

Received: 2010.01.14  
Accepted: 2010.02.26  
Published: 2010.03.17

## Fizjologia i molekularny mechanizm działania glikokortykoidów\*

### Physiology and molecular mechanism of glucocorticoid action

Andrzej Nagalski<sup>1,2</sup>, Anna Kiersztan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup> Laboratorium Neurodegeneracji, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej

#### Streszczenie

Endogenne glikokortykoidy (GC) są wydzielane do krążenia przez korę nadnerczy. Proces ten podlega kontroli zegara biologicznego i może być w każdej chwili zwiększony pod wpływem bodźca stresowego. Poziom GC krążących w organizmie regulowany jest ogólnoustrojowo przez oś podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy, jak i lokalnie przez dostęp do komórek docelowych oraz metabolizm przedreceptorowy z udziałem dehydrogenazy 11 $\beta$ -hydroksysteroidowej. W genomowym mechanizmie działania GC pośredniczą dwa indukowane ligandem czynniki transkrypcyjne: wykazujący duże powinowactwo receptor mineralokortykoidów (MR) oraz mający 10-krotnie mniejsze powinowactwo receptor glikokortykoidów (GR). Odpowiedź na GC różni się między osobnikami, tkankami i komórkami. Różnorodność i swoistość w reakcji na hormony steroidowe w komórce jest kontrolowana na różnych poziomach m.in.: translokacji receptora, oddziaływaniu ze swoistymi czynnikami transkrypcyjnymi i koregulatorami oraz na poziomie białka receptora regulowanego przez mikroRNA. Ponadto, z jednego genu GR, w wyniku alternatywnego splicingu i alternatywnej inicjacji translacji powstaje wiele izoform tego receptora. Charakteryzują się one unikalnym wzorem ekspresji oraz różną aktywnością transkrypcyjną. Dodatkowo, każda izoforma podlega różnym modyfikacjom potranslacyjnym wpływającym na ich funkcje. Określenie molekularnego mechanizmu działania GC staje się jeszcze bardziej skomplikowane po uświadomieniu sobie, że GC mogą indukować szybkie, niegenomowe działanie w cytoplazmie. Ścisła kontrola w uwalnianiu GC, jak i ich komórkowo swoista aktywność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jest to szczególnie widoczne w stanach niedoboru lub nadmiaru GC, występującego odpowiednio w chorobie Addisona i w zespole Cushinga.

#### Słowa kluczowe:

glikokortykoidy • oś podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy • receptor glikokortykoidów • dehydrogenaza 11 $\beta$ -hydroksysteroidowa • choroba Addisona • zespół Cushinga

#### Summary

Endogenous glucocorticoids (GCs) are secreted into the systemic circulation from the adrenal cortex. This release is under the control of the circadian clock and can be enhanced at any time in response to a stressor. The levels of circulating GC are regulated systemically by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and locally by access to target cells and pre-receptor metabolism by 11 $\beta$ -hydroxysteroids dehydrogenase enzymes. GCs mediate their genomic action by binding to two different ligand-inducible transcription factors: high-affinity mineralocorticoid receptor

\* Praca finansowana z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (BW nr 1755/25/07).

(MR) and 10-fold lower affinity glucocorticoid receptor (GR). Responses to GCs vary among individuals, cells, and tissues. The diversity and specificity in the steroid hormone's response in the cell is controlled at different levels, including receptor translocation, interaction with specific transcription factors and coregulators, and the regulation of receptor protein levels by microRNA. Moreover, multiple GR isoforms are generated from one single GR gene by alternative splicing and alternative translation initiation. These isoforms all have unique tissue distribution patterns and transcriptional regulatory profiles. Furthermore, each is subjected to various post-translational modifications that affect receptor function. Deciphering the molecular mechanisms of GC action is further complicated by the realization that GCs can induce rapid, non-genomic effects within the cytoplasm. A tight regulation of GC secretion and their cell-specific activity is essential for proper organism function. This is particularly seen under conditions of GC deficiency or excess, as in Addison's disease and Cushing's syndrome, respectively.

**Key words:** glucocorticoids • HPA axis • glucocorticoid receptor • 11 $\beta$ -hydroxysteroids dehydrogenase • Addison's disease • Cushing's syndrome

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=907185>

**Word count:** 5180

**Tables:** 1

**Figures:** 8

**References:** 53

**Adres autora:** dr Anna Kiersztan, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: akiersztan@biol.uw.edu.pl

**Wykaz skrótów:** 11 $\beta$ -HSD – dehydrogenaza 11 $\beta$ -hydroksysteroidowa; AA – kwas arachidonowy; ACTH – hormon adrenokortykotropowy; AF1/2 – domena o funkcji aktywacyjnej; AME – zespół pozornego nadmiaru aldosteronu; AP-1 – białko aktywacyjne 1; AVP – wazopresyna; białko StAR – białkowy regulator steroidogenezy; CBG – globulina wiążąca kortykosteroidy; CRH – kortykoliberyna; DBD – domena wiążąca DNA; GC – glikokortykoidy; GR – receptor glikokortykoidów; GRE – element odpowiadający na GC; H6PDH – dehydrogenaza heksozo-6-fosforanowa; Hsp – białko szoku cieplnego; IRF-3 – czynnik regulujący interferon 3; LBD – domena wiążąca ligand; MAP – białka związane z mikrotubulami; MAPK – kinaza aktywowana przez miogeny; mGR – błonowy receptor GC; MR – receptor mineralokortykoidów; NF- $\kappa$ B – jądrowy czynnik kappa B; nGRE – negatywny GRE; NTD – N-terminalna domena transaktywacyjna; oś HPA – oś podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy; PI3K – kinaza 3-fosfatydiloinozytolowa; PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza białkowa C; SCN – jądro nadskrzyżowaniowe podwzgórza.

## WSTĘP

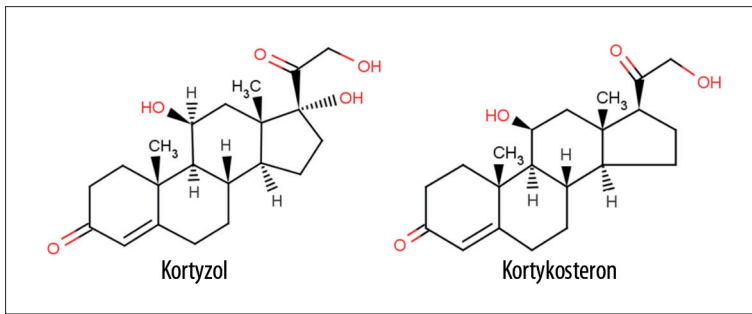
Glikokortykoidy (GC), hormony steroidowe wydzielane przez korę nadnerczy, regulują wiele procesów fizjologicznych umożliwiając przygotowanie i radzenie sobie organizmu z fizycznym oraz emocjonalnym stresem. Są one ważnymi regulatorami metabolizmu węglowodanów, białek i lipidów, a także wpływają na odpowiedź immunologiczną, równowagę wodno-elektrolitową, regulację ciśnienia krwi oraz metabolizm kości. Wśród innych działań GC należy wspomnieć ich wpływ na zmiany nastroju i zachowania, modyfikację pobierania pokarmu, temperaturę ciała, percepcję bólową i funkcje neuroendokrynne [7,49].

Głównymi glikokortykoidami są kortyzol (hydrokortyzon) i kortykosteron (ryc. 1). Większość ssaków wytwarza oba steroidy, jednak między gatunkami występują różnice proporcji w jakich są one wytwarzane. Kortyzol jest dominującym glikokortykoidem u człowieka. Gryzonie

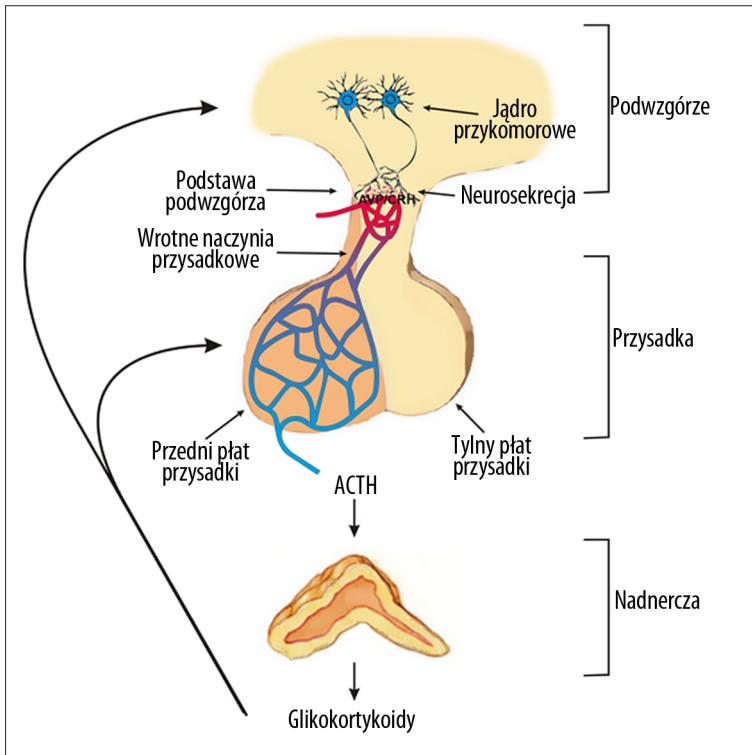
wytwarzają głównie kortykosteron, podczas gdy owca, świnia, królik i pies wytwarzają znaczące ilości obu tych związków [7,43]. Biologiczna aktywność GC jest uwarunkowana obecnością grupy hydroksylowej w pozycji C11 cząsteczki steroidu. Utlenienie tej grupy powoduje przekształcenie związku w postać nieaktywną. Tak więc, kortyzol i kortykosteron są aktywnymi biologicznie steroidami, podczas gdy kortyzon i 11-dehydrokortykosteron są nieaktywne [15].

## REGULACJA SEKRECIJ GLIKOKORTYKOIDÓW

GC są wytwarzane z cholesterolu przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy. Poziom ich sekrecji kontrolowany jest przez oś podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy (HPA) (ryc. 2) [50]. Podwzgórze odbiera oraz integruje neuronalną i humoralną informację z wielu źródeł. Działa zatem jako sensor zmian w środowisku wewnętrznym i zewnętrznym. Używając tej informacji podwzgórze odpowiada na niekorzystne



Ryc. 1. Struktury chemiczne naturalnych glikokortykoidów

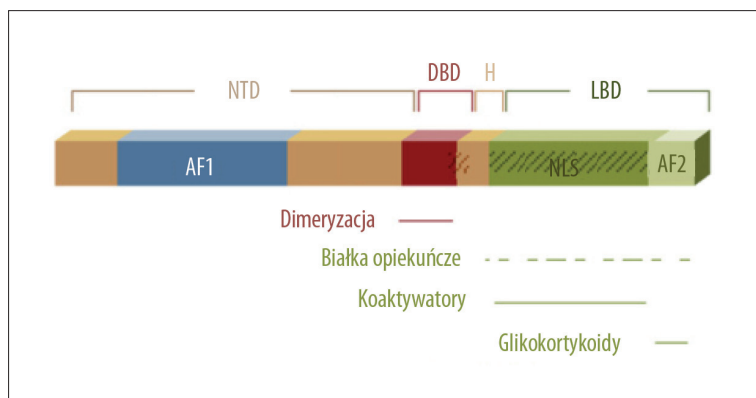


Ryc. 2. Oś podwzgórze–przysadka–kora nadnerczy; AVP – wazopresyna; CRH – kortykoliberyna; ACTH – hormon adrenokortykotropowy

okoliczności (fizyczne bądź emocjonalne) oraz czynniki okołodobowe aktywując szlak prowadzący do syntezy GC. Pierwszym krokiem jest wydzielanie dwóch neurohormonów podwzgórze: kortykoliberyny (CRH) i wazopresyny (AVP). Neurohormony te przechodzą z podwzgórze przez wrotne naczynia przysadkowe do przedniego płata przysadki i stymulują wytwarzanie peptydu proopiomelanokortyny, z którego odcinany jest hormon adrenokortykotropowy (ACTH) przedostający się do krwi [7]. ACTH oddziałuje na korę nadnerczy i inicjuje syntezę kortyzolu/kortykosteronu. Synteza GC przebiega z udziałem enzymów z rodziny cytochromu P-450. Czynnikiem limitującym biosyntezę hormonów steroidowych jest szybkość przechodzenia cholesterolu przez błonę mitochondrialną. Za transport cholesterolu do mitochondriów odpowiedzialne jest białko StAR (steroidogenic acute regulatory protein), którego ekspresję indukuje ACTH działając przez receptor melanokortyny 2. Bezpośrednio po syntezie GC są uwalniane do krążenia w wyniku dyfuzji [12]. Oś podwzgórze–przysadka–kora nadnerczy podlega regulacji zwrotnej przez GC, które hamują uwalnianie CRH i AVP z podwzgórze i ACTH z przedniego płata przysadki (ryc. 2) [7].

Sekrecja GC wykazuje wyraźną zależność czasową o rytmie zarówno okołodobowym (circadian) jak i szybkim/pulsacyjnym (ultradian). Okołodobowy szczyt wydzielania GC jest ściśle związany z aktywnością zwierząt: występuje wczesnym rankiem u zwierząt dziennych, a na początku nocy u zwierząt nocnych. Natomiast pulsacyjne wydzielanie GC zachodzi z częstością 1–2 razy na godzinę. Za rytmiczne wydzielanie GC odpowiedzialny jest nadrzędny zegar biologiczny mieszczący się w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórze (SCN, suprachiasmatic nuclei) wpływających na oś HPA. Wykazano również, że SCN może wpływać bezpośrednio na korę nadnerczy przez autonomiczny układ nerwowy i regulować wydzielanie GC oraz wrażliwość na ACTH niezależnie od działania osi HPA. Trzecim regulatorem rytmicznego wydzielania GC jest zegar biologiczny występujący w samej korze nadnerczy, który zostaje zachowany nawet w hodowli *in vitro* [13].

Ostatnie badania sugerują, że związek między sekrecją GC a ACTH może być o wiele słabszy niż początkowo sądzono. Pod wpływem różnych warunków fizjologicznych (np.



Ryc. 3. Podstawowe domeny receptora wiążącego glikokortykoidy (wg [25] – zmodyfikowano); NTD – N-terminalna domena transaktywacyjna; DBD – domena wiążąca DNA; H – region łączący; LBD – domena wiążąca ligand; AF1/2 – domeny o funkcji aktywacyjnej, NLS – sygnał lokalizacji jądrowej

wczesny okres poporodowy, starzenie, stres) i patofizjologicznych (np. stany zapalne i sepsa, choroby psychiczne i metaboliczne), nie obserwuje się korelacji w wydzielaniu obu tych hormonów. W ostatnich latach wykazano, że wiele neuropeptydów, neuroprzebieżników, opioidów, czynników wzrostowych, cytokin i adipokin wpływa na wydzielanie GC niezależnie od ACTH [6].

GC są również uwalniane pod wpływem fizycznego i/lub emocjonalnego stresu. Odpowiedź na stres może być różna w zależności od typu, intensywności oraz czasu trwania bodźca, a także od doświadczeń danego osobnika. Gwałtowne podniesienie stężenia GC we krwi mobilizuje jak najwięcej rezerw energetycznych. Stąd obserwowane wahania ich poziomu, sięgające od stężeń nanomolowych aż do trzech rzędów wielkości wzwyż, a więc do stężeń mikromolowych [7].

### RECEPTORY WIĄŻĄCE GLIKOKORTYKOIDY

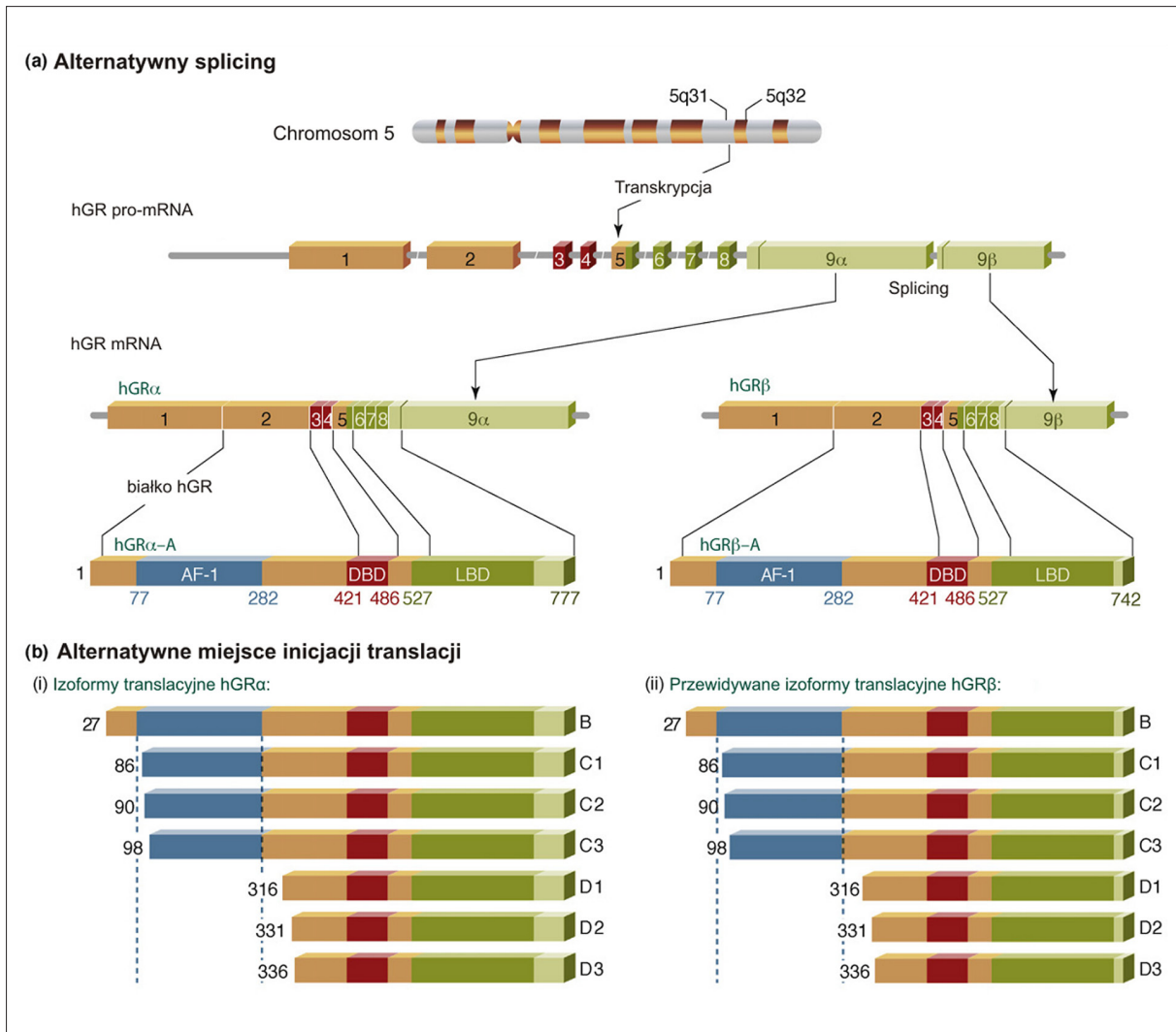
Mechanizm działania glikokortykoidów polega głównie na wiązaniu ich z wewnątrzkomórkowym receptorem (GR, NR3C1). Receptor glikokortykoidów oprócz receptorów innych hormonów steroidowych, takich jak: androgeny, estrogeny, progesteron i mineralokortykoidy został zakwalifikowany do podrodziny 3 receptorów jądrowych, czyli zależnych od liganda czynników transkrypcyjnych [19]. GR ma wysoki stopień homologii z innymi członkami tej podrodziny i składa się z kilku odrębnych domen (ryc. 3). N-terminalna domena transaktywacyjna (NTD, N-terminal transactivation domain), która jest najbardziej zmiennym pod względem długości i sekwencji elementem wśród receptorów wiążących hormony steroidowe, zawiera domenę o funkcji aktywacyjnej 1 (AF1, activational function domain 1), biorącą udział w regulacji transkrypcji. Domena wiążąca DNA (DBD, DNA-binding domain) zawiera dwa bogate w cysteinę palce cynkowe i jest odpowiedzialna za dimeryzację i wiązanie receptora do DNA. Region łączący (H) pomaga w translokacji kompleksu GR-ligand do jądra, podobnie jak C-końcowa domena wiążąca ligand (LBD, ligand binding domain). Ponadto, domena LBD zawierająca drugą domenę o funkcji aktywacyjnej 2 (AF2) jest odpowiedzialna za wiązanie liganda, pomaga również w dimeryzacji oraz zawiera sekwencję oddziałującą z białkami opiekuńczymi. AF2 po związaniu hormonu podlega zmianie konformacyjnej, która pozwala na interakcję z dodatkowymi czynnikami uczestniczącymi w aktywacji transkrypcji lub represji [25,28].

Po związaniu GC powstały kompleks GR-ligand transportowany jest do jądra komórkowego, gdzie działa bezpośrednio jako czynnik transkrypcyjny lub oddziałuje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, wpływając na ekspresję genów docelowych [3]. Stąd działanie GC ma stosunkowo wolny początek i utrzymuje się przez jakiś czas po tym jak GC zostanie usunięty z krążenia. Oprócz receptora glikokortykoidów, GC mogą również aktywować receptor wiążący mineralokortykoidy (MR, NR3C2) [7].

GR ma niewielkie powinowactwo do kortyzolu i kortykosteronu (stała dysocjacji  $K_d$ , odpowiadająca stężeniu liganda, przy którym występuje zajęcie 50% miejsc wiążących, wynosi 10–20 nM), jest selektywny w stosunku do GC i słabo wiąże mineralokortykoid aldosteron. Receptor ten jest obecny prawie we wszystkich komórkach. Odpowiedź komórkowa na GC zależy nie tylko od obecności hormonu, ale również od stężenia receptora, które zmienia się np. podczas rozwoju, cyklu komórkowego oraz zaburzeń w układzie endokrynnym. W przeciwieństwie do GR, MR ma duże i w przybliżeniu równe powinowactwo do kortyzolu, kortykosteronu i aldosteronu. Stała dysocjacji ( $K_d$ ), wynosi 0,5–2 nM. MR jest umiejscowiony głównie w dystalnych kanalikach nerkowych, a także w innych komórkach lub tkankach, w których istotną rolę odgrywa utrzymanie równowagi  $Na^+/K^+$ , takich jak: gruczoły potowe, ślinianki przyuszne i okrężnica. MR znajduje się również w niektórych rejonach mózgu, zwłaszcza w neuronach systemu limbicznego, korze węchowej i w mniejszym stopniu w podwzgórzu [7].

Przy dużym stężeniu GC, MR jest wysycany, a za obserwowane efekty biologiczne jest odpowiedzialny GR. Nie tłumaczyło to jednak jak tkanki zawierające MR, np. nerki, są preferencyjnie regulowane *in vivo* przez aldosteron. Odpowiedź na to pytanie pojawiła się dopiero wraz z badaniami, które scharakteryzowały swoisty komórkowo mechanizm dostępności GC do ich receptora (zob. rozdział „Przedreceptorowy metabolizm GC”).

Gen kodujący GR, podobnie jak MR, zawiera 9 eksonów. W wyniku alternatywnego splicingu prekursorowego mRNA powstaje 5 podtypów GR: GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A i GR-P. Spośród nich podtypom GR $\alpha$  i GR $\beta$  poświęca się najczęściej uwagi. Te dwie izoformy mają identyczny N-koniec kodowany przez eksony 2–8, a różnią się tylko C-końcem (ryc. 4) [25]. GR $\alpha$  jest klasycznym, funkcjonalnie aktywnym receptorem, natomiast GR $\beta$  nie



Ryc. 4. Mechanizm powstawania izoform receptora glikokortykoidów (wg [25] – zmodyfikowano); hGR – ludzki receptor glikokortykoidów

wiąże endogennych ani syntetycznych GC. O GR $\beta$  początkowo sądzono, że reguluje on ekspresję genów tylko przez blokowanie działania GR $\alpha$  (działa jako dominant-negativ GR), jednak ostatnie badania sugerują, że GR $\beta$  może także regulować ekspresję genów niezależnie od GR $\alpha$  [24].

Dodatkowym mechanizmem zwiększającym różnorodność izoformy  $\alpha$  jest alternatywna translacja. Gen GR ma wiele funkcjonalnych sekwencji Kozak (sekwencja mRNA rozpoznawana przez rybosom jako miejsce, od którego mRNA jest przepisywany na kolejność aminokwasów), czego rezultatem jest występowanie różnych wariantów translacyjnych receptora (ryc. 4) [48]. U człowieka opisano przynajmniej 8 różnych izoform określonych jako GR $\alpha$ -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2 i -D3, różniących się tylko długością N-końca. Wszystkie izoformy zawierają identyczną, nienaruszoną domenę wiążącą ligand i są funkcjonalnym receptorem, wykazują również podobne powinowactwo do GC i większość po związaniu hormonu podlega transportowi do jądra, gdzie wpływają na transkrypcję genów docelowych. Wyjątkiem jest izoforma GR $\alpha$ -D3 umiejscowiona głównie w jądrze niezależnie od obecności czy

braku GC [25,31]. Badania na szczurach i myszach wskazują, że poziom ekspresji poszczególnych izoform translacyjnych GR różni się między tkankami. Przykładowo poziom izoformy GR $\alpha$ -C jest wyraźnie wyższy w trzustce i płucach niż w wątrobie, natomiast GR $\alpha$ -D występuje w większych ilościach w śledzionie i w pęcherzu moczowym. Tkankowoswoiste rozmieszczenie izoform GR $\alpha$ , a także ich różna aktywność transkrypcyjna dostarczają nowego mechanizmu, dzięki któremu obserwujemy tkankowo swoistą odpowiedź na GC. Izoformy translacyjne znaleziono również dla receptora MR oraz innych receptorów wiążących hormony steroidowe, co wskazuje, że alternatywna translacja jest powszechnym mechanizmem kontroli odpowiedzi komórkowej na te hormony [25].

W genie GR zidentyfikowano również kilka polimorfizmów, które są związane z obniżeniem aktywności transkrypcyjnej GR, bądź ze zwiększeniem wrażliwości na GC. Mogą one wyjaśniać dużą zmienność osobniczą w odpowiedzi na GC oraz sugerują, że analiza sekwencji genu GR może być wskaźnikiem wystąpienia określonych chorób, odpowiedzi na leczenie oraz wystąpienia działań niepożądanych [24].

## ROLA MIKRORNA W REGULACJI POZIOMU RECEPTORA GLIKOKORTYKOIDÓW

MikroRNA należy do klasy małych niekodujących RNA o długości około 21 nukleotydów, które regulują ekspresję genów. MikroRNA są kodowane przez geny, które ulegają transkrypcji, ale nie translacji, zamiast tego pierwotny transkrypt (pri-microRNA) jest przekształcany w strukturę spiniki do włosów (pre-microRNA), a następnie w funkcjonalne mikroRNA. Wydaje się, że działanie mikroRNA opiera się na wiązaniu 6–8 nukleotydowej sekwencji na 5'-końcu mikroRNA (tzw. seed region) do 3'-końca docelowego mRNA (3'-UTR), co prowadzi do represji translacji [4].

Od czasów odkrycia wielokrotnie wykazano istotny wpływ swoistych mikroRNA w wielu istotnych procesach komórkowych, takich jak np. różnicowanie, apoptoza czy metabolizm. Niedawno wykazano, że mikroRNA-124 wiąże potencjalny seed region w 3'-UTR GR. Ponadto okazało się, że fizjologiczny poziom ekspresji mikroRNA-124 w kilku regionach mózgu jest wystarczający do obniżenia poziomu GR *in vivo*. Analiza *in silico* w 3'-UTR GR wykazała istnienie wielu seed regions, które mogą być potencjalnie rozpoznawane przez mikroRNA. Pozostaje teraz tylko pytanie, które z tych mikroRNA są zaangażowane w regulację poziomu GR w określonych tkankach [12].

### KOMÓRKOWO SWOISTA DOSTĘPNOŚĆ GC DO RECEPTORA

Mimo że pomiar kortyzolu/kortykosteronu we krwi jest sensownym wskaźnikiem działania osi HPA, to jest słabym markerem ilości GC dostarczanych do GR w komórkach docelowych. Około 80% GC we krwi związanych jest z wykazującą dużą swoistość globuliną wiążącą kortykosteroidy (CBG), która nie tylko ułatwia dystrybucję GC, ale także odgrywa ważną rolę w jego tkankowo swoistym uwalnianiu. Dzieje się tak prawdopodobnie na skutek obecności receptorów CBG, które stymulują odłączanie GC od CBG [47]. Tylko niewielka część puli cząsteczek hormonu jest wolna lub luźno związana z albuminami. W przypadku syntetycznych GC, np. deksametazonu są one w dużej mierze związane raczej z albuminami niż z CBG [32]. Uwolnione GC dyfundują z krwi przez błonę komórkową do cytoplazmy komórek docelowych. W zasadzie tylko niezwiązane steroidy mają łatwy dostęp do komórek docelowych. W stanie zapalnym miejscowo uwalniane proteazy serynowe mogą uwalniać GC od wiążących je globulin. Jednak lokalnie syntetyzowane CBG (np. w przysadce) mogą ograniczać dostęp GC przez wyłapywanie wolnych steroidów. Dostęp GC do komórek docelowych jest również modyfikowany przez międzybłonowe transportery zależne od ATP, które obniżają wewnątrzkomórkowe stężenie GC przez aktywne usuwanie ich z komórki. Białka te, zwane również P-glikoproteinami oporności wielolekowej (MDR P-glycoprotein), są obecne w określonych tkankach i tak jak CBG wykazują dużą swoistość w stosunku do GC. Tak więc warunkują tkankową swoistość dostarczania GC do komórek docelowych, fenomenu który przyczynia się do subtelnych różnic w profilu farmakologicznym różnych glikokortykoidów. Ponadto zaburzenia w regulacji tych białek mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju oporności na glikokortykoidy. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się ekspresja P-glikoproteiny MDR w barierze krew–mózg, która wydają się ograniczać dostęp

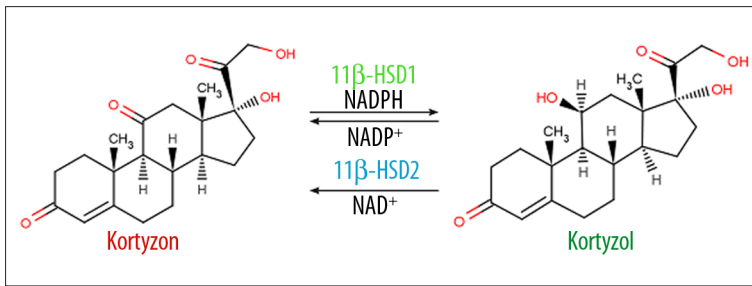
steroidów, takich jak deksametazon, a w mniejszym stopniu kortyzolu i kortykosteronu do mózgu [33]. Co ciekawe, ludzka P-glikoproteina rozpoznaje jako substrat raczej kortyzol niż kortykosteron. Pośmiertna analiza stężenia GC w ludzkim mózgu wykazała, że rzeczywiście stosunek kortykosteronu do kortyzolu jest większy niż obserwowany we krwi. Ponadto, scharakteryzowano polimorfizmy w genie P-glikoproteiny wpływające na przenikanie GC do mózgu, po analizie których można przewidzieć skutki działania leków przeciwdepresyjnych [12].

### Przedreceptorowy metabolizm GC

Po uwolnieniu GC i jego dyfuzji do cytoplazmy komórek docelowych, najważniejszym czynnikiem regulującym dostęp endogennych GC do receptorów (GR lub MR) jest prawdopodobnie lokalny metabolizm steroidów z udziałem mikrosomalnego enzymu – dehydrogenazy 11 $\beta$ -hydroksysteroidowej (11 $\beta$ -HSD) (EC 1.1.1.146). Enzym ten katalizuje przekształcenia kortyzolu i jego nieaktywnego metabolitu kortyzonu u ludzi (lub kortykosteronu i 11-deoksykortykosteronu u gryzoni) (ryc. 5). Jego istnienie odkryto w 1953 r., ale dopiero w późnych latach 80 w pełni zrozumiano jego funkcję [7].

U ludzi zidentyfikowano dwie izoformy tego enzymu: typ 1 (11 $\beta$ -HSD1) oraz typ 2 (11 $\beta$ -HSD2), które są produktami dwóch różnych genów. Obie izoformy należą do nadrodziny dehydrogenaz o krótkim łańcuchu, ale ich homologia sięga tylko 21% i odnosi się głównie do miejsc konserwowanych u wszystkich przedstawicieli nadrodziny. Swoista tkankowo ekspresja izoenzymów odgrywa istotną rolę w fizjologii GC, gdyż reguluje dostęp aktywnych postaci GC do receptorów GR i MR. Obie izoformy różnią się pod względem swoistości substratowej, powinowactwa do substratu oraz kierunku katalizowanych reakcji (podsumowane w tabeli 1) [15]. Oba izoenzymy zawierają N-końcową sekwencję, umożliwiającą zakotwiczenie enzymów w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER). Część katalityczna 11 $\beta$ -HSD2 jest zwrócona w kierunku cytoplazmy, podczas gdy w 11 $\beta$ -HSD1 jest skierowana w stronę światła ER. Ma to swoje odzwierciedlenie w dostępności kofaktorów i potencjalnej dwukierunkowości działania 11 $\beta$ -HSD1 [53].

11 $\beta$ -HSD2 jest enzymem o dużej swoistości w stosunku do substratu, zależnym od NAD<sup>+</sup> i działającym wyłącznie jako dehydrogenaza. Uważa się, że główną funkcją 11 $\beta$ -HSD2 jest inaktywacja kortyzolu i dzięki temu zapobieganie jego wiązaniu do MR. Dlatego enzym ten występuje w tkankach charakteryzujących się wysoką ekspresją receptora dla mineralokortykoidów: nerkach, śliniankach przyusznych, gruczołach potowych, okrężnicy i mięśniach gładkich naczyń krwionośnych. Myszy pozbawione genu 11 $\beta$ -HSD2 wykazują dużą śmiertelność przedurodzeniową, a u tych, które przeżyją rozwija się zespół pozornego nadmiaru aldosteronu (apparent mineralocorticoid excess – AME), tak jak u ludzi ze swoistą mutacją w genie tej dehydrogenazy oraz u ludzi i zwierząt, u których aktywność 11 $\beta$ -HSD2 jest zablokowana inhibitorem [7]. W zespole AME obserwuje się aktywację MR przez GC w nerkach, co prowadzi do nadciśnienia, hiperkalemii, zasadowicy metabolicznej oraz obniżonego stężenia krążącej we krwi reniny i aldosteronu [2].



Ryc. 5. Reakcje katalizowane przez izoenzymy dehydrogenazy 11β-hydroksysteroidowej

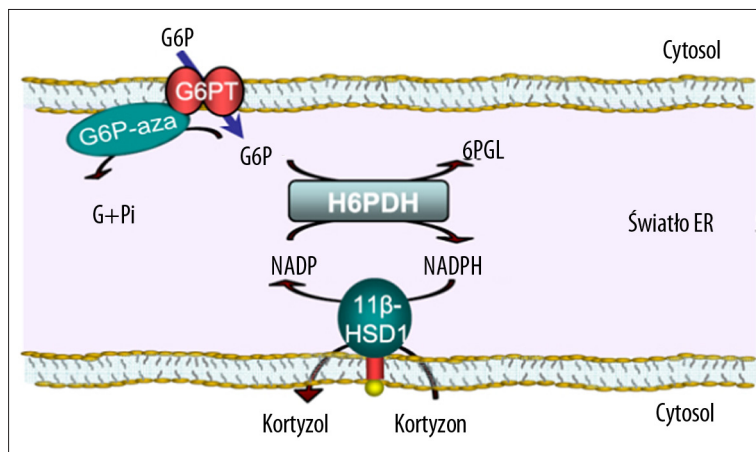
Tabela 1. Porównanie 11β-HSD1 i 11β-HSD2

	11β-HSD1	11β-HSD2
<b>Wielkość</b>	34 kDa	40 kDa
<b>Główna funkcja</b>	reduktaza	dehydrogenaza
<b>Powinowactwo do substratu oraz wartości <math>K_m</math></b>	małe	duże
	kortyzol: 17 μM	kortyzol: 12 nM
	kortykosteron: 20 μM	kortykosteron: 45 nM
	kortyzon: 200 μM	deksametazon: 140 nM
		kortyzon: nie jest substratem
		aldosteron: nie jest substratem
<b>Kofaktory</b>	NADP(H)	NAD <sup>+</sup>
<b>Rozmieszczenie</b>	rozpowszechniony	ograniczony
<b>Ekspresja tkankowa</b>	wątroba	kanaliki nerkowe
	tkanka tłuszczowa	gruczoły potowe
	dojrzały mózg	ślinianka przyuszną
	układ naczyniowy	okrężnica
	proksymalne kanaliki nerkowe	rozwijający się mózg
		łożysko
		układ naczyniowy
<b>Inhibitory</b>	kwas glicyretynowy	kwas glicyretynowy
	karbenoksolon	karbenoksolon
	furosemid	furosemid
	BVT.2733	
	„Związek 544” firmy Merck	

Wykorzystano [7,17,22,53].

11β-HSD2 występuje również w komórkach niemających MR, takich jak łożysko i rozwijający się mózg, gdzie prawdopodobnie stanowi ochronę przed potencjalnie szkodliwym działaniem nadmiaru kortyzolu/kortykosteronu [7]. Udokumentowano również występowanie 11β-HSD2 w tkankach nowotworowych. Wielokrotnie dowiedziono, że GC wykazują działanie antyproliferacyjne przez hamowanie cyklu komórkowego w fazie G1. Postawiono więc

hipotezę, że zwiększona ekspresja tej izoformy dehydrogenazy w komórkach bogatych w GR jest korzystna dla wzrostu komórek nowotworowych i może być istotnym składnikiem inicjacji i progresji nowotworu [15]. W miejscach, gdzie 11β-HSD2 nie występuje (np. dorosły mózg, kardiomyocyty) lub enzym ten jest inaktywowany przez zmianę w stanie redoks (np. tkanki uszkodzone) GC mogą działać jako główny ligand MR [16].



Ryc. 6. Umiejscowienie  $11\beta$ -HSD1 i H6PDH (wg [52] – zmodyfikowano); G6P – glukoza-6-fosforan; G6PT – transporter glukozy-6-fosforanu; G6Paza – glukoza-6-fosfataza; G – glukoza; 6PGL – 6-fosfoglukonian; H6PDH – dehydrogenaza heksozo-6-fosforanowa;  $11\beta$ -HSD1 – dehydrogenaza  $11\beta$ -hydroksysteroidowa 1

**$11\beta$ -HSD1** jest izoformą o niewielkiej swoistości substratowej, zależną od NADP(H). Występuje głównie w tkankach wykazujących dużą wrażliwość na GC (wątroba, tkanka tłuszczowa, płuca). Można ją znaleźć również w mózgu, zwłaszcza w podwzgórzu, hipokampie, korze i móżdżku. Ostatnie badania wykazały zwiększenie funkcji poznawczych u osób starszych, którym podawano inhibitory  $11\beta$ -HSD1 [38]. Izoforma ta jest aktywna w postaci dimeru i wykazuje kinetykę kooperatywną w stosunku do kortyzonu i 11-dehydrokortykosteronu jako substratów. Stąd  $11\beta$ -HSD1 dynamicznie przystosowuje się do nanomolarnych jak i mikromolarnych stężeń 11-oksosteroidów [53].

$11\beta$ -HSD1 współwystępuje po stronie światła błony ER z dehydrogenazą heksozo-6-fosforanową (H6PDH), która jak się okazało jest niezbędna do aktywności tego enzymu (ryc. 6). Kierunek reakcji katalizowanej przez  $11\beta$ -HSD1 jest zdeterminowany przez ilość dostępnego  $\text{NADP}^+$  i NADPH. W stanie oczyszczonym  $11\beta$ -HSD1 może działać dwukierunkowo, natomiast w obecności redukującego NADPH, powstającego z udziałem H6PDH,  $11\beta$ -HSD1 przełącza się na aktywność reduktazy generując aktywne GC [29]. Jednoczesna ekspresja genów kodujących H6PDH i  $11\beta$ -HSD1 została potwierdzona w wielu tkankach szczurzych, a największą ich ilość stwierdzono w wątrobie, nerkach i komórkach Leydiga [21].

Ważnym postępowaniem w zrozumieniu roli  $11\beta$ -HSD1 w działaniu GC było wyhodowanie myszy z niefunkcyjnym genem kodującym ten enzym. Myszy te były niezdolne do przekształcania 11-dehydrokortykosteronu do kortykosteronu, jednak nie wykazywały widocznych nieprawidłowości i zachowały w pełni aktywną izoformę  $11\beta$ -HSD2. Były również płodne i rodziły zdrowe potomstwo. Nadnercza samców myszy były powiększone, sugerując hiperplazję, którą można wyjaśnić stymulacją osi HPA, mającej na celu przywrócenie poziomu kortykosteronu. Badania na myszach z mutacją podkreśliły znaczenie  $11\beta$ -HSD1 dla aktywacji enzymów glukoneogenezy w wątrobie. Myszy te miały wyraźnie obniżone stężenie glukozy po głodzeniu w porównaniu z osobnikami bez tej mutacji [30]. Wykazywały również fenotyp kardioprotekcyjny, tj. niski poziom triglicerydów we krwi i podniesiony cholesterol HDL. Ponadto miały obniżony poziom rezystyny i TNF- $\alpha$ , ale podwyższony poziom mRNA adiponektyny w tkance tłuszczowej.

Myszy te poddane diecie bogatej w tłuszczę przybierały na wadze mniej niż myszy kontrolne, a odkładany tłuszcz umiejscawiał się głównie w tkance obwodowej [38].

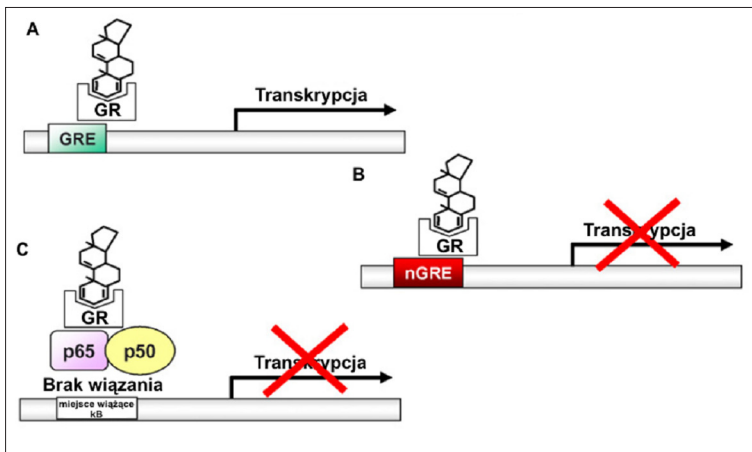
Mimo że ten izoenzym w większości tkanek wykazuje działanie reduktazy i zwiększa lokalnie stężenie aktywnych GC, to w kanalikach proksymalnych kory nerki funkcjonuje jako dezaktywująca dehydrogenaza, wykazująca bardzo nieznaczną aktywność reduktazy [22]. Stopień ekspresji  $11\beta$ -HSD1 w trakcie rozwoju nerek jest dość zróżnicowany. Nie wydaje się żeby enzym ten ulegał ekspresji w okresie płodowym, natomiast jest on indukowany u ssaków po urodzeniu i jego ilość wzrasta wraz ze zwiększającym się pobieraniem sodu. Fizjologiczna rola  $11\beta$ -HSD1 w nerkach nie została jeszcze w pełni określona. Minimalna aktywność reduktazy jest w pewnym stopniu zaskakująca ze względu na to, że nerki zawierają dużą ilość H6PDH. Mimo że inne reakcje enzymatyczne w komórkach proksymalnych nerki mogą współzawodniczyć o NADPH, co wyjaśniałoby ograniczoną aktywność reduktazy, to nawet w sytuacji zapewnienia optymalnych warunków do zajścia reakcji aktywność ta jest minimalna lub żadna. Przyczyną tego może być potranslacyjna modyfikacja enzymu lub obecność endogennego kofaktora, który hamowałby aktywność reduktazy [22].

Ze względu na bardzo duże znaczenie GC w utrzymaniu homeostazy, zmiany w aktywności izoform  $11\beta$ -HSD mogą negatywnie wpływać na wiele procesów metabolicznych przyczyniając się do rozwoju otyłości, cukrzycy typu 2, nadciśnienia oraz chorób sercowo-naczyniowych [1,26]. Dlatego znaczenie tego enzymu jako potencjalnego celu w terapii wyżej wymienionych zaburzeń jest bardzo intensywnie badane [34,51].

#### GENOMOWY MECHANIZM DZIAŁANIA GLIKOKORTYKOIDÓW

GR po związaniu hormonu reguluje bezpośrednio lub pośrednio swoiste zmiany w transkrypcji DNA i powoduje syntezę nowych białek. W nieobecności liganda GR występuje przede wszystkim w cytoplazmie w wielobiałkowych kompleksach zawierających białka szoku cieplnego: Hsp90, Hsp70, Hsp65 i Hsp40. Ponadto może oddziaływać również z immunofilinami, innymi białkami opiekuńczymi (np. p23) i licznymi kinazami aktywowanymi przez mitogeny (MAPK) [42]. Związanie hormonu przez





Ryc. 7. Mechanizm działania glikokortykoidów (wg [42] – zmodyfikowano); GR – receptor glikokortykoidów; GRE – element odpowiadający na GR; negr – negatywny element odpowiadający na GR

GR zapoczątkowuje oddysocjowywanie receptora od białek, z którymi współwystępował w cytoplazmie i transport kompleksu GR-ligand do jądra [20].

Oprócz wiązania liganda, inne szlaki sygnałowe mogą bezpośrednio modulować odpowiedź komórkową na GC poprzez fosforylację GR. Fosforylacja GR przez kinazy, takie jak MAPK, CDK oraz GSK-3 może wpływać na jego aktywność przez zmianę konformacji receptora, zmianę powinowactwa do DNA oraz do koregulatorów. Ponadto fosforylacja może blokować przemieszczanie się receptora z cytoplazmy do jądra oraz kierować go na zależną od ubiquitynacji degradację. Różne schematy fosforylacji dostarczają kolejnego mechanizmu za pomocą którego GR może wpływać na ekspresję genów w różnych komórkach [18]. Poza fosforylacją na regulację działania GR wpływają również inne potranslacyjne modyfikacje, takie jak ubiquitynacja, sumoilacja i acetylacja [11,31].

Wczesne badania wykazały, że zaktywowany GR działa jako czynnik transkrypcyjny, indukując lub hamując ekspresję genów docelowych przez bezpośrednie oddziaływanie ze swoistym elementem odpowiadającym na GC (glucocorticoid response element – GRE) znajdującym się w rejonie promotorowym [23]. Na GRE składa się 15 nukleotydów: dwie 6 nukleotydowe sekwencje będące niedokładnym palindromem przedzielone 3 nukleotydową sekwencją rozdzielającą (spacer). Wśród tych 15 nukleotydów tylko kilka pozycji jest niezmiennych, a większość z nich może zostać zamieniona bez większego wpływu na powinowactwo do receptora [40].

Niedawna analiza organizacji i funkcji elementów genomowych odpowiedzialnych za regulację transkrypcji przez GR wykazała, że:

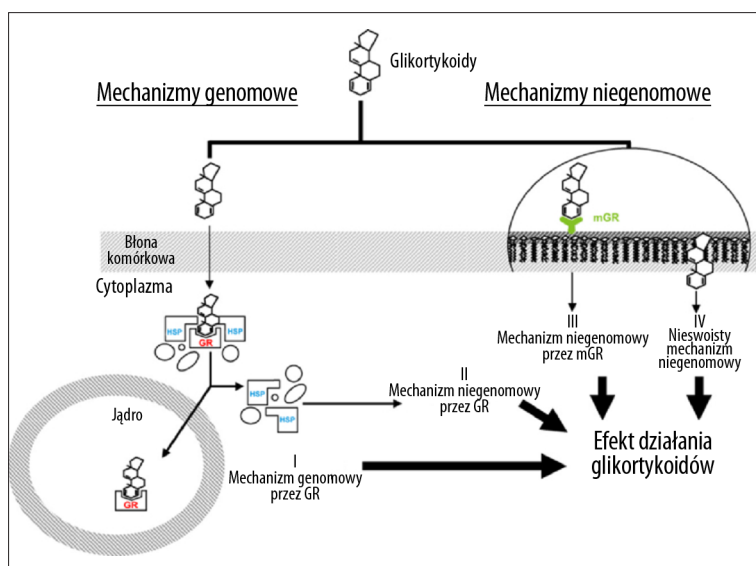
- zajęcie miejsca GRE przez GR jest czynnikiem warunkującym odpowiedź na GC (przynajmniej w komórkach linii ludzkiego raka płuc A549);
- sekwencja konsensusowa wykazuje dość dużą zmienność między promotorami różnych genów, jednak poszczególne GRE są wysoce konserwowane ewolucyjnie w tych samych promotorach;
- większość GRE znajduje się w znacznych odległościach od miejsca startu transkrypcji genów docelowych (>10 kpz);

- GRE są równomiernie rozmieszczone powyżej jak i poniżej regulowanych genów, pozycja indywidualnych GRE jest zazwyczaj konserwowana ewolucyjnie;
- GRE są zazwyczaj złożonymi elementami obejmującymi miejsca wiązania wielu czynników transkrypcyjnych [40].

Dostęp kompleksu GR-ligand do GRE dokonuje się poprzez procesy, w których następuje odłączenie białek opiekuńczych od receptora oraz następującej po nich fosforylacji, dimeryzacji i translokacji do jądra [23].

Wewnątrzkomórkowy transport GR jest regulowany przez białka opiekuńcze, wspomagane przez białka związane z mikrotubulami MAP (microtubule associated protein). Transport GR do jądra wzdłuż mikrotubul odbywa się w większości komórek. W neuronach GR (i MR) został odnaleziony w wielu odległych od jądra miejscach, takich jak zakończenia presynaptyczne, dendryty, kolce dendrytyczne i błony postsynaptyczne, wskazując na decydującą rolę transportu przez mikrotubule w regulacji transdukcji sygnału przez GC w tych komórkach. Białka związane z cytoszkieletem wykazują bardzo różny poziom ekspresji w różnych typach neuronów. Wprowadza to dodatkowy, swoisty komórkowo, poziom regulacji działania GC [12]. Niedawno wykazano swoiste dla różnych regionów hipokampa różnice w translokacji GR i MR do jądra pod wpływem przyłączenia GC [37].

Kolejnym poziomem regulacji dostępu GR do GRE jest obecność swoistych koregulatorów, które są silnymi modyfikatorami funkcji receptorów jądrowych. Koregulatory są częścią dużych jądrowych kompleksów wielobiałkowych wpływających na związane z DNA receptory steroidowe. Mogą one działać jako koaktywatory lub korepresory. Zidentyfikowano ponad 100 białek koregulatorowych receptorów jądrowych, spośród których dziesiątki wykazują aktywność w stosunku do GR i MR. Nierównomierne rozmieszczenie koregulatorów w różnych tkankach odpowiadających na GC jest kolejnym czynnikiem decydującym o działaniu GC. Ponadto, aktywność koregulatorów jest ściśle kontrolowana przez modyfikacje potranslacyjne [27]. Interesującym zagadnieniem związanym z koregulatorami jest to, czy swoistość efektów MR i GR jest regulowana przez dołączanie swoistych koregulatorów. Mimo że GR i MR wiążą się do tej samej sekwencji regulatorowej w DNA, to wynik transkrypcji może być różny w zależności od koaktywatora związanego z określonym genem oraz



Ryc. 8. Podsumowanie genomowego i niegenomowego mechanizmu działania GC (wg [42] – zmodyfikowano); GR – receptor glikokortykoidów; mGR – błonowy receptor glikokortykoidów; Hsp – białka szoku cieplnego

liganda, jaki związany jest z receptorem [12]. Kompleks GR-ligand wraz z koaktywatorami, przyłączony do regionu promotorowego lub regionu wzmacniacza, są niezbędne do ostatecznego przyłączenia polimerazy RNA II. Proces ten nazywamy zależną od liganda transaktywacją (ryc. 7A) [20].

Kompleks GC-ligand może również hamować transkrypcję genów na skutek wiązania się do sekwencji różnej od GRE zwanej nGRE (negatywny GRE) (ryc. 7B). nGRE został zidentyfikowany dla wielu genów. Przykładem jest represja genu proopiomelanokortyny zachodząca podczas regulacji osi HPA na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego przez ACTH i CRH. Porównanie nGRE wykazało, że nie mają one wysoce konserwowanej sekwencji konsensusowej. Ponadto GR wykazuje mniejsze powinowactwo do sekwencji nGRE niż GRE. Mechanizm hamowania transkrypcji przez GC może zachodzić również przez złożone sekwencje zawierające nGRE oraz miejsca wiązania innych czynników transkrypcyjnych [14].

Aktywowany GR poza działaniem jako pozytywny, a w pewnych warunkach, jako negatywny czynnik transkrypcyjny, wpływa również na transkrypcję genów pośrednio przez oddziaływania typu białko-białko. Przykładem takiego działania jest zdolność monomerów kompleksu GR-ligand do hamowania indukcji ekspresji genów odpowiedzi zapalnej przez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak: białko aktywacyjne 1 (AP-1, c-fos/c-jun), jądrowy czynnik kappa B (NF- $\kappa$ B) czy czynnik regulujący interferon 3 (IRF-3) [42] (ryc. 7C). Aktywność ta, określana jako zależna od liganda transrepresja, jest swoista co do promotora, jednak nie wydaje się, żeby wymagała wiązania do swoistej sekwencji DNA. Transrepresja wyjaśnia działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne klinicznie używanych syntetycznych GC, takich jak deksametazon [20]. Jest ona również istotnym mechanizmem różnicowanego wpływu GC na funkcjonowanie neuronów [10].

#### **NIEGENOMOWY MECHANIZM DZIAŁANIA GLIKOKORTYKOIDÓW**

Mimo że działanie GC zależy głównie od zmian w transkrypcji genów, to niektóre procesy indukowane przez te

związki zachodzą zbyt szybko, aby mogły być tym tłumaczone. Szybkie działanie GC wykazano w różnych komórkach i tkankach oraz dla odpowiedzi behawioralnej u różnych gatunków kręgowców. Wśród tkanek i układów, w których scharakteryzowano takie działanie GC są: mięśnie, trzustka, serce, tkanka tłuszczowa, system immunologiczny oraz mózg. Na przykład w mięśniach gładkich wykazano hamowanie ich skurczu w tchawicy przez szybkie działanie GC, które nie jest blokowane przez antagonisty GR. Podobne, szybkie działanie hamujące GC wywierały na uwalnianie insuliny z komórek  $\beta$  trzustki. W sercu GC indukują śródbłonkowe wydzielanie tlenu azotu na skutek aktywacji syntazy tlenu azotu za pośrednictwem kinazy 3-fosfatydilinozytolowej (PI3K) i kinazy Akt, które są odpowiedzialne za silny kardioprotekcyjny efekt steroidów. Szybkie działanie GC obserwujemy również w miejscach działania sprzężenia zwrotnego regulującego wydzielanie GC. W przysadce, stymulowane przez CRH wydzielanie ACTH hamowane jest w ciągu kilku minut przez szybki mechanizm, niezależny od transkrypcji [44].

Zaproponowano trzy różne mechanizmy wyjaśniające szybkie niegenomowe działanie GC (ryc. 8):

- nieswoiste oddziaływanie GC z błoną komórkową;
- niegenomowe efekty wywołane przez cytosolowy GR;
- swoiste wiązanie się GC do znajdującego się w błonie receptora [42].

Glikokortykoidy w dużych stężeniach mogą zmieniać właściwości fizyko-chemiczne błon biologicznych, zwłaszcza błony komórkowej i mitochondrialnej. Wykazano, że GC mogą wbudowywać się w te błony i zmieniać funkcje białek błonowych, a przez to wpływać na peroksydację lipidów oraz przepuszczalność błon [41]. W komórkach układu odpornościowego, na skutek oddziaływania GC z ich błoną komórkową dochodzi do redukcji przepływu jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  przez błonę, co przyczynia się do szybkiej immunosupresji i w konsekwencji redukcji procesów zapalnych [8]. Pod wpływem GC zaobserwowano również zwiększenie wycieku protonów z mitochondriów, co prowadzi do zmniejszenia wytwarzania ATP i przyczynia się do istotnych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek [42].

W niegenomowym mechanizmie działania GC, może również pośredniczyć klasyczny GR. Jak wcześniej wspomniano niezwiązany z ligandem GR znajduje się w cytoplazmie w kompleksie zawierającym białka szoku cieplnego i liczne kinazy (np. MAPK). Po przyłączeniu się liganda do receptora, z wielobiałkowego kompleksu odłącza się GR i jest translokowany do jądra, natomiast uwolnione białka, np. kinaza tyrozynowa Src, mogą być odpowiedzialne za niektóre szybkie efekty działania GC. Inna obserwacja dotyczy kwasu arachidonowego (AA), istotnego mediatora wzrostu komórkowego, jak i wielu reakcji metabolicznych oraz zapalnych. Uwolnienie AA ze znajdujących się w błonie fosfolipidów jest kontrolowane przez różne czynniki (np. czynniki wzrostu, białka adaptorowe, kinazy MAP oraz lipokortynę 1) i może być hamowane przez GC na szlaku zależnym od GR, a niezależnym od transkrypcji [9]. Wyniki te wskazują, że GR może działać nie tylko jako jądrowy regulator transkrypcji genów, ale może być również zaangażowany w szybkie niegenomowe działanie GC [42].

Trzecia hipoteza mogąca wyjaśniać niegenomowe działanie GC zakłada istnienie błonowego receptora GC (mGR). Istnienie tego receptora po raz pierwszy wykazano w błonach neuronów płazów i w komórkach chłoniaka u gryzoni. Receptor mGR został zidentyfikowany także w ludzkich jednojądrowych komórkach obwodowych krwi z użyciem bardzo wrażliwego barwienia immunofluorescencyjnego i monoklonalnych przeciwciał, takich samych jak dla GR. Nadekspresja GR nie wykazała większej ilości mGR w błonie komórkowej. Stąd wydaje się, że mGR nie jest tylko GR, który został przetransportowany do błony. Sugeruje się raczej, że mGR jest wariantem GR powstającym przez alternatywny splicing, zmianę promotora lub obróbkę potranslacyjną [5]. Dodatkowych dowodów dostarczają obserwacje kliniczne. Jednym z przykładów jest wykazana u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów podwyższona ilość mGR w monocytach i limfocytach B, która pozytywnie koreluje z różnymi parametrami rozwoju choroby [42]. Pojawia się również coraz więcej dowodów na to, że ten receptor błonowy jest sprzężony z białkami G oraz ich kaskadą sygnałową np. cAMP, kinazą białkową A (PKA) i C (PKC). Co ciekawe, szybki efekt GC występuje również u niższych kręgowców i stanowi mechanizm konserwujący ewolucyjnie do tego stopnia, że potencjalny receptor błonowy może stanowić ewolucyjnie starszą postać GR [44].

### ZABURZENIA W STĘŻENIU GLIKOKORTYKOIDÓW

Ścisła kontrola w uwalnianiu GC jak i ich komórkowo swoista aktywność jest niezbędna do prawidłowej regulacji metabolizmu w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Jest to szczególnie widoczne w stanach niedoboru lub nadmiaru GC, występującego odpowiednio w chorobie Addisona i w zespole Cushinga.

Choroba Addisona, to rzadkie schorzenie układu dokrewnego, w którym nadnercza wytwarzają niewystarczającą ilość hormonów steroidowych (GC i często także mineralokortykoidów). Schorzenie to po raz pierwszy opisał w 1855 roku brytyjski chirurg Thomas Addison. Objawy choroby są mało charakterystyczne, a najczęstsze z nich to: narastające zmęczenie, słabość mięśni, utrata łaknienia, spadek masy ciała, wymioty, biegunka, niedociśnienie

ortostatyczne, hipoglikemia (szczególnie u dzieci), bóle: brzucha, mięśni, stawów i głowy, pocenie się oraz zmiany w nastroju i osobowości. Choroba Addisona może być wywołana przez reakcję autoimmunologiczną przeciwko korze nadnerczy, wrodzony brak zdolności syntezy glikokortykoidów oraz dysfunkcję przysadki [45].

Dla porównania u osób, u których występuje długotrwała i podwyższona sekrecja GC rozwija się zespół Cushinga. Zespół opisał amerykański lekarz Harvey Cushing w 1932 roku. Jest on spowodowany przez nowotwory nadnerczy (znany jako choroba Cushinga), rozrost nadnerczy, ektopowe wytwarzanie ACTH (np. przez niewielkie guzy nowotworowe płuc) lub wywołany terapią syntetycznymi GC (tzw. egzogeny zespół Cushinga). Najczęściej choroba ta występuje w postaci egzogennej, jest ona tymczasowa i jej objawy ustępują, gdy pacjenci przestają przyjmować syntetyczne GC. Natomiast endogenna postać, obejmująca wymienione wcześniej przyczyny, nie jest częsta i zazwyczaj rozwija się bardzo powoli. Diagnoza endogennego zespołu Cushinga jest trudna ze względu na to, że wiele z symptomów często występuje w populacji. Jednym z objawów jest tzw. otyłość brzuszna charakteryzująca się rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej głównie na tułowiu i twarzy, a nieobejmująca kończyn. Ponadto, u chorych obserwuje się podwyższone stężenie cholesterolu, nadciśnienie oraz oporność na insulinę mogącą prowadzić do hiperglikemii i rozwoju cukrzycy typu 2. U pacjentów rozwija się również osteoporoza, ponieważ duże stężenie GC osłabia jelitową resorpcję wapnia, hamuje powstawanie kości, natomiast przyspiesza ich resorpcję. Ponadto występują zaburzenia układu pokarmowego, zakażenia bakteriami i grzybami oportunistycznymi oraz nieprawidłowości w leczeniu ran (przez hamujące działanie kortyzolu na układ immunologiczny). Wśród innych objawów można wymienić: okrągłą twarz (tzw. twarz księżycowata), nadmierne pocenie się, teleangiektazję czyli rozszerzenie drobnych naczyń krwionośnych leżących bezpośrednio pod skórą (tzw. „pajęczki naczyniowe”), cienką skórę (na której łatwo powstają siniaki), słabość mięśni (spowodowana katabolicznym działaniem GC na mięśnie), hirsutyzm (owłosienie typu męskiego u kobiet) oraz różowe lub czerwone rozstępny na tułowiu, pośladkach, nogach i piersiach. Nadmierne stężenie kortyzolu może również spowodować bezsenność, obniżone libido, impotencję, brak miesiączki oraz bezpłodność. Pacjenci często cierpią na różne zaburzenia psychiczne wahające się od stanów euforycznych do psychoz. Często jest również występowanie depresji i niepokojów [39].

Warto podkreślić, że wiele z wyżej wymienionych skutków nadmiaru GC są składowymi zespołu metabolicznego, który opisuje wachlarz blisko związanych ze sobą zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość, hiperglikemia, dyslipidemia, nadciśnienie czy oporność na insulinę. Dlatego powstała hipoteza, mówiąca, że przyczyną tych chorób i zaburzeń, oprócz złej diety i siedzącego trybu życia, może być długotrwałe utrzymywanie się podwyższone stężenia GC [1,26,36]. W świetle tych obserwacji badania nad tkankowo swoistym mechanizmem działania GC stały się jednym z ważniejszych tematów ostatniej dekady, dając nadzieję na rozwój nowych sposobów leczenia tych zaburzeń metabolicznych. Co istotne, zwiększony poziom GC zaobserwowano u osób z opornością na insulinę, silnie korelujący z hiperglikemią i fenotypem otłuszczonej wątroby. Jednak otyłość niekoniecznie

musi być związana z ogólnoustrojowym zwiększeniem poziomu GC, bardziej istotne jest lokalne stężenie GC, które jest regulowane przez 11 $\beta$ -HSD [50].

Oprócz zespołu metabolicznego, chronicznie zwiększony poziom GC zaobserwowano również u chorych cierpiących na zespół wyniszczenia towarzyszący chorobie nowotworowej tzw. kacheksja. W stanie tym zachodzi niekontrolowana masywna utrata tkanki tłuszczowej i masy mięśni szkieletowych prowadząca do zagrażającego życiu osłabieniu pacjenta, znacznie pogarszającym jakość życia oraz tolerancję interwencji terapeutycznych. Z powodu kacheksji umiera około 30% pacjentów z nowotworami [46].

Zwiększona aktywność osi HPA jest również powszechna w depresji, anoreksji, zaburzeniach obsesyjno-kompulsywnych oraz w stanach panicznych. Natomiast w stresie, po przeżyciach traumatycznych oraz w sezonowo występujących zaburzeniach afektywnych obserwuje się zredukowaną aktywność osi HPA [35].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Anagnostis P., Athyros V.G., Tziomalos K., Karagiannis A., Mikhailidis D.P.: Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009; 94: 2692–2701
- [2] Atanasov A.G., Ignatova I.D., Nashev L.G., Dick B., Ferrari P., Frey F.J., Odermatt A.: Impaired protein stability of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2: a novel mechanism of apparent mineralocorticoid excess. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007; 18: 1262–1270
- [3] Barnes P.J.: Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur. Respir. J.*, 2006; 27: 413–426
- [4] Bartel D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281–297
- [5] Bartholome B., Spies C.M., Gaber T., Schuchmann S., Berki T., Kunkel D., Bienert M., Radbruch A., Burmester G.R., Lauster R., Scheffold A., Buttgerit F.: Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.*, 2004; 18: 70–80
- [6] Bornstein S.R., Engeland W.C., Ehrhart-Bornstein M., Herman J.P.: Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2008; 19: 175–180
- [7] Buckingham J.C.: Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br. J. Pharmacol.*, 2006; 147(Suppl.1): S258–S268
- [8] Buttgerit F., Straub R.H., Wehling M., Burmester G.R.: Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 3408–3417
- [9] Croxtall J.D., Choudhury Q., Flower R.J.: Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 130: 289–298
- [10] Datson N.A., Morsink M.C., Meijer O.C., de Kloet E.R.: Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 583: 272–289
- [11] Davies L., Karthikeyan N., Lynch J.T., Sial E.A., Gkourtsa A., Demonacos C., Krstic-Demonacos M.: Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol.*, 2008; 22: 1331–1344
- [12] de Kloet E.R., Fitzsimons C.P., Datson N.A., Meijer O.C., Vreugdenhil E.: Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res.*, 2009; 1293: 129–141
- [13] Dickmeis T.: Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.*, 2009; 200: 3–22
- [14] Dostert A., Heinzl T.: Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10: 2807–2816
- [15] Draper N., Stewart P.M.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.*, 2005; 186: 251–271
- [16] Funder J.W.: Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail. Rev.*, 2005; 10: 15–22
- [17] Fuster D., Escher G., Vogt B., Ackermann D., Dick B., Frey B.M., Frey F.J.: Furosemide inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Endocrinology*, 1998; 139: 3849–3854
- [18] Gallier-Beckley A.J., Cidlowski J.A.: Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, 2009; 61: 979–986
- [19] Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V.: Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58: 685–704
- [20] Glass C.K.: Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 556–560
- [21] Gomez-Sanchez E.P., Romero D.G., de Rodriguez A.F., Warden M.P., Krozowski Z., Gomez-Sanchez C.E.: Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. *Endocrinology*, 2008; 149: 525–533
- [22] Gong R., Morris D.J., Brem A.S.: Human renal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 functions and co-localizes with COX-2. *Life Sci.*, 2008; 82: 631–637
- [23] Goulding N.J.: The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation – a four-ring circus. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004; 4: 629–636
- [24] Gross K.L., Cidlowski J.A.: Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2008; 19: 331–339
- [25] Gross K.L., Lu N.Z., Cidlowski J.A.: Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2009; 300: 7–16
- [26] Hale C., Wang M.: Development of 11 $\beta$ -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2008; 8: 702–710
- [27] Han S.J., Lonard D.M., O'Malley B.W.: Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2009; 20: 8–15
- [28] Heitzer M.D., Wolf I.M., Sanchez E.R., Witchel S.F., DeFranco D.B.: Glucocorticoid receptor physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2007; 8: 321–330
- [29] Hewitt K.N., Walker E.A., Stewart P.M.: Minireview: hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Endocrinology*, 2005; 146: 2539–2543
- [30] Holmes M.C., Kotelevtsev Y., Mullins J.J., Seckl J.R.: Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001; 171: 15–20

## PODSUMOWANIE

W ostatnich latach wiedza na temat GC i mechanizmu ich działania rosła w sposób wykładniczy m.in. dlatego, że glikokortykoidy są grupą najważniejszych i najczęściej przepisywanych leków przeciwzapalnych, przeciwalergicznymi i immunosupresyjnymi, która mimo wielu poważnych działań niepożądanych wciąż nie może znaleźć godnego następcy. Być może stało się to siłą napędową do badań nad lepszym zrozumieniem i rozszyfrowaniem skomplikowanego mechanizmu działania GC na poziomie komórki, tkanki czy organizmu. Dodatkowo hipoteza, że podwyższony poziom GC może się przyczyniać do rozwoju otyłości, cukrzycy typu 2, nadciśnienia oraz chorób sercowo-naczyniowych, które mogą się stać plagą XXI wieku, skłaniała do podjęcia badań mających na celu wyjaśnienie tkankowościsłego mechanizmu działania GC, gdyż może się to przyczynić do poznania patogenetyki wyżej wymienionych chorób metabolicznych oraz pozwoli na projektowanie nowych metod ich leczenia.

- [31] Lu N.Z., Cidlowski J.A.: Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell. Biol.*, 2006; 16: 301–307
- [32] Lu N.Z., Wardell S.E., Burnstein K.L., Defranco D., Fuller P.J., Giguere V., Hochberg R.B., McKay L., Renoir J.M., Weigel N.L., Wilson E.M., McDonnell D.P., Cidlowski J.A.: International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58: 782–797
- [33] Meijer O.C., Karssen A.M., de Kloet E.R.: Cell- and tissue-specific effects of corticosteroids in relation to glucocorticoid resistance: examples from the brain. *J. Endocrinol.*, 2003; 178: 13–18
- [34] Oppermann U.: Type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase as universal drug target in metabolic diseases? *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2006; 6: 259–269
- [35] Pariante C.M., Thomas S.A., Lovestone S., Makoff A., Kerwin R.W.: Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? *Psychoneuroendocrinology*, 2004; 29: 423–447
- [36] Saltiel A.R.: New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, 2001; 104: 517–529
- [37] Sarabdjitsingh R.A., Meijer O.C., Schaaf M.J., de Kloet E.R.: Subregion-specific differences in translocation patterns of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Res.*, 2009; 1249: 43–53
- [38] Seckl J.R.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004; 4: 597–602
- [39] Shibli-Rahhal A., Van Beek M., Schlechte J.A.: Cushing's syndrome. *Clin. Dermatol.*, 2006; 24: 260–265
- [40] So A.Y., Chaivorapol C., Bolton E.C., Li H., Yamamoto K.R.: Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet.*, 2007; 3: e94
- [41] Stahn C., Buttgerit F.: Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2008; 4: 525–533
- [42] Stahn C., Löwenberg M., Hommes D.W., Buttgerit F.: Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007; 275: 71–78
- [43] Szeto A., Gonzales J.A., Spitzer S.B., Levine J.E., Zaias J., Saab P.G., Schneiderman N., McCabe P.M.: Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*, 2004; 29: 861–866
- [44] Tasker J.G., Di S., Malcher-Lopes R.: Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, 2006; 147: 5549–5556
- [45] Ten S., New M., Maclaren N.: Clinical review 130: Addison's disease 2001. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 2909–2922
- [46] Tisdale M.J.: Cachexia in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 862–871
- [47] Torpy D.J., Ho J.T.: Corticosteroid-binding globulin gene polymorphisms: clinical implications and links to idiopathic chronic fatigue disorders. *Clin. Endocrinol.*, 2007; 67: 161–167
- [48] van der Laan S., Meijer O.C.: Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; 585: 483–491
- [49] van Raalte D.H., Ouwens D.M., Diamant M.: Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of the therapeutic options? *Eur. J. Clin. Invest.*, 2009; 39: 81–93
- [50] Vegiopoulos A., Herzog S.: Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007; 275: 43–61
- [51] Walker B.R.: Cortisol – cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet. Med.*, 2006; 23: 1281–1288
- [52] Walker E.A., Ahmed A., Lavery G.G., Tomlinson J.W., Kim S.Y., Cooper M.S., Ride J.P., Hughes B.A., Shackleton C.H., McKiernan P., Elias E., Chou J.Y., Stewart P.M.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulation by intracellular glucose 6-phosphate provides evidence for a novel link between glucose metabolism and hypothalamo-pituitary-adrenal axis function. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 27030–27036
- [53] Wamil M., Seckl J.R.: Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target. *Drug Discov. Today*, 2007; 12: 504–520

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.