

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Jiří Hanyk

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv fibrátů na diferenciaci střevních
buněk *in vitro***

Bakalářská práce

Jiří Hanyk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně za pomoci vedoucí práce
Mgr. Kateřiny Čížkové, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

Jiří Hanyk

SOUHRN

Fibráty jsou široce používaná hypolipidemická léčiva, která slouží jako ligand pro receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů alfa (PPAR α). V této bakalářské práci se zabývám vlivem fibrátu, konkrétně fenofibrátu, na diferenciaci buněk nádorové buněčné linie HT-29 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva.

Teoretická část shrnuje základní poznatky a informace o celkové histologické stavbě střeva a průběhu diferenciaci buněk střevního epitelu. Práce dále popisuje strukturu a mechanismus účinku PPARs, se zaměřením na funkce a ligandy izoformy PPAR α .

V praktické části jsou zaznamenány výsledky ovlivnění buněk fenofibrátem při použití dvou různých koncentrací – 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – na buňky v různém stupni diferenciaci – nediferencované, během diferenciaci a diferencované. Vyhodnocení je provedeno na základě proliferčního testu (WST-1 test) a metody In-cell Elisa (ICE), pomocí níž se sledovala změna exprese dvou markerů diferenciaci – villinu a intestinální alkalické fosfatázy (IAP). Přítomnost a subcelulární lokalizace PPAR α v buňkách HT-29 po ovlivnění fenofibrátem je detekována pomocí imunocytochemického barvení (ICC).

SUMMARY

Fibrates are widely used hypolipidemic drugs which serve as ligands of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). The bachelor thesis studied effect of fenofibrate treatment on cell differentiation of a human colon cancer cell line – HT-29.

The theoretical part of the thesis summarizes principal knowledge and information about the overall histological structure of the intestines and differentiation of intestinal epithelial cells. The study also describes the structure and mechanism of action of PPARs with a focus on the functions and ligands PPAR α .

The experimental part contains the results of fenofibrate treatment by using two different concentrations – 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ – on cells at different stages of differentiation – proliferating, differentiating and differentiated cells. The evaluation is based on a proliferation assay (WST-1) and an In-Cell Elisa (ICE) method for monitoring the change in expression of differentiation markers – villin and intestinal alkaline phosphatase (IAP). The presence and subcellular localization PPAR α in HT-29 cells of fenofibrate treatment is detected by immunocytochemical staining (ICC).

Poděkování:

Rád bych tímto poděkoval Mgr. Kateřině Čížkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala během zpracování bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Zlatce Huškové za seznámení s náležitostmi týkající se práce s buněčnými kulturami. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině, která mě ve studiu podporuje.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Histologická stavba střeva.....	3
3.1.1	Diferenciace buněk v epitelu	6
3.1.2	Modely pro studium diferenciace	8
3.2	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs)	10
3.2.1	Základní charakteristika.....	10
3.2.2	Struktura.....	11
3.2.3	Mechanismus účinku	12
3.2.4	Ligandy PPAR α	14
3.2.5	Funkce PPAR α	15
3.2.6	Vliv PPAR α na proliferaci buněk	16
4	MATERIÁL A METODY	18
4.1	Biologický materiál a kultivační podmínky	18
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	18
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	19
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.4.1	Ovlivnění buněk fenofibrátem	20
4.4.2	Test proliferace – WST-1	21
4.4.3	In-Cell ELISA (ICE).....	22
4.4.4	Analýza buněčného cyklu – průtokové cytometrie.....	23

4.4.5	Imunocytochemické barvení (ICC)	24
5	VÝSLEDKY.....	26
5.1	Test proliferace (WST-1) a ICE.....	26
5.2	Analýza buněčného cyklus – průtoková cytometrie	29
5.3	Imunocytochemické barvení (ICC).....	30
6	DISKUSE	33
7	ZÁVĚR.....	35
8	LITERATURA.....	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CBCC	střevní kmenové buňky (Crypt Base Columnar Cell)
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DBD	DNA vazebná doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EET	kyselina epoxieikosatrienová
EFA	esenciální mastné kyseliny
FBS	fetální bovinní sérum
FF	fenofibrát
HAT	histon acetyl-transferáza
HDAC	histon deacetyláza
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HEK293	buněčná linie odvozená od embryonálních ledvinových buněk
HepG2	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
HRP	křenová peroxidáza
HT-29	buněčná linie odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva
IAP	intestinální alkalická fosfatáza
ICC	imunocytochemické barvení
ICE	In-Cell Elisa
IL-6	interleukin 6
MAPK	mitogenem aktivované protein kinázy
NaBt	butyrát sodný
NF κ B	nukleární faktor kappa B
PBS	fosfátový pufr
PPARs	receptory aktivované proliferátory peroxizomů
PPRE	PPAR response element
RT	pokožová teplota (room temperature)
RXR	retinoidní X receptor
SD	směrodatná odchylka
sEH	solubilní epoxidhydrolázy
TA	střevní progenitorové buňky (transit-amplifying)

TBS	Tris Bufferes Saline
TG	triglyceridy
TMB	3,3,5,5-tetrametylbenzidin
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
WST-1	Water-soluble tetrazolium salts

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění buněk v kryptě tlustého střeva a tenkého střeva s jednotkou klky-krypty.

Obrázek 2: Schématické znázornění typů střevních epiteliálních buněk.

Obrázek 3: Schéma sliznice tenkého střeva a postupná diferenciacie buněk.

Obrázek 4: Exprese PPAR α na úrovni mRNA v různých typech lidských tkání.

Obrázek 5: Schématické zobrazení struktury PPAR α .

Obrázek 6: Mechanismus transaktivace jaderného receptoru PPAR.

Obrázek 7: Chemická struktura fenofibrátu.

Obrázek 8: Vliv 5 mmol·l⁻¹ butyrátu sodného (NaBt).

Obrázek 9: Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na nediferencované buňky.

Obrázek 10: Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na diferencující se buňky.

Obrázek 11: Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na diferencované buňky.

Obrázek 12: Množství DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Obrázek 13: Reprezentativní mikrofotografie exprese PPAR α v buňkách HT-29 a rozdělení barevných kanálů pomocí programu ImageJ.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozpis koncentrací a použitých objemů na triplet pro WST-1 test.

Tabulka 2: Rozpis koncentrací a použitých objemů na doublet pro ICE.

Tabulka 3: Rozpis koncentrací a použitých objemů pro analýzu buněčného cyklu.

Tabulka 4: Rozpis koncentrací a použitých objemů na ICC.

Tabulka 5: Jaderná pozitivita, po ovlivnění fenofibrátem, u buněk v různém stupni diferenciaci.

1 ÚVOD

Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs) jsou ligandem-aktivované transkripční faktory, které se řadí mezi jaderné receptory. Hrají důležitou roli při regulaci energetické homeostázy, metabolismu lipidů a glukózy, zánětu, a jsou zodpovědné za proliferaci a diferenciaci buněk. Jedním z takových ligandů aktivujících PPARs, konkrétně PPAR α , jsou fibráty. Jedná se o hypolipidemická léčiva, která se používají v klinické praxi při léčbě dyslipidemie, díky jejich schopnosti snižovat plazmatickou hladinu triglyceridů, a naopak zvyšovat hladinu lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) cholesterolu.

V nedávných studiích byl pozorován vliv ligandů PPAR α na proliferační schopnost v různých nádorových liniích. Výsledek prokázal koncentrační závislost agonistů PPAR α na proliferaci buněk. Nízká koncentrace fibrátu podporovala proliferační schopnost buněk, zatímco při vyšší koncentraci docházelo k inhibici. Z toho důvodu se v bakalářské práci zaměřuji na diferenciaci buněčné linie HT-29 po ovlivnění fenofibrátem ve dvou různých koncentracích.

2 CÍLE PRÁCE

Proliferačním testem za použití WST-1 reagentu stanovit vliv fenofibrátu v různých koncentracích na proliferační schopnost buněčné linie HT-29 při různém stupni diferenciaci.

Metodou In-Cell ELISA sledovat změnu exprese markerů diferenciaci, villinu a intestinální alkalické fosfatázy (IAP), a výsledky srovnat s proliferační aktivitou buněk.

Imunocytochemickým barvením detekovat přítomnost a subcelulární lokalizaci PPAR α v buňce po ovlivnění buněk fenofibrátem.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Histologická stavba střeva

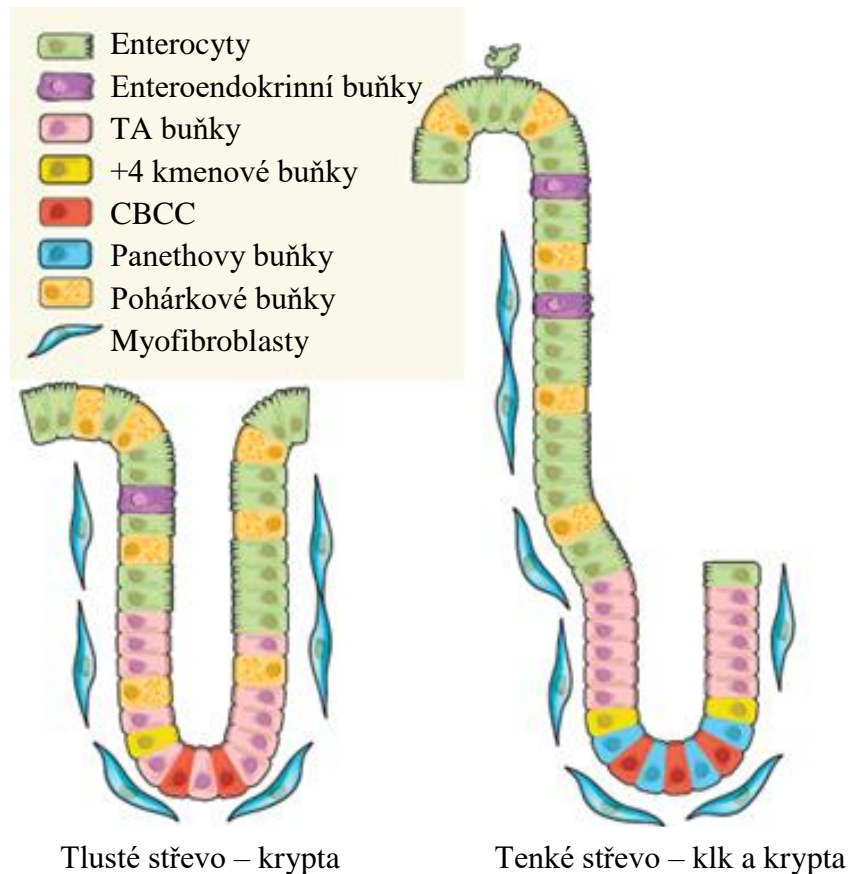
Trávicí systém se skládá z trávicí trubice – ústní dutina, jícen, žaludek, tenké střevo, tlusté střevo a anus – a přidružených žláz, jako jsou slinné žlázy, játra a slinivka břišní. Vnitřní epitelální výstelka tenkého střeva musí současně dosáhnout účinného trávení a absorpce potravin pro zachování, růst a energetické potřeby těla, přičemž neustále plní funkci bariéry proti potenciálně nebezpečným mikroorganismům a karcinogenům, které jsou přítomny ve střevním luminu. Úlohou tlustého střeva je vstřebávání většiny vody a iontů (Barker, 2014; Mescher, 2018).

Tenké střevo (délka 3-5 m) je tvořeno ze tří částí – dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*). Všechny tři části tenkého střeva mají velmi podobnou histologickou stavbu a charakteristickým znakem sliznice je přítomnost klků a krypt (Sancho *et al.*, 2004; Mescher, 2018).

Klky (*villi intestinales*) jsou krátké slizniční výrůstky (0,5-1,5 mm), které hustě pokrývají vnitřní povrch tenkého střeva a vybíhají do lumina. Tyto prstovité výběžky pokrývá jednovrstevný cylindrický epitel, složený převážně z resorpčních buněk – enterocytů, a v menší míře z pohárkovitých a enteroendokrinních buněk (Lüllmann-Rauch, 2012; Mescher, 2018). Nejdelsí klky jsou zastoupeny ve dvanáctníku, s nejvyšším zastoupením enterocytů. Naproti tomu, pohárkovité buňky jsou nejrozšířenější v epitelu krátkých klků distální oblasti tenkého střeva, kde produkují hlen, potřebný pro usnadnění průchodu stále kompaktnější stolice směrem k tlustému střevu (Barker, 2014).

Mezi bázemi klků se nachází vyústění četných, krátkých, tubulózních žláz zvaných krypty (*glandulae intestinales*), rovněž známé jako Lieberkühnovy krypty, které jsou pokračováním epitelu klků (Lüllmann-Rauch, 2012; Mescher, 2018). Na spodu kryptové části jsou lokalizovány multipotentní kmenové buňky CBCC (Crypt base Columnar cell), které se nachází mezi Panethovými buňkami, a dávají vznik ostatním buňkám sliznice střeva. V kryptě se nachází ještě kmenové buňky +4 (zaujímají čtvrtou pozici ze základny krypty), které jsou tzv. „rezervní“ a mohou po poranění obnovit kompartment CBCC kmenových buněk. Zbytek krypty zabírají progenitorové buňky (TA; transit-amplifying) (Barker, 2014).

Tlusté střevo (délka 1,3-1,5 m) se skládá ze slepého střeva s červovitým výběžkem (*appendix vermiformis*), tračniku (*colon*) a konečníku (*rectum*). Sliznice tlustého střeva nemá klky a po celé jeho délce ústí četné krypty, které jsou hlubší a hustěji rozmístěné než ve střevě tenkém. Epitel je vystlán pohárkovými a resorpčními buňkami s malým množstvím enteroendokrinních buněk (Lüllmann-Rauch, 2012; Mescher, 2018). Organizace buněk v tlustém a tenkém střevě je zaznamenána na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schématické znázornění buněk v kryptě tlustého střeva a tenkého střeva s jednotkou klky-krypty (převzato z Medema *et* Vermeulen, 2011).

Střevní epitel je složen alespoň ze sedmi diferencovaných typů buněk (Gerbe, 2012). Jak již bylo zmíněno výše, nejhojněji zastoupeným typem buněk ve střevním epitelu jsou enterocyty.

Jedná se o vysoké cylindrické buňky s bazálně uloženým oválným jádrem a jejich hlavní funkcí je resorpce živin. Z apikálního konce cylindrických buněk vybíhají specializované cytoplazmatické výběžky, tzv. mikroklky (*villus*), které zvětšují buněčný povrch pro resorpci. Hustě uspořádané mikroklky jsou viditelné jako kartáčový nebo žíhaný lem směřující do lumina orgánu. Délka mikroklků je přibližně 1 μm a šířka

0,1 μm . Tlustý glykokalyx, který pokrývá mikroklky střevního kartáčového lemu, obsahuje na membránu vázané proteiny a enzymy uplatňující se při natrávení některých makromolekul (Mescher, 2018).

Každý mikroklk obsahuje svazek aktinových filament, která jsou příčně propojena jak mezi sebou, tak s okolní cytoplazmatickou membránou. Ačkoliv jsou mikroklky relativně stabilní, uspořádání jejich mikrofilament je dynamické a mění se na základě interakcí s myozinem. To přispívá k udržení optimálních podmínek pro resorpci, která je realizována prostřednictvím různých kanálů, receptorů a jiných proteinů v plazmalemě. (Mescher, 2018).

Každý enterocyt je vybaven v průměru 3 000 mikroklky a každý mm^2 slizničního povrchu obsahuje kolem 200 milionů těchto struktur. Mikroklky, klky a cirkulární řasy dohromady velmi zvětšují rozlohu slizničního povrchu, který přichází do kontaktu s živinami přítomnými v luminu. Enterocyty mají rovněž schopnost produkovat řadu enzymů (laktáza, sacharóza-izomaltáza, dipeptidylpeptidáza IV), které v glykokalyxu hydrolyzují disacharidy a dipeptidy na monosacharidy a aminokyseliny. Ty jsou poté snadno resorbovány aktivním transportem a přenášeny ke kapilárám. Lipidy jsou štěpeny lipázami, a vstupují pomocí micel do enterocytů pasivní difúzí a prostřednictvím membránových transportérů (Mescher, 2018; Simon-Assmann *et al.*, 2007).

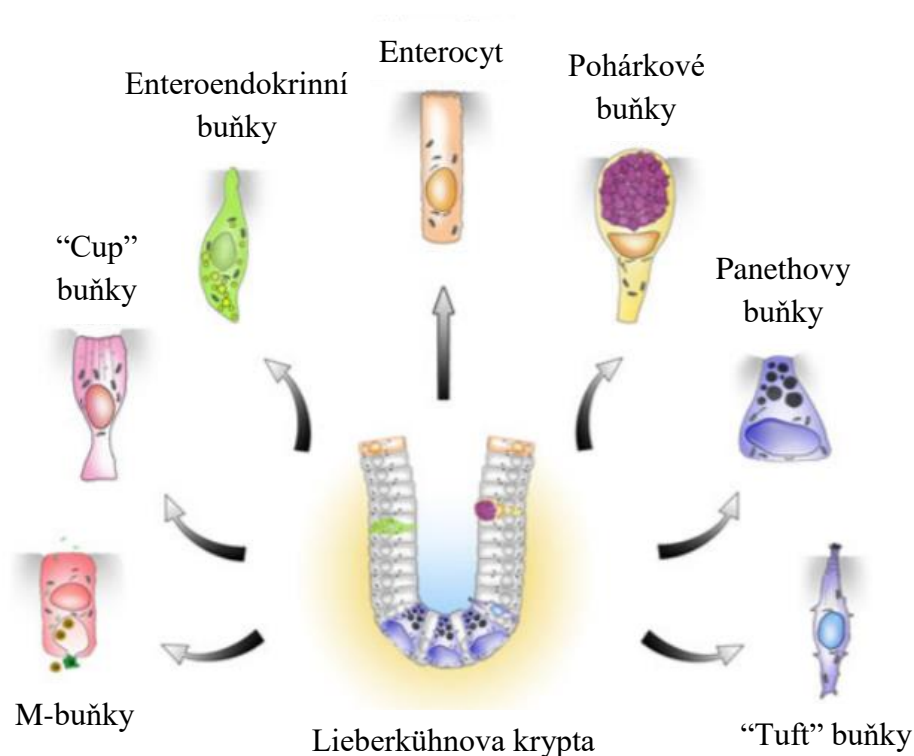
Dalším typem buněk jsou buňky pohárkové, které se nachází mezi enterocyty. Jejich sekretem jsou glykoproteinové muciny, které se následnou hydratací mění v hlen, jehož hlavní funkcí je chránit a zvlhčovat výstelku střeva (Mescher, 2018).

Panethovy buňky v bazální části krypty pod úrovní kmenových buněk jsou exokrinní buňky s velkými eosinofilními sekrečními granuly v apikální cytoplazmě. Granula Panethových buněk obsahují lysozym, fosfolipázu A₂ a hydrofobní peptidy zvané defensiny. Všechny tyto látky se vážou na bakteriální stěnu mikroorganismů a následně ji rozrušují. Panethovy buňky tak hrají důležitou roli ve vrozené imunitě a v regulaci mikroprostředí střevních krypt (Mescher, 2018).

Imunitní funkci mají na starosti rovněž M-buňky. Jedná se o specializované epitelové buňky sliznice ilea, umístěné nad lymfatickými folikuly Peyeroých plaků. V záhybech bazolaterální membrány těchto buněk se nacházejí intraepitelové lymfocyty a buňky prezentující antigen (APC). M-buňky vycytávají selektivní endocytózou antigeny a transportují je do sousedních lymfocytů a dendritických buněk, které pak migrují do lymfatických uzlíků, kde vyvolají příslušnou imunitní odpověď (Mescher, 2018).

Enteroendokrinní buňky se nachází ve variabilním počtu po celé délce tenkého střeva a produkují různé peptidové hormony, jako je např.: cholecystokinin (CCK), gastrický inhibiční polypeptid (GIP) nebo sekretin. Jejich zúžená apikální část, která je v kontaktu s lumenem, obsahuje chemorecepční molekuly, jež registrují koncentraci některých živin, např.: sacharidů, a tím regulují výdej hormonů na svém bazálním povrchu (Mescher, 2018).

Kromě výše popsaných střevních buněk, existují nejméně další dva typy – “tuft” a “cup” buňky (Obrázek 2). Jejich funkce není zatím zcela objasněna (Barker, 2014), ale tyto vzácné typy buněk se mohou nacházet v kryptách i na klcích (Barker *et al.*, 2012).



Obrázek 2: Schématické znázornění typů střevních epitelálních buněk (převzato z Gerbe *et al.*, 2012).

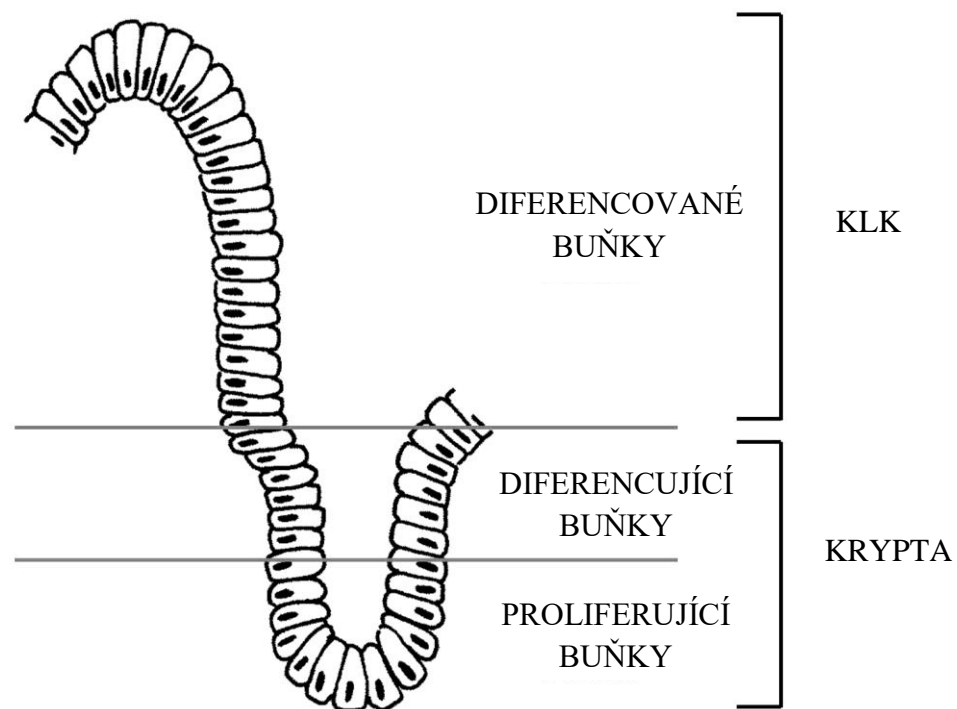
3.1.1 Diferenciace buněk v epitelu

Střevní epitel je struktura relativně labilní a jeho buňky se neustále a rychle obnovují mitotickou aktivitou kmenových buněk. Buňky střevního epitelu jsou každý týden nahrazeny novými buňkami. Ke generování nových buněk z multipotentních kmenových buněk dochází uvnitř Lieberkühnových krypt, kde jsou lokalizovány ve specifických „výklencích“ (fr. *niche*) (Tremblay *et al.*, 2006; Mescher, 2018).

Z kmenových buněk vznikají progenitorové TA buňky, které se diferencují

do různých typů funkčních buněk, když migrují z krypty směrem ke špičce klků, aby nahradily epitelové buňky, které byly ztraceny prostřednictvím anoikis na vrcholu klku (Obrázek 3). Diferenciace, tedy cesta z krypty na klk trvá 2 dny, a vrcholu klku buňky dosáhnou během 5 dnů (Sancho *et al.*, 2004; Barker, 2014). Klky jsou tak místem lemovaným funkčními diferencovanými epiteliálními buňkami, které zde plní svoji funkci (Benoit *et al.*, 2012). Výjimkou jsou Panethovy buňky, které nemigrují vzhůru do oblasti klku, ale pohybují se směrem dolů na dno krypty, kde plní svoji funkci 6-8 týdnů (Snippert *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2012). Proliferace, migrace a diferenciace epiteliálních buněk musí být přísně regulována různými mechanismy řízenými růstovými faktory a cytokiny (Tremblay *et al.*, 2006).

Tlusté střevo je charakterizováno prodlouženými žlázami pokrytými jednoduchým epitelem, ve kterém jsou přítomny převážně absorpční buňky (kolonocyty) a pohárkové buňky. Obnova buněk probíhá obdobně jako u střeva tenkého (Simon-Assmann *et al.*, 2007).



Obrázek 3: Schéma sliznice tenkého střeva a postupná diferenciace buněk (převzato z Čížková *et al.*, 2015-16).

3.1.2 Modely pro studium diferenciace

V roce 1964 Jorgen Fogh založil první lidskou buněčnou linii karcinomu tlustého střeva s názvem HT-29. O třináct let později již bylo odvozeno z karcinomů tlustého střeva 127 kultivovatelných lidských nádorových buněčných linií. Podle původu nádoru vykazují buněčné linie vysokou diverzitu ve stupni diferenciace, proliferace a metabolických vlastnostech. Dobře známé a popsané jsou dvě buněčné linie odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva – Caco-2 a již zmíněná HT-29 (Simon-Assmann *et al.*, 2007).

Lidská buněčná linie adenokarcinomu HT-29 je považována za pluripotentní střevní buněčnou linii. Bylo prokázáno, že tyto buňky vykazují vysokou míru spotřeby glukózy, a proto vyžadují vysokou koncentraci glukózy v médiu. Za standardních růstových podmínek, tj. v přítomnosti 25 mmol·l⁻¹ glukózy a 10% fetálního bovinního séra, vykazují buňky HT-29 nediferencovaný fenotyp (Augeron *et Laboisse*, 1984). Rostou jako vícevrstvé, nepolarizované a nediferencované buňky, které neexprimují žádné diferenciacní markery funkčních epiteliálních buněk, pouze malé množství hydroláz. Nicméně, buňky HT-29 jsou schopny exprimovat různé markery diferenciace pod vlivem změn kultivačního média nebo induktorů diferenciace (Simon-Assmann *et al.*, 2007; Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). Pokud nahradíme v kultivačním médiu glukózu za galaktózu, dochází k indukci reverzibilní diferenciace v enterocyty. Pokud jsou buňky pěstovány za vhodných kultivačních podmínek nebo po ošetření různými induktory, jako například butyrát sodný, mohou být modulovány tak, aby exprimovaly různé cesty diferenciace enterocytů (Martínez-Maqueda *et al.*, 2015).

Polarizovaný fenotyp je charakterizován morfologickými, fyziologickými a biochemickými markery. Diferenciace je spojena s růstem a buňky tvoří monovrstvu s těsnými spoji a typickými mikroklky tvořícími kartáčový lem. Mikroklky těchto diferencovaných buněk obsahují bílkoviny (např. villin), které jsou běžně přítomné ve střevních mikroklcích. Kromě toho tyto diferencované buňky exprimují hydrolázy asociované s kartáčovým lemem, který je typický pro tenké střevo. Aktivity enzymů jsou však mnohem nižší než u aktivity normálního střeva a neexprimují laktázu. Maximální enzymové aktivity (např. sacharóza-izomaltáza, aminopeptidáza N a alkalická fosfatáza) je dosaženo po 30 dnech kultivace (Martínez-Maqueda *et al.*, 2015).

Butyrát sodný je mastná kyselina s krátkým řetězcem, produkována bakteriální fermentací sacharidů v tlustém střevě. Jedná se o hlavní energetický substrát pro buňky

epitelu tlustého střeva a má schopnost inhibovat buněčnou proliferaci a stimulovat buněčnou diferenciaci těchto buněk. Mechanismus působení butyrátu je založen na změně struktury chromatinu, zvýšením acetylace histonu. Butyrát sodný totiž funguje jako silný inhibitor histon-deacetyláz, které vedou k hyperacetylaci histonů (Siavoshian *et al.*, 2000).

Lidská epitelální buněčná linie Caco-2 byla široce používána jako model střevní epitelální bariéry pro *in vitro* toxikologické studie a zkoumání funkce a regulace střevních buněk. Buněčná linie Caco-2 má totiž schopnost se diferencovat spontánně, bez použití diferenciacních faktorů na monovrstvu buněk s mnoha vlastnostmi typickými pro absorpční enterocyty v kartáčovém lemu, který se nachází v tenkém střevě. Spontánní diferenciac se dosahuje postkonfluenční kultivací. Buněčná linie Caco-2 je heterogenní a obsahuje buňky s mírně odlišnými vlastnostmi. Lze tedy očekávat, že kultivační podmínky budou vybírány pro růst různých subpopulací buněk, což povede k buněčnému modelovému systému s vlastnostmi, který se může lišit od původní buněčné linie (Tremblay *et al.*, 2006; Natoli *et al.*, 2012; Lea, 2015).

3.2 Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs)

3.2.1 Základní charakteristika

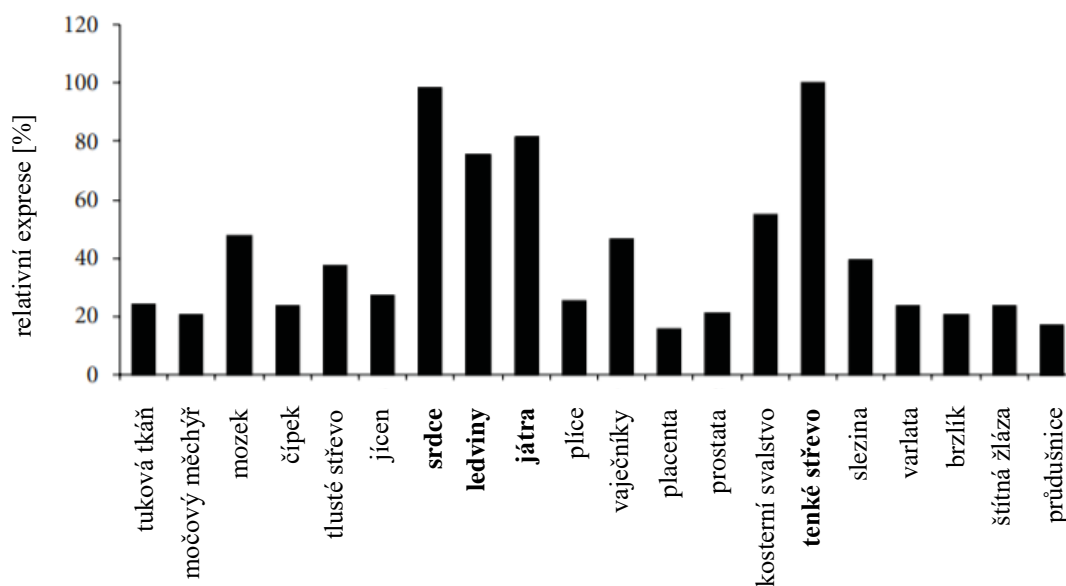
Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) jsou ligandem-aktivované transkripční faktory, které po aktivaci stimulují genovou expresi, vazbou do promotorové oblasti cílových genů. Řadí se do superrodiny jaderných receptorů (NR) a jsou známy tři podtypy tohoto receptoru – PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) a PPAR γ (NR1C3) (Escher *et Wahli*, 2000; Pyper *et al.*, 2010). Všichni tři členové fungují jako senzory pro mastné kyseliny a jejich deriváty, čímž kontrolují důležité metabolické cesty podílející se na metabolismu lipidů a energetické homeostázy (Pyper *et al.*, 2010). Kromě toho se podílí na regulaci zánětu a imunitní odpovědi, stejně jako metabolismu xenobiotik (Čížková *et al.*, 2015).

Všechny tři receptory jsou kódovány různými geny a leží na různých chromozómech. PPAR α je lokalizován na 22 chromozómu v oblasti 22q12-q13.1. Receptor PPAR β/δ se nachází na chromozómu 6 v pozici 6p21.1-p21.2 a receptor PPAR γ je umístěn na chromozómu 3 v pozici 3p25 (Desvergne *et Wahli*, 1999).

Tyto tři izoformy PPARs se navzájem liší z hlediska tkáňové distribuce, specifických ligandů a fyziologických rolí. Každý z nich tak aktivuje nebo potlačuje různé geny (Grygiel-Górniak, 2014). Exprese PPAR α se vyskytuje ve všech tkáních. Nejvíce je však exprimován v buňkách, které mají aktivní schopnost oxidace mastných kyselin, jako jsou jaterní hepatocyty, kardiomyocyty srdečního svalu, buňky proximálního tubulu ledvin a nejvyšší exprese dosahují enterocyty tenkého střeva, viz Obrázek 4 (Burns *et Heuvel*, 2007).

PPAR β (také označován jako PPAR δ) je exprimován rovněž ve většině tkání a často více než PPAR α a PPAR γ . Neznámější úlohu hraje PPAR β v kosterním svalstvu, kde zprostředkovává genovou expresi a stimuluje oxidaci mastných kyselin. Kromě toho se účastní procesů, jako je buněčná diferenciaci a hojení ran (Rodriguez *et Kersten*, 2017).

PPAR γ je exprimovaný převážně v tukové tkáni, makrofázích imunitního systému a tlustém střevě. Existuje ve dvou odlišných proteinových formách PPAR γ 1 a PPAR γ 2, které vznikají rozdílným transkripčním počátkem a alternativním sestřihem (Burns *et Heuvel*, 2007; Rakhshandehroo *et al.*, 2010).



Obrázek 4: **Expresse PPAR α na úrovni mRNA v různých typech lidských tkání.**

Relativní exprese je vztažena k expresi v tenkém střevě (100 %)

(převzato z Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

3.2.2 Struktura

Geny pro PPARs jsou translatované ze šesti kódujících exonů a struktura PPARs se skládá ze čtyř funkčních domén – A/B oblast, DNA-vazebná doména (C), pantová oblast (D) a ligand vazebná doména (E/F), viz Obrázek 5 (Desvergne *et Wahli*, 1999).

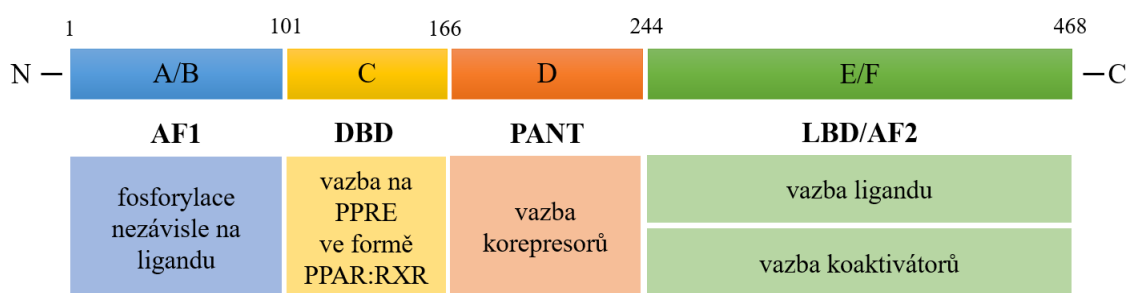
N-koncová A/B doména je mezi izotypy PPARs málo konzervativní a obsahuje oblast aktivační funkce-1 (AF-1), která je zodpovědná za aktivaci receptoru, nezávisle na ligandu (Escher *et Wahli*, 1999; Pyper *et al.*, 2010). Tato oblast může být fosforylována pomocí mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK), což má za následek změnu v transkripční aktivitě. U PPAR α dochází vlivem fosforylace ke zvýšení transkripční aktivity, zatímco fosforylace PPAR γ stejnou kinázou způsobí negativní regulaci transkripční funkce (Aranda *et Pascual*, 2001; Rakhshandehroo *et al.*, 2010).

Po doméně A/B následuje velmi konzervativní DNA vazebná doména (DBD), která je schopna rozpoznat specifickou cílovou sekvenci a umožňuje PPARs fyzicky interagovat s DNA v oblasti tzv. PPAR response element (PPRE) ve formě heterodimeru s RXR – PPAR:RXR (Aranda *et Pascual*, 2001; Rakhshandehroo *et al.*, 2010). Interakci zajišťují dva konzervativní motivy zinkového prstu, obsaženého v DBD, které

rozpoznávají oblast PPRE, složenou ze sekvence dvou hexanukleotidů (AGGTCA) oddělené jedním nukleotidem (Desvergne *et Wahli*, 1999; Kota *et al.*, 2005; Pyper *et al.*, 2010).

Vedle DNA-vazebné domény je flexibilní pantová doména (D), která spojuje DNA-vazebnou doménu a ligand-vazebnou doménu (E). Tato pantová oblast váže korepresorové proteiny (Pyper *et al.*, 2010).

Ligand vazebná doména (LBD) obsahuje místo pro navázání ligandu, které je zásadní pro heterodimerizaci s RXR (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). LBD je tvořena 13 α -helixy a 4 β -listy, které vytváří hydrofóbní kapsu pro vazbu ligandu (Aranda *et Pascual*, 2001). Součástí LBD je i oblast aktivační funkce-2 (AF-2), která je na ligandu závislá. Po navázání ligandu prochází oblast AF-2 konformační změnou, která umožňuje tvorbu vodíkových vazeb. Tato konformační změna v proteinu umožňuje interakci receptoru s koaktivátory (Pyper *et al.*, 2010).



Obrázek 5: Schématické zobrazení struktury PPAR α

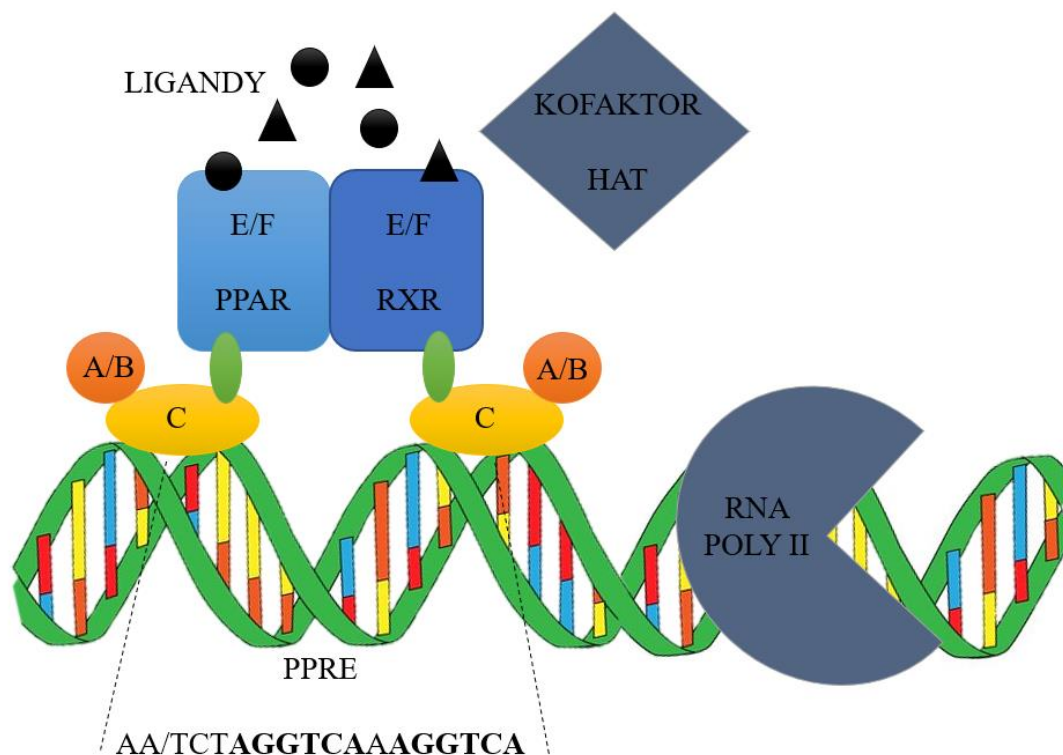
(upraveno podle Aranda *et Pascual*, 2001; Pyper *et al.*, 2010).

3.2.3 Mechanismus účinku

Všechny PPARs sdílejí stejný molekulární mechanismus působení, prostřednictvím tvorby heterodimerů s jaderným receptorem RXR, se kterým zprostředkovávají expresi cílových genů (Rakhshandehroo *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2012).

Ačkoliv jsou PPARs lokalizovány převážně v jádře, v nepřítomnosti ligandu PPAR α a PPAR γ dynamicky přecházejí mezi jádrem a cytoplazmou. Po navázání ligandu jsou tyto receptory indukovány k translokaci do jádra (Umemoto *et Fujiki*, 2012) a procházejí konformační změnou. Ta způsobuje uvolnění korepresoru histon deacetylázy (HDAC) a umožňuje PPAR heterodimerizovat s retinoidním X receptorem (RXR). Heterodimer PPAR:RXR se váže na DNA v oblasti PPRE umístěné v promotoru cílových genů. Na aktivovaný heterodimer se připojí RNA polymeráza II a koaktivátory s histon

acetyl-transferázou (HAT) aktivitou, které modifikují strukturu chromatinu uvolněním histonu H1, a zvyšují transkripci cílových genů, viz Obrázek 6 (Escher *et Wahli*, 1999; Peters *et al.*, 2012; Čížková *et al.*, 2016).



Obrázek 6: **Mechanismus transaktivace jaderného receptoru PPAR**

(upraveno podle Escher *et Wahli*, 1999).

PPARs mohou rovněž vést ke snížení regulace genové exprese, ke které dochází interferováním s jinými proteiny a transkripčními faktory prostřednictvím mechanismu trans-represe. Příkladem může být vazba podjednotky p65 transkripčního faktoru NFκB na PPAR. Transkripční aktivita PPARs může být ovlivněna přechody mezi fosforylací a defosforylací domény A/B (Monsalve *et al.*, 2013; Čížková *et al.*, 2016).

Podobně jako u jiných jaderných receptorů, i PPARs jsou fosfoproteiny a jejich transkripční aktivita je ovlivněna kinázami a fosfatázami. Fosforylace mitogenem aktivovanými proteinkinázami (MAPK), proteinovou kinázou A (PKA) a C (PKC), AMP kinázou (AMPK) a glykogen syntázou kinázou-3 (GSK3) ovlivňuje oblast AF-1 (ligand-nezávislá) a AF-2 (ligand-závislá), které jsou zodpovědné za aktivaci receptoru. Účinky fosforylace závisí na buněčném kontextu, subtypu receptoru a metabolizovaném zbytku (Burns *et Heuvel*, 2007).

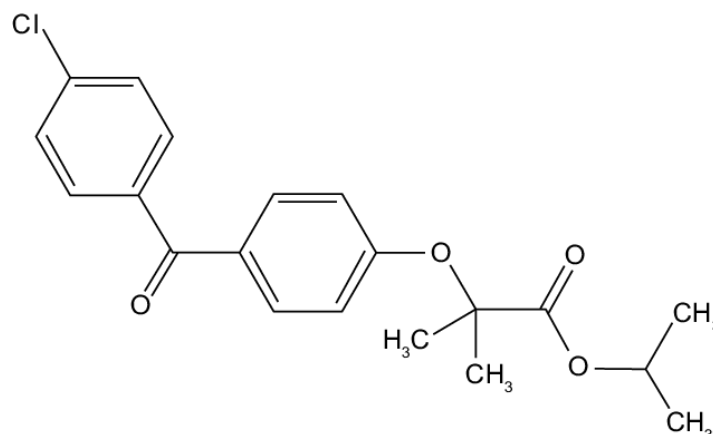
3.2.4 Ligandy PPAR α

Ligandy PPAR α můžeme rozdělit do dvou kategorií – přírodní biologické molekuly (endogenní) a syntetická xenobiotika (exogenní) (Pyper *et al.*, 2010).

Endogenní nebo přirozeně se vyskytující biologické molekuly, které slouží jako ligandy PPAR α , zahrnují mastné kyseliny a jejich deriváty z metabolických drah (Pyper *et al.*, 2010). Z toho důvodu se PPARs nazývají lipidovými senzory (Grygiel-Górniak, 2014). Mezi endogenní molekuly řadíme eikosanoidy, jenž jsou třídou mastných kyselin odvozených hlavně od kyseliny arachidonové. Cestou lipoxygenázy vedoucí k tvorbě leukotrienů (LT) a hydroxyeikosatetraenových kyselin (HETE) nebo cestou cyklooxygenázy produkující prostaglandiny (PG). Některé z těchto eikosanoidů jsou aktivátory různých izoform PPARs (Desvergne *et Wahli*, 1999).

Přírodními agonisty PPAR α jsou esenciální mastné kyseliny (EFA), které způsobí transkripci genů podílejících se na homeostázi glukózy a lipidů. Omega-3 EFA zahrnují kyselinu dokosahexaenovou a kyselinu eikosapentaenovou, které se používají při prevenci a léčbě kardiovaskulárních a metabolických onemocnění. Eikosanoidy i EFA jsou však vyžadovány v relativně vysokých koncentracích (přibližně 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro aktivaci PPAR α (Grygiel-Górniak, 2014).

Mezi syntetické ligandy řadíme fibráty – fenofibrát (Obrázek 7), klofibrát, gemfibrozil, bezafibrát a další. Tato hypolipidemická léčiva se používají v klinické praxi při léčbě dyslipidemie. Působením fibrátů dochází ke snížení exprese genu apolipoproteinu C-III a snížení plazmatické hladiny triglyceridů. Na druhou stranu dochází ke zvýšení hladiny lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) cholesterolu a zvýšením exprese genů apolipoprotein A-I a A-II. Také zvyšují citlivost na inzulín a snižují hladiny glukózy v plazmě. Mezi syntetické ligandy rovněž řadíme určité herbicidy, pesticidy a další kontaminanty z prostředí (Lee *et al.*, 2003; Pyper *et al.*, 2010; Grygiel-Górniak, 2014; Mirza *et al.*, 2019).



Obrázek 7: Chemická struktura fenofibrátu (převzato z Mohsin *et al.*, 2016).

3.2.5 Funkce PPAR α

Jak již bylo zmíněno, PPAR α je exprimován hlavně ve tkáních, ve kterých dochází k oxidaci mastných kyselin. K β -oxidaci dochází převážně u dvou subcelulárních organel – mitochondrie a peroxizómy. Při aktivaci, receptor primárně řídí expresi genů podílejících se na metabolismu lipidů. PPAR α tak působí jako lipidový senzor a hraje důležitou roli v regulaci metabolismu živin a energetické homeostázy. Kromě toho se podílí na regulaci zánětu a metabolismu xenobiotik (Grygiel-Górniak, 2014; Čížková *et al.*, 2016). Ukázalo se, že všechny tři izoformy PPARs se podílejí na energetickém metabolismu. PPAR α a PPAR β/δ fungují převážně jako katabolické regulátory energetického výdeje, zatímco PPAR γ reguluje anabolický metabolismus v tom, že hraje roli při skladování energie (Pyper *et al.*, 2010).

Aktivace PPAR α vede ke snížení hladiny lipidů a eliminaci triglyceridů (TG) z plazmy, což má za následek vysokou hladinu HDL cholesterolu. Rovněž je dobře prokázána jeho účast na glukózové homeostáze a rozvoji inzulínové rezistence. V játrech kontroluje PPAR α metabolismus lipidů, jako je absorpce, aktivace a oxidace mastných kyselin, lipolýza, ketogeneze a skladování TG. Aktivace receptoru exogenními ligandy, jako jsou fibráty a další peroxizomální proliferační látky, podporují expresi cytochromu P4504A (CYP4A), který katalyzuje omega-hydroxylaci mastných kyselin. Tyto mechanismy jsou prospěšné při redukci syntézy TG. Aktivace PPAR α dále vede k přeměně jaterního cholesterolu na HDL, čímž se snižuje jaterní hladina VLDL. Proto jeho aktivátory hrají významnou roli v léčbě dyslipidemie snížením hladin triglyceridů v plazmě a zvýšením HDL cholesterolu (Kota *et al.*, 2005; Mirza, 2019).

PPAR α hraje rovněž prospěšnou roli při snižování zánětu. Aktivace tohoto

receptoru ovlivňuje jak akutní, tak chronické zánětlivé poruchy zahrnující neutrofilů a makrofágů (Pyper *et al.*, 2010). Agonisté PPAR α vykazují protizánětlivé účinky v cévních buňkách. Tyto účinky zahrnují zvýšenou expresi endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). V endoteliálních buňkách agonisté PPAR α inhibují produkci zánětlivých cytokinů (např. TNF- α , IL-6, ...) a snižují expresi cyklooxygenázy-2 v cévních buňkách hladkého svalstva pomocí NF- κ B signální represe. PPAR α také indukuje apoptózu a down-regulaci expresi tkáňového faktoru a metaloproteinázy (MMP) v makrofázích aktivovaných cytokiny (Kota *et al.*, 2005; Monsalve *et al.*, 2013).

3.2.6 Vliv PPAR α na proliferaci buněk

V poslední době byly fibráty považovány za potencionální protinádorová léčiva s relativně nízkou toxicitou. Navzdory této skutečnosti je úloha PPAR α v karcinogenezi kontroverzní. Existuje mnoho studií, které popisují jejich potenciál pro léčbu rakoviny a chemoprevenci (Urbanska *et al.*, 2008; Panigrahy *et al.*, 2008). Na druhou stranu byla popsána zvýšená proliferace v buněčných liniích lidského karcinomu prsu po léčbě ligandy PPAR α , konkrétně WY-14643 a klofibráty (Suchanek *et al.*, 2002). U hlodavců bylo například prokázáno, že dlouhodobé podávání agonistů PPAR α způsobuje hepatokarcinogenezi. Tento efekt však u lidí prokázán nebyl (Mandard *et al.*, 2004; Peter *et al.*, 2012). Přesná úloha PPAR α a jeho ligandů u rakoviny zůstává tedy nejasná.

Současný zájem o cílení PPAR α pro prevenci určitých rakovin, včetně tlustého střeva a leukémie, je založen na studiích, které ukazují, že agonisté PPAR α inhibují proliferaci endotelových buněk a zvyšují syntézu agonistů PPAR γ . Zda PPARs fungují jako nádorové supresory nebo jako onkogeny u rakoviny je stále neznámé. Složitost drah, které jsou regulovány PPARs, a sklon těchto cest ke změně v rakovinu, nabízí některé vysvětlení pro rozdílné funkce PPARs v různých typech nádorů. Vzhledem k tomu, že cílení PPARs může zlepšit klinické důsledky metabolických poruch, o nichž je známo, že jsou spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny (např. diabetes mellitus, obezita, dyslipidemie a chronický zánět), je modulace aktivit PPARs atraktivním přístupem pro prevenci a léčbu rakoviny (Peter *et al.*, 2012).

Při studii (Čížková *et al.*, 2016), ve které byly zkoumány různé ligandy PPAR α (fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil) na různých buněčných liniích (HEK293, HepG2 a HT-29) byla prokázána koncentrační závislost agonistů PPAR α na proliferaci buněk. Při nižších koncentracích byla pozorována oproti kontrolním buňkám zvýšená proliferace ve všech testovaných buněčných liniích, s výjimkou buněčné linie HEK293 ovlivněné

fenofibrátem. Při vyšší koncentraci bylo zřejmé potlačení buněčné proliferace. Podle studie se zdá, že PPAR α není čistý onkogen nebo supresor nádoru. Přes mnoho popsáných protinádorových účinků fibrátů, bylo na základě výzkumu navrženo, že vliv fibrátů u testovaných linií karcinomu nemá žádný protinádorový účinek. Zvýšená proliferace buněk byla navíc doprovázena indukcí proteinu CYP2J2, který by mohl tento jev vysvětlit.

Enzymy cytochromu P450 (CYP) nazývané CYP epoxygenázy jsou regulovány právě PPAR α . Tyto enzymy, zejména CYP2C a CYP2J, přeměňují kyselinu arachidonovou na kyseliny epoxieikosatrienové (EETs), které jsou pak sEH hydrolyzovány na odpovídající dioly. EETs mají obecně cytoprotektivní účinky a stimulují buněčnou proliferaci prostřednictvím signálních drah PI3K a MAPK (Čížková *et al.*, 2016). V navazující studii (Čížková, 2018) byla zkoumána exprese právě CYP2C8, CYP2J2 a sEH v lidských buněčných liniích v závislosti na koncentraci fibrátů. Získané výsledky ukázaly, že po expozici fibrátů jsou změny poměru CYP2J2 / sEH úzce spojeny s buněčnou proliferací a mohly by vysvětlovat různé proliferační reakce buněk na různé koncentrace fibrátů. Nižší koncentrace fibrátů zvyšovaly buněčnou proliferaci a zároveň zvyšovaly expresi CYP2J2, zatímco vyšší koncentrace fibrátů vedly ke zvýšení exprese sEH ve všech třech testovaných buněčných liniích (Čížková, 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál a kultivační podmínky

Při práci byla použita lidská buněčná linie HT-29 odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva (ECACC 91072201). Buněčná linie byla autentizována pomocí STR lokusů na Ústavu klinické genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc.

Buněčná kultura byla pěstována v kultivačním médium – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), které obsahovalo 10% fetální bovinní sérum, penicilin ($100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$), streptomycin ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), 1% pyruvát sodný a 1% glutamax. Kultivační podmínky v inkubátory byly nastaveny na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 5% CO_2 v atmosféře. Buňky byly pasážovány 2x týdně standartním postupem.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Sigma Aldrich, kat.č. D6171)
- trypsin (Gibco®; ThermoFisher Scientific, kat.č. 25200-056)
- butyrát sodný (Sigma Aldrich, kat.č. B5887)
- fenofibrát (Cayman, kat.č. 10005368)
- Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, kat.č. 11 644 807 001)
- primární králičí polyklonální protilátka villin (GeneTex, kat.č. GTX110034)
- primární králičí polyklonální protilátka IAP (GeneTex, kat.č. GTX112100)
- primární králičí polyklonální protilátka PPAR α (GeneTex, kat.č. GTX28934)
- propidium jodid (Sigma Aldrich, kat.č. P4170)
- RNáza A (Sigma Aldrich, kat.č. R6513)

Použité soupravy:

- Pierce Colorimetric In-Cell ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. 62200)
- detekční systém Dako RealTM EnVisionTM, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Dako, kat.č. K5007)

Použité roztoky a jejich příprava:

- 10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na_2HPO_4 a 2 g KH_2PO_4 ; následně doplnit na objem 1 l dH_2O
- 30% H_2O_2

- 10% dimethylsulfoxid (DMSO): 100 µl DMSO, 900 µl sterilní dH₂O
- 1X Tris Buffered Saline (TBS): 2,5 ml 20X TBS; 47,5 ml dH₂O
- 4% formaldehyd: 36-40% formaldehyd ředit do 1X TBS
- 1X permeabilizační pufr: 0,11 ml Thermo Scientific™ Surfact-Amps™ X-100 Detergent; 11 ml 1X TBS
- Quenching roztok: 0,38 ml 30% H₂O₂; 11 ml 1X TBS
- oplachovací pufr: 7,5 ml 20X TBS; 141 ml dH₂O; 1,5 ml Surfact-Amps 20 Detergent
- diluent pro protilátky: 3 ml blokovacího pufru; 3 ml 1X oplachovacího pufru (1:1)
- zředěný HRP konjugát: 30 µl HRP konjugát; 12 ml 1X oplachovací pufr
- citrátový pufr pro imunocytochemické barvení (pH 6,0-6,2):
roztok A: 10 mmol·l⁻¹ kyseliny citrónové (10,505 g kyseliny citrónové v 500 ml dH₂O); roztok B: 10 mmol·l⁻¹ citronan sodný (14,705 g v 500 ml dH₂O); smíchat 9 ml roztoku A a 41 ml roztoku B a doplnit na 500 ml dH₂O
- 0,5M TRIS pufr (pH 7,6): 61 g TRIS BASE + 1 l dH₂O; úprava pH pomocí koncentrované HCl
- 0,5M TRIS + Tween 20 (0,05%): 500 µl Tween na 1 l TRIS pufru
- citrátový pufr (10x) pro cytometrii: 5,68 g citrátu trisodného dihydrátu v 500 ml dH₂O
- zásobní roztok propidium iodid – 2 mg/ml v 10x citrátovém pufru; pracovní roztok – 2 ml zásobního roztoku smíchat s 2 ml TritonuX a 40 ml ddH₂O

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- flowbox – MCS-Advantage (Thermo Scientific)
- inkubátor s atmosférou CO₂ (HeraCell)
- vodní lázeň – TW8 (Julaba)
- inverzní mikroskop – Eclipse TS100 (Nikon)
- centrifuga – MR22i (Jouan)
- elisa reader – PowerWave XS (Bio-Tek)
- tkáňový mikroprocesor – HistosPro (Milestone)
- lednička (4 °C) a mrazák (Gorenje)
- světelný mikroskop – BX40 (Olympus)
- orbitální třepačka – 3005 (GFL)
- průtokový cytometr – BD FACSVerser (BIOSCIENCES)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Ovlivnění buněk fenofibrátem

Fenofibrát slouží jako ligand pro PPAR α a byl testován na buněčné linii HT-29 ve dvou různých koncentracích – 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Testování probíhalo na různém stupni diferenciovaných buněk – nediferencované, během diferenciaci a diferencované. K diferenciaci byl použit zásobní roztok 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ butyrátu sodného, který se ředil do 10% DMSO ve sterilní deionizované vodě. Zásobní roztok 40 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fenofibrátu (Cayman) byl vyředěn médiem DMEM na 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, který se dále ředil dle potřeby.

Buňky byly vysety na 96-jamkovou kultivační destičku o hustotě 10 000 buněk/jamka v 80 μl média a nechaly se adherovat přes noc v inkubátoru (standartní podmínky: 37 °C a 5% CO₂). Buňky byly vysety v triplicátech pro WST-1 test a v doubletech pro ICE.

Při ovlivnění nediferencovaných buněk byl na adherované buňky aplikován butyrát sodný, DMSO (kontrola) nebo roztok fenofibrátu, který byl ředěn do čistého DMEM média (Tabulka 1 pro WST-1 test nebo Tabulka 2 pro ICE). Z naředeného roztoku se do média s buňkami přidávalo 20 μl .

Tabulka 1: Rozpis koncentrací a použitých objemů na triplet pro WST-1 test.

koncentrace testované látky v jamce	koncentrace pracovního roztoku	objem (předředěného) zásobního roztoku [μl]	objem média [μl]
5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaBt	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	4,20	80
25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	125 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,01	80
150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	750 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	6,49	80
0,1% DMSO	0,5%	0,40	80

Legenda: NaBt = butyrát sodný; FF = fenofibrát; DMSO = dimethylsulfoxid

Tabulka 2: Rozpis koncentrací a použitých objemů na doublet pro ICE.

koncentrace testované látky v jamce	koncentrace pracovního roztoku	objem (předředěného) zásobního roztoku [μl]	objem média [μl]
5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaBt	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	3,10	60
25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	125 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,76	60
150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	750 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	4,88	60
0,1% DMSO	0,5%	0,30	60

Buňky byly inkubovány 72 hod za standardních podmínek, a poté byl proveden proliferační WST-1 test nebo fixace pro ICE.

Při ovlivnění buněk během diferenciacce byl na adheované buňky aplikován na 72 hod roztok fenofibrátu nebo DMSO, ve stejných objemech a koncentracích, jako u buněk nediferencovaných, s tím rozdílem, že se testované látky ředily do média s 25 mmol·l⁻¹ butyrátem sodným.

V případě ovlivnění diferencovaných buněk, nejprve došlo k ovlivnění adheovaných nediferencovaných buněk 5 mmol·l⁻¹ butyrátem sodným na 72 hod. Následně se diferencovaným buňkám odsálo médium s NaBt a přidalo se 80 µl čerstvého DMEM média. Buňky poté byly ovlivněny jako v případě nediferencovaných buněk.

4.4.2 Test proliferace – WST-1

Proliferační test s použitím Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) je založen na principu funkčních mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách, které štěpí tetrazoliové soli na rozpustný formazan. Kvantifikace se provádí spektrofotometrickým měřením při vlnové délce 450 nm.

K ovlivněným buňkám bylo do každé jamky přidáno 10 µl WST-1 reagentu a buňky byly inkubovány 30-60 min v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5% CO₂). Následně byla spektrofotometrem změřena absorbance.

Výsledné hodnoty v tripletech byly zprůměrovány, a od hodnot absorbance ovlivněných buněk a kontroly byla odečtena průměrná hodnota blanku. Následně byla vypočítána proliferační aktivita [%]:

$$\text{proliferační aktivita [\%]} = \frac{\text{hodnota absorbance ovlivněných buněk}}{\text{hodnota absorbance kontroly}} \times 100$$

Relativní hodnoty ze tří opakování byly zprůměrovány a vyneseny do sloupcového grafu společně se stanovenou směrodatnou odchylkou (SD). Výsledky proliferačního testu byly hodnoceny jednovýběrovým t-testem, vztaženým na střední hodnotu, která představovala 100 % (kontrola). Statisticky signifikantní výsledky (P < 0,05) jsou označeny hvězdičkou (*). Všechny výpočty byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel 2016.

4.4.3 In-Cell ELISA (ICE)

Metoda In-Cell Elisa (ICE) slouží k detekci proteinů – villin a alkalická fosfatáza (IAP) – přímo v buňce. Protein je rozpoznán specifickou primární protilátkou, na kterou se váže sekundární protilátka enzymaticky značená křenovou peroxidázou (HRP). Jako substrát je použit 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Kvantifikace se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

Buňkám vyšetých v doubletech a ovlivněných fenofibrátem (viz 4.4.1.) bylo odsáto médium a byly opláchnuty PBS. Následovala fixace 4% formaldehydem (100 μ l/jamka), ředěným do 1X TBS, po dobu 15 min při pokojové teplotě (RT). Po odstranění formaldehydu byly buňky 2x opláchnuty 1X TBS (100 μ l/jamka). TBS se odstranilo, přidal se 1X permeabilizační pufr (100 μ l/jamka) a vzorky se inkubovaly 15 min při RT. Poté se permeabilizační pufr odstranil, buňky se 1x opláchly 1X TBS a přidal se Quenching roztok (100 μ l/jamka), obsahující 1% H₂O₂ v 1X TBS, a nechal se inkubovat 20 min při RT. Po odstranění Quenching roztoku následoval znovu 1x oplach 1X TBS, přidal se blokovací pufr (100 μ l/jamka) a inkubace 60 min při RT.

Primární králičí protilátky villinu a IAP (GeneTex) byly naředěny diluentem pro protilátky (villin – 1:1500 a IAP – 1:500). Diluent pro protilátky je roztok blokovacího a oplachovacího pufru 1:1. Blokovací pufr byl odstraněn a do příslušných jamek se přidaly primární protilátky (50 μ l/jamka), k negativním kontrolám pouze diluent pro protilátky. Destičky se zalepily a nechaly se inkubovat přes noc v ledničce při 4 °C.

Po proběhnutí inkubace se odstranila primární protilátka a buňky se 3x opláchly oplachovacím pufrem (100 μ l/jamka). Následně byl přidán zředěný HRP konjugát (100 μ l/jamka) v oplachovacím pufru, a vzorky se nechaly inkubovat 30 min při RT. Po odstranění HRP konjugátu následoval opět 3x oplach oplachovacím pufrem (200 μ l/jamka). Poté se přidal TMB substrát (100 μ l/jamka) a inkuboval se ve tmě 15 min při RT. Po uplynutí inkubace se přidal TMB Stop roztok (100 μ l/jamka) a změřila se absorbance při 450 nm (do 30 min od přidání roztoku).

Z kultivační destičky byly odstraněny roztoky a 2x opláchnuty dH₂O (200 μ l/jamka). Následně se přidal Janus Green Whole-Cell Stain (100 μ l/jamka) a inkuboval se 5 min při RT. Buňky poté byly 3-5x opláchnuty dH₂O, dokud se neodstranil nadbytek barviva. Nakonec byl přidán eluční pufr (100 μ l/jamka), který se inkuboval 10 min při RT a následně byla změřena absorbance při 615 nm.

Výsledné hodnoty absorbancí při 450 nm (A450) byly zprůměrovány pro negativní kontrolu a hodnota odečtena od všech hodnot A450 jednotlivých jamek. Následně bylo provedeno znormalizování A450 s A615 (tj. pro každou jamku $A = A450/A615$). Normalizované absorbance byly zprůměrovány pro jednotlivé doublety a byla určena exprese markeru diferenciaci (fold change) [%]:

$$\text{exprese markeru diferenciaci} [\%] = \frac{A_{\text{ovlivněných buněk}}}{A_{\text{kontroly}}} \times 100$$

Relativní hodnoty ze tří opakování byly zprůměrovány a vyneseny do sloupcového grafu společně se stanovenou směrodatnou odchylkou. Výsledky exprese markeru diferenciaci byly hodnoceny jednovýběrovým t-testem, vztaženým na střední hodnotu, která představovala 100 % (kontrola). Statisticky signifikantní výsledky ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*). Všechny výpočty byly provedeny pomocí programu Microsoft Excel 2016.

4.4.4 Analýza buněčného cyklu – průtokové cytometrie

Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky vysety na 6cm kultivační misky v hustotě 2×10^5 buněk / miska v 2,7 ml kultivačního média. Po adhezi přes noc byly buňky ovlivněny $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaBt nebo kombinací $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaBt + $150 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ FF. Kontrolní buňky byly ovlivněny pouze 0,1% DMSO. Do každé misky bylo přidáno 300 μl příslušného pracovního roztoku podle Tabulky 3.

Tabulka 3: **Rozpis koncentrací a použitých objemů pro analýzu buněčného cyklu.**

koncentrace testované látky v jamce	koncentrace pracovního roztoku	objem (předředěného) zásobního roztoku [μl]	objem média [μl]
5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaBt	50 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	33,33	300
150 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ FF	1500 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	11,72	300
0,1% DMSO	1%	3,00	300

Kultivace s testovanou látkou probíhala 24 hod. Poté byly buňky ztrypsinizovány, opláchnuty PBS a centrifugovány při 1200 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a následovala fixace ledově vyhlazeným 70% etanolem na třepačce na ledu po dobu 30 min. Do dalšího zpracování byly vzorky uchovávány při -20°C .

Vzorky se dále stáčely při 2500 rpm 5 min, po odstranění supernatantu byly promyty citrátovým pufrem, opět stočeny při 2500 rpm 5 min a supernatant odstraněn.

K buněčným peletám se přidalo 600 μl propidium jodidu (100 $\mu\text{g/ml}$) a vzorky se inkubovaly 15 min při 37°C. Po uplynutí doby inkubace se ke vzorkům přidalo 400 μl RNasy A (0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a vzorky se opět inkubovaly 15 min při 37°C. Následně se vzorky nechaly 30 min na ledu a následovalo měření na průtokovém cytometru BD FACSVersé (BD, USA).

4.4.5 Imunocytochemické barvení (ICC)

Metoda imunocytochemického barvení (ICC) slouží k identifikaci antigenu v buňkách pomocí specifické vazby antigenu a protilátky. Buňky jsou fixovány na podložní sklo vychlazeným roztokem metanol:aceton (1:1). Přítomnost a subcelulární distribuce receptoru PPAR α byla detekována pomocí sekundární protilátky značené křenuvou peroxidázou (HRP) s chromogenním substrátem 3,3'-diaminobenzidin (DAB) a pozorována ve světelném mikroskopu (Olympus).

Testování opět probíhalo na různém stupni diferenciovaných buněk. Buňky byly vysety do 6-jamkového panelu v hustotě 3 x 10⁵ buněk / jamka ve 2 ml kultivačního média. Po adhezi přes noc byly buňky ovlivněny DMSO (kontrola) nebo roztokem fenofibrátu o dvou různých koncentracích – 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Buňky byly ovlivněny stejným způsobem jako v kapitole 4.4.1. Ovlivnění buněk fenofibrátem, s rozdílem odlišných použitých objemů roztoků (Tabulka 4).

Tabulka 4: **Rozpis koncentrací a použitých objemů na ICC.**

koncentrace testované látky v jamce	koncentrace pracovního roztoku	objem (předředěného) zásobního roztoku [μl]	objem média [μl]
25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	125 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,56	500
150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FF	750 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	9,55	500
0,1% DMSO	0,5%	2,50	500

Buňky byly inkubovány 72 hod za standardních podmínek, a poté byla provedena fixace na podložní sklo.

Po 72 hod inkubace bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS a byla provedena trypsinizace. Suspenze buněk byla přenesena do plastové mikrozkuhavky a stočena na stolní centrifuze po dobu 5 min při 1200 rpm. Opatrně byl odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v 50 μl DMEM média. Na podložní sklo, popsané tužkou, byly naneseny odděleně 2 kapky buněčné suspenze (1 kapka o objemu

cca 2,5 μ l). Kapky byly jemně rozetřeny pipetou a nechaly se zaschnout na vzduchu. Buňky byly následně fixovány 10 min v ledově vychlazeném roztoku metanol:acetonu (1:1). Po vyjmutí z fixace opět zaschnuly na vzduchu a byly uchovávány při -20 °C v mrazáku. Před vlastní imunocytochemickou detekcí byly fixované buňky rehydratovány pomocí vody, po dobu 5 min, z důvodu že inkubace s protilátkou a dobarvení jader probíhá ve vodním prostředí. Následně byly blokovány endogenní peroxidázy pomocí 0,3% H_2O_2 po dobu 15 min, aby se zabránilo negativní pozitivitě, a poté byl proveden oplach pod tekoucí vodou.

Revitalizace antigenu teplem byla provedena pomocí citrátového pufru pH6 v tkáňovém mikroprocesoru HistosPro (Milestone) po dobu 15 min. Po zchladnutí vzorků byl proveden oplach vodou 5 min. Následně oplach TRIS puftrem po dobu 5 min a poté oplach TRIS puftrem s Tween 20 rovněž 5 min. Na podložním skle byly obkresleny parafínovou tužkou buňky a bylo nanášeno Protein Block Serum Free (DAKO), které se se vzorky inkubovalo ve vlhčící komoře 10 min. Následně byla naředěna primární protilátka v diluentu pro protilátky (PPAR α 1:100). Skla se nechala okapat do buničiny (bez oplachu) a inkubovala se s primární protilátkou po dobu 60 min. Následoval oplach TRIS puftrem 2 x 5 min a poté oplach TRIS puftrem s Tween 20 po dobu 5 min. Na vzorky byla nanášena sekundární protilátka (DAKO, EnVision-HRP) po dobu 30 min. Následoval opět oplach TRIS puftrem 2 x 5 min a poté oplach TRIS puftrem s Tween 20 po dobu 5 min. Vizualizace byla provedena smícháním 1 ml Real substrate buffer (DAKO) a 1 kapky Real DAB⁺ chromogen (DAKO). Doba inkubace byla 5 min. Poté byly vzorky promyty pod tekoucí vodou cca 5 min a dobarveny jádra hematoxylinem po dobu 1-10 min (záleží na stáří hematoxylinu). Ještě jednou byly buňky promyty pod tekoucí vodou 5 min. Nakonec bylo provedeno odvodnění alkoholem a acetonem (96% alkohol: 5 min; aceton: 3 min), projasnění xylenem (xylen 3: 5 min; xylen 4: 5 min) a montování pomocí montovacího média Pertex.

Pro hodnocení přesunu receptoru PPAR α do jádra byly pomocí světelného mikroskopu s kamerou pořízeny pro každý vzorek mikrofotografie z 10 zorných polí při zvětšení 200x. Hodnocení probíhalo pomocí programu ImageJ za využití pluginu IHC Profiler, který umožňuje dekonvoluci barev a tím usnadňuje rozhodování, zda jde o jadernou pozitivitu či nikoliv. V každém zorném poli byla jaderná pozitivita vyjádřena jako % buněk. Následně byla určena průměrná jaderná pozitivita [%] a směrodatná odchylka pro jednotlivé vzorky.

5 VÝSLEDKY

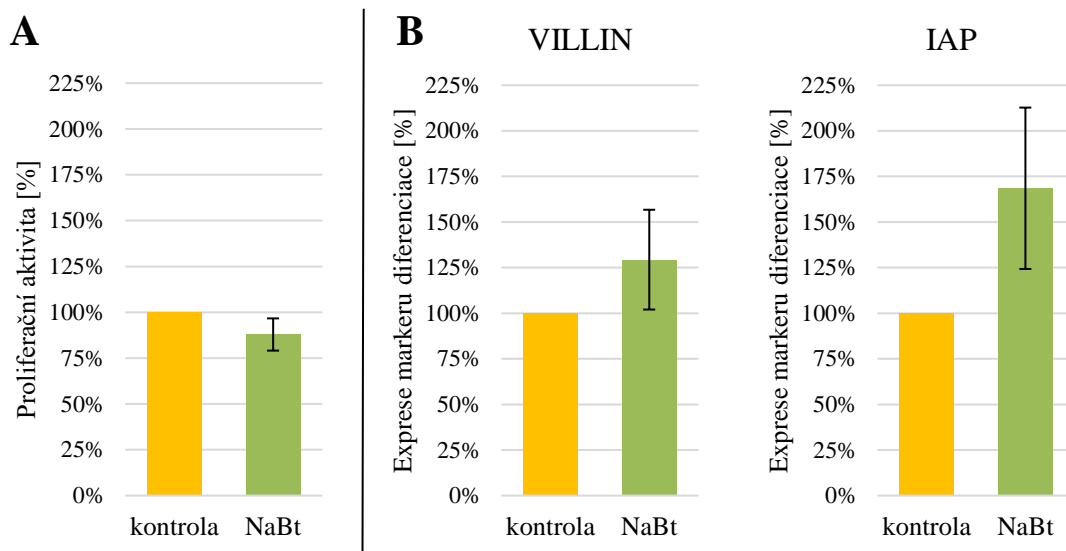
V experimentální části jsem sledoval vliv fibrátů na diferenciaci střevních buněk u nádorové buněčné linie HT-29, která je odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva. Konkrétně se jednalo o působení fenofibrátu ve dvou koncentracích - $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Látka byla testována na buňkách v různém stupni diferenciaci – buňky nediferencované, během diferenciaci/diferencující a buňky diferencované.

Výsledky proliferační aktivity byly stanoveny testem proliferace za použití WST-1 reagentu a pro potvrzení zvýšení/snížení proliferace byly porovnány s hodnotami exprese markeru diferenciaci, metodou In-cell Elisa. V našem případě byl markerem zvolen villin a intestinální alkalická fosfatáza (IAP). Pro analýzu buněčného cyklu, při interakci fenofibrátu a butyrátu sodného, se využila metoda průtokové cytometrie. Imunocytochemické barvení bylo použito na potvrzení přítomnosti a lokalizaci PPAR α . Na základě vyhodnocení lokalizace PPAR α v buňce byla stanovena jaderná pozitivita.

5.1 Test proliferace (WST-1) a ICE

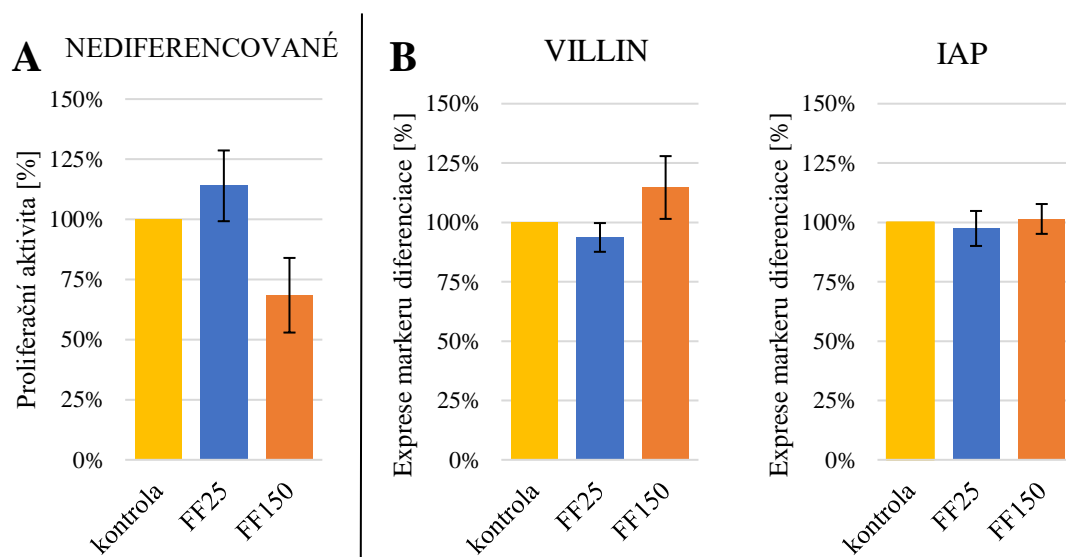
Buňky byly vysety v 96-jamkové kultivační destičce o hustotě 10 000 buněk/jamka s kultivačním médiem. Proliferační aktivita a exprese markeru diferenciaci byla postupně stanovena u buněk nediferencovaných, diferencujících a diferencovaných, které byly ovlivněny dvěma koncentracemi fenofibrátu (FF) – $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (25FF) a $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (150FF). Data u Obrázků 8-11 představují průměr ze 3 nezávislých opakování \pm SD, vztažených k relativní hodnotě kontroly 100 %.

V rámci experimentu byla stanovena i proliferační aktivita a exprese markeru pro samotný $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ butyrát sodným (NaBt), jakož to látku použitou pro diferenciaci buněk. U buněk ovlivněných pouze $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaBt po dobu 72 hod, došlo oproti kontrole k poklesu proliferační aktivity, jelikož vlivem NaBt dochází k diferenciaci buněk a tím ke ztrátě proliferační schopnosti (Obrázek 8A). To potvrdil i nesignifikantní nárůst exprese obou markerů diferenciaci – villinu ($P = 0,204$) a IAP ($P = 0,115$) (Obrázek 8B).



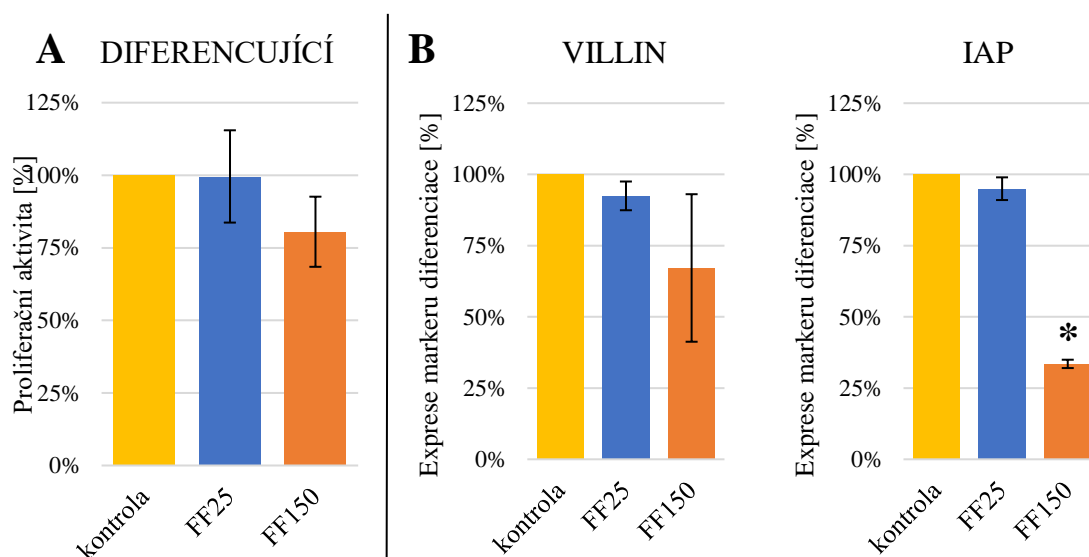
Obrázek 8: Vliv $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ butyrátu sodného (NaBt): A – proliferační aktivita; B – exprese villinu a IAP.

U nediferencovaných buněk koncentrace $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (FF25) působí zvýšení proliferace na 113,93 % proliferace kontrolních buněk. Zároveň s tím dochází i k mírnému (nesignifikantnímu) snížení markerů diferenciaci. V případě villinu na 93,67 % kontroly a u IAP na 97,46 % kontroly. Oproti tomu koncentrace $150 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (FF150) má inhibiční efekt, a dochází ke snížení proliferační schopnosti buněk na 68,44 % kontroly ($P = 0,072$). Dochází ke zvýšení exprese villinu na 114,70 %, u IAP je exprese 101,46 % kontroly (Obrázek 9).



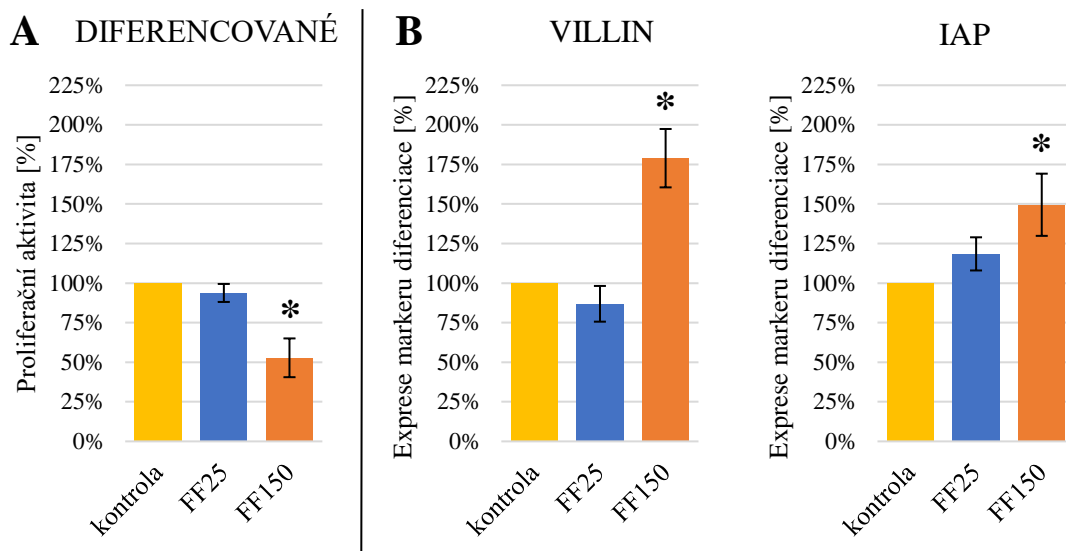
Obrázek 9: Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na nediferencované buňky: A – proliferační aktivita; B – exprese villinu a IAP.

Buňky během diferenciaci byly vystaveny současně $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaBt s FF25 nebo FF150 po dobu 72 hod. V případě koncentrace $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zůstala proliferační aktivita v porovnání s kontrolou téměř nezměněná, zatímco u koncentrace FF150 došlo k výraznějšímu poklesu proliferace (Obrázek 10A). Přestože došlo ke snížení proliferace, dochází i ke snížení exprese villinu a IAP (Obrázek 10B). V případě koncentrace $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u IAP došlo k signifikantní změně oproti kontrole ($P = 0,0002$).



Obrázek 10: Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na diferencující se buňky: A – proliferační aktivita; B – expese villin a IAP.

V případě diferencovaných buněk, byly nediferencované buňky nejprve na 72 hod ovlivněny $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaBt a následně, když byly buňky diferencované, tak byly na dalších 72 hod ovlivněny FF25 nebo FF150. U diferencovaných buněk se předpokládal pokles proliferační aktivity, jelikož diferencovaná buňka ztrácí proliferační schopnost. U obou koncentrací FF byl patrný pokles (Obrázek 11A). V případě koncentrace $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se jedná o signifikantní rozdíl oproti kontrole ($P = 0,022$). S výjimkou villinu u FF25, došlo jinak v ostatních případech k nárůstu expese (Obrázek 11B). U koncentrace $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou hodnoty expese u obou markerů signifikantní – villin ($P = 0,018$) a IAP ($P = 0,049$).



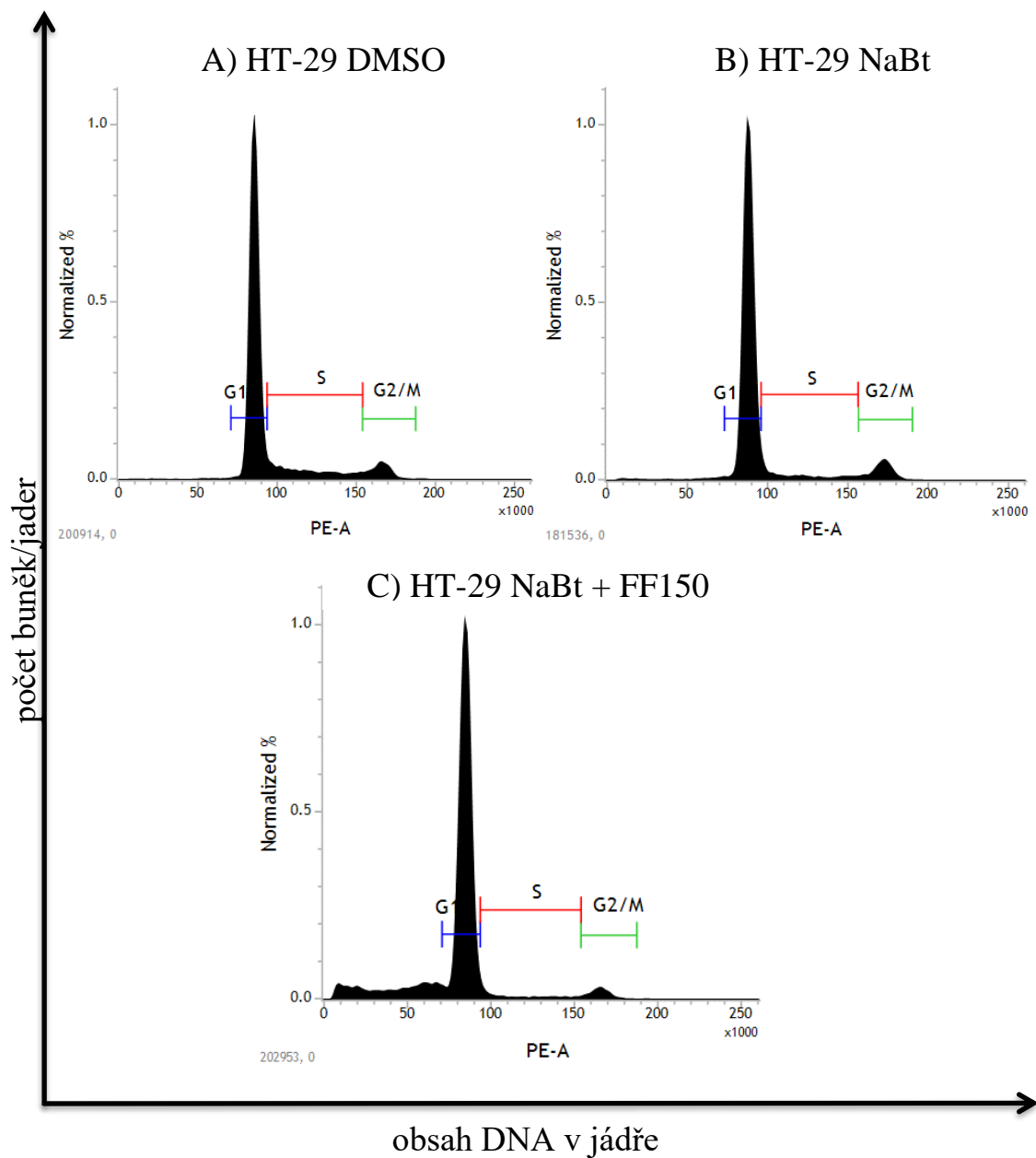
Obrázek 11: **Vliv různých koncentrací fenofibrátu (FF25 a FF150) na diferencované buňky:** A – proliferační aktivita; B – exprese villinu a IAP.

Z Obrázků 8, 9 a 11 je patrná koncentrační závislost fenofibrátů na proliferaci buněk. Při poklesu nebo naopak nárůstu proliferační aktivity, dochází k opačnému projevu v expresi obou markerů diferenciaci.

5.2 Analýza buněčného cyklus – průtoková cytometrie

Protože test proliferační aktivity a ICE u diferencujících buněk vedly k neočekávaným výsledkům, kdy spolu s proliferační aktivitou zároveň klesá i exprese villinu a IAP, byly metodou průtokové cytometrie stanoveny jednotlivé fáze buněčného cyklu (G1, S, G2/M) u kontrolních neovlivněných buněk (vystavených pouze DMSO), buněk ovlivněných NaBt a buněk ovlivněných kombinací NaBt a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fenofibrátem.

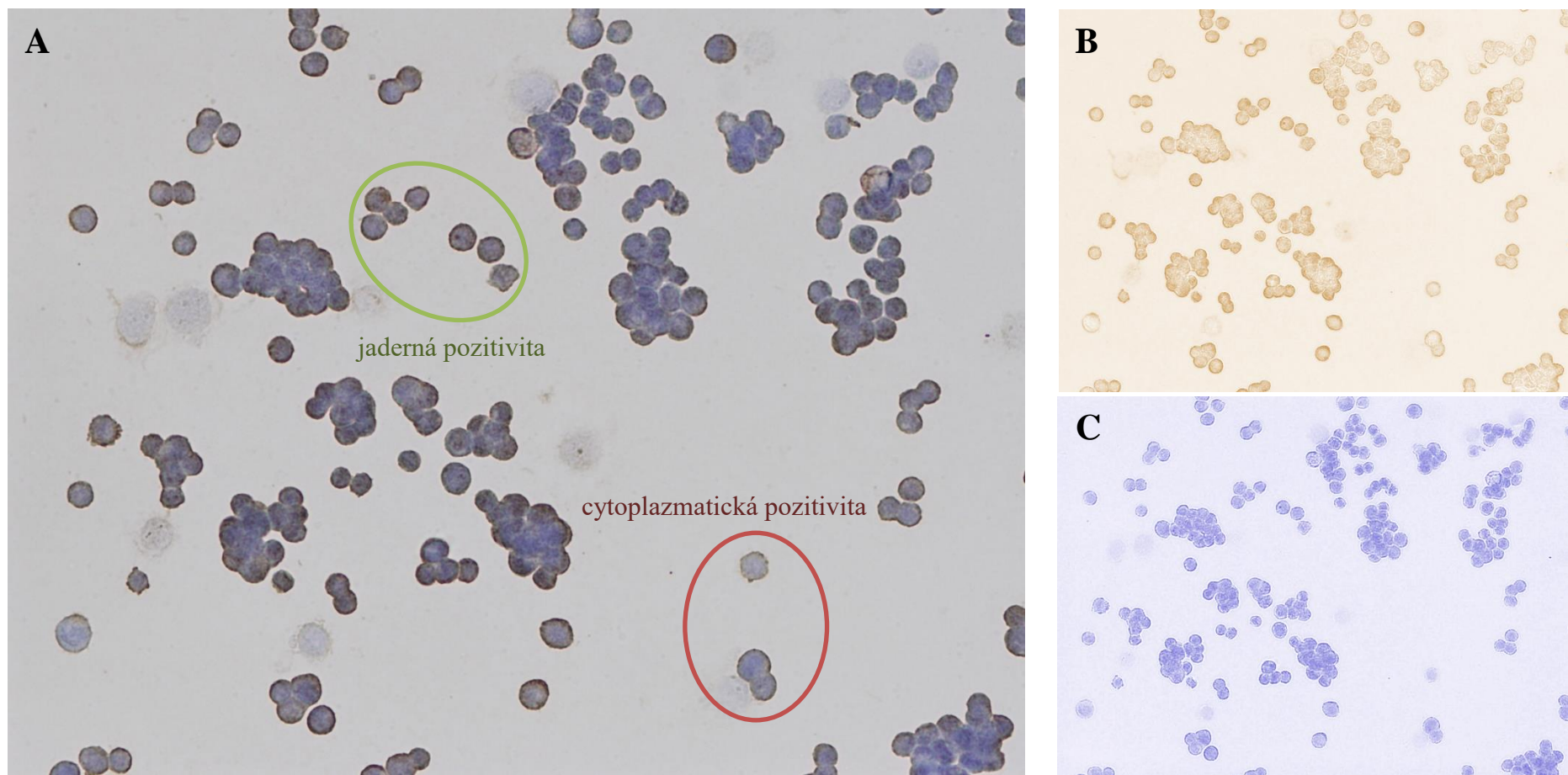
Výsledné histogramy z cytometrického měření pro první dvě skupiny, tedy buňky ovlivněné DMSO a NaBt, vykazují normální distribuci DNA mezi jednotlivé fáze buněčného cyklu. U buněk ovlivněných NaBt ubývá v porovnání s kontrolními buňkami buněk v S fázi buněčného cyklu (Obrázek 12A a 12B). U třetí skupiny, buňky ovlivněné kombinací NaBt a 150FF, došlo k jasné fragmentaci DNA, která je zaznamenána na třetím histogramu, jako balastní část před G1 fází. Došlo také k poklesu buněk v S a G2/M fázi (Obrázek 12C).



Obrázek 12: Množství DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu – A) HT-29 DMSO; B) HT-29 NaBt; C) HT-29 NaBt + 150FF.

5.3 Imunocytochemické barvení (ICC)

Metoda ICC byla vyhodnocena na základě skutečnosti, že aktivace PPAR α je spojena s přesunem z cytoplazmy do jádra buňky. Byla tak zkoumána přítomnost a subcelulární lokalizace PPAR α . Přítomnost receptoru byla zjištěna u všech pozorovaných buněk a detekována byla jak cytoplazmatická, tak jaderná lokalizace PPAR α (Obrázek 13).



Obrázek 13: **Reprezentativní mikrofotografie (zvětšeno 200x) exprese PPAR α v buňkách HT-29 a rozdělení barevných kanálů pomocí programu ImageJ.**

- A) originální fotografie s popiskem jaderné/cytoplazmatické positivity;
 B) IHC Profiler – DAB (detekce PPAR α); C) IHC Profiler – Hematoxylin (barvení jader)

Vzorky z ICC byly hodnoceny jako % pozitivních buněk v jádře v deseti zorných polích. Průměrné procento jaderné positivity bylo stanoveno pro kontrolní buňky a buňky ovlivněné fenofibrátem ve dvou různých koncentracích.

V testované buněčné linii HT-29 byl u nediferencovaných a diferencovaných buňkách, ovlivněných fenofibrátem, zjištěn zvýšený počet buněk s jadernou pozitivitou PPAR α ve srovnání s příslušnými kontrolními buňkami. Diferencující buňky měli naopak nižší jadernou pozitivitu v porovnání s kontrolou. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 5. Z Tabulky 5 je rovněž patrné, že při použití vyšší koncentrace fenofibrátu (FF150) se zvyšuje jaderná pozitivita. Toto bylo pozorováno u všech buněk s různým stupněm diferenciaci.

Tabulka 5: Jaderná pozitivita, po ovlivnění fenofibrátem, u buněk v různém stupni diferenciaci.

stupeň diferenciaci	koncentrace testované látky [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	jaderná pozitivita [%]	SD
nediferencované buňky	kontrola*	53,16	$\pm 4,25$
	25	60,58	$\pm 17,36$
	150	81,26	$\pm 7,62$
diferencující buňky	25	42,16	$\pm 26,46$
	150	49,56	$\pm 27,76$
diferencované buňky	kontrola*	65,58	$\pm 15,48$
	25	68,67	$\pm 20,38$
	150	72,09	$\pm 17,57$

*kontrola – 0,1% DMSO

6 DISKUSE

Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs) jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které se kromě regulace homeostázy glukózy a lipidů, podílejí na proliferaci a diferenciaci buněk (Peters *et al.*, 2012). Fibráty patří mezi exogenní sloučeniny, které slouží jako ligandy PPAR α a využívají se v klinické praxi při léčbě dyslipidemie (Pyper *et al.*, 2010). Tato práce demonstruje vliv fenofibrátu při dvou různých koncentracích na diferenciaci buněčné linie HT-29.

V předchozí studii (Čížková *et al.*, 2016) byla u buněčné linie HT-29 stanovena koncentrace fenofibrátu (13,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), která podporuje proliferaci buněk (maximální koncentrace viability). Tato koncentrace je podobná koncentracím dosahovaných v plazmě pacientů (13,8-83,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) po normálním terapeutickém podání tohoto léčiva. Druhá koncentrace (205,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) působí jako inhibitor proliferace (IC10), při které je viabilita buněk ve srovnání s kontrolními buňkami 90 %.

Na základě této studie byla pro experiment použita koncentrace 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ podporující proliferaci a koncentrace 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s inhibičním efektem. Tato koncentrační závislost byla prokázána v případě nediferencovaných buněk. Stejný trend koncentrační závislosti fenofibrátu na proliferační schopnost buněk, jako v případě HT-29, můžeme sledovat i u buněčné linie HepG2, odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Při testování jiných fibrátových ligandů (bezafibrát nebo gemfibrozil) je tento trend pozorován ještě navíc u buněčné linie HEK293, odvozené od lidských embryonálních ledvinových buněk. Ve všech třech případech buněčných linií se jedná o tkáň s vysokou expresí PPAR α , důvodem aktivní schopnosti oxidace mastných kyselin (Čížková *et al.*, 2016).

U nediferencovaných buněk, u nichž byla prokázána koncentrační závislost ligandu na proliferační aktivitu, docházelo při nízké koncentraci fenofibrátu (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) k proliferaci buněk a byl zaznamenán pokles markerů diferenciaci. V opačném případě, kdy docházelo k inhibici proliferační schopnosti buněk, vlivem vyšší koncentrace fenofibrátu (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), byl detekován nárůst u obou diferenciacních markerů.

Diferencované buňky ztrácí proliferační schopnost a získávají specifické funkce. Aplikace butyrátu sodného vedla ke snížení proliferace buněk HT-29 a zároveň došlo ke zvýšení exprese obou sledovaných markerů diferenciaci. U diferencovaných buněk ovlivněných nižší koncentrací fenofibrátu (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), v porovnání s kontrolními

diferencovanými buňkami, nedochází k výrazné změně proliferační aktivity buněk a zároveň s tím je mírně snížena exprese villinu a zvýšena exprese IAP. Vyšší koncentrace fenofibrátu ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vede k významnému poklesu proliferační aktivity buněk, doprovázené výrazným nárůstem exprese villinu a IAP v porovnání s buňkami diferencovanými. Zdá se tedy, že tato vyšší koncentrace fenofibrátu vede k více diferencovanému fenotypu. Diferenciace buněk byla po aktivaci PPAR α pozorována i u myších adipocytů v bílé tukové tkáni po aplikaci bezofibrátu (Goto *et al.*, 2011).

Metoda imunocytochemického barvení (ICC) prokázala přítomnost receptoru PPAR α u všech testovaných buněk. Receptor PPAR α se po své aktivaci translokuje z cytoplazmy do jádra, kde spouští transkripci cílových genů (Umemoto *et Fujiki*, 2012). U buněk nediferencovaných a diferencovaných byl pozorován koncentračně závislý nárůst jaderné pozitivita PPAR α po ovlivnění fenofibrátem. Nárůst jaderné pozitivita naznačuje skutečnost, že změny v expresi sledovaných proteinových markerů (villin a IAP) jsou alespoň částečně řízeny tímto receptorem. Vyšší jadernou pozitivitu u diferencovaných buněk oproti nediferencovaným, prokazuje i práce (Abbott, 2009), ve které je popsán časný vývoj gastrointestinálního traktu, kdy dochází při postupné diferenciaci buněk k přesunu PPAR α z cytoplazmy do jádra.

U diferencujících buněk byl zaznamenán jak pokles proliferace, tak i pokles obou markerů diferenciace. Navíc došlo k poklesu jaderné lokalizace receptoru PPAR α po ovlivnění fenofibrátem v porovnání jak s diferencovanými, tak nediferencovanými buňkami. Toto lze vysvětlit záznamem z průtokové cytometrie, kdy je možné pozorovat, že při kombinaci butyrátu sodného s fenofibrátem, dochází k fragmentaci DNA, což je znak buněčné smrti. Vliv kombinace butyrátu sodného a fenofibrátu na buněčnou linii HT-29, nebyl zatím v žádném článku publikován. Lze předpokládat synergický efekt těchto dvou látek, který vede ke smrti buněk, a nikoliv ke změnám jejich diferenciačního stavu.

7 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl testován vliv fenofibrátu, jakož to ligandu PPAR α , na diferenciaci buněčné linie HT-29, která je odvozená od adenokarcinomu tlustého střeva. Cílem bylo stanovit proliferační aktivitu při různých fenofibrátových koncentracích (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a porovnat ji s expresí dvou markerů diferenciaci – villin a IAP. Následně metodou ICC detekovat přítomnost a subcelulární lokalizaci PPAR α po ovlivnění fenofibrátem.

Výsledky potvrdily koncentrační závislost fenofibrátu na proliferační schopnost, buněčné linie HT-29. Vyšší koncentrace fenofibrátu (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) snižuje proliferační aktivitu a zároveň zvyšuje expresi villinu a IAP v nediferencovaných i diferencovaných buňkách. Změny v subcelulární lokalizaci také ukazují vyšší jadernou pozitivitu v diferencovaných buňkách než v buňkách nediferencovaných. Získané výsledky naznačují roli PPAR α v diferenciaci buněk HT-29.

8 LITERATURA

Abbott D. B. (2009): Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reproductive Toxicology* 27 (3-4): 246-257.

Aranda A., Pascual A. (2001): Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological reviews* 81 (3): 1269-1304.

Augeron C., Laboisie L. C. (1984): Emergence of Permanently Differentiated Cell Clones in a Human Colonie Cancer Cell Line in Culture after Treatment with Sodium Butyrate. *Cancer research* 44 (9): 3961-3969.

Barker N. (2014): Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* 15 (1): 19-33.

Barker N., Oudenaarden van A., Clevers H. (2012): Identifying the Stem Cell of the Intestinal Crypt: Strategies and Pitfalls. *Cell Stem Cell* 11 (4): 452-460.

Benoit D. Y., Groulx J-F., Gagne D., Beaulieu JF. (2012): RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *Journal of Signal Transduction*. Article ID 248759.

Burns A. K., Heuvel P. V. J. (2007): Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771 (8): 952-960.

Čížková K. (2018): Expression of cytochrome P450 epoxygenases and soluble epoxide hydrolase is regulated by hypolipidemic drugs in dose-dependent manner. *Toxicology and Applied Pharmacology* 355: 156-163.

Čížková K., Rajdova A., Ehrmann J. (2015): Spatio-Temporal Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α During Human Prenatal Development. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 116 (4): 361-366.

Čížková K., Rajdova A., Ehrmann J. (2015-16): Soluble Epoxide Hydrolase as a Potential Key Factor for Human Prenatal Development. *Cells Tissues Organs* 201: 277-286.

- Čížková K., Steigerová J., Gurský J., Ehrmann J. (2016): Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning. *Lipids in Health and Disease* 15 (1): 164.
- Desvergne B., Wahli W. (1999): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 20 (5): 649-688.
- Escher P., Wahli W. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation research* 448 (2): 121-138.
- Gerbe F., Legraverend C., Jay P. (2012): The intestinal epithelium tuft cell: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (17): 2907-2917.
- Goto T., Lee J-Y., Teraminami A., Kim Y-I., Hirai S., Taku Uemura T., Inoue H., Takahashi N., Kawada T. (2011): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *The Journal of Lipid Research* 52 (5): 873-884.
- Grygiel-Górniak B. (2014): Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal* 13:17.
- Kota P. B., Huang H-W. T., Roufogalis D. B. (2005): An overview on biological mechanismus of PPARs. *Pharmacological Research* 51 (2): 85-94.
- Lea T. (2015): Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K. *et al.*, (eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer. Chapter 10. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4_10.
- Lee Ch-H., Olson P., Evans M. R. (2003): Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology* 144 (6): 2201-2207.
- Lüllmann-Rauch R. (2012): *Histologie*. Grada, Praha. ISBN 978-80-247-3729-4.
- Mandard S., Müller M., Kersten S. (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (4): 393-416.

- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. (2015): HT29 Cell Line. In: Verhoeckx K. *et al.*, (eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer. Chapter 11. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4_11.
- Medema J. P., Vermeulen L. (2011): Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474 (7351): 318-326.
- Mescher L. A. (2018): *Junqueirovy základy histologie*. Galén, Praha. ISBN 978-80-7492-324-1.
- Mirza Z. A., Althagafi I. I., Shamshad H. (2019): Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 166: 502-513.
- Mohsin K., Alamri R., Ahmad A., Raish M., Alanazi F.K., Hussain M. D. (2016): Development of self-nanoemulsifying drug delivery systems for the enhancement of solubility and oral bioavailability of fenofibrate, a poorly water-soluble drug. *International Journal of Nanomedicine* 2016 (11): 2829-2838.
- Monsalve A. F., Pyarasani D. R., Delgado-Lopez F., Moore-Carrasco R. (2013): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators of Inflammation*. Article ID 549627.
- Natoli M., Leoni D. B., D'Agnano I., Zucco F., Felsan A. (2012): Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in Vitro* 26 (8): 1243-1246.
- Panigrahy D., Kaipainen A., Huang S., Butterfield E. C., Barnés M. C., Fannon M., Laforme M. A., Chaponis M. D., Folkman J., Kieran W. M. (2008): PPAR α agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (3): 985–990.
- Peters M. J., Shah M. Y., Gonzalez J. F. (2012): The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews Cancer* 12 (3): 181-195.

Pyper R. S., Viswakarma N., Yu S., Reddy K. J. (2010): PPAR α : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear Receptor Signaling* 8 (1): DOI: 10.1621/nrs.08002.

Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S. (2010): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research*. Article ID 612089.

Rodriguez A. de la Rosa M., Kersten S. (2017): Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (10): 1212-1220.

Sancho E., Batlle E., Clevers H. (2004): Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual review of cell and development biology* 20: 695-723.

Siavoshian S., Segain J-P., Kornprobst M., Bonnet C., Cherbut C., Galmiche J-P., Blotière M. H. (2000): Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46 (4): 507-514.

Simon-Assmann P., Turck N., Sidhoum-Jenny M., Gradwohl G., Kedinger M. (2007): In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biology and Toxicology* 23 (4): 241-256.

Snippert J. H., van der Flier G. L., Sato T., van Es J. H., den Born M., Kroon-Veenboer C., Barker N., Klein M. A., van Rheenen J., Simons D. B., Clevers H. (2010): Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell* 143 (1): 134-144.

Suchanek M. K., May J. F., Robinson A. J., Lee J. W., Holman A. N., Monteith R. G., Roberts-Thomson J. S. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell line MCF-7 and MDA-MB-231. *Molecular Carcinogenesis* 34 (4): 165–171.

Tremblay E., Auclair J., Delvin E., Levy E., Ménard D., Pshezhetsky A., Rivard N., Seidman G. E., Sinnett D., Vachon H. P., Beaulieu J. (2006): Gene Expression Profiles of Normal Proliferating and Differentiating Human Intestinal Epithelial Cells: A Comparison with the Caco-2 Cell Model. *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (4): 1175-1186.

Umemoto T., Fujiki Y. (2012): Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes to Cells* 17 (7): 576-596.

Urbanska K., Pannizzo P., Grabacka M., Croul S., Del Valle L., Khalili K., Reiss K. (2008): Activation of PPAR α inhibits IGF-I-mediated growth and survival responses in medulloblastoma cell lines. *International Journal of Cancer* 123 (5): 1015–1024.