

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2015

Adéla Špičánová



Univerzita Palackého V Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv vybraných agonistů PPARs na regulaci CYP
epoxygenáz**

Diplomová práce

Autorka:	Bc. Adéla Špičánová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. MUDr Jiří Ehrmann, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Adéla Špičánová

Název diplomové práce: Vliv vybraných agonistů PPARs na regulaci CYP epoxygenáz

Pracoviště: Oddělení histologie a embryologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Rok obhajoby diplomové práce: 2015

Klíčová slova: Cytochrom P450, mnohočetná léková rezistence, CYP epoxygenázy, CYP2J2, PPARs, fenofibrát, bezafibrát, gemfibrozil, buněčná linie HEK 293 a HepG2, Western Blott.

Počet stran: 62

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Souhrn:

Cytochromy P450 hrají důležitou roli v biotransformaci xenobiotik. Metabolismus léčiv je v současnosti spojován s mnohočetnou lékovou rezistencí, která se stala problémem při rezistenci rakovinných buněk na chemoterapii. Zajímavou skupinou CYP enzymů jsou CYP 450 epoxygenázy, do kterých patří rodiny CYP2C a CYP2J2. Tyto enzymy se nacházejí zejména v játrech, ale také v ledvinách, plicích, gastrointestinálním traktu, mozku atd. Podílejí se na metabolismu 20 % klinicky významných léčiv, ale také mají významné endogenní funkce, převádějí kyselinu arachidonovou na epoxyeicosatrienové kyseliny (EETs), které v buňkách podporují proliferaci, brání apoptóze, účastní se buněčné signalizace, regulují transport iontů, atd.

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) jsou transkripční faktory, které jsou zahrnuty v celé řadě biologických procesů jako je např. zánět, proliferace, diferenciací, regulují homeostázu lipidů a glukózy. Díky jejich funkcím se staly potenciální pro chemoprevenci a terapii rakoviny. Experimentální část diplomové práce se věnuje vlivu PPAR α na regulaci proteinu CYP2J2 v embryonální ledvinové buněčné linii HEK293 a nádorové jaterní buněčné linii HepG2. Obě tyto linie byly nejprve ovlivněny PPAR α ligandy, fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem. Pomocí western blot analýzy byla detekována exprese CYP2J2 proteinu.

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Bc. Adéla Špičánová

Title of theses: Effects of PPARs agonists to regulation of CYP epoxygenasis.

Department: Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Palacky University in Olomouc

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

The year of presentation: 2015

Keywords: Cytochrome P450, Multidrug rezistence, CYP epoxygenases, CYP2J2, PPARs, Fenofibrate, Bezafibrate, Gemfibrozile, Cell lines of HEK 293 and HepG2, Westtern Blott.

Number of pages: 62

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary:

Cytochromes P450 play an important role in the biotransformation of xenobiotics. Drug metabolism is currently associated with multidrug resistance which has become a problem in the resistance of cancer cells to chemotherapy. An interesting group of CYP enzymes are CYP 450 epoxygenases, which belong to a family of CYP2C CYP2J2. These enzymes are expressed in various tissues, especially in the liver but also in kidney, lung, gastrointestinal tract, brain, etc. They are involved in the metabolism of 20% of clinically important drugs. They also have important endogenous function. They convert arachidonic acid to epoxyeicosatrienoic acid (EETs), which are involved in regulation of cell proliferation, avoiding to apoptosis, cell signaling, ion transport and etc.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are transcription factors which are included in a number of biological processes such as e.g. inflammation, proliferation, differentiation, regulate lipid and glucose homeostasis. Their functions have become potential for chemoprevention and cancer therapy. Experimental work is devoted to the influence of PPAR α in the regulation of protein CYP2J2 in embryonic kidney cell line HEK293 and liver tumor cell line HepG2. Both of these lines were initially affected PPAR α ligands, fenofibrate, bezafibrate and gemfibrozil. Then, changes in expression of CYP2J2 protein were estimated by western blot analysis.

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Jiřího Ehrmanna, Ph.D. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Olomouci dne:.....

.....

Bc. Adéla Špičánová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu mé diplomové práce prof. MUDr. Jířímu Ehrmannovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, připomínky, cenné rady a pomoc při zpracovávání mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat slečně Mgr. Kateřině Čížkové za pomoc, ochotu a vedení při realizaci celé experimentální části. Také velké díky patří mé rodině a příteli za podporu a trpělivost při sepisování své práce.

Obsah

Seznam použitých zkratek	12
Cíle diplomové práce	14
Teoretická část	15
1 Úvod.....	16
1.1. Cytochromy P450	17
1.1.1. Biotransformace xenobiotik.....	20
1.1.2. Mnohočetná léková rezistence a CYP 450	20
1.1.4. Cytochrom P450 epoxygenázy	23
1.2. Receptory aktivované proliferátory peroxizomů	26
1.2.1 Proteinová struktura PPARs	27
1.2.2 Způsob aktivace PPARs	27
1.2.3 Izotopy PPARs	29
1.2.4 Ligandy PPARs	30
1.2.5 PPARs ve vztahu s CYP 450 epoxygenázami.....	32
Experimentální část.....	33
2 Metodika	34
2.1 Experimentální ovlivnění exprese CYP2J2 různými ligandy receptoru PPRA α u lidské buněčné linie HEK 293 a lidské nádorové buněčné linie HepG2	34
2.1.1 Biologický materiál	34
2.1.2 Podmínky kultivace	34
2.1.3 Přístrojová technika a pomůcky	34
2.1.4 Chemikálie, roztoky a pufry	35
2.1.5 Použité protilátky.....	37
2.1.6 Pracovní postup	38
2.1.6.1 Pasážování buněk	38
2.1.6.2 Test životaschopnosti buněk	38
2.1.6.3 Příprava buněčných lyzátů a proteinových frakcí pro western blot	40
2.1.6.4 SDS–PAGE a Western blot analýza	41
3 Výsledky	43
3.2 Experimentální ovlivnění exprese CYP2J2 různými ligandy receptoru PPRA α u lidské buněčné linie HEK 293 a lidské nádorové buněčné linie HepG2	43

3.2.1	Test životaschopnosti buněk.....	43
3.2.2	Příprava buněčných lyzátů a proteinových frakcí pro western blot.....	51
3.2.3	Western blot analýza.....	53
4	Diskuze	56
5	Závěr	58
	Seznam použité literatury	59

Seznam použitých zkratek

CYP 450	Cytochrom P450
CO ₂	Oxid uhličitý
CO	Oxid uhelnatý
GIT	Gastrointestinální trakt
Fe ³⁺	Atom hemového železa (železitý iont)
NADP ⁺	Nikotinaminadenindinukleotid fosfát
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát redukováný
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
O ₂	Kyslík
H ⁺	Vodík
H ₂ O	Voda
OH	Hydroxylová funkční skupina
SH	Thiolová funkční skupina
COOH	Hydroxylová funkční skupina
NH ₂	Aminoskupina
RH	Substrát
ROH	Oxidovaný substrát
MDR	(Multidrug resistance) Mnohočetná léková rezistence
EETs	Epoxyeicosatrienové kyseliny
sEH	Rozpustné epoxy hydroxylázy
DHETs	Dihydroxyeicosatrienové kyseliny
NR	(Nuclear receptor) Jaderné receptory
PPAR	(Peroxisome Proliferator-activated Receptor) Receptory aktivované proliferátory peroxizomů
PPRE	(PPAR Response Element) responzivní element pro PPAR
RXR	(Retinoid X Receptor) Receptor pro retinoid X
SMRT	Tlumící mediátor pro retinoidy a thyroidní receptor
N-CoR	Jaderný korepresor receptorů
PBP	Vázající protein
SRC-1	Koaktivátor steroidních receptorů
CBP	CREB-vázající protein

PBC-1 α	PPAR γ koaktivátor 1 α
8-HETE	8- hydroxyeicosatetraenová kyselina
12-, 15-HETE	12-, 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina
TZD	Thiazolidindiony
RT	Pokožová teplota

Cíle diplomové práce

Cílem teoretické části diplomové práce je seznámit se s tématem „Vliv vybraných agonistů PPRAs na regulaci CYP epoxygenáz“. Na toto téma sepsat literární rešerši, která seznámí čtenáře se samotnou definicí cytochromů P450, jejich vztahem k mnohočetné lékové rezistenci, CYP epoxygenázami a receptory aktivovanými proliferátory peroxizomů (PPAR), zejména s PPAR α .

Experimentální část byla zaměřena na stanovení viability u buněčné linie ledvin HEK293 a nádorové buněčné linie jater HepG2 po ovlivnění ligandy PPAR α (fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem). Poté byla stanovena exprese proteinu CYP2J2 v HEK293 a HepG2 po ovlivnění ligandy PPAR α .

Teoretická část

1 Úvod

Cytochromy P450 patří do skupiny hemoproteinů (spolu s hemoglobinem, myoglobinem atd.). Poprvé byly objeveny M. Klingenbergem roku 1958. Vyskytují se takřka ve všech organizmech, např. v bakteriích, rostlinách a živočiších. V lidském genomu bylo nalezeno 57 genů, řada z nich jsou v lidských buňkách využívány k metabolismu steroidů, prostaglandinů, vitamínů A a D. Primárně jsou však nejvíce známy jako metabolizátory xenobiotik (léčiva, drogy, různé chemikálie). Konkrétně se účastní I. fáze biotransformace xenobiotik [1, 7].

Metabolismus léčiv je v současné době spojován s problémem mnohočetné lékové rezistence (MDR). Na vzniku MDR se účastní mnoho faktorů a mechanismů, které zvyšují odolnost rakovinných buněk vůči chemoterapii. Je známo, že CYP epoxygenázy (CYP2C, CYP2J) metabolizují okolo 20 % klinicky důležitých léčiv [6]. Kromě toho CYP epoxygenázy mají důležitou endogenní funkci, převádějí kyselinu arachidonovou na epoxyeicosatrienové kyseliny (EETs), 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET a 14,15-EET. Zdá se, že tyto sloučeniny mají mnoho biologických funkcí, např. v buněčné signalizaci, v mitogenesy, v zánětu, v regulaci cévního řečiště a iontových kanálů [6].

Bylo prokázáno, že CYP epoxygenázy hrají důležitou roli při aktivaci receptorů aktivovaných proliferátorů peroxizomů (PPARs). PPARs patří do rodiny jaderných receptorů, které slouží jako transkripční regulátory a díky tomu se podílejí na regulaci biologických procesů jako je např. vývoj a diferenciaci, metabolismus lipidů a glukózy, apoptóza, nádorové bujení a regenerace tkáně. Také bylo zjištěno, že regulují řadu genů účastnících se biotransformace xenobiotik. Existují tři izotopy, jsou to PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . Všechny se od sebe liší svými funkcemi, mírou exprese v různých tkáních a vazbou ligandů [21]. PPARs receptory jsou aktivované pomocí PPAR ligandů. Ty se dělí na přírodní a syntetické. Mezi ty přírodní patří zejména mastné kyseliny a deriváty mastných kyselin [34]. Mezi syntetické ligandy patří thiazolidindiony (TZD) a fenofibráty [21].

1.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP 450) patří mezi rodinu enzymů obsahující hemovou skupinu [1]. Jejich název byl odvozen od skutečnosti, že v redukovaném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým (CO) absorbují viditelné světlo o vlnové délce 450nm. Písmeno P značí pigment. Jiné enzymy obsahující také hem jako např. hemoglobin, peroxidázy, katalázy a jiné absorbují viditelné světlo o jiné vlnové délce [2].

Z fylogenetického hlediska se jedná o velmi starou skupinu, která se objevila zhruba před 1,5 miliardami let. Během evoluce tyto enzymy podstoupily řadu změn. Nově vznikaly a vyvíjely se takřka ve všech organismech, jak v prokaryotických tak i eukaryotických buňkách jako jsou např. archea, bakterie, rostliny, houby a živočichové. V současnosti jich bylo nalezeno v bakteriích kolem 20, v rostlinách jich existují stovky a u člověka jich je kolem 60. V buňkách se vyskytují zejména v endoplazmatickém retikulu, ale také v mitochondriích [1, 3].

V lidském genomu bylo nalezeno 57 genů pro CYP 450, které se řadí do 18 rodin a 44 podrodin [6]. Dle nomenklatury se členové jedné rodiny značí arabskými číslicemi a musí vykazovat minimálně 40 % homologie (stejná sekvence v primární struktuře). Podrodiny se značí velkým tiskacím písmenem a jejich homologie musí být nejméně 55 %. Jednotlivý členové podrodin mají přiřazená ještě další arabská čísla a výsledné označení potom může vypadat např. CYP2J2. CYP 450 se v lidském organismu vyskytují zejména v játrech, ale také v ledvinách, mozku, plicích, placentě, gastrointestinálním traktu (GIT), kůži a dalších orgánech. Stručný přehled CYP 450 vyskytujících se v různých typech tkáně uvádí Tabulka 1.

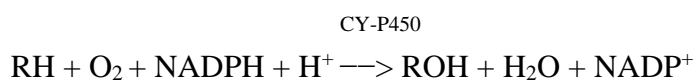
Cytochrom P450	Tkáň
1A1	Plíce, ledviny, játra, GIT, placenta, kůže, lymfocyty
1B1	Ledviny, játra, kůže, prostata, děloha, lidský plod
2A6	Plíce, játra
2B6	GIT, plíce, játra
2C	Hltan, játra, GIT, plíce, srdce
2D6	GIT, játra
2E1	Plíce, placenta, játra
2J2	Játra, ledviny, plíce, hypofýza, srdce
3A	Játra, ledviny, děloha, plod, plíce, GIT, placenta

Tabulka 1. *Tkáňová distribuce cytochromů P450 u člověka (převzato z cit. [1, 6]).*

Jedná se o monooxygenázy, které hrají klíčovou roli v I. fázi metabolismu xenobiotik (cizorodé látky, léčiva apod.). Monooxygenázy mají obecně za úkol vázat a aktivovat molekulu kyslíku, ze které je jeden atom vkládán do substrátu a druhý atom je redukován na vodu [6].

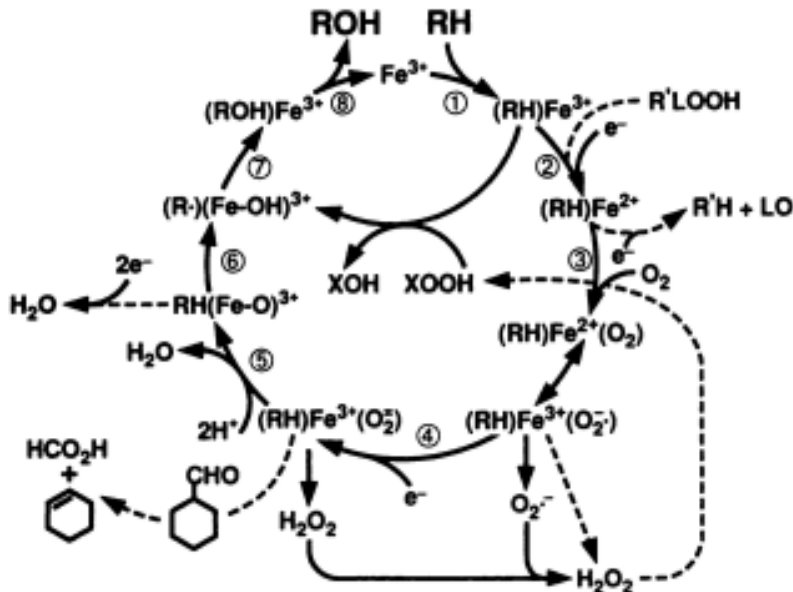
K aktivaci kyslíku je zapotřebí reakce, při které se hem v CYP váže silně k thiolátové síře v aminokyselině cysteinu. Toto chování odlišuje CYP od ostatních hemoproteinů (mají jiné katalytické vlastnosti než např. hemoglobin). Substrát RH se váže na oxidovanou formu Fe^{3+} za vzniku komplexu $(RH)Fe^{3+}$. Tohoto typu reakce se účastní nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH), z něhož dochází k přenosu elektronu na komplex $(RH)Fe^{3+}$ za vzniku redukováného komplexu $(RH)Fe^{2+}$, na který se váže atom kyslíku. Vzniká tak hydroxylovaný produkt ROH. Jak již bylo zmíněno, druhý atom kyslíku se stává součástí vody [1].

Obecnou reakci substrátu za účasti CYP 450 lze popsat takto:



Průběh reakčního mechanismu reakce v živé buňce je ovšem mnohem komplikovanější než popisuje tato rovnice. Mezičlánkem přenosu elektronu z NADPH na CYP 450 je enzym NADPH:cytochrom 450 reduktáza nacházející se v endoplazmatickém retikulu.

V mitochondriích se poté setkáme s ferredoxin reduktázou, nehemovým Fe-S proteinem. Zdrojem elektronů pro redukcí CYP ovšem nemusí být jen NADPH, ale také NADH. CYP 450 nemusí k oxidativní reakci využívat pouze molekulární kyslík, ale také kyslík z peroxidů či peroxokyselin [1]. Celkový reakční cyklus popisuje Obrázek 1.



Obrázek 1. Reakční cyklus CYP 450 (převzato z cit. [1])

RH – substrát, *ROH* – monooxygenační produkt, *R'LOOH* – lipidický hydroperoxid,

R'H+LO – redukční produkty hydroperoxidu, *XOOH* – peroxy sloučenina (alternativní donor kyslíku), *Fe* – atom hemového železa enzymu.

1.1.1. Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou látky cizorodého původu, mezi něž patří např. léčiva, drogy, průmyslové a farmaceutické chemikálie, environmentální polutanty (znečišťující látky, které mají škodlivý vliv na živé organismy) a další. Tyto látky vstupují do těla jednoduše přes vnější bariéry, jako jsou kůže, plíce a gastrointestinální trakt (GIT). Krví a tkáněmi se dostávají až do jater, kde probíhá jejich metabolismus. Díky jejich nepolární povaze jsou špatně vylučovány ven z těla. Proto existují speciální metabolické dráhy se speciálními enzymy, jejichž cílem je zajistit jejich přeměnu na látky polárnější. Ty jsou poté snadněji vylučovány močí nebo stolicí [1, 3].

Biotransformace zahrnuje tři fáze. V I. fázi dochází k vytvoření a vnesení polární funkční skupiny (-OH, -SH, -COOH, -NH₂) do molekuly parentní látky, díky nimž se jejich metabolity stávají více polárními. Většina reakcí probíhá v endoplazmatickém retikulu buňky, kde se také nacházejí hlavní enzymy účastníci se této fáze a to monooxygenázy cytochromy P450. Ve II. fázi jsou produkty první fáze konjugovány s vysoce polární skupinou, jejímž donorem je konjugiční činidlo, jako je např. kyselina glukuronová, octová či glutathion. Během III. fáze jsou konjugované metabolity molekul exportovány z buňky pomocí mnoha specifických transportérů, např. ABC transportéry [5, 6].

1.1.2. Mnohočetná léková rezistence a CYP 450

V současné době se stala rezistence rakovinných buněk k chemoterapii závažným problémem při léčbě pacientů s různými typy nádorů. Setkáváme se schopností nádorových buněk odolávat účinkům cytostatických látek. Mnohočetná léková rezistence (MDR) je založena na tzv. zkřížené rezistenci mezi protinádorovými léčivy lišícími se jak strukturně, tak mechanismem účinku. Se vznikem MDR je spojováno mnoho faktorů a mechanismů, které zvyšují odolnost buněk vůči chemoterapii. Příčiny vzniku lékové interakce mohou být např. stav pacienta, životní prostředí avšak nejčastější způsob vzniku rezistence zahrnuje sníženou či zvýšenou expresi či aktivitu enzymů podílejících se na detoxikaci léčiv [6, 13].

Další možné příčiny vzniku mezilékových interakcí jsou kompetice o gastrointestinální absorpci, interakce během membránového transportu, vazba k plasmatickým proteinům,

vazba k transportním proteinům a P-glykoproteinům, farmakodynamické interakce na receptorové úrovni, inhibice metabolismu, indukce metabolismu a kompetice o aktivní ledvinovou exkreci [14].

Cytochromy P450, zejména rodiny CYP1, 2 a 3 jsou známy jako tzv. „metabolizátory léků“ zodpovědné za I. fázi metabolismu léčiv [4]. Jak je popsáno výše, může se stát, že některá léčiva mohou ovlivňovat (snižovat či zvyšovat jejich aktivitu) různé formy CYP. Zejména při opakovaném podávání léku a současným podáváním dvou i více léků najednou. Pak se tyto léky mohou stát substrátem, inhibítorem či induktorem pro CYP. Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů nejznámějších lidských CYP v Tabulce 2.

Nejdůležitějším cytochromem P450 účastnící se detoxikace léčiv je CYP3A4. Nejvíce se vyskytuje v játrech, ale nalezneme ho také v tenkém střevě, mozku, placentě a plicích. Nejvýznamnějšími induktory CYP3A4 jsou barbituráty, rifampicin nebo dexamethason [15]. Na metabolismu léků se významně podílí i CYP epoxigenázy. Podrodina CYP2C představuje jaterní enzymy, které metabolizují okolo 20 % klinicky důležitých léčiv. Na metabolismu léčiv se podílí i další CYP epoxigenázy, CYP2J2 [6].

Různá exprese forem CYP mezi nádorovou a zdravou okolní tkání má pro pacienta nesmírnou důležitost ve specifikaci terapie. Mohlo by to sloužit k vývoji proléčiv

prodrugs), které jsou netoxické k normálním zdravým buňkám a toxické k buňkám nádorovým [6, 17].

CYP 450	Substráty	Induktory	Inhibitory
1A2	Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), Aromatické aminy, kofein	PAH, dioxiny	Fluvoxamin, amiodaron
2B6	Nikotin, metadon	barbituráty	ticlopidin
2C8	Retonoidy, taxol	rifampin	Gemfibrozil
2C9	Tolbutamin, diklofenak, warfarin	Rifampicin, barbituráty	Flukonazol, Amiodaron, fenofibrat
2C19	Omeprazol, diazepam	Rifampicin, barbituráty	Omeprazol, chloramfenikol
2D6	Antidepresiva, beta-blokátory	Dexamethason, rifampin	Bupropion, histamin H1, amiodaron
2E1	Ethanol, nitrosaminy, acetaminofen	Ethanol, hladovění	disulfiram
3A4,5,7	Steroidy, taxol, acetaminofen, cyklosporin, Různé dihydropyridiny	Steroidy, Barbituráty, rifampicin	HIV antivirotika, imatinib, gřepfruitový džus, aj.

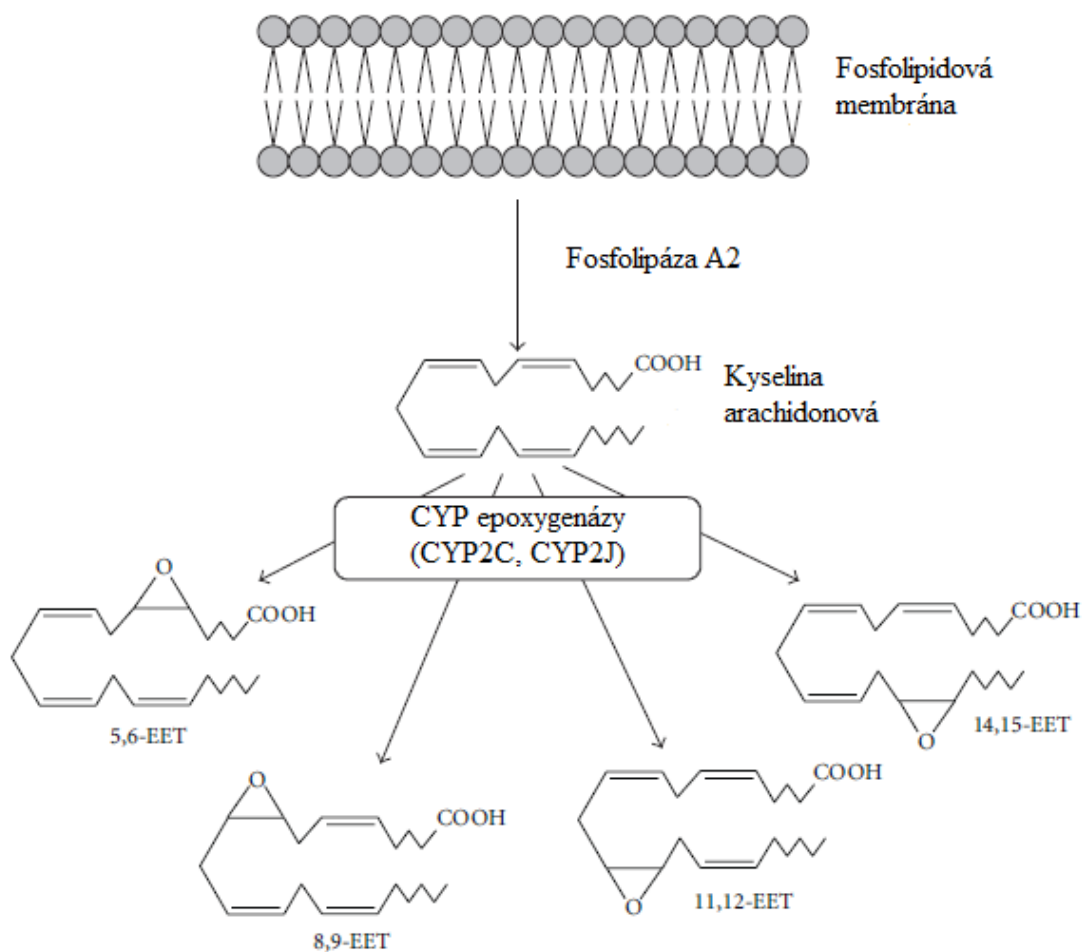
Tabulka 2. Vybrané lidské CYP 450 a stručný přehled jejich substrátů, induktorů a inhibitorů [3, 15].

1.1.4. Cytochrom P450 epoxygenázy

Zajímavou skupinou CYP enzymů jsou CYP epoxygenázy (podrodiny CYP2C a CYP2J). Do podrodiny CYP2C patří celkem čtyři homologní geny: CYP2C8, 2C9, 2C18 a 2C19. Jsou lokalizované na chromozomu 10q24. Tato podrodina reprezentuje okolo 18 % z celkového obsahu cytochromů P450 v játrech dospělého jedince. CYP2C jsou vysoce polymorfni, což stěžuje u pomalých metabolizátorů nalézt optimální dávkování léčiv [3, 6].

Lidská podrodina CYP2J obsahuje pouze jeden gen a to 2J2. Expres CYP2J2 je zvýšená ve zhoubných nádorech jater, jícnu, prsu, plic a kolorektu. V játrech představuje asi 1-2 % celkového obsahu cytochromů P450. Je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1, konkrétně na 1p32.1 [6]

Kromě metabolismu léčiv mají CYP epoxygenázy významnou endogenní funkci. Převádějí kyselinu arachidonovou na čtyři regioizomery epoxyeicosatrienové kyseliny (EETs), konkrétně na 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET (popisuje Obrázek 2). EETs hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech, jako je např. mitogeneze, buněčná signalizace, regulace cévního tonu a iontových kanálů, mají protizánětlivé účinky a chrání před ischemií myokardu a mozku a snižují krevní tlak. Mají také značný vliv na růst nádorových buněk. Mnoho studií zkoumalo možnou účast CYP2J2 a EETs v mnoha procesech podporující vznik nádorů. Řada experimentů prokázala, že tyto enzymy jsou pozitivními regulátory proliferace nádorových buněk, angiogeneze a inhibují apoptózu [8-12]. Např. ve studii od Jing et al. byla prokázána zvýšená regulace CYP2J2 v 77 % nádorové lidské tkáně a vyskytoval se v osmi různých lidských nádorových liniích [11].



Obrázek 2. Uvolnění kyseliny arachidonové z fosfolipidové membrány pomocí fosfolipázy A2. Její následný převod na čtyři regioizomery EETs pomocí CYP epoxygenáz (CYP2C a CYP2J2). (Převzato z cit. [6] a upraveno)

EETs se vyskytují uvnitř v buňkách, ale také jsou začleněné do fosfolipidů a vážou se na cytosolové proteiny a jaderné receptory. Což naznačuje, že některé jejich funkce mohou být přímo ovlivňovány interakcemi s intracelulárními efektorovými systémy.

Rozpuslné epoxid hydroxylázy (sEH) převádějí EETs na dihydroxyeicosatrienové kyseliny (DHETs), které jsou méně aktivní než EETs. sEH zde vystupují jako inhibitory EETs, protože tlumí jejich účinky. Ve studii od Enayetallah et al. byla prokázána snížená regulace sEH v nádorech ledvin a jater a naopak se vyskytovaly enzymy EETs [16]. Naopak jiné studie prokázaly nález sEH v cholangiokarcinomech, pokročilé rakovině vaječníku ve srovnání s normální tkání, nebo v počátečním stádiu rakoviny [16]. Stejně jako u CYP je tato kapitola stále v mnoha směrech neprobádaná a k pochopení je zapotřebí mnoho dalších studií [17].

EETs a DHET mohou sloužit jako ligandy pro receptory aktivované proliferátory peroxizomů alfa ($PPAR\alpha$) a stimulují vazbu heterodimeru $PPAR/RXR$ na responzivní elementy (PPRE). Další EET-produkující CYP jsou CYP4X1 a CYP2U1, ale ty mají menší důležitost [6].

1.2. Receptory aktivované proliferátory peroxizomů

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) jsou ligandy aktivované transkripční faktory. Patří do rodiny jaderných receptorů (NR), do kterých náleží také např. vitamín D, steroidní, thyroïdní a retinoidní receptory. PPARs ligandy jsou jak endogenní tak i exogenní sloučeniny, které hrají klíčovou roli v regulaci důležitých biogenních funkcí, jako je buněčná diferenciaci a vývoj, metabolismus glukózy a lipidů, udržování homeostázy, tkáňová regenerace, regulace zánětu, apoptózy a nádorového bujení. PPARs jsou zapojeny do řady chronických nemocnění jak je diabetes, obezita a ateroskleróza [6, 18].

Peroxizomy jsou buněčné organely nacházející se ve většině rostlinných a živočišných buněk, které se podílejí zejména na β -oxidaci mastných kyselin, ale také na syntéze cholesterolu a žlučových kyselin. Strukturálně rozdílné chemické látky, které indukují účinky enzymů peroxizomů a tím metabolismus mastných kyselin se nazývají proliferátory peroxizomů (PPs) [21]. První práce, které identifikovali a pojmenovali PPARs, probíhaly na počátku 90. let. Studie byly zaměřeny na hledání cílových genů látek aktivujících proliferaci peroxizomů (PPs) u hlodavců [19]. V tom samém roce byl Issemanem a Greenem naklonován první PPAR z myších jater, brzy na to následovalo dalších několik druhů PPAR homologů.

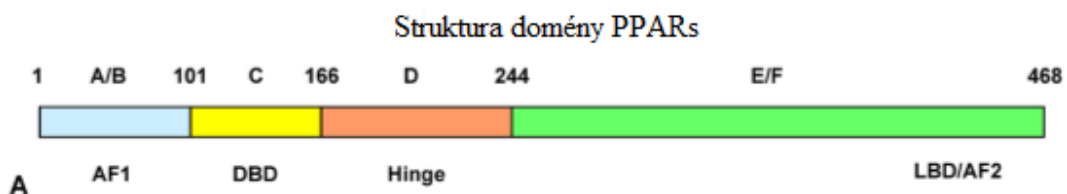
V současné době jsou známy tři různé členové PPARs rodiny, kódování pomocí různých samostatných genů: PPAR α , PPAR β (nebo se také setkáváme s pojmenováním PPAR δ) a posledním členem je PPAR γ . Všechny se od sebe liší svými funkcemi, mírou exprese v různých tkáních a vazbou ligandů [21].

1.2.1 Proteinová struktura PPARs

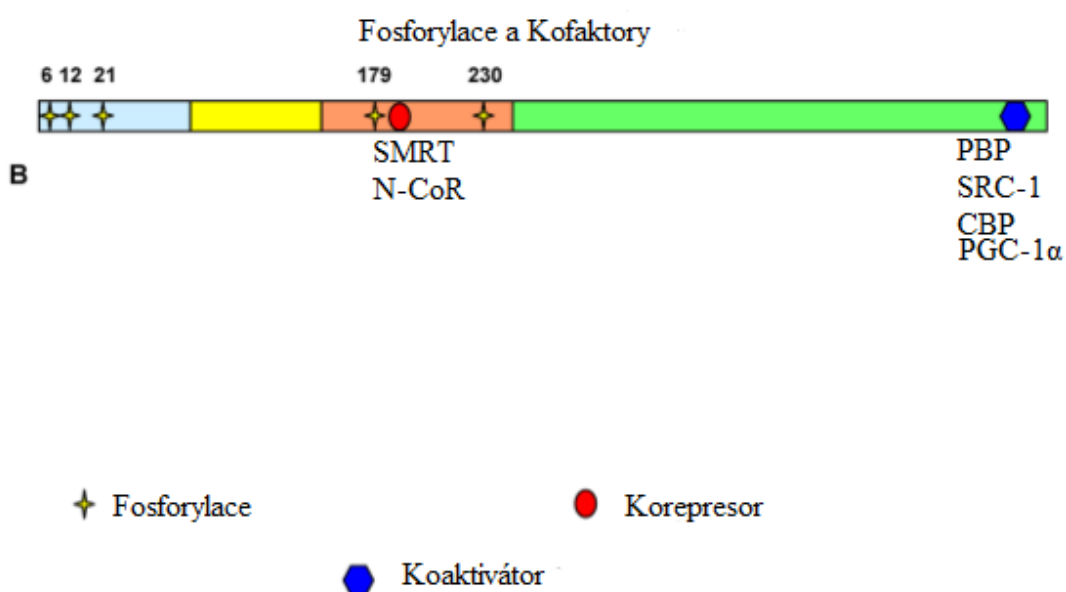
PPARs sdílí společné strukturální a funkční domény s většinou jaderných receptorů. Celkem existuje pět odlišných domén: A/B, C, D, E a F (Obrázek 3.). N-koncová A/B doména obsahuje aktivační oblast AF-1 (Ligand-independent Activation Function-1). Tato oblast má nízkou transkripční aktivitu a funkčně je nezávislá na vazbě k ligandu [22]. Po ní následuje vysoce konzervativní DNA-vazebná doména (DNA-Binding Domain, DBD), která obsahuje motiv dvou zinkových prstů, což je pro NR typické. Tato doména rozpoznává specifickou sekvenci DNA, na kterou se pak váže [22]. Následuje D doména (Hinge Domain), která spojuje DNA-vázající doménu s ligand-vázající doménou (Ligand-Binding Domain, LBD) [22]. LBD, doména E umožňuje vazbu ligandu a aktivaci receptoru. LBD obsahuje koncovou aktivační oblast závislou na ligandu, doménu AF-2 (Ligand-dependent Activation Function 2). AF-2 doména je složená ze dvou α -helixů a jednoho β -skládaného listu, součástí struktury je i ligand vázající kapsa (Ligand-Binding Pocket), do které se váže ligand. Tato doména je potlačena dokud nedojde k vazbě ligandu [22].

1.2.2 Způsob aktivace PPARs

Po navázání ligandu na PPARs a vytvoření heterodimeru s receptorem pro retinoid X (RXR) vznikne aktivovaný komplex PPAR/RXR. Ten se poté váže do promotorové oblasti cílových genů na responzivní elementy pro PPAR (PPRE). Tato vazba následně vede k aktivaci transkripce specifických genů, což způsobí samotnou aktivitu PPARs. Pokud se nenaváže ligand, pak PPAR interagují s mnoha korepresorovými proteiny, které brání vazbě receptorů k DNA a inhibují tak transkripci genů. Korepresorem může být např. SMRT (tlumící mediátor pro retinoidy a thyroidní receptor) a N-CoR (jaderný korepresor receptorů). Naopak proteiny stimulující expresi PPAR cílových genu jsou koaktivátory, např. PBP (vázající protein), SRC-1 (koaktivátor steroidních receptorů), CBP (CREB-vázající protein) a PGC-1 α (PPAR γ koaktivátor 1 α). Jako i jiné jaderné receptory jsou PPARs fosfoproteiny. Z toho důvodu může být jejich transkripční aktivita ovlivněna prostřednictvím fosforylace AF-1 domény, která není závislá na ligandu (Obrázek 4.) [6, 20, 22].



Obrázek 3. Schéma struktury domény PPARs. (Převzato z cit. [20] a upraveno)
 AF1 – ligand nezávislá aktivační doména 1 (A/B), DBD – DNA-vazebná doména (C),
 Hinge – D doména, LBD/AF2 – ligand-vázající doména/ligand-závislá aktivační doména (E/F)



Obrázek 4. Schématické znázornění aktivace či inhibice PPARs pomocí fosforylace, koaktivátorů a korepresorů. (Převzato z cit. [20] a upraveno)
 Fosforylace je značena žlutou hvězdičkou, korepresory červeným oválkem a koaktivátory jsou značeny modrým šestiúhelníkem.

1.2.3 Izotopy PPARs

Jak již bylo uvedeno, PPARs existují ve třech izotopech: PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ . PPAR α byly první receptory PPARs, které byly v 90. letech identifikovány. Nejprve byly nalezeny na myším chromozomu 15, později byly lokalizovány na lidském chromozomu 22 na pozici 22q12-q13.1 [19, 23]. Vysoká hladina exprese PPAR α se vyskytuje zejména ve tkáních s aktivním katabolismem mastných kyselin, jako jsou např. játra, ledviny, srdce, hnědá tuková tkáň, svaly, tenké a tlusté střevo [19, 24, 25]. Jejich hlavní funkce je zejména regulace metabolismu lipidů a homeostázy v játrech. Expresi PPAR α regulují některé fyziologické podněty jako je stres, hormony, glukokortikoidy, inzulín a leptin [20]. Kersten et al. (1999) prokázal, že hladina exprese PPAR α v myších játrech během hladovění vzrostla, což vedlo ke zvýšení exprese PPAR α cílových genů a tím se zvýšil přísun mastných kyselin [26]. V lidských játrech se hladina exprese PPAR α může individuálně odlišovat, avšak bylo zjištěno, že tato hladina je nižší, než bylo prokázáno u hlodavců [20].

PPAR β/δ byl nalezen na 17. myším chromozomu a 6. lidském chromozomu na pozici 6p21.1 – p21.2 [27]. Tyto receptory se také účastní katabolizmu, ale jejich účinky se více vztahují ke svalům a srdci, ačkoli také regulují některé geny v játrech [28]. Také bylo zjištěno, že PPAR β/δ hrají roli ve vývoji kůže, vlasových folikul, svalů a nervového systému [29, 30].

PPAR γ jsou lokalizovány na 6. myším chromozomu. Gen pro lidský receptor byl lokalizován na chromozomu 3 v oblasti 3p25 [31]. PPAR γ obsahují tři různé promotory, které dávají vznik třem různým mRNA izoformám: PPAR γ 1, PPAR γ 2 a PPAR γ 3. Avšak Chen et al. popsal další tři izoformy v lidských THP-1 makrofázích: PPAR γ 4, PPAR γ 5, PPAR γ 7. Pouze PPAR γ 4 je pokládán za novou izoformu proteinu, PPAR γ 5 a PPAR γ 7 jsou překládány do proteinu PPAR γ 1 [32]. Expresi izoform PPAR γ se vyskytuje téměř ve všech tkáních, záleží na typu izoformy. Jsou to nejvýznamnější regulátorem diferenciací tukové tkáně, podílí se na metabolismu lipidů, zánětlivých onemocnění a v kardiovaskulárních chorobách [22].

1.2.4 Ligandy PPARs

PPARs ligandy jsou různé chemické látky, které aktivují PPARs svou vazbou na ligand vázající se kapsu nacházející se v ligand vázající doméně. Dělí se na syntetické (exogenní) a přírodní (endogenní) biologické molekuly.

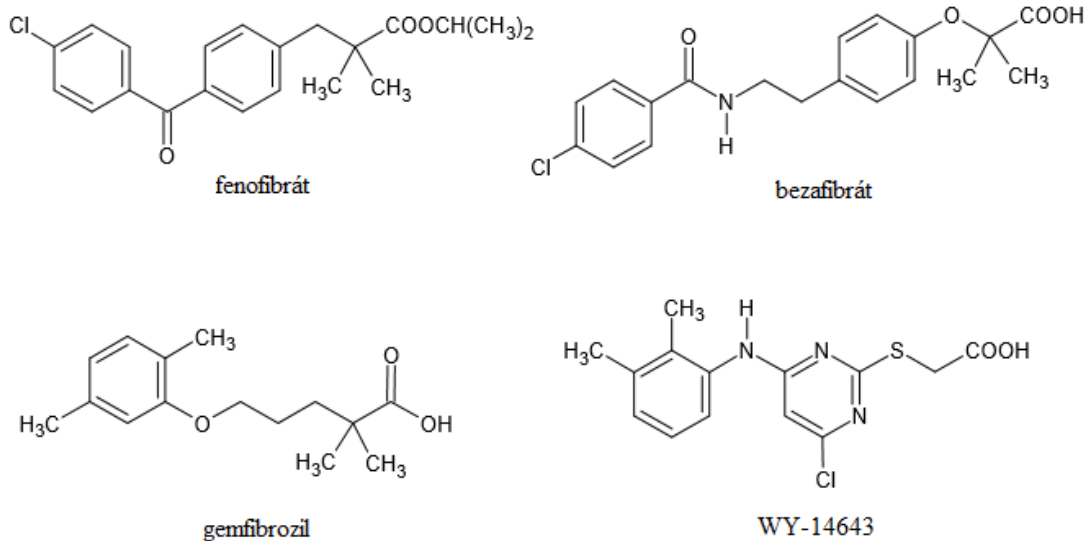
1.2.4.1 Přírodní ligandy

Mezi endogenní ligandy patří zejména mastné kyseliny a deriváty mastných kyselin.^[34] Specifickým ligandem pro PPAR α je 8-hydroxyeicosatetraenová kyselina (8-HETE), prostaglandin A nebo leukotrien B4 (LTB4). Nasycené a nenasycené mastné kyseliny, např. kyselina palmitová, linolenová, arachidonová a olejová a eicosanová kyselina jsou ligandy pro PPAR α a PPAR β/δ . Přírodními ligandy pro receptor PPAR γ jsou prostaglandiny D2 a J2, 9- a 13-hydroxyoktadekadienová kyselina a 12- a 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina (12-, 15-HETE) [22].

1.2.4.2 Syntetické ligandy

Thiazolidindiony (TZD) jsou ligandy s velmi vysokou afinitou k PPAR γ . Na základě jejich schopnosti snižovat hladinu glukózy a hladinu cirkulujících mastných kyselin byly původně vyvinuty ke snížení inzulínové rezistence a léčbě diabetes mellitus 2. typu. TZD prostřednictvím jejich terapeutických účinků hrají klíčovou roli v regulaci glukózy a homeostázy. Avšak v poslední době bylo prokázáno, že mají důležitou úlohu v buněčné proliferaci a malignitě [21]. Mezi TZD patří ciglitazon, pioglitazon, rosiglitazon aj.

Druhou významnou skupinou syntetických ligandů jsou fenofibráty. Jsou to strukturálně různé sloučeniny, které jsou nejvíce využívány jako hypolipidemická léčiva pro zvýšení hladiny triglyceridů v plasmě (a tím snížení LDL částic v séru). Vysoce selektivnímu ligandy pro PPAR α jsou fenofibrát (Obrázek 5) a klofibrát. Bezafibrát (Obrázek 5) aktivuje všechny tři izoformy PPARs ve stejné míře. Dalším velmi účinným fibrátem je např. gemfibrozil nebo WY14643 [21, 22] (Obrázek 5).



Obrázek 5. Schématické znázornění struktury vybraných ligandů PPARs. (Vytvořeno pomocí datasheetu).

1.2.5 PPARs ve vztahu s CYP 450 epoxigenázami

Bylo prokázáno, že PPAR α se kromě dalších procesů účastní i biotransformace. V lidských hepatocytech tyto receptory aktivují členy podrodin CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2E, CYP2J2 a CYP3A a některé konjugační enzymy (EPHX2, GSTA) [33].

In vivo a in vitro studie na zvířecích modelech.

Bylo prokázáno, že PPAR α ligandy mají značné účinky na CYP2C v lidských a myších buňkách. Nicméně lidské cytochromy mohou mít odlišnou cestu působení než myši. EDM392949 je ligandem pro PPAR α a PPAR γ . Bylo prokázáno, že po dlouhodobém účinku byla zvýšená exprese CYP2C9 v krysích hepatocytech [40]. Naopak léčba tímto ligandem v lidských játrech prokazuje silnou indukci CYP2C8 [40].

Myší epoxgenázy a jejich metabolity mají pro-angiogenní funkce. Studie s myším CYP2C44 (katalytický homolog lidských CYP2C8 a 2C9) prokazují, že CYP2C44 je cílový gen pro PPAR α . WY-14643 (PPAR α ligand) snižuje regulaci CYP2C44, což redukuje syntézu EETs, která následně vede k snížení nádorové masy, objemu a vaskularizaci (prokrvení) nádorového štěpu. Stejně výsledky byly získány z myších s lidským PPAR genem [35, 36].

In vitro studie s lidskými buňkami.

Bylo zjištěno, že EETs produkované pomocí CYP2C a 2J2 jsou schopné aktivovat PPAR α v lidské buněčné linii HepG2 (jaterní nádorová buněčná linie) [37]. Wray et al. potvrzují nález aktivovaných PPAR α pomocí CYP2J2 produktů v buněčné linii HEK293 (embryonální buněčná linie ledvin) [38]. Jejich výsledky ukazují, že aktivace PPAR α se účastní 8,9-EET, 11,12-EET, ale už ne 14,15-EET.

Prueksaritanont et al. studovali účinek klofibrátu, fenofibrátu a gemfibrozilu (ligandy PPAR α) v lidských hepatocytech. Všechny tři fibráty zvyšovali hladinu mRNA CYP2C8. Klofibrová a fenofibrová kyselina zvyšovala aktivitu CYP2C8, avšak léčba gemfibrozilem vedla ke snížení aktivity CYP2C8 [39].

Experimentální část

2 Metodika

2.1 Experimentální ovlivnění exprese CYP2J2 různými ligandy receptoru PPRA α u lidské buněčné linie HEK 293 a lidské nádorové buněčné linie HepG2

2.1.1 Biologický materiál

Pro experimentální část této práce byly použity dvě lidské buněčné linie: HEK 293, která je odvozena od embryonální ledvinové tkáně a HepG2, která je odvozena od nádorové tkáně jater.

2.1.2 Podmínky kultivace

Linie buněk byly kultivovány v DMEM médiu. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37°C a v 5% CO₂. Tři dny v týdnu byla prováděna pasáž, při které se buňkám vyměnilo médium, a početně byly buňky redukovány, aby mohly narůst nové.

2.1.3 Přístrojová technika a pomůcky

Termostat Series II water jacket CO₂ Incubator (Thermo Scientific, USA), sterilní box Mars safety class II (Scanlaf, Dánsko), vodní lázeň (GFL, Německo), centrifuga IEC L31R Multispeed centrifuge (Thermo Scientific, USA), minicentrifuga MiniSpin Eppendorf, Německo), invertovaný mikroskop Primo Vert (Zeiss, Německo), Elisa reader Power wave XS (Bio Tek Instruments, Inc., USA), Počítač, aparatura pro vertikální elektroforézu (Scie-Plas, UK), zdroj napětí EV 261 (Consort, Belgie), termoblok AccuBlockTM- digital dry bath (LabNet, USA), transferová aparatura V10 SDB Semi-dry (Scie-Plas, UK).

Pipetátor s 5 a 10 ml skleněnými špičkami, automatické jednoduché pipety 10, 20, 200, 1000 a 5000, multikanálové 200 a opakovací 20 pipety, Sterilní špičky 10, 200, 1000 a 5000, sterilní špičky s filtry 200 a 1000 a loudovací špičky 200, kultivační lahvičky, 10 a

15 ml zkumavky, 1,5 a 2 ml eppendrofky, Elisa destičky, kultivační misky (6 cm), 250 ml odměrné válce, nitrocelulózná membrána Amersham Hybond™ ECL™, fotografický film (obojí GE Healthcare, UK), počítadlo a kalkulačka.

2.1.4 Chemikálie, roztoky a pufrý

2-[4-(4-chlorobenzoyl)phenoxy]-2-methyl-propanová kyselina, 1-methylethyl ester (fenofibrát, Cayman Chemical Company, USA), 2-[4-[2-(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2methyl-propanová kyselina (bezafibrát, Cayman Chemical Company, USA), 5-(2,5-dimethylphenoxy)-2,2dimethylpentanová kyselina (gemfibrozil, Cayman Chemical Copmany, USA), DMSO (Wak-Chemie Medical, Německo), 1x a 10x PBS pufr, Trypsin (PAA, Rakousko), [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (WST-1, Roche, Švýcarsko), TRIS hydroxymethylaminomethan (P-LAB, ČR), Tween 20 (Dako, Dánsko), RIPA pufr, Inhibitory fosfatáz (FI) a proteináz (PI) Complete (Roche, 30 Švýcarsko), hovězí sérový albumin (BSA), dodecylsulfát sodný (SDS), N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED), amonium persulfát, 30% bis-akrylamid (vše Serva electrophoresis GmbH, Německo), molekulový marker Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare, UK), vzorkovací roztok LSB, 0,2% roztok Ponceau S solution for elecetrophoresis (Serva electrophoresis), sušené odtučněné mléko, chemiluminiscenční kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific, USA), vývojka, přerušovač, ustalovač (vše Agfa-Gevaert N. V. Belgie), dH2O

DMEM kultivační médium 10%: Dulbecco's Modified Eagle Medium, 100 IU/ml penicilin, 100µg/ml streptomycin, 10% (v/v) fetální sérum, 0,25 mg/ml glutamin: na 500 ml 10% DMEM: 440 ml DMEM, 50 ml fetální sérum, 5 ml penicilin/streptomycin, 5 ml glutaminu

10x PBS pufr pH 7,6 (10x): 80 g NaCl; 2 g KCl; 32,1 g Na₂HPO₄; 2 g KHPO₄; doplnit do 1 l dH₂O

RIPA lyzační pufr: Obsahuje mix FI: jedna tableta se rozpustí v 1 ml dH₂O – ředí se 10x, PI: jedna tableta se rozpustí ve 2 ml dH₂O – ředí se 25x.

1,0M TRIS-HCl pufr pH 6,8: 121,1 g TRIS rozpustit v 1 l dH₂O, upravit pH pomocí konc. HCl na 6,8

1,5M TRIS-HCl pufr pH 8,8: 181,65 g TRIS rozpustit v 1 l dH₂O, upravit pH pomocí konc. HCl na 8,8

5x ELFO pufr: 15,1 g TRIS; 5,09 g SDS; 72 g glycinu; doplnit do 1 l dH₂O

Vzorkovací pufr LSB 4x: na 8 ml roztoku: 3,5 ml ddH₂O, 0,5 ml 1M TRIS pH 6,8, 1,6 ml glycerolu, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml β-merkapt ethanolu, 0,4 ml 0,5% btomfenolové modře

20x transferový pufr: 2,9 g glycinu; 5,8 g TRIS; 0,37 g SDS; 200 ml methanolu; doplnit do 1 l dH₂O

Mléčný pufr: 5 % mléko v 1x PBS: 5 g sušené odtučněné mléko, doplnit do 100 ml 1x PBS puftrem

Blokovací pufr: 5 % mléko v 1x PBS + Tween 20: 5 g sušené odtučněné mléko, doplnit do 100 ml 1x PBS puftrem a přidat 100 µl Tween20

Bradfordové roztok: 0,02 g Coomassie Brilliant Blue G250; 10 ml ethanolu; 20 ml kyseliny orthofosforečné; doplnit do 40 ml dH₂O

Fenofibrát: 5,3 mg rozpuštěno v 1,5 ml DMSO

Bezafibrát: 5,41 mg rozpuštěno v 1,5 ml DMSO

Gemfibrozil: 3,75 mg rozpuštěno v 1,5 ml DMSO

2.1.5 Použité protilátky

K detekci proteinu CYP2J2 byla použita neznačená myší monoklonální protilátka (ředí se 1:1000 do mléčného pufru, Novus Biologicals NBP2-01178). Dalším stanovovaným proteinem byl GAPDH, který slouží jako endogenní kontrola, zda se nachází v jednotlivých proteinových frakcích stejné množství proteinů (ředění 1:25 000, Sigma aldrich, cat. no. G8795). Sekundární protilátka je polymer konjugovaný s křenovou peroxidázou, který nese anti-myší imunoglobuliny (ředí se 1:6000, Dako REAL™ EnVision™ HRP Mouse, Dako, Dánsko).

2.1.6 Pracovní postup

2.1.6.1 Pasážování buněk

Z kultivační lahvičky bylo vylito médium a lahvička byla 3x propláchnuta PBS. Poté byl do lahvičky napipetován 1 ml trypsinu a lahvička byla dána na 3-5 min do termostatu. Po inkubaci bylo do lahvičky napipetováno 9 ml čistého média DMEM. Obsah celé lahvičky byl přepipetován do zkumavky a stočen v centrifuze 5 min při 1000 rpm. Buňky na dně zkumavky byly rozsuspendovány v 1 ml, objem byl doplněn čistým médiem na 10 ml. 1,5 ml buněk v médiu bylo vráceno do kultivační lahvičky a objem byl doplněn na 10 ml. Lahvička byla ponechána v termostatu do příští pasáže.

2.1.6.2 Test životaschopnosti buněk

Po pasáži buněk byly zbylé buňky stočeny, médium bylo odlito a do zkumavky k nim byl přidán 1 ml čistého média. Buňky byly rozsuspendovány a 10 μ l bylo napipetováno k 90 μ l čistého média do eppendorfky. Z tohoto množství bylo odebráno 10 μ l buněk do Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem bylo napočítáno množství buněk ve 25 čtvercích a následně vypočítána koncentrace buněčné suspenze.

Dle předchozích výpočtů byly na 96-jamkovou destičku vysazeny buňky o množství 5000 (pro HEK293) a 10 000 (pro HepG2) buněk na jamku. Po 24 hodinách od výsevu byl k buňkám přidán fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil. Koncentrace jednotlivých ligandů v roztoku jsou uvedeny v Tabulce 4. V jamkách sloužící jako blank bylo pouze čisté kultivační médium a v jamkách sloužící jako kontrola byly neovlivněné buňky s médiem. Inkubace probíhala 72 hod v termostatu při 37°C. Po inkubaci bylo do všech jamek přidáno 10 μ l reagentu WST-1 a následovala další inkubace 1 hod. Poté byla měřena absorbance na Elisa readeru při 450 nm.

Test životaschopnosti byl proveden ve třech opakováních. Ze získaných průměrných hodnot absorbancí byla vypočítána koncentrace jednotlivých látek (fenofibrát, bezafibrát,

gemfibrozil), při které došlo k 10% inhibici viability buněk (IC90). [IC90] byla stanovena minimálně ve třech opakování pro jednotlivé látky u obou buněčných liniích a byla stanovena jejich průměrná hodnota, která byla použita při dalším testu.

	HEK293			HepG2		
	F	B	G	F	B	G
Koncentrace	1	80	50	25	100	100
v μM	2,5	110	80	50	150	150
	5	140	120	100	200	200
	10	170	150	150	250	250
	15	200	180	200	300	300
	20	230	210	250	400	400

Tabulka 3. *Koncentrace pro jednotlivé ligandy u HEK293 a HepG2.*

F je fenofibrát, B je bezafibrát a G je gemfibrozil

Princip metody:

Test životaschopnosti buněk se využívá pro posouzení účinků fenofibrátu, bezafibrátu a gemfibrozilu na lidskou buněčnou linii HEK 293 a lidskou nádorovou buněčnou linii HepG2 a stanovení jejich inhibiční koncentrace [IC90]. Podstatou je použití tetrazoliové soli [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (WST-1), která je štěpena na ve vodě nerozpustný barevný formazan, pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Tato metoda slouží k měření toxicity látek, kdy tato reakce probíhá pouze u metabolicky aktivních buněk, přičemž množství vznikajícího formazanu je přímo úměrný počtu buněk, které přežily. Intenzita zbarvení formazanu se provádí spektrofotometricky.

2.1.6.3 Příprava buněčných lyzátů a proteinových frakcí pro western blot

Dle předešlého postupu byly buňky spočítány v Bürkrově komůrce pod mikroskopem. Podle výpočtů byly vysety do kultivačních misek o průměru 6 cm v koncentraci 4×10^5 buněk na misku (HEK293) a 8×10^5 buněk na misku (HepG2), na objem 2,7 ml kultivačního média. Po 24 hod byly k buňkám přidány ligandy (fenofibrát, bezafibrát, gemfibrozil) o průměrné koncentraci [IC₉₀] ve 300 μl média. V miskách sloužící jako kontrola bylo pouze čisté médium s buňkami. Inkubace probíhala 24 a 72 hodin v termostatu při 37°C. Poté byly buňky 3x promyty PBS pufrem, byl na ně nanesen trypsin a byly inkubovány 3-5 min v termostatu při 37°C. Poté k nim bylo přidáno médium, celý obsah byl přenesen do eppendorfek a byly stočeny na 5 min, 1000 rpm při pokojové teplotě (RT). Poté byly opláchnuty studeným PBS pufrem a byly stočeny na 5 min, 1000 rpm při RT. Supernatant byl odsát a pelety byly uchovány na -80°C.

K peletě na ledu byl přidán lyzační pufr Ripa (dle velikosti pelety). Vzorky byly zvortexovány a ponechány 30 min na třepačce na ledu. Poté byly vzorky stočeny na 15 min, 15 000 rpm při 4°C. Supernatant byl odpipetován do nových eppendorfek.

Mezitím byla do mikrotitrační destičky připravena kalibrační řada pomocí BSA a dH₂O. Poté byl do mikrotitrační destičky připraven vzorek na měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové. Před měření byly všechny vzorky po přidání pufru Bradfordové inkubovány 10 min při RT. Absorbance byla měřena na Elisa readeru při 595 nm. Vzorky byly poté uchovány při -80°C.

Princip metody dle Bradfordové:

Principem je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 (váže bazické a aromatické aminokyseliny v proteinech) na molekulu proteinů. Po reakci se změní hnědá barva na intenzivně modrou, jejíž maximální vlnová délka je 595 nm. Po změření absorbance se zkonstruuje kalibrační křivka a výpočtem z rovnice kalibrační křivky se zjistí koncentrace proteinů v lyzátu.

2.1.6.4 SDS–PAGE a Western blot analýza

Nejprve byly připraveny 10 % separační a 5 % zaostřovací gely (Tabulka 5). Jednotlivé vzorky byly smíchány 4:1 se vzorkovacím pufrem LSB (přímou úměrou se zvyšuje poměr), dle výpočtů z předešlého stanovení koncentrace proteinů v lyzátech metodou Bradfordové. Poté byla sestavena separační aparatura, kam byl přidán 5x ředěný ELFO pufř. Vzorky byly zahřívány 80 s při 95°C. Do krajních jamek byly nejprve napipetovány 2 μ l hmotnostního markeru. Do ostatních jamek byl nanesen smíchaný roztok vzorku a LSB dle výpočtů z předešlého stanovení koncentrace. Separace probíhala při napětí 110 V po dobu 120 min.

Po separaci byl gel promýván v transfer pufru a byl ponechán 20 min na třepačce. Na posledních 5 min byly v transfer pufru také namočený filtrační blotovací papír a membrány. Poté bylo blotováno při napětí 10 V 50 min, během čehož byly proteiny přeneseny z gelu na membránu. Membrány byly barveny 5 min v roztoku Ponceau a opláchnuty dH₂O.

Z membrán byly vyřezány proužky (stripy) dle molekulových hmotností detekovaných proteinů (CYP2J2 okolo 50kb a GAPDH okolo 30kb). Stripy byly blokovány 1 hodinu v blokovacím pufru. Mezitím byla primární protilátka pro CYP2J2 naředěna v mléčném pufru. Obě primární protilátky byly nanесeny na stripy a inkubovány ve vlhké komůrce přes noc v chladničce. Druhý den byly proužky promývány 3x po 5 min v roztoku 1xPBS s Tween 20. Sekundární protilátka byla ředěna v mléčném pufru, poté byla nanесena na proužky a inkubace probíhala 1 hod ve vlhké komůrce za RT. Po inkubaci byly stripy opět promývány 3x po 5 min v roztoku 1xPBS s Tween 20. K chemiluminiscenční detekci se nechal 5 min působit chemiluminiscenční kit DURA (zesiluje signál). Poté byly stripy vloženy do nasvícené kazety a byly přeneseny do fotokomory. Tam byl ke stripům pro GAPDH přiložen fotografický papír na 10 s a film byl vyvolán a vysušen. Pro CYP2J2 byl fotografický papír ponechán 20 min a poté byl také vyvolán a vysušen.

Složka v ml	10% separační gel (10 ml)	5 % zaostřovací gel (2 ml)
dH ₂ O	4,0	1,4
30 % akrylamid	3,3	0,33
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5	0,25
10 % SDS	0,1	0,02
10 % amonium persulfát	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002

Tabulka 4. Složení separačního a zaostřovacího gelu v SDS-PAGE. Objemy jsou uvedeny v ml.

3 Výsledky

3.2 Experimentální ovlivnění exprese CYP2J2 různými ligandy receptoru PPAR α u lidské buněčné linie HEK 293 a lidské nádorové buněčné linie HepG2

3.2.1 Test životaschopnosti buněk

Test životaschopnosti buněk byl proveden ke stanovení inhibiční koncentrace [IC90] pro lidskou buněčnou linii HEK 293 a lidskou nádorovou buněčnou linií HepG2 po ovlivnění ligandy PPAR α (fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem). Z průměrných hodnot naměřené absorbance při vlnové délce 450 nm byl sestaven graf v závislosti viability buněk (%) na koncentraci jednotlivých látek (μM). Do grafu byla přidána spojnice trendu, ze které byla stanovena rovnice, z níž bylo vypočítáno [IC90]. Experiment byl prováděn ve třech opakováních a průměrná hodnota [IC90] byla použita pro další test.

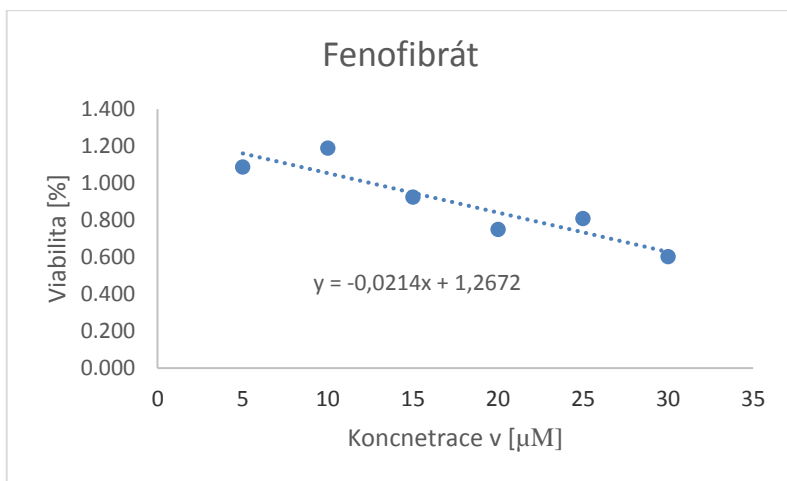
Průměrné hodnoty inhibiční koncentrace [IC90] jednotlivých látek, pro buněčnou linii HEK 293 jsou uvedeny v Tabulce 5 a pro nádorovou buněčnou linií HepG2 v Tabulce 6. Grafy 1a, b, c jsou výsledkem absorbance pro buněčnou linií HEK293 ovlivněnou fenofibrátem. Grafy 2a, b, c pro HEK 293 ovlivněné bezafibrátem a grafy 3a, b, c pro HEK293 ovlivněné gemfibrozilem. Pro buněčnou nádorovou linií HepG2 ovlivněnou fenofibrátem jsou grafy 4a, b, c, pro bezafibrát grafy 5a, b, c a pro gemfibrozil grafy 6a, b, c.

	HEK293		
	Fenofibrát	Bezafibrát	Gemfibrozil
[IC90]	17,16	121,7	88,2
	15,8	98,3	104,5
	18,1	99	80,5
Průměrná [IC90]	17,02 ± 0,94	106,3 ± 10,87	91,1 ± 10,01

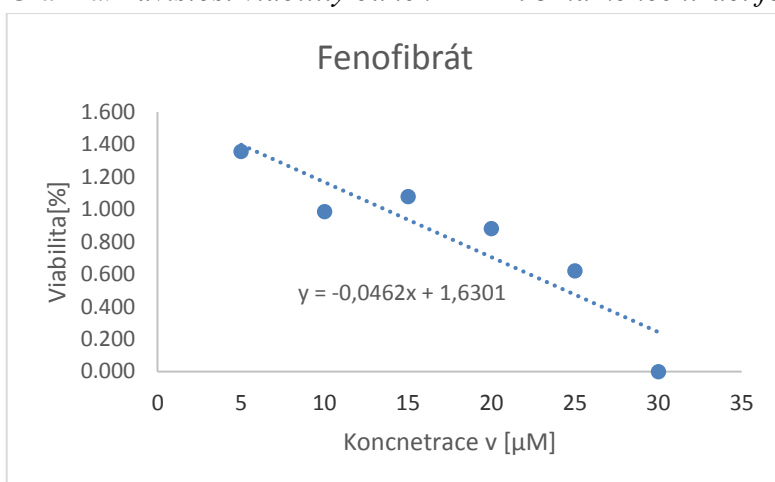
Tabulka 5. Hodnoty vypočítaných [IC90] pro buněčnou linii HEK293.

	HepG2		
	Fenofibrát	Bezafibrát	Gemfibrozil
[IC90]	85,76	160	129
	123,8	194	142
	95,13	154	129
Průměrná [IC90]	101,6 ± 16,18	169 ± 17,61	133 ± 6,13

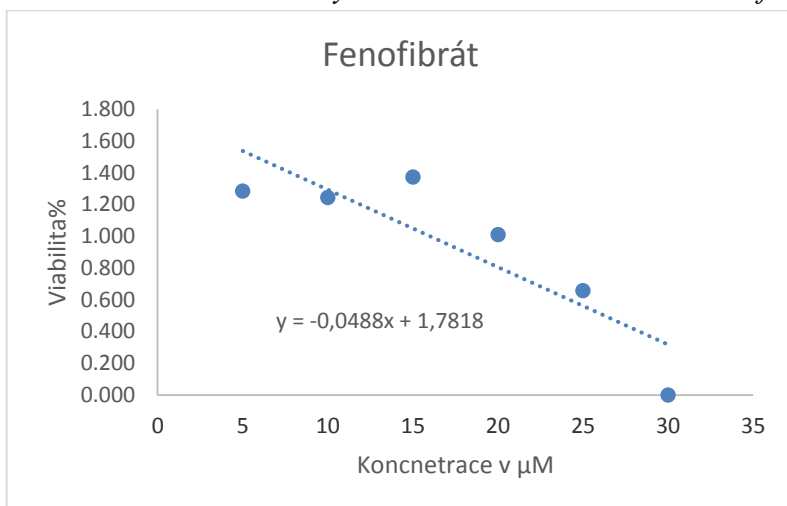
Tabulka 6. Hodnoty vypočítaných [IC90] pro nádorovou buněčnou linii HepG2.



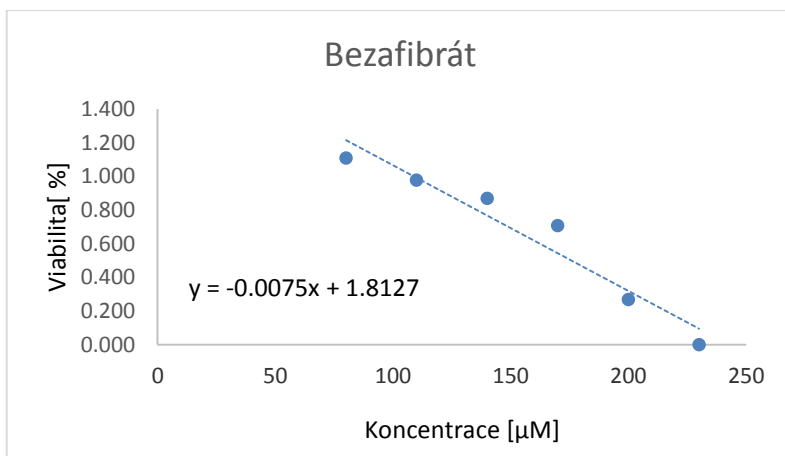
Graf 1a. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 17,16.



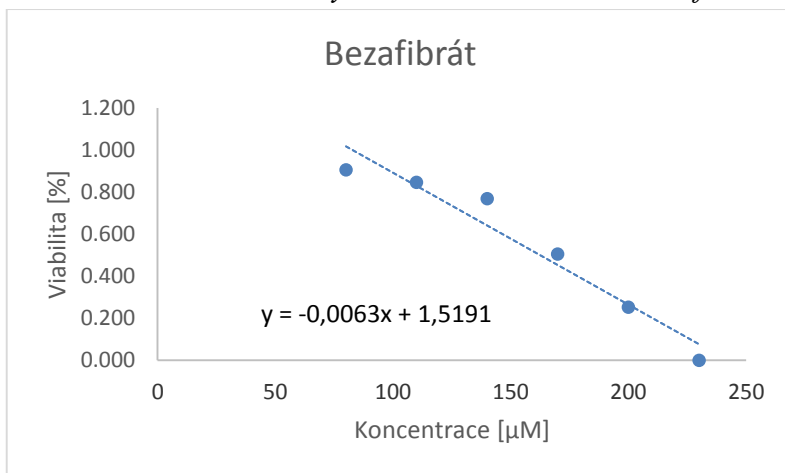
Graf 1b. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 15,8.



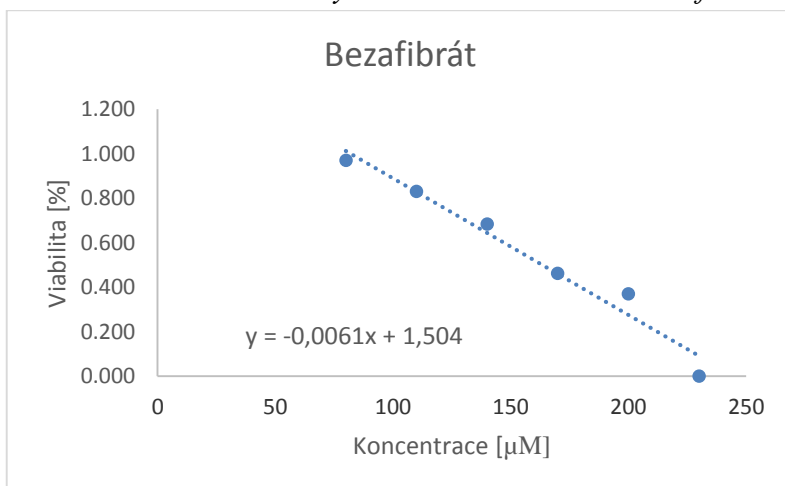
Graf 1c. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 18,1.



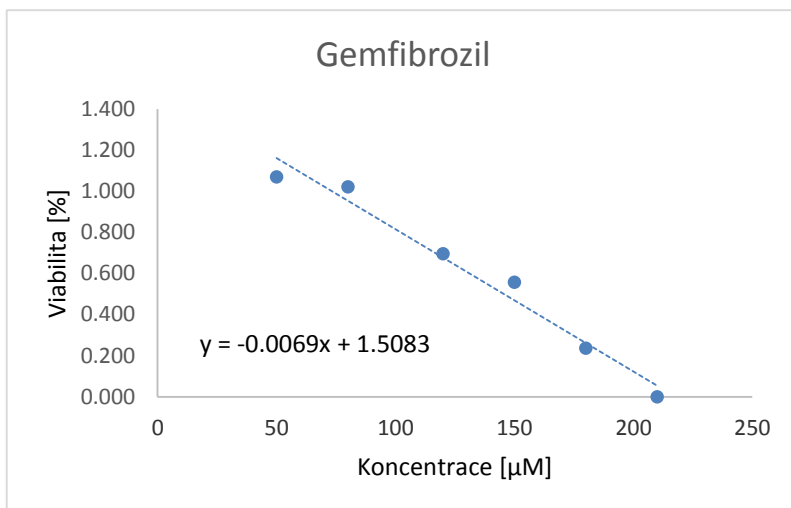
Graf 2a. Závislost viability buněk na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 121,7.



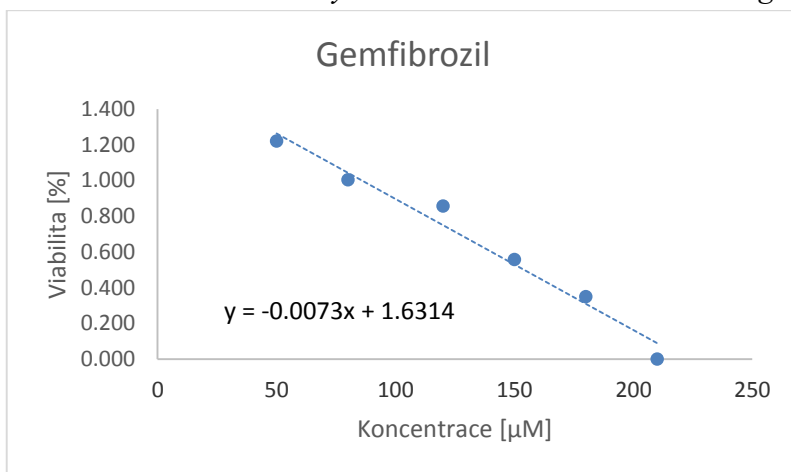
Graf 2b. Závislost viability buněk na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 98,3.



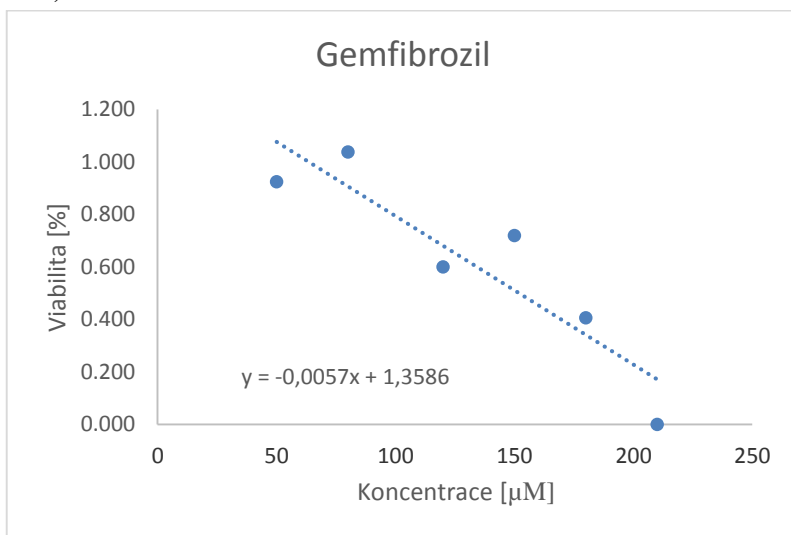
Graf 2c. Závislost viability buněk na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 99.



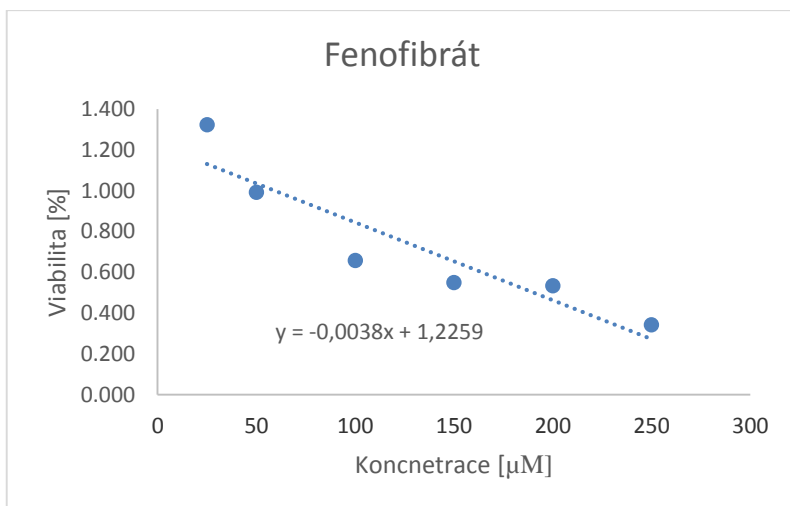
Graf 3a. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 88,2.



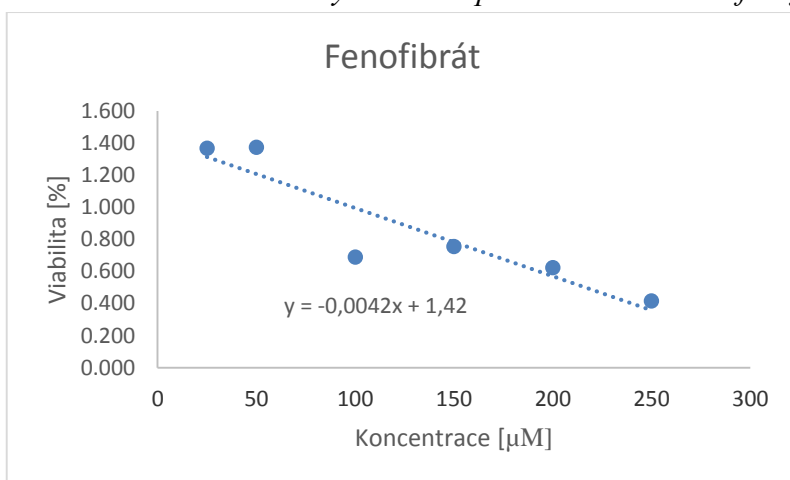
Graf 3b. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 104,5.



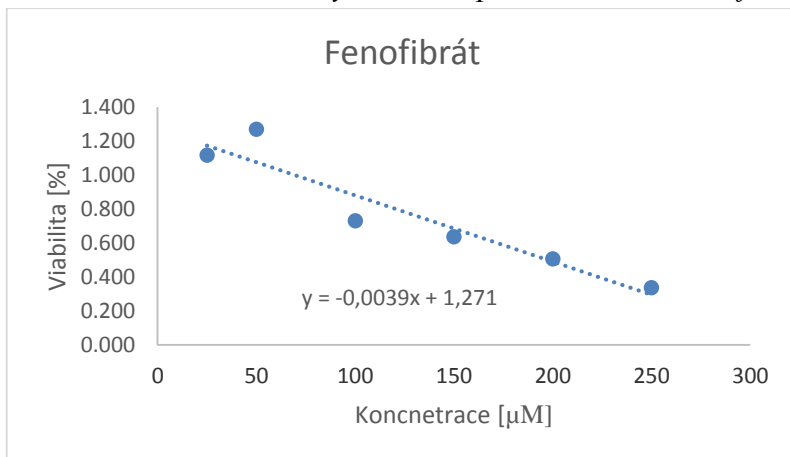
Graf 3c. Závislost viability buněk HEK293 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 80,5.



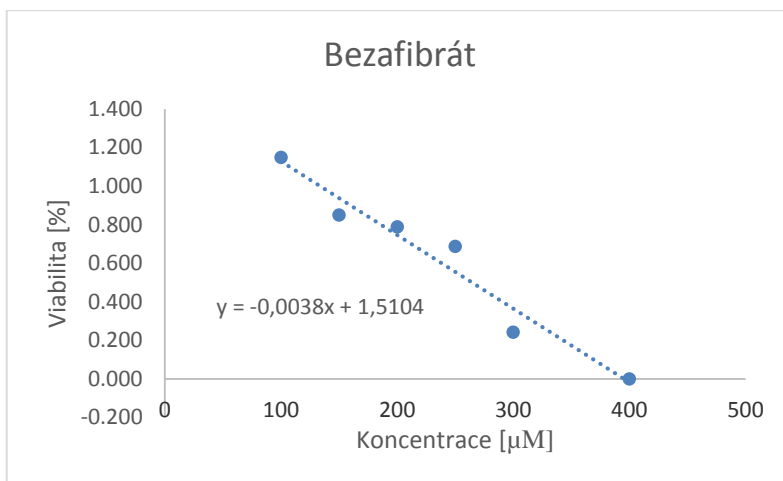
Graf 4a. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 85,76.



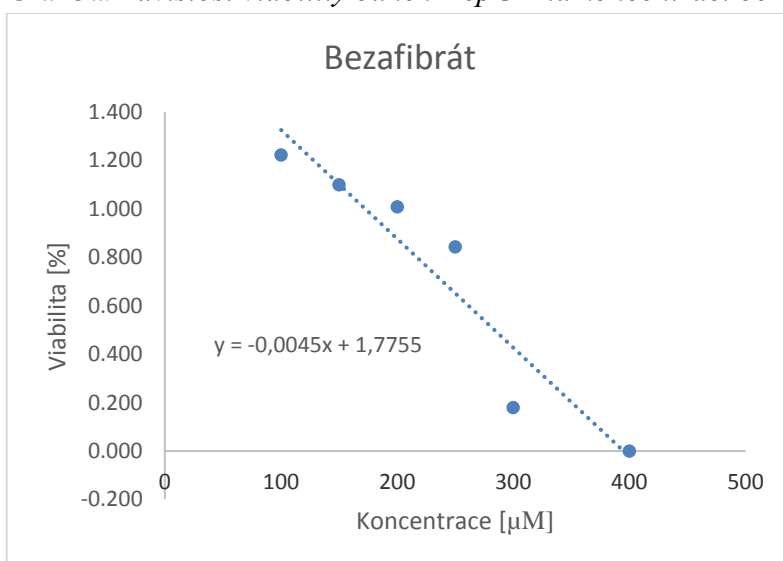
Graf 4b. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 123,8.



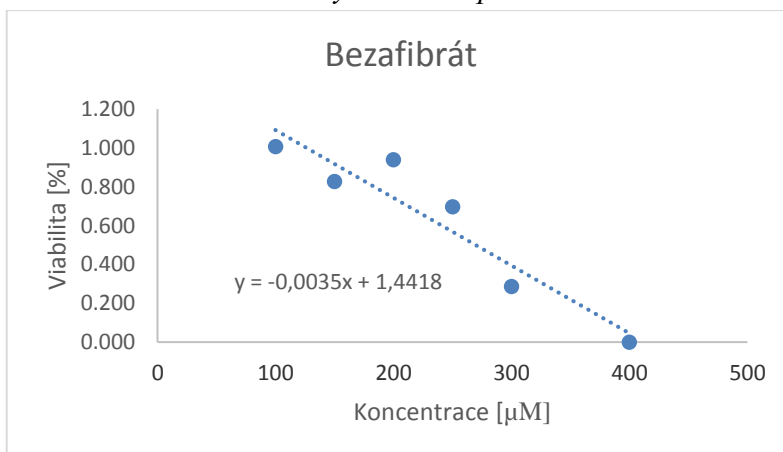
Graf 4c. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci fenofibrátu, [IC90] je 95,13.



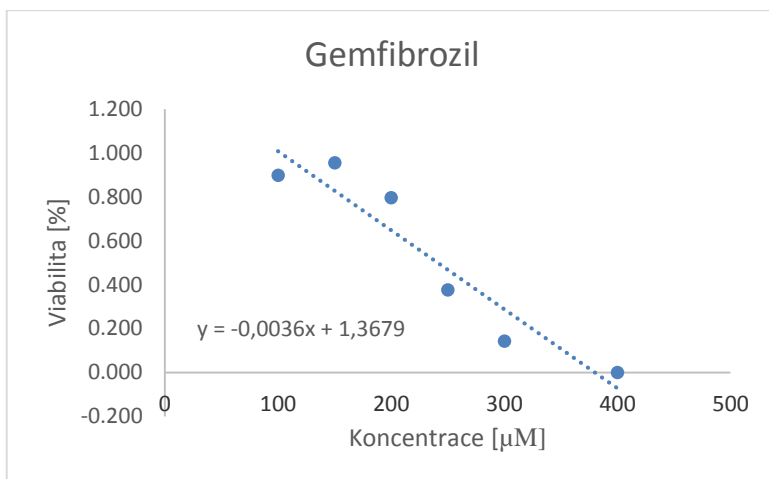
Graf 5a. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 160.



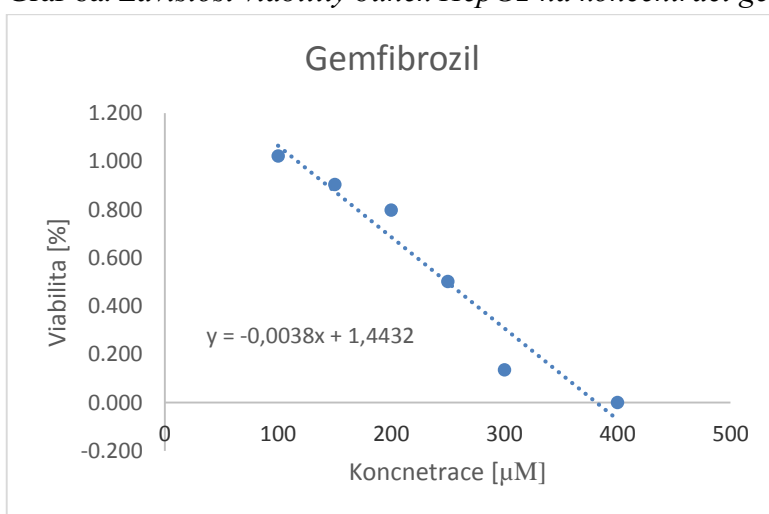
Graf 5b. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 194.



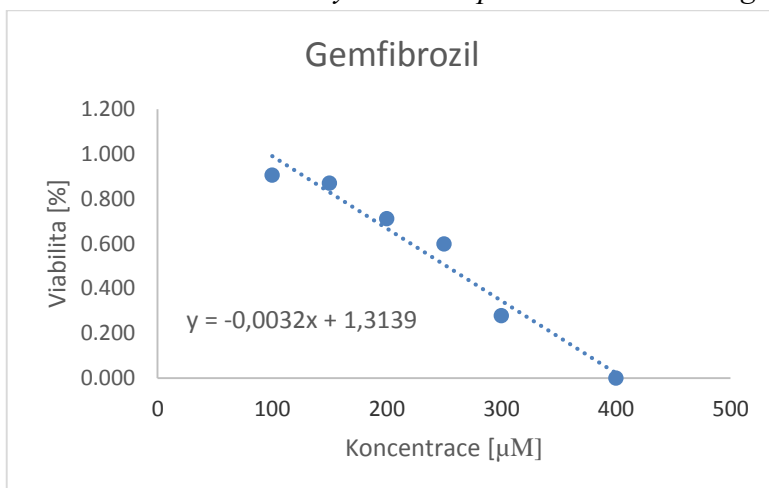
Graf 5c. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci bezafibrátu, [IC90] je 154.



Graf 6a. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 129.



Graf 6b. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 142.



Graf 6c. Závislost viability buněk HepG2 na koncentraci gemfibrozilu, [IC90] je 129.

3.2.2 Příprava buněčných lyzátů a proteinových frakcí pro western blot

Pro ovlivnění buněk buněčné linií HEK293 a buněčné nádorové linií HepG2 byly použity výsledné průměrné koncentrace jednotlivých látek. Poté byly připraveny buněčné lyzáty. Pomocí metody Bradfordové byla naměřena koncentrace jejich proteinů. Byla sestavena kalibrační křivka, díky níž byly vypočítány objemy vzorků, které byly použity na SDS-PAGE a Western blot analýzu. Naměřené hodnoty pro HEK293 jsou uvedeny v Tabulce 7 a naměřené hodnoty pro HepG2 jsou uvedeny v Tabulce 8.

	HEK293						
	F 24H	B 24H	G 24H	Kontrola	F 72H	B 72H	G 72H
A₅₉₅	0,727	0,743	0,827	1,18	0,988	0,88	0,893
	0,713	0,677	0,831	1,212	0,988	0,73	0,634
Průměr	0,72	0,71	0,829	1,196	0,988	0,805	0,7635
μg/μL	3,337754	3,249337	4,301503	7,546419	5,707339	4,089302	3,72237
na 20 μg	5,992053	6,155102	4,649538	2,650264	3,50426	4,890811	5,372922
4×LSB	0,834439	0,812334	1,075376	1,886605	1,426835	1,022325	0,930592
Objem	6,826492	6,967436	5,724913	4,536868	4,931095	5,913136	6,303514

Tabulka 7. Hodnoty naměřených absorbancí [A₅₉₅], koncentrací proteinů ve vzorcích [μg/μL] a objemů vzorků [μl] pro SDS-PAGE. Buněčná linie HEK293.

F je fenofibrát, B je bezafibrát a G je gemfibrozil.

24H je označení pro buňky, které byly ovlivněny 24 hodin.

72H je označení pro buňky, které byly ovlivněny 72 hodin.

	HepG2						
	F 24H	B 24H	G 24H	Kontrola	F 72H	B 72H	G 72H
A595	0,561	0,629	0,55	1,015	0,606	0,765	1,032
	0,592	0,581	0,68	1,02	0,633	0,776	1,041
Průměr	0,5765	0,605	0,615	1,0175	0,6195	0,7705	1,0365
μg/μL	1,725605	1,963303	2,046706	5,40367	2,550401	3,897413	6,270294
na 20 μg	11,59014	10,18692	9,771801	3,701188	7,841903	5,131609	3,189643
4×LSB	0,431401	0,490826	0,511676	1,350917	0,6376	0,974353	1,567574
Objem	12,02154	10,67774	10,28348	5,052106	8,479503	6,105962	4,757217

Tabulka 8. Hodnoty naměřených absorbancí [A595], koncentrací proteinů ve vzorcích [μg/μL] a objemů vzorků [μl] pro SDS-PAGE. Nádorová buněčná linie HepG2.

F je fenofibrát, *B* je bezafibrát a *G* je gemfibrozil.

24H je označení pro buňky, které byly ovlivněny 24 hodin.

72H je označení pro buňky, které byly ovlivněny 72 hodin.

3.2.3 Western blot analýza

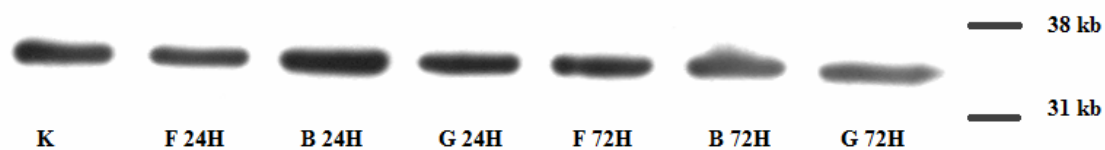
K hodnocení změn hladin exprese CYP2J2 po ovlivnění PPAR α v buněčných liniích HEK293 a HepG2 byla použita western blot analýza. Exprese proteinů CYP2J2 byla detekována pomocí primární a sekundární protilátky. Jako endogenní kontrola pro ověření stejného množství proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce GAPDH proteinu. Detekce proteinů byla stanovena u všech proteinových frakcí, u kontrolních (neovlivněných) tak i u ovlivněných buněčných linií po 24 a 72 hodinách.

Míra exprese pro GAPDH protein je ve všech buňkách u obou buněčných linií po 24 i 72 hodin inkubace stejná (Obrázek 6).

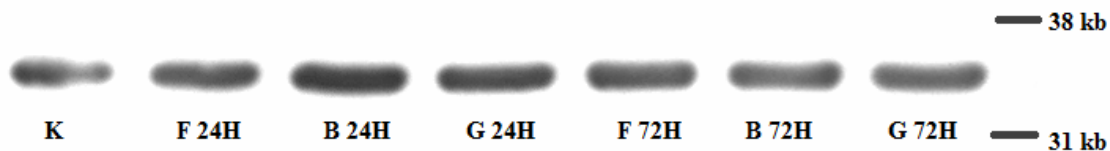
U nádorové buněčné linie HepG2 po ovlivnění buněk fenofibrátem v inhibiční koncentraci [IC90] byla míra exprese pro stanovovaný protein CYP2J2 téměř stejná po 24 i 72 hodinové inkubaci, oproti neovlivněným buňkám nenastala žádná zřetelná změna. Po použití [IC90] bezafibrátu je míra exprese neovlivněných buněk oproti buňkám po 24 hodinové inkubaci rovněž stejná. Po 72 hodinové inkubaci je míra exprese proteinu CYP2J2 zřetelně nižší. Po použití [IC90] gemfibrozilu nenastala změna v expresi u buněk inkubovaných 24 hodin. Po inkubaci 72 hodin je míra exprese proteinu CYP2J2 nepatrně snížena. Jediná výraznější změna v expresi proteinu CYP2J2 je pokles exprese po ovlivnění buněk HepG2 bezafibrátem po 72 hodinové inkubaci. Demonstruje obrázek 7.

U neovlivněných (kontrolních) buněk HEK293 byla exprese proteinu CYP2J2 téměř nedetekovatelná. Celkově se hladina tohoto proteinu výrazně změnila po ovlivnění buněk studovanými látkami. Po ovlivnění [IC90] fenofibrátem byla po 24 hod inkubaci exprese proteinu CYP2J2 velmi nízká, avšak po inkubaci 72 hodin se exprese proteinu rapidně zvýšila. Po použití [IC90] bezafibrátu byla exprese proteinu vyšší po inkubaci 24 hodin, po inkubaci 72 hodin se exprese snížila. Po ovlivnění buněk [IC90] gemfibrozilem byla exprese proteinu CYP2J2 opět vyšší po inkubaci 24 hodin, po 72 hodinové inkubaci se exprese snížila. Nejvyšší exprese proteinu CYP2J2 byla detekovaná u fenofibrátu po 72 hodinové inkubaci, nejnižší detekce byla naměřena u gemfibrozilu po 72 hodinové inkubaci a u neovlivněných buněk se exprese téměř neprojevila. Vše demonstruje obrázek 8.

HepG2

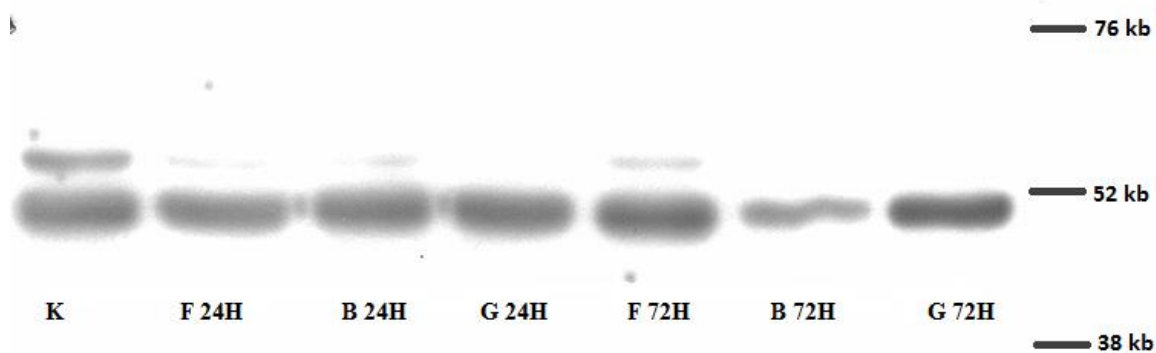


HEK293



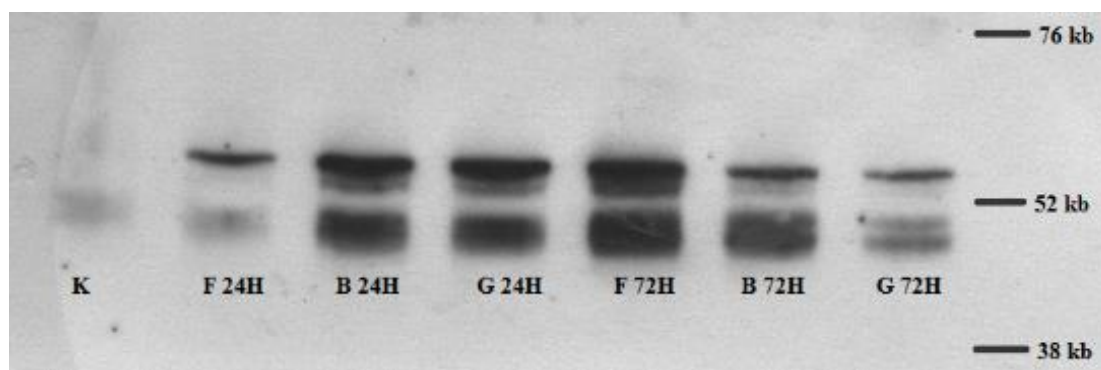
Obrázek 6. *Expresa proteinu GAPDH v proteinové frakci kontrolních buněk a buněk ovlivněných PPARα.*

HepG2



Obrázek 7. *Expresa proteinu CYP2J2 v proteinových frakcích kontrolních buněk a buněk ovlivněných PPARα.*

HEK 293



Obrázek 8. *Expres proteinu CYP2J2 v proteinových frakcích kontrolních buněk a buněk ovlivněných PPARα.*

Legenda k obrázkům 6 – 8

K – kontrola, F 24H – buňky ovlivněné [IC90] fenofibrátem, po inkubaci 24 hodin, B 24H – buňky ovlivněné [IC90] bezafibrátem po 24 hodinové inkubaci, G 24H – buňky ovlivněné [IC90] gemfibrozilem 24 hod od ovlivnění, F 72H – buňky ovlivněné [IC90] fenofibrátem po 72 hod. inkubaci, B 72H – buňky ovlivněné [IC90] bezafibrátem 72 hodin od ovlivnění, G 72H – buňky ovlivněné [IC90] gemfibrozilem 72 hod. od ovlivnění.

4 Diskuze

Tato diplomová práce demonstruje vliv PPAR α na regulaci proteinu CYP2J2. Pro experiment byla vybrána lidská embryonální buněčná linie ledvin HEK293, jde tedy o nenádorovou buněčnou linii, a lidská nádorová buněčná linie jater HepG2. Pro ovlivnění buněk byly vybrány tyto ligandy PPAR α : fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil. Jde o syntetické ligandy PPAR α , které jsou široce využívány v klinické praxi pro léčbu dislipidemií [21].

Prostřednictvím testu životaschopnosti se potvrdilo, že po ovlivnění buněk fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem dochází k poklesu životnosti buněk a to v závislosti na použité koncentraci (Grafy 1a-6c). Také byl tento test proveden za účel stanovení hodnot inhibiční koncentrace [IC90] pro všechny tři ligandy, pro následné ovlivnění buněčných linií. Tento test také potvrzuje řadu studií, které popisují schopnost PPARs jako inhibitory růstu nádorových buněk, jejich proliferaci a induktory apoptózy [11,39,41].

Expresí proteinu CYP2J2 byla detekována v řadě tkání lidského těla, např. v myokardu, játrech, pankreatu, tenkém a tlustém střevě, ledvinách, hypofýze a plicích. [6] K jeho expresi také dochází v průběhu embryonálního vývoje [16]. Zvýšená exprese CYP2J2 v porovnání s okolní nenádorovou tkání byla prokázána u karcinomu endometria, jazyka, hltanu, hrtanu, jícnu, plic, prsu, žaludku, jater a tlustého střeva [11,16]. Expresí CYP2J2 byla také prokázána u různých nádorových buněčných linií, ale ne v nenádorových buněčných liniích. Na základě těchto výsledků autoři předpokládají, že exprese CYP2J2 by mohla být potencionálním biomarkrem využitelným v diagnostice a cílené léčbě nádorů [11].

CYP2J2 patří mezi CYP epoxygenázy. Jde o proteiny, které metabolizují přeměnu kyseliny arachidonové na čtyři různé regioizomery epoxyeicosatrienových kyselin (EETs). Tyto EETs zvyšují proliferaci buněk, brání apoptóze a podporují metastázování [11,41].

Výsledky ukazují, že exprese CYP2J2 je ovlivněná ligandy PPAR α . Tuto regulaci potvrzují i studie jiných autorů [37,38]. Western blot analýza byla provedena ke sledování změn míry exprese u proteinu CYP2J2 po ovlivnění jednotlivými PPARs ligandy v buněčné linii HEK293 a nádorové buněčné linii HepG2. Výsledky této práce ukazují, že k expresi CYP2J2 dochází u obou buněčných linií. Ovšem míra exprese CYP2J2 u neovlivněných buněk je u nenádorové linie HEK293 v porovnání s nádorovou linií HepG2 velmi slabá, což odpovídá studii provedenou Jinag et al. 2005. U nádorové linie HepG2 se exprese CYP2J2 po ovlivnění různými ligandy výrazně neměnila. Jedinou výjimkou bylo snížení exprese tohoto proteinu u buněk ovlivněných bezafibrátem po 72 hodinové inkubaci. U HEK293 buněčné linie byla nejnižší míra exprese stanovena u gemfibrozilu po 72 hodinovém ovlivnění a nejvyšší exprese byla detekována u fenofibrátu po 72 hodinovém ovlivnění.

Pro kontrolu stejného množství proteinů ve všech vzorcích byla provedena detekce GAPDH proteinu. Míra exprese u proteinu GAPDH, který sloužil jako kontrola, zda je ve všech proteinových frakcích stejné množství, byla stejná u HEK293 i HepG2.

Výsledky této práce ukazují, že ligandy PPAR α se účastní regulace exprese CYP2J2. Pro plné pochopení mechanismu, jakým fibráty regulují změnu exprese CYP2J2 a dalších epoxygenáz v nádorových a nenádorových buňkách, je ale třeba řada dalších studií.

5 Závěr

Pomocí testu životaschopnosti byl prokázán účinek fenofibrátu, bezafibrátu a gemfibrozilu na buněčné linii HEK293 a nádorové buněčné linii GepG2. S rostoucí koncentrací látek klesala viabilita buněk u obou buněčných linií. Tento test také pomohl stanovit inhibiční koncentrace látek, které byly použity v dalším testování. Expres proteinů CYP2J2 po ovlivnění danými látkami byla stanovena z proteinových frakcí získaných z lyzátů buněčných linií HEK293 a HepG2. Expres byla detekována pomocí western blot analýzy.

Míra exprese CYP2J2 u buněčné nádorové linie HepG2 se po ovlivnění testovanými látkami výrazně neměnila s výjimkou snížení exprese CYP2J2 u buněk po inkubaci 72 hodin s bezafibrátem. Výrazné změny v expresi CYP2J2 po ovlivnění různými fibráty byly prokázány v buněčné linii HEK293. U neovlivněných buněk byla hladina CYP2J2 sotva detekovatelná. Po ovlivnění buněk fibráty obecně došlo k nárůstu exprese tohoto proteinu.

Pochopení mechanismu, jakým ligandy PPAR α regulují expresi CYP2J2 a dalších epoxygenáz by mohlo přispět ke zlepšení léčby onkologických pacientů.

Seznam použité literatury

1. STIBOROVÁ M., HUDEČEK J., HODEK P., FREI E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* 93, 229-237.
2. BERNHART R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology* 124, 128-145.
3. ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 737 – 747.
4. ČÍŽKOVÁ K., KONIECZNA A., ERDOSOVÁ B., EHRMANN J. (2014): Time-dependent expression of cytochrome P450 epoxygenases during human prenatal development. *Organogenesis* 10:1, 1-9; Landes Bioscience.
5. DVOŘÁK Z., CVEK B. (2011): Vybrané kapitoly z buněčné biologie. Univerzita Palackého Olomoci, 1. vydání, skripta, ISBN:978-80-244-2724-9.
6. ČÍŽKOVÁ K., KONIECZNA A., ERDOSOVÁ B., LICHNOVSKÁ R., EHRMANN J. (2012): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in regulation of cytochromes P450: New way to overcome multidrug resistance? Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012, Article ID 656428, 10 pages, doi: 10.1155/2012/656428.
7. GUENGERICH F. P. (2006). Cytochrome P450 and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* 2006, 8(1) Article 12 (<http://www.aapsj.org>).
8. CHEN C., WEI X., RAO X., WU J., YANG S., CHEN F., MA D., ZHOU J., DACKOR R. T., ZELDIN D. C., WANG D. W. (2011): Cytochrome P450 2J2 is highly expressed in hematologic malignant diseases and promotes tumor cell growth. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(2):344–355. doi: 10.1124/jpet.110.174805.
9. WEI X., ZHANG D., corresponding author DOU X., NIU N., HUANG W., BAI J., and ZHANG G. (2014): Elevated 14,15- epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14: 841. Published online 2014 Nov 18. doi: 10.1186/1471-2407-14-841.

10. FLEMING I. (2007): Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82:60–67.
11. JIANG J. G., CHEN C. L., CARD J. W., YANG S., CHEN J. X., FU X. N., NING Y. G., XIAO X., ZELDIN D. C., WANG D. W. (2005): Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Res.* 2005;65(11):4707–4715. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4173.
12. SPECTER A. A. (2009): Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. Department of Biochemistry, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City IA 52242. *Journal of Lipid Research*, April Supplement.
13. <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/62/1455.pdf>
14. KREMERS P. (2002): In vitro test for predicting drug-drug interactions: the need for validated procedures. *Pharmacology and Toxicology* 91:209-217.
15. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/>
16. ENAYETALLAH A. E., FRENCH R. A., GRANT D. F. (2006): Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *Journal of Molecular Histology*, 37, 133–141, doi:10.1007/s10735-006-9050-9.
17. PANIGRAHY D., KAIPAINEN A., GREENE E. R., HUANG S. (2010): Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2010) 29:723–735, doi:10.1007/s10555-010-9264-x.
18. PETERS J. M., SHAH Y. M., GONZALES F. J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews*, Vol. 12:181-195.
19. ISSEMAN I., GREEN S. (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, Vol. 347: 645-649.
20. PYPER S. R., VISWAKARMA N., YU S., REDDY J. K. (2010): PPAR: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling*, Vol. 8:1-21, doi:10.1621/nrs.08002.
21. CLARK R. B. (2002): The role of PPARs in inflammation and immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 71 no. 3 388-400.
22. DESVERGNE B., WAHLI W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-88.

23. SHER T., YI H. F., MCBRIDE O. W., GONZALES F. J. (1993): cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598-604.
24. BOOKOUT A. L., JEONG Y., DOWNES M., YU R. T., EVANS R. M., MANGELSDORF D. J. (2006): Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789-99.
25. BRAISSANT O., FOUFELLE F., SCOTTO C., DAUCA M., WAHLI W. (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-66.
26. WALGREN J. E., KURTZ D. T., MCMILLAN J. M. (2000): Expression of PPAR(α) in human hepatocytes and activation by trichloroacetate and dichloroacetate. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 108, 116-32.
27. YOSHIKAWA T., BRKANAC Z., DUPONT B. R., XING G.-Q., LEACH R. J., DETERA-WADLEIGH S. D. (1996): Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, Vol. 35:637-368.
28. SANDERSON L. M., DEGENHARDT T., KOPPEN A., KALKHOVEN E., DESVERGNE B., MULLER M., KERSTEN S. (2009): Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) but not PPAR α serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol* 29, 6257-67.
29. MICHALIK L., WAHLI W. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1771, no. 8, pp. 991–998, 2007.
30. HALL M. G., QUIGNODON L., DESVERGNE B. (2008): Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ in the brain: facts and hypothesis. *PPAR Research*, vol. 2008, Article ID 780452, 10 pages.
31. GREENE M. E., BLUMBERG B., MCBRIDE O. W., YI H. F., KRONQUIST K., KWAN K., HSIEH L., GREENE G., NIMER S. D. (1995): Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hepatopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995;4(4-5):281-99.
32. CHEN Y., JIMENEZ A. R., MEDH J. D. (2006): Identification and regulation of novel PPAR- γ splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1759, no. 1-2, pp. 32–43.

33. RAKHSHANDEHROO M., KNOCH B., MÜLLER M., KERSTEN S. (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research*, vol. 2010, Article ID 612089, 20 pages.
34. HOSTETLER H. A., PETRESCU A. D., KIER A. B., SCHROEDER F. (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor α interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem* 280, 18667-82.
35. POZZI A., POPESCU V., YANG S. et al. (2010): The anti-tumorigenic properties of peroxisomal proliferator-activated receptor α are arachidonic acid epoxygenase-mediated. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 17, pp. 12840–12850.
36. POZZI A., IBANEZ M. R., GATICA A. E. et al. (2007): Peroxisomal proliferator-activated receptor- α -dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 24, pp. 17685–17695.
37. NG V. Y., HUANG Y., REDDY L. M., FALCK J. R., LIN E. T., KROETZ D. L. (2007): Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor α . *DrugMetabolism and Disposition*, vol. 35, no. 7, pp. 1126–1134.
38. WRAY J. A., SUGDEN M. C., ZELDIN D. C. et al. (2009): The epoxygenases CYP2J2 activates the nuclear receptor PPAR α in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 10, Article ID e7421.
39. PRUEKSARITANONT T., RICHARDS K. M., QIU Y. et al. (2005): Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes,” *Pharmaceutical Research*, vol. 22, no. 1, pp. 1–78.
40. RICHERT L., TUSCHL G., VIOLLON-ABADIE C. et al. (2008): Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluormethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 36, no. 4, pp. 702–714.
41. JINAG J. G., NING Y. G., CHEN CH. et al. (2007): Cytochrome P450 epoxygenase promotes human cancer metastasis. *Cancer res* 2007, 67:6665-6674. Published online July 17,2007, doi:10.1158/0008-5472.CAN-063643.