA v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ o 39 %. Absolutní hodnoty ukazují, že průměrná spotřeba kyslíku se zvýšila z hodnoty 0,612 $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mil.b}$ na hodnotu 0,856 $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mil.b}$. Zvýšení spotřeby kyslíku PBMC po aplikaci NA bylo statisticky průkazné $p = 0,0116$.

Při použití 7-oxo-DHEA ve vyšší koncentraci (10 $\mu\text{mol/l}$) nedošlo k zvýšení spotřeby kyslíku buněk (obr.4, 5, 6).



Obr. 6 NA stimulovaná spotřeba kyslíku bez a po přidání 7-oxo-DHEA v koncentraci 0,1 a 10 $\mu\text{mol/l}$, 24 hodinová inkubace.

☆ označuje signifikantní rozdíl. Svislé úsečky označují SD.

4 DISKUZE

Hlavní význam této práce spočívá v tom, že dokazuje termogenní účinek 7-oxo-dehydroepiandrosteronu. Data byla získána pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody měřením klidové a noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku PBMC a srovnávána se spotřebou kyslíku PBMC po aplikaci výše zmíněného steroidu.

Klidové hodnoty spotřeby kyslíku PBMC se pohybovaly v rozmezí 0,085 – 0,285 nmol O₂/min/10⁶ buněk. Průměr činil 0,197 nmol O₂/min/10⁶ buněk, což jsou v porovnání s diplomovou bakalářskou prací Mikulka (2005), o něco vyšší hodnoty. Mikulka uvádí rozmezí hodnot v rozsahu 0,042 – 0,361 nmol O₂/min/10⁶ buněk. Průměrné hodnoty činily 0,173 nmol O₂/min/10⁶ buněk. V práci Janský a ost. 2006 se uvádí klidová hodnota spotřeby kyslíku 1,16 nmol O₂/min/10⁶ buněk, což jsou v porovnání s hodnotami v mojí práci podstatně vyšší hodnoty. Tento rozdíl se dá přičítat velké variabilitě hodnot ve výše uvedené práci.

Při měření spotřeby kyslíku PBMC po aplikaci noradrenalinu v koncentraci 10⁻⁴M došlo k nárůstu v rozsahu 0,142 – 0,594 nmol O₂/min/10⁶ buněk, tj o 121 – 405 %. Mikulka (2005) uvádí zvýšení hodnot spotřeb kyslíku PBMC po aplikaci NA v rozmezí 148 – 428 %, což je o něco vyšší nárůst, ale vzhledem k variabilitě hodnot je rozdíl zanedbatelný. Práce Janský a ost. (2006) uvádí nárůst klidové spotřeby kyslíku po aplikaci NA o 400 %. Důvodem mírně odlišných hodnot může být skutečnost, že jsem používala jinou Clarkovou kyslíkovou elektrodu. Hodnoty také ovlivňovalo mnoho ostatních faktorů, které znemožňovaly přesnou interpretaci naměřených dat, jako je např. časová nestabilita signálu sondy, šum výstupního signálu a samotné opotřebování elektrod.

Moje měření naznačují, že metabolismus leukocytů je stimulatelný adrenergními agonisty. Leukocyty jsou tudíž použitelné jako modelový systém pro studium podstaty termogenního účinku katecholaminů a jiných hormonů.

V předkládané práci bylo jasně prokázáno, že 7-oxo-DHEA zvyšuje klidovou a noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Tyto údaje jsem nemohla s jinými pracemi porovnat, protože v literatuře se žádné údaje tohoto druhu nevyskytují. V akutním pokusu 7-oxo-DHEA neovlivňoval klidovou spotřebu kyslíku PBMC, což se dalo očekávat, protože je známo, že účinek steroidních hormonů není okamžitý. Účinek 7-oxo-DHEA se v mých pokusech projevil až po 24 hodinové inkubaci. 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 μmol/l zvýšil klidovou spotřebu kyslíku o 81%. V nižší koncentraci 7-oxo-DHEA (0,1 μmol/l) neměl termogenní účinek. Výsledky naznačují, že vyšší koncentrace hormonu než 10 μmol/l,

by mohly vyvolat větší odezvu spotřeby kyslíku PBMC. Koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ je však nefyziologická, poněvadž převyšuje nalezenou koncentraci 7-oxo-DHEA v krvi o 5 řádů. Z časových důvodů nebylo možno pokusy s vyššími koncentracemi provést. Kdyby tato data byla k dispozici, bylo by možné sestavit dose-response křivku a stanovit tak hodnoty odpovídající kapacitě steroidní termogeneze.

Po přidání noradrenalinu se po 24 hodinové inkubaci PBMC s 7-oxo-DHEA o koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ zvýšila spotřeba kyslíku o 39 % ve srovnání se účinkem samotného NA. U koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ nebyl však účinek 7-oxo-DHEA zaznamenán.

Z výsledků plyne, že 7-oxo-DHEA by mohl zvyšovat jak klidovou, tak NA stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Koncentrační efekt je však v dalších pokusech nutné teprve prokázat. Zdá se, že 7-oxo-DHEA by mohl mít podobný mechanismus účinku jako thyroïdní hormony, u kterých bylo prokázáno, že potencují termogenní účinek katecholaminů (Svedmyr, 1966a; 1966b).

5 ZÁVĚR

Byly sledovány změny spotřeby kyslíku po aplikaci 7-oxo-dehydroepiandrosteronu u klidových a noradrenalinem stimulovaných leukocytů. Bylo prokázáno, že 7-oxo-DHEA nemá žádný vliv na spotřebu kyslíku PBMC v akutním pokuse. Metabolismus leukocytů lze stimulovat až po 24 hodinové inkubaci s 7-oxo-DHEA v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$, který zvýšil spotřebu kyslíku o 81 %. Po přidání noradrenalinu k PBMC, které byly stimulované 7-oxo-DHEA v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ se spotřeba kyslíku PBMC navýšila o 39 %. Výsledky naznačují, že 7-oxo-DHEA by mohl ovlivňovat jak obligatorní tak fakultativní termogenezi.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ARLT W, CALLIES F, KOEHLER I, CHRISTOPH VAN VLIJMEN J, FASSNACHT M, STRASBURGER CH J, SEIBEL M J, HUEBLER D, ERNST M, OETTEL M, REINCKE M, SCHULTE H M, ALLOLIO B: Dehydroepiandrosterone supplementation in healthy men with an age-related decline of dehydroepiandrosterone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4686 – 4692, 2001.

BLAAK E E, SARIS W M H, van BLAAK M A: Adrenoreceptor subtypes mediating catecholamine-induced thermogenesis in man. *Int J Obes* 17: 78 – 81, 1993.

BOBYLEVA V, BELLEI M, KNEER N, LARDY H: The effect of ergosteroid 7-oxo-dehydroepiandrosterone on mitochondrial membrane potential: possible relationship to thermogenesis. *Arch Biochem Biophys* 341: 122 – 128, 1997.

BOYUM A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Sspl* 21: 77 – 89, 1968.

BRAND M D: The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1018: 128 – 133, 1990.

CELEC P, STÁRKA L: Dehydroepiandrosterone – is the fountain of youth drying out? *Physiol Res* 52: 397 – 407, 2003.

DE BLASTI A, LIPARTITI M, MOTULSKY H, INSEL P A, FRATELLI M: Aginost – induced redistribution of beta – adrenergic receptors on intact human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 60 (6): 1080 – 1088, 1985.

GOIN J, STERIN – BORDA E S, FINIASZ M, FERNANDEZ J, DE BRACCO M E: Active alúpha-2 and beta-adrenoreceptors in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 49: 178 – 181, 1991.

GRAAFSMA S J, VAN TITS L J, WILLEMS P H, HECTORS M P, RODRIQUES DE MIRANDA J F, DE PONT J J, THIEN T: Beta 2-adrenoreceptor up-regulation in relation to cAMP production in human lymphocytes after physical exercise. *Br J Clin Pharmacol* 30: 142S – 144S, 1990.

HAEN E, LIEBL B, LEDERER T, PLISKA V: Revised radioreceptor assay for beta 2-adrenoreceptors expressed on peripheral mononuclear leukocytes. *J Recept Res* 11: 129 – 140, 1991.

HAMPL R, STÁRKA L, JANSKÝ L: Steroids and Thermogenesis. *Physiol Res* 55: 123 – 131, 2006.

IHLER G, CHAMI – STEMMAN H: 7-oxo-DHEA and Raynaud's phenomenon. *Med Hypotheses* 60: 391 – 397, 2003.

JANSKÝ L, MATOUŠKOVÁ E, STRÁNSKÁ E: Thermogenic action of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells. *J Thermal Biol* 31: 50 – 52, 2006.

JANSKÝ L: Cold – induced thermogenesis. „In“: High – Altitude Medical Science, Ed: G Ueda, S Kusama, N F Voelkel. Shinshu University 349 – 360, 1988

JANSKÝ L: Hormonální termogeneze. Čs Fyziologie 43: 58 – 63, 1994a.

JANSKÝ L: Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. Physiol Rev 75: 237 – 259, 1995.

JANSKÝ L: Netřesová termogeneze. Vesmír 73 (11): 628 – 630, 1994b.

JANSKÝ L: Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. Biol Rev 48: 85 – 132, 1973.

JANSKÝ P, JANSKÝ L: Sites and cellular mechanisms of human adrenergic thermogenesis. J Therm Biol 27: 269 – 277, 2002.

KALIMI M, REGELSON W (eds): Dehydroepiandrosteron (DHEA). Biochemical, Physiological and Clinical Aspect. W de Gruyter, Berlin, 2000.

KASAL A: Steroidy na začátku jednadvacátého století. Chem Listy 97: 921 – 941, 2003.

KROBOTH P D, SALEK F S, PITTENGER A L, FABIAN T J, FRYE R F: DHEA and DHEA-S: A review. J Clin Pharmacol 39: 329 – 348, 1999.

LABRIE F, LUU-THE V, BÉLANGER A, LIN S-X, SIMARD J, PELLETIER G: Is dehydroepiandrosterone a hormone? J Endocrinology 187: 169 – 196, 2005.

LARDY H, PARTRIDGE B, KNEER N, WEI Y: Ergosteroids: induction of thermogenic enzymes in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone. Proc Natl Acad Sci USA 92: 6617 – 6619, 1995.

LINEK V, VACEK V, SINKULE J, BENEŠ P: Měření koncentrace kyslíku membránou pokrytými kyslíkovými sondami. Academia, p141, 1987.

MARWAH A, MARWAH P, LARDY H: Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for the quantitative determination of 7-oxo-dehydroepiandrosterone-3 β -sulfate in human plasma. J Chromagr B 721: 197 – 205, 1999.

MIKULKA A: Úloha různých adrenergických receptorů v termogenezi lidských lymfocytů. Diplomová práce, JČU, p34, 2005.

MORFIN R: Involvement of steroids and cytochromes P₄₅₀ species in the triggering of immune defense (Review). J Steroid Biochem Mol Biol 80: 273 – 290, 2002.

MURRAY R K, GRANNER D K, MAYES P A, RODWELL V W: Harperova Biochemie. H + H, p872, 2002.

RICCI A, BORNZETI E, CONTERNO A, GRECO S, MULATERO P, SCHENA M, SCHIAVONE D, TAYEBATI S K, VEGLIO F, AMENTA F: Alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. Hypertension 33: 707 – 712, 1999.

STEEL N: Dehydro-epiandrosteron and ageing. *Age and Ageing* 28: 89 – 91, 1999.

STRUNECKÁ A, JANSKÝ L: Hibernace a sezónní afektivní porucha. *Psychiatrie* 10: 220 – 223, 2006.

SVEDMYR N: Studies on the relationship between some metabolic effects of thyroid hormones and catecholamines in animals and man. *Acta Physiol Scand* 68: Suppl. 274, 1 – 46, 1966a.

SVEDMYR N: The influence of thyroxine treatment and thyroidectomy on the calorogenic and some other metabolic effects of adrenaline and noradrenaline in experiments on fasted rabbits. *Acta Physiol Scand* 66: 257 – 268, 1966b.

ŠULCOVÁ J, HAMPL R, HILL M, STÁRKA L, NOVÁČEK A: Delayed effects of short-term transdermal application 7-oxo-dehydroepiandrosterone on its metabolites, some hormonal steroids and relevant proteohormones in healthy male volunteers. *Clin Chem Lab Med* 43: 221 – 227, 2005.

TCHERNOF A, LABRIE F: Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *European J Endocrinol* 151: 1 – 14, 2004.

TITINCHI S, CLARK B: Alpha 2-adrenoreceptors in human lymphocytes: direct characterisation by [H^3] – yohimbine binding. *Biochem Biophys Res Commun* 121: 1 – 7, 1984.

ZHAO J, CANNON B, NEDERGAARD J: Thermogenesis is β_3 - but not β_1 -adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am J Physiol* 257: R2002 – R2011, 1998.

ZHAO J, CANNON B, NEDERGAARD J: α_1 -adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of β_3 -adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells. *J Bio Chem* 272: 32847 – 32856, 1997.