

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Jana Novobilská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Modulace jaderných receptorů deriváty steroidních látek
u nádorových buněk in vitro**

Bakalářská práce

Jana Novobilská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Jana NOVOBILSKÁ
Osobní číslo: R210173
Studijní program: B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Modulace jaderných receptorů deriváty steroidních látek u nádorových buněk in vitro
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Přehled metodiky: 2D a 3D kultivace vybraných nádorových buněčných linií, test buněčné viability, Western blot analýza, imunofluorescenční detekce.
3. Experimentální část.
4. Vyhodnocení výsledků a jejich zpracování.
5. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(1), 19-34.
- Mishra P, Gulbake A, Jain A, Khare P, Soni V, Vyas SP, Jain SK. (2009): Steroid receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 26(3):207-73.
- Zhao L, Zhou S, Gustafsson JÅ. (2019): Nuclear Receptors: Recent Drug Discovery for Cancer Therapies. *Endocr Rev.* 40(5):1207-1249.
- Simons SS. Jr, Edwards DP, Kumar R. (2014): Minireview: dynamic structures of nuclear hormone receptors: new promises and challenges. *Mol Endocrinol.* (28), 173-82.
- Nath S, Devi GR. (2016): Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics.*, 163, 94-108.
- Barchánková L, Magdolenová A, Hájek M. (2019): 3D buněčné sféroidy jako modely solidních nádorů. *Bioprospect.* 29, 35-40.
- D'Arcy MS. (2019): Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 43(6):582-592.
- De Bruin EC, Medema JP. (2008): Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response: *Cancer Treat Rev* (34), 737-49.
- Elmore S. (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol pathol* (35), 495-516.
- Hanahan D, Weinberg, RA. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* (100), 57-70.
- Igney FH, Krammer PH. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* (2), 277-288.
- Molinary M. (2000): Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* (33), 261-274.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.
Ústav klinické a molekulární patologie

Datum zadání bakalářské práce: 20. března 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Jana Novobilská
Název práce:	Modulace jaderných receptorů deriváty steroidních látek u nádorových buněk in vitro
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Klíčová slova:	Jaderné receptory, karcinom pankreatu, cholestanové deriváty
Počet stran:	53
Jazyk:	Český

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem cholestanových derivátů a jejich analogů na jaderné receptory nádorových buněk pankreatu. Teoretická část shrnuje poznatky o jaderných receptorech a jednotlivých typech, které byly studovány v praktické části. Dále přibližuje problematiku karcinomu pankreatu a roli jaderných receptorů v jeho tumorigenezi.

Praktická část zahrnovala ovlivnění nádorových buněčných linií Bx PC-3 a MIA PaCa-2 vybraným cholestanovým derivátem, které následovalo analýzou buněčného cyklu. Dále byl sledován vliv testované látky na expresi proteinů a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony.

Bibliographical identification

Author´s name and surname:	Jana Novobilská
Title:	Modulation of nuclear receptors by steroid derivatives in cancer cells in vitro
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Keywords:	Nuclear receptors, pancreatic cancer, cholestane derivatives
Number of pages:	53
Language:	Czech

Summary:

This bachelor's thesis deals with the influence of cholestane derivatives and their analogues on the nuclear receptors of pancreatic tumor cells. The theoretical part summarizes knowledge about nuclear receptors and individual types that were studied in the practical part. It also approaches the issue of pancreatic cancer and the role of nuclear receptors in its tumorigenesis.

The practical part included the influence of tumor cell lines Bx PC-3 and MIA PaCa-2 with a selected cholestane derivative, followed by cell cycle analysis. Furthermore, the effect of the tested substance on protein expression and nuclear receptor localization was monitored.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Steigerové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Jana Novobilská

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Janě Steigerové Ph.D., za nesmírnou ochotu a pomoc, jak při práci na experimentech, tak při sepisování práce. Nemalé díky patří také mé rodině a přátelům, kteří mi byli psychickou podporou po celou dobu studia.

OBSAH:

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	3
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
3.1	Jaderné receptory	4
3.1.1	Struktura jaderných receptorů	4
3.1.2	Androgenní receptor	5
3.1.3	Estrogenový receptor	7
3.1.4	Progesteronový receptor	8
3.2	Steroidní hormony	9
3.3	Slinivka břišní	9
3.3.1	Karcinom slinivky břišní	11
3.3.2	Screening nádorů slinivky břišní	12
3.3.3	Léčba nádorů slinivky břišní	13
3.3.4	Nádorové linie slinivky břišní	14
3.4	Role steroidních receptorů u karcinomu slinivky břišní	14
4	MATERIÁLY A METODY	16
4.1	Biologický materiál	16
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	16
4.2.1	Použité chemikálie	16
4.2.2	Použité roztoky	17
4.2.3	Použité protilátky	18
4.2.4	Testované cholestanové deriváty	19
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	20
4.3.1	Přístrojové vybavení	20
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	21

4.4.1	Kultivace a pasážování buněk	21
4.4.2	Ovlivnění buněk testovanými deriváty	21
4.4.3	Test viability buněk	21
4.4.4	Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií	22
4.4.5	Western blot analýza	23
4.4.6	Imunofluorescenční barvení buněk	25
4.4.7	Statistické zpracování dat	26
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Vliv cholestanových derivátů na viabilitu buněk	27
5.2	Vliv testovaného derivátu na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie a Western blot analýzy	30
5.3	Vliv testovaného derivátu na expresi receptorů pro steroidní hormony metodou imunofluorescenčního barvení a Western blot analýzou	32
6	DISKUSE	39
7	ZÁVĚR	44
8	LITERATURA	45
9	INTERNETOVÉ ZDROJE	53

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
AA+BIS	akrylamid/bis-akrylamid 30%
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenový receptor
BRCA (1/2)	označení supresorových genů, z ang. breast cancer – nádory prsu (breast cancer gene number 1/2)
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine
CAR	receptor, z angl. chimeric antigen receptor
CBP	acetyltransferáza, z angl. CREB-binding protein (cyclic AMP response element binding protein)
CCND1	gen kódující cyklin D1 (cyclin D1 gene)
CDK	cyklin-dependentní kináza, z angl. cyclin-dependent kinase
CDKN2A	gen inhibitoru cyklin-dependentní kinázy 2A
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DBD	DNA vazebná doména, z angl. DNA binding domain
DES	diethylstilbestrol
DMEM	kultivační médium z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ER (α/β)	estrogenový receptor (α/β)
ERK	kináza, z angl. extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetální bovinní sérum

GR	glukokortikoidní receptor
HRP	křenová peroxidáza, z angl. horseradish peroxidase
HSP	proteiny tepelného šoku, z angl. heat shock protein
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace
IL-6	interleukin 6
KRAS	gen, z angl. Kirsten rat sarcoma virus
LBD	ligand vazebná doména, z angl. ligand binding domain
MAPK	mitogeny aktivované proteinkinázy
Mcm-7	minichromosome maintenance complex component 7
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NCoR1	korepresor jaderného receptoru 1, z angl. nuclear receptor corepresor 1
PAI1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PARP	poly(ADP-ribóza)polymeráza
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer saline
PR-A	progesteronový receptor A
PR-B	progesteronový receptor B
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor kyseliny retinové, z angl. retinoic acid receptor
RIPA	lyzační pufr, z angl. radioimmunoprecipitation assay buffer
RNase A	z angl. ribonuclease A
RPM	otáčky za minutu z angl. rotation per minute
RPMI 1640	kultivační médium, z angl. Roswell Park Memorial Institute

RXR	receptor retinoidu X
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s použitím dodecylsíranu sodného
SMAD4	gen, z angl. Mothers against decapentaplegic homolog 4
SMRT	z angl. silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SRC	koaktivátor steroidního receptoru, z angl. steroid receptor coactivator
STAT3	transkripční faktor, z angl. Signal transducer and activator of transription 3
Tb	trilobolid
TBS	pufř, z angl. tris-buffer saline
TEMED	tetramethylethylendiamin
TGF β	transformující růstový faktor β , z angl. Transforming growth factor β
TP53	gen, z angl. Tumor protein p53
TR	receptor thyroidního hormonu
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura steranu (vlevo) struktura cholesterolu (vpravo)	2
Obr. 2: Struktura jaderného receptoru znázorněna v 1D aminokyselinové sekvenci (horní část) a 3D organizaci (dolní část) DBD (DNA vázající doména) a LBD (ligand vazebná doména)..	5
Obr. 3: Chemická struktura hormonu testosteronu (vlevo) a dihydrotestosteronu (vpravo).....	6
Obr. 4: Chemická struktura hormonu 17 β -estradiolu.....	8
Obr. 5: Chemická struktura hormonu progesteronu	9
Obr. 6: Anatomický popis pankreatu v trávicí soustavě.....	10
Obr. 7: Věkově standardizovaná pětiletá incidence (modré pole) a mortalita (šedé pole) ve vybraných zemích Evropy v roce 2020.....	13
Obr. 8: Strukturální vzorce testovaných derivátů cholestanu a jejich analogů.	19
Obr. 9: Vliv testovaného derivátu 6 (A) v koncentracích 1–12 μ M na buněčnou viabilitu nádorových buněk Bx PC-3 a MIA PaCa-2 a (B) v koncentracích 5–50 μ M na viabilitu BJ buněk nenádorových po dobu 48 h.	28
Obr. 10: Změny morfologie buněk po ovlivnění testovanou látkou 6 v koncentracích 2, 4 a 6 μ M (48 h) vzhledem ke kontrolním (Ctrl) buňkám (zvětšení 20x).....	29
Obr. 11: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u buněčné linie (A) Bx PC-3 a (B) MIA PaCa-2.....	30
Obr. 12: Imunodetekce proteinů podílejících se na kontrole buněčného cyklu u buněčné linie (A) Bx PC-3 v koncentracích 2 a 4 μ M po dobu 24 a 48 h a (B) MIA PaCa-2 ovlivněných testovanou látkou v koncentracích 2, 4 a 6 μ M po dobu 24 a 48 h.....	31
Obr. 13: Imunofluorescenční detekce AR buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 a 4 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	32
Obr. 14: Imunofluorescenční detekce AR buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 a 4 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	33

Obr. 15: Imunofluorescenční detekce ER- α buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	34
Obr. 16: Imunofluorescenční detekce ER- α buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 a 4 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	35
Obr. 17: Imunofluorescenční detekce ER- β buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2, 4 a 6 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	36
Obr. 18: Imunofluorescenční detekce ER- β buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2, 4 a 6 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.	37
Obr. 19: Imunodetekce proteinů steroidních receptorů u buněčné linie A) Bx PC-3 ovlivněných testovanou látkou v 2 a 4 μ M koncentracích po dobu 24 a 48 h a B) MIA PaCa-2 ovlivněných testovanou látkou v 2, 4 a 6 μ M koncentracích po dobu 24 a 48 h.	38

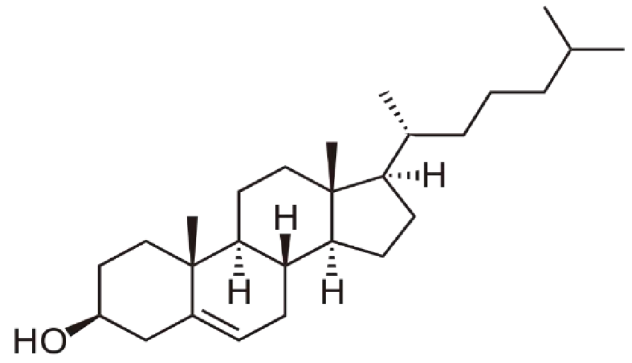
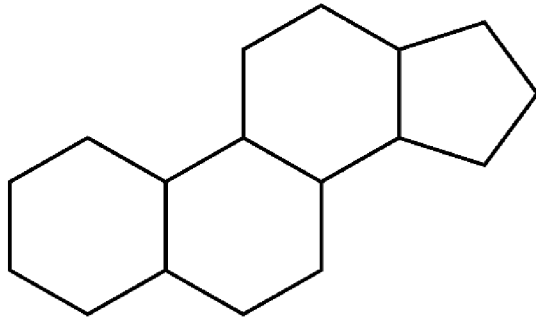
SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled použitých primárních protilátek.....	18
Tab. 2: Přehled použitých sekundárních protilátek.....	18
Tab. 3: Výsledná cytotoxicita cholestanových derivátů a jejich analogů po 48 h inkubaci.....	27

1 ÚVOD

Karcinom slinivky břišní představuje nádorové onemocnění s nejhorší prognózou, často fatálními následky. V posledních letech se počet pacientů s diagnostikovaným karcinomem slinivky břišní zvyšuje, a kvůli pokročilým stádiím v době diagnózy zůstává míra přežití stále nízká (Klein, 2021). Vzhledem k závažnosti tohoto onemocnění jsou stále hledány nové možnosti potenciálních léků, které by snížily progresi tohoto nádorového onemocnění a zvýšily šanci na úplné vyléčení. V předkládané bakalářské práci jsme se zaměřili na působení steroidních látek odvozených od cholesterolu na modelu nádorových buněčných linií pankreatu a pokusili se objasnit některé mechanismy účinků, zejména úlohu jaderných receptorů pro steroidní hormony.

Steroidní látky jsou komplexní organické molekuly, jejichž základní molekulou je cyklopentanoperhydrofenanthren neboli steran viz Obr. 1. Jedná se o látky vyskytující se jak v přírodě, tak o látky připravené synteticky. Podle počtu uhlíkových atomů rozlišujeme tyto prekurzory steroidů: gonan (C17), estran (C18), androstan (C19), pregnan (C21), cholan (C24) a cholestan (C27) (Shimada a kol., 2001). Nejzastoupenějším steroidem je vysoce lipofilní cholesterol (Obr. 1), který je metabolizován na žlučové kyseliny v játrech, a slouží také jako výchozí látka pro syntézu steroidních hormonů, které plní v eukaryotních organismech spoustu důležitých funkcí, a to především těch regulačních (Wallimann a kol., 1997; Cole a kol., 2019). Mezi steroidní hormony řadíme androgeny, kortikoidy, estrogeny, progesteron a vitamín D a jeho metabolity (Shimada a kol., 2001). Hydrofilní nebo ve vodě rozpustné hormony působí primárně na povrchu buněčné membrány vazbou na receptory uložené v plazmatické membráně. Naproti tomu hydrofobní hormony cirkulují vázané na nosné plazmatické proteiny a jsou schopny volně difundovat přes buněčné membrány, čímž spustí aktivitu specifického intracelulárního hormonálního receptoru (Cole a kol., 2019). Steroidní hormony jsou také známy pro svou důležitou funkci v proliferaci buněk a vzniku mnoha typů nádorů. Svou schopností modulace receptorů, a tím také genové exprese, jsou velice slibným předmětem výzkumu ve vývoji nových chemoterapeutik (Ahmad a Kumar, 2011).



Obr. 1: Struktura steranu (vlevo) struktura cholesterolu (vpravo). Převzato z Stanczyk, 2009; AbuMweis a kol., 2008.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Stanovit viabilitu nádorových a nenádorových buněk po ovlivnění testovanými cholestanovými deriváty a jejich analogy.
3. Charakterizovat vliv testovaných cholestanových derivátů na buněčný cyklus a expresi receptorů pro steroidní hormony.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Jaderné receptory

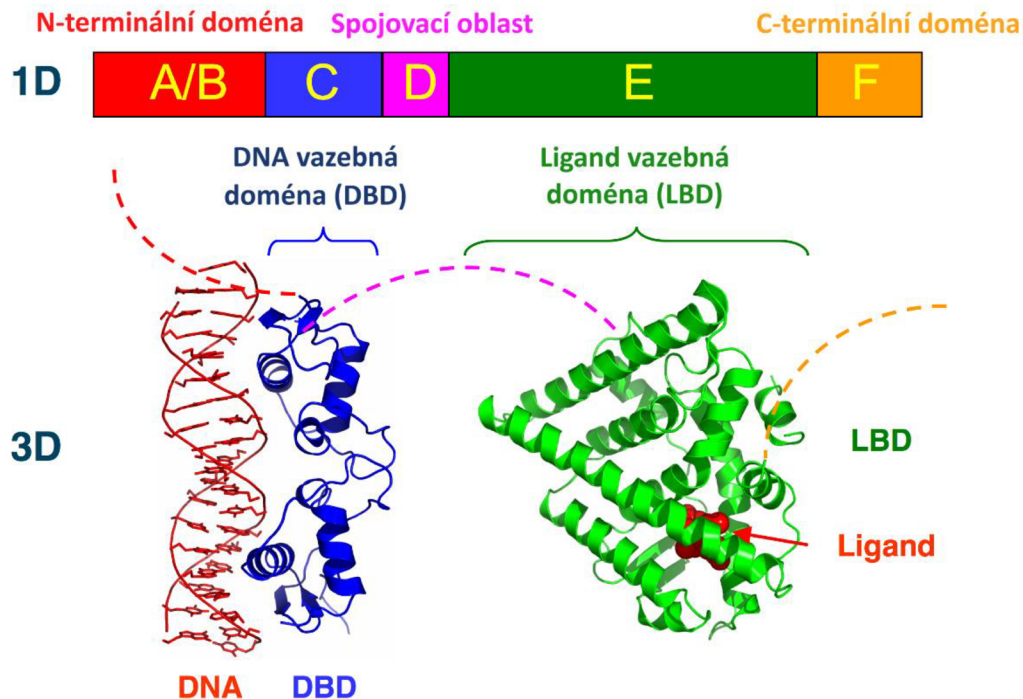
Jaderné receptory, nebo také ligandem aktivované transkripční faktory, jsou ve své chemické podstatě proteiny, které jsou schopny vazby na určité sekvence DNA (Frigo a kol., 2021). Touto vazbou poté regulují následnou transkripci, a to buď pozitivně či negativně. Funkce receptorů jsou velice rozmanité, od regulace dělení buněk a udržení homeostázy, přes ontogenetický vývoj, až po regulaci metabolismu. Pro plnění těchto funkcí je však v mnoha případech potřeba navázání pro ně specifických nízkomolekulárních látek neboli ligandů, které se snadno dostávají přes cytoplazmatickou membránu až k samotnému receptoru, který se nachází buď v cytosolu nebo v jádře. Nachází-li se receptor v cytosolu, musí po navázání ligandu dojít k odštěpení cytoplazmatických proteinů a následně k jeho translokaci do jádra. Po navázání ligandu dochází také k dimerizaci receptoru, který se následně váže k DNA responzivnímu elementu (Yilma 2019).

Jaderné receptory můžeme rozdělit na tři základní skupiny. První skupinou jaderných receptorů jsou receptory steroidní, kam řadíme androgenní (AR), estrogenový (ER), progesteronový (PR), glukokortikoidní (GR) a mineralokortikoidní (MR) receptor. Pro tyto receptory je charakteristické, že se nachází v cytosolu a jsou na nich navázány proteiny tepelného šoku (HSP proteiny). Druhou skupinou jsou receptory vitamínu D (VDR), thyroïdního hormonu (TR), retinoidní (RAR) a rexinoidní (RXR). Ty se nacházejí výhradně v jádře. Jako samostatnou skupinu lze také označit tzv. „orphan“, neboli „sirotčí“ receptory, kam patří např. receptory PXR nebo CAR. Tyto receptory se nazývají „sirotčí“, jelikož pro ně nebyl doposud nalezen žádný endogenní ligand (Heinlein a Chang, 2002).

3.1.1 Struktura jaderných receptorů

Jaderné receptory se skládají z několika základních funkčních domén, které jsou znázorněny na Obr. 2. N-terminální doména, někdy též nazývaná hypervariabilní či doména A/B má funkci aktivační. Tato oblast často podléhá alternativnímu splicingu, díky čemuž se N-terminální doméně přisluhují receptorově, druhově a buněčně specifické účinky. Jaderné receptory se váží k responzivním elementům ve svých cílových promotorech prostřednictvím DNA-vazebné domény, nebo-li C-domény. Ta se skládá ze dvou zinkových prstů a je zodpovědná za rozpoznání a afinitu k cílové oblasti DNA. Dále také zprostředkovává dimerizaci receptoru. Za C-doménou se nachází D-doména, která umožňuje změnu konformace receptoru po navázání ligandu. Další neméně důležitou částí receptoru je E-doména vázící

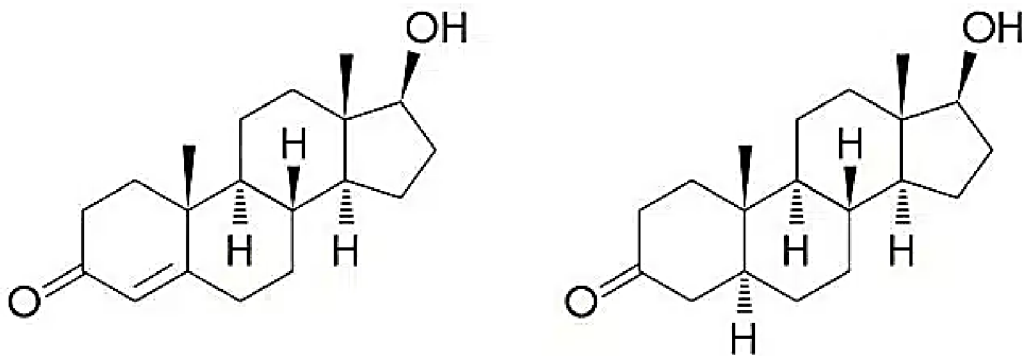
ligand. Tato doména se napříč jadernými receptory liší, sdílejí však společnou strukturu 11–13 α -helixů, která se podílí na aktivaci receptoru, a zda-li se daný ligand naváže či nikoli. Poslední komponentou jaderných receptorů je C-terminální doména, která rovněž zastává aktivační funkci (Leopold a kol., 2002).



Obr. 2: Struktura jaderného receptoru znázorněna v 1D aminokyselinové sekvenci (horní část) a 3D organizaci (dolní část) DBD (DNA vázající doména) a LBD (ligand vazebná doména). Převzato z Jahangir a kol., 2016.

3.1.2 Androgenní receptor

Androgeny jako např. testosteron nebo dihydrotestosteron (viz Obr. 3) a jejich receptory (AR) hrají důležitou roli ve vývoji reprodukčního, kardiovaskulárního, imunitního a nervového systému. AR se nacházejí především v buňkách mužských pohlavních orgánů, a v některých dalších typech tkání. Mimo jiné se mohou také podílet na vzniku nádorů slinivky, prostaty, jater, ledvin aj. (Davey a Grossmann, 2016).



Obr. 3: Chemická struktura hormonu testosteronu (vlevo) a dihydrotestosteronu (vpravo). Převzato a upraveno z: Russel a Wilson, 1994.

Jak již bylo zmíněno výše, struktura jaderného receptoru se skládá z několika domén, které mají za úkol rozpoznat cílovou nukleotidovou sekvenci, navázat se za přítomnosti ligandu (agonisty či antagonisty) a tím spustit či zastavit transkripci. Androgenní receptor, jakožto i ostatní steroidní receptory, je aktivován navázáním vhodného agonisty, po němž prochází řadou konformačních změn. Nejprve se oddisociují proteiny tepelného šoku, jako například HSP90, HSP70 nebo p23, poté se AR dimerizuje, podléhá fosforylaci a následné translokaci do jádra (Tan a kol., 2014). Tento receptor se následně váže na responzivní element, který je dán sekvencí šesti nukleotidů s tří nukleotidovým spacerem 5'-TGTnnnTCT-3' v promotoru genu AR. Transkripční aktivita AR může být dále ovlivněna koregulátory – specifickými proteiny, vzájemnými se na již aktivovaný receptor, jehož aktivitu mohou pomocí modifikace chromatinu a histonů buď zvýšit (koaktivátory) či snížit (korepresory) (Verrijdt, 2003; Gao a kol. 2005). Mezi koaktivátory řadíme proteiny, které se podílí na tvorbě konečného transkripčního komplexu. Tyto proteiny, nazývající se SRC (steroid receptor coactivator), pak díky epigenetickým změnám, jako je např. acetylace histonů, ovlivňují transkripci. Mezi acetyltransferázy, které váží kovalentní vazbou acetylové skupiny na histony, patří CBP (CREB-binding protein) a jeho homolog p300. Za další epigenetické změny jsou odpovědné bromodoménové a extraterminální proteiny vážící se na acetylované histony a histon deacylázy, které zase acetylové skupiny odštěpují (Dawson a kol., 2012).

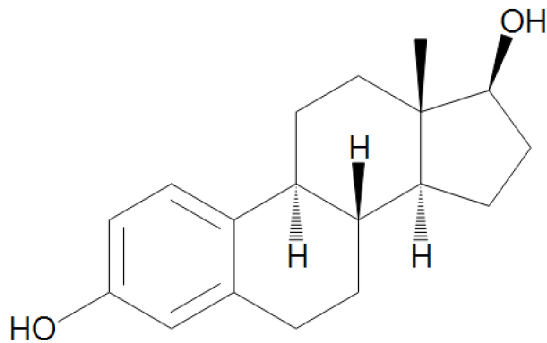
Naopak mezi korepresory patří proteiny NCoR1 (nuclear receptor corepresor 1) a SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor). Po jejich navázání dochází ke změně konformace receptoru čímž dojde k deacetylaci histonů a inhibici transkripce (Ritter a kol., 2021).

3.1.3 Estrogenový receptor

Estrogenové receptory ER- α a ER- β hrají stejně jako androgenní receptory významnou roli v normálním ontogenetickém vývoji každého jedince. Tyto receptory a jejich podtypy se nacházejí v různých částech lidského těla. Jsou lokalizovány například v prsu, vaječnicích, mozku, kardiovaskulárním systému, urogenitálním traktu, ale také v kostech (Levin, 2001).

Navzdory své strukturní podobnosti však neplní ER- α a ER- β stejné funkce. Ve studiích prováděných na myších byla u samic knockoutem ER- α , přičemž ER- β zůstal plně funkční, pozorována neplodnost spojená s hypoplazií dělohy. Samci disponovali nízkým počtem a špatnou pohyblivostí spermií. Naopak při knockoutu ER- β byl nejzásadnějším projevem tvorba časných atretických folikulů a menší počet žlutých tělísek. Plodnost byla v tomto případě pouze snížena. Z této studie vyplývá, že správná funkce ER je zásadní pro obě pohlaví. Pro muže z hlediska životaschopnosti a kvality spermií, a pro ženy z hlediska správné funkce vaječníků a fyziologie dělohy (Pearce a Jordan, 2004).

K aktivaci ER dochází analogicky jako u AR po navázání příslušného agonisty. Mezi ligandy ER řadíme estrogen a mnoho dalších od něho odvozených sloučenin jako např. syntetický estrogen diethylstilbestrol (DES) nebo některé fytoestrogeny, sloučeniny produkované rostlinami, mezi které můžeme zařadit genistein, přítomný v sójových bobech (Pearce a Jordan, 2004). Za nejvíce produkovaný estrogen v těle a přirozený ligand ER je však označován 17 β -estradiol (viz Obr. 4), který hraje zásadní roli v mnoha fyziologických a patofyziologických procesech. Jeho dva metabolity, estron a estriol, jsou i přes svou vysokou afinitu k ER označovány za velmi slabé agonisty. Některé studie však dokazují, že by mohly vykazovat tkáňově specifický efekt. V promotorech některých genů, zejména těch, které se podílejí na proliferaci, mohou mít ER- α a ER- β opačné účinky, což naznačuje, že celková proliferativní odpověď na 17 β -estradiol je výsledkem rovnováhy mezi signalizací ER- α a ER- β (Heldring a kol., 2007).

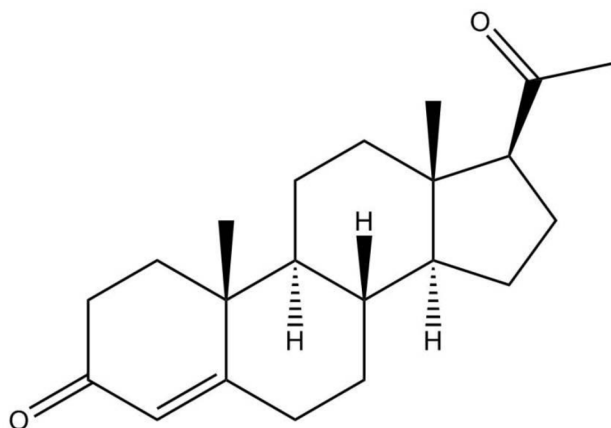


Obr. 4: Chemická struktura hormonu 17 β -estradiolu. Převzato z: Gruber a kol., 2022.

3.1.4 Progesteronový receptor

Progesteronový receptor (PR) je jedním z hlavních regulátorů v ženských reprodukčních orgánech, kde například řídí vývojové procesy a diferenciaci během menstruačního cyklu a těhotenství. Mimo jiné se s ním můžeme setkat také v centrálním nervovém systému (Grimm, 2016).

Jeho přirozeným ligandem je steroidní hormon progesteron (viz Obr. 5), který je tvořen zejména žlutým tělískem a placentou. K jeho metabolické přeměně dochází v játrech, kde se mění na 5 α -dihydro-progesteron a allopregnanolon. Allopregnanolon se považuje za neurosteroid kvůli svým neuroprotektivním a regeneračním účinkům na traumatická poranění mozku. Dále podporuje produkci myelinu, a dokonce zpomaluje progresi Alzheimerovy choroby (Tuckey, 2005; Taraborrelli, 2015). Progesteron se ovšem svými účinky podílí také na metabolismu sacharidů, lipidů a bílkovin. Tento steroidní hormon způsobuje přímým působením na pankreatické ostrůvky hyperinzulinémií, přičemž také podporuje ukládání glykogenu v játrech. Paradoxně však antagonizuje účinky inzulínu na metabolismus glukózy v tukové tkáni a kosterním svalstvu (Kalkhoff, 1982).



Obr. 5: Chemická struktura hormonu progesteronu. Převzato z: Mulac-Jericevic a kol., 2000.

PR můžeme rozlišit na dva základní typy – PR-B a PR-A. Oba receptory sdílejí centrální část domény vázající DNA a karboxy-terminální konec domény vázající ligand. Rozdílné jsou aminokyselinovou sekvencí, kde má PR-A o 164 aminokyselin méně než PR-B. Jejich zastoupení je ale v lidských buňkách rovnoměrné (Taraborreli, 2015).

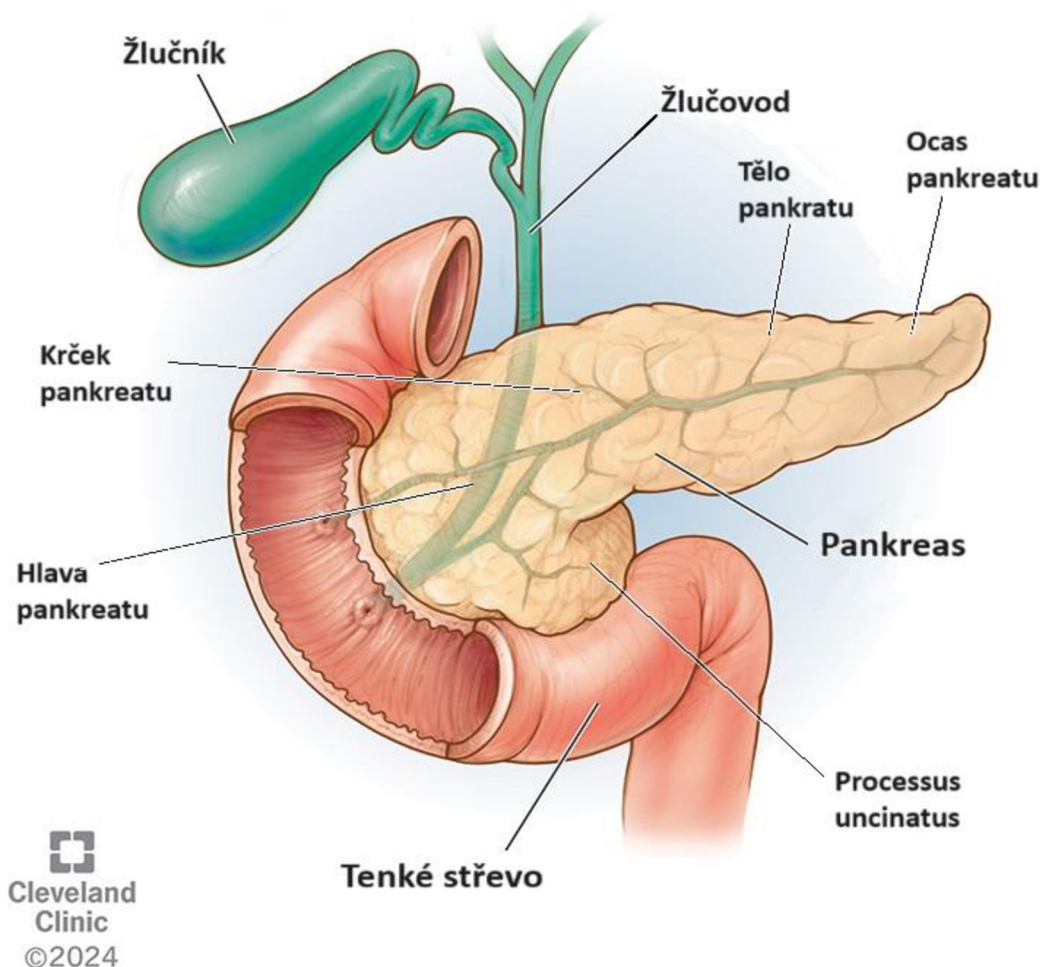
3.2 Steroidní hormony

Jak již bylo výše zmíněno, steroidní hormony jsou důležitými regulátory různých fyziologických procesů. Z chemického hlediska hovoříme o sloučeninách jejichž společným prekurzorem je cholesterol. Jeho syntéza probíhá zejména v játrech, ale také v kůře nadledvin či enterocytech, a to vzájemnou konverzí dvou výchozích molekul acetyl-CoA, která dále pokračuje tvorbou meziproductů skvalenu a lanosterolu. Pro steroidní hormony je charakteristická společná základní struktura – cyklopentanoperhydrofenantren. Jedná se o polycyklický komplex obsahující 17 atomů uhlíku tvořící čtyřkruhový systém. Podle počtu atomů uhlíku pohlavní steroidy dělíme do tří skupin: progestiny s 21 atomy uhlíku; dále androgeny s 19 atomy uhlíku a nakonec estrogeny, které se vyznačují 18 atomy uhlíku (Taraborreli, 2015). Steroidní hormony jsou známy svou důležitou rolí v buněčné proliferaci a vývoji mnoha typů nádorů. Jejich schopnost modulace receptorů, a tím také genové exprese je předmětem výzkumu a vývoje nových chemoterapeutik (Ahmad a Kumar, 2011).

3.3 Slinivka břišní

Slinivka břišní neboli pankreas (z lat. pancreas) se řadí mezi orgány trávicí soustavy. Jedná se o podlouhlou, plochou, laločnatou žlázu, která je umístěna u zadní stěny břišní dutiny bezprostředně za žaludkem. Ačkoli je slinivka v zásadě žlázou s vnější sekrecí, plní také velmi

důležité endokrinní funkce. Anatomicky se pankreas dělí na tři hlavní části, a to hlavu, tělo a ocas, což je patrné z Obr. 6 (Mahadevan, 2019). Dalšími částmi jsou dále krček pankreatu a *Processus uncinatus*. Strukturou tento orgán obsahuje také dva stavebně i funkčně odlišné oddíly. První je část exokrinní, kterou představuje jemným vazivem krytá složená tubuloalveolární žláza s vývody orgánu. Druhá, část endokrinní, je tvořena buňkami soustředěnými do tzv. Langerhansových ostrůvků. Tyto buňky dělíme na čtyři typy, a to konkrétně typ α , produkující glukagon, typ β , produkující inzulin, amylin a C-peptid, typ δ , secernující somatostatin, typ F tvořící pankreatický peptid, a nakonec typ ϵ , produkující ghrelin (Cade a Hanison, 2017). Funkce pankreatu spočívá v produkci trávicích šťáv a hormonů, které regulují hladinu glukózy v krvi. Vyprodukované šťávy jsou dále odváděny vývodem do ústí dvanáctníku (Karpińska, a Czauderna, 2017).



Obr. 6: Anatomický popis pankreatu v trávicí soustavě. Převzato a upraveno z: Cleveland Clinic, 2024.

3.3.1 Karcinom slinivky břišní

Nádorová onemocnění jsou onemocnění, způsobené změnou genotypu buněk somatickými mutacemi v onkogenech a tumor supresorových genech, která patří v dnešní době mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Společným znakem nádorových buněk jsou defekty regulačních procesů, které řídí normální proliferaci a homeostázu buněk (Kamisawa a kol., 2016; WHO, 2020).

Karcinom slinivky břišní je onemocnění způsobeno variabilní skupinou nádorů, které se řadí k nejzávažnějším typům nádorů s nejhorsím přežitím. Lze je rozdělit na adenokarcinomy duktální části, které tvoří přes 90 % případů pankreatických nádorů, a ostatní – nádory cystické, neuroendokrinní, lymfomy a metastázy nádorů jiných lokalizací (Hlavsa a kol., 2008).

Většina nádorů pankreatu vzniká z mikroskopických neinvazivních epiteliálních proliferací v pankreatických kanálcích, které jsou také označovány jako pankreatické intraepiteliální neoplazie. Na tumorigenezi pankreatu mají vliv čtyři hlavní řídicí geny: *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* a *SMAD4*. Mezi prvotní spouštěče patří mutace genů *KRAS* a *CDKN2A*. Gen *KRAS* kóduje malou GTPázu, která funguje v downstream signalizaci z receptorů růstových faktorů, a je také nejčastěji mutovaným onkogenem vyskytujícím se u více než 90 % nádorů. Funkce tumor supresorového genu *CDKN2A* na druhou stranu spočívá v kódování regulátoru buněčného cyklu. Taktéž se vyskytuje v 90 % všech případů duktálních adenokarcinomů. *TP53*, také tumor supresorový gen, kóduje stejnojmenný protein, který hraje klíčovou roli v buněčné stresové reakci. *SMAD4* zprostředkovává signalizaci downstream od receptoru transformujícího růstového faktoru β (TGF β), a rovněž se jedná o tumor supresorový gen (Kamisawa a kol., 2016).

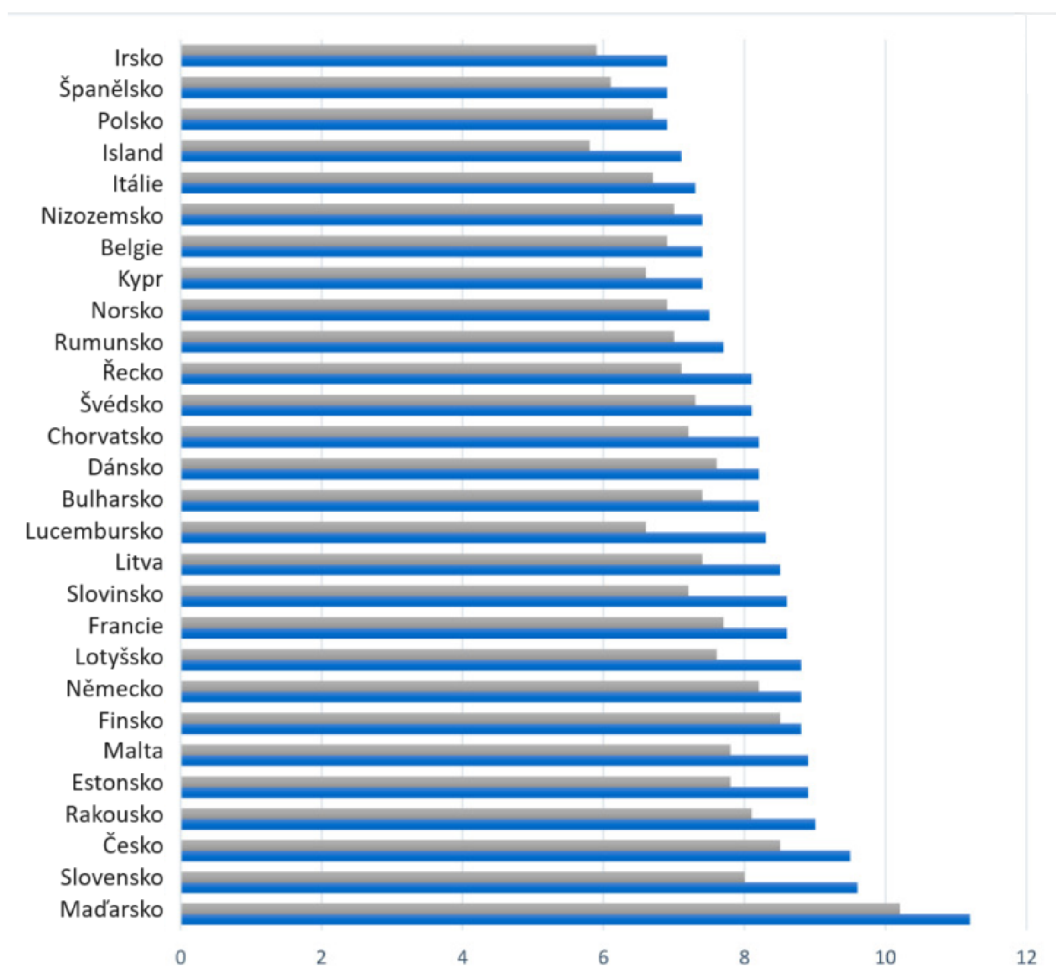
Riziko vzniku karcinomu slinivky se může kromě obvyklých zdravotních faktorů, jako je obezita, diabetes 2. typu a užívání tabáku, také zvyšovat při mutacích v *BRCA2*, či u pacientů s Lynchovým nebo Peutz-Jeghersovým syndromem. Dále mohou být výrazněji ohroženi lidé s hereditární pankreatitidou atd. (Kamisawa a kol., 2016; Mizrahi a kol., 2020). Jak již bylo výše zmíněno, prognóza u tohoto onemocnění je špatná a ve většině případů končí fatálně. To je způsobeno zejména asymptomatickým průběhem, kdy příznaky nastávají až při pokročilých stádiích onemocnění (Šafanda a kol., 2010). Mezi tyto příznaky patří například ikterus, postprandiální zvracení nebo příznaky nespecifické jako je únava, anorexie, hubnutí a bolesti břicha (Hlavsa a kol., 2008).

3.3.2 Screening nádorů slinivky břišní

Dle statistik na území Evropy onemocní karcinomem pankreatu průměrně 2,31 občanů na 100 000 obyvatel. V rámci České republiky to však činí 9,5 případů na 100 000 obyvatel, čímž se řadíme mezi první tři státy s nejvyšší incidencí, a zároveň i mortalitou v celé Evropě viz Obr. 7. To je pravděpodobně způsobeno nezdravým životním stylem (kouření, konzumace alkoholu atd.), ale také nedostatečným screeningovým programem. Četnost onemocnění plynule stoupá od 45 let věku, nejčastější výskyt je ve věkovém rozmezí 65-75 let, průměrně deset procent pacientů má rodinnou dispozici.

Jelikož jsou nádorová onemocnění slinivky břišní charakteristická pro svůj asymptomatický průběh, je diagnóza v ranných stádiích velice obtížná. Navíc je většina metod odhalujících toto onemocnění velice nákladná a často invazivní, a proto ji nelze využít v plošných preventivních programech. Tyto metody se tedy využívají pouze u rizikových skupin (výskyt této nemoci v rodině, mutace v genu *BRCA1*, *BRCA2* aj.).

Pro screening těchto skupin se používají vysoce specializované metody zajišťující časnou detekci. Nejprve se z krevních testů detekuje biomarker – sacharidový antigen 19-9, který poukazuje na možný karcinom v oblasti trávicího traktu. Jedná se také o zároveň nejvyužívanější biomarker karcinomu pankreatu. U pacientů, s již diagnostikovaným tumorem pankreatu, abnormální koncentrace tohoto markeru koreluje se stádiem onemocnění nebo velikostí tumoru. Lze jej tedy použít k posouzení prognózy a volbě dalších postupů při léčbě. Dalším krokem, při zvýšené koncentraci tohoto sacharidového antigenu, je využití pokročilejších metod jako je například magnetická rezonance, počítačová tomografie nebo endoskopická ultrasonografie. Endoskopická ultrasonografie je pro detekci karcinomu pankreatu ze všech metod považována za nejcitlivější a umožňuje přesné určení velikosti i malých lézí (<30 mm) a rozsahu nádorové infiltrace do cév (Partyka a kol., 2023).



Obr. 7: Věkově standardizovaná pětiletá incidence (modré pole) a mortalita (šedé pole) ve vybraných zemích Evropy v roce 2020. Převzato a upraveno z: Partyka a kol., 2023.

3.3.3 Léčba nádorů slinivky břišní

Navzdory významnému pokroku v diagnostice a terapii zůstává karcinom pankreatu jedním z typů nádorových onemocnění s velice špatnou prognózou. Léčba nádorů slinivky břišní je značně komplikovaná, a to zejména kvůli pozdnímu stanovení diagnózy v důsledku dlouhého bezpříznakového průběhu. Dalším důvodem je také výrazná heterogenita těchto nádorů, která zásadně ztěžuje testování nových léčiv (Remedia, 2022). Hlavní nadějí na vyléčení je radikální chirurgický výkon, který je ale ovšem vhodný pouze u 10–20 % případů, jelikož více než 85 % nádorů slinivky břišní je diagnostikováno již v pokročilém stádiu. Samotná radioterapie není v léčbě karcinomu pankreatu příliš často užívána, a to zejména z důvodu radiorezistence nádoru. Chemoterapie má lepší léčebnou odpověď. Z podávaných cytostatik se dlouhou dobu používaly režimy založené na aplikaci 5 fluorouracilu (5-FU) nebo gemcitabinu v monoterapii. Trojkombinace (5-FU - irinotekan - oxaliplatin) je v současné době považována za zlatý standard adjuvantní léčby pacientů v dobrém celkovém stavu

(Conroy a kol., 2018). Na vzestupu je biologická léčba, jejíž podstatou je zabránění růstu nádorových buněk a metastatického šíření nádoru. V léčbě pokročilého karcinomu pankreatu byla testována řada cílených léčiv (včetně cetuximabu, bevacizumabu, a dalších), a přestože výsledky studií fáze I a II byly často velmi nadějně, žádný z uvedených přípravků v randomizované studii fáze III účinnost prozatím nepotvrdil (Neoptolemos a kol., 2017).

3.3.4 Nádorové linie slinivky břišní

Neúspěšné vyléčení karcinomu pankreatu je kromě pozdních příznaků této nemoci také způsobeno nedostatkem informací o molekulárním vývoji onemocnění. Pro studium těchto procesů jsou využívány již zavedené standardizované buněčné linie, u kterých jsou hodnoceny různé parametry jako například *in vivo* a *in vitro* růstová povaha, fenotypové projevy jako je schopnost adheze, invaze, migrace a tumorigeneze, a také především genotypové změny nejčastěji mutovaných genů (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4*). Všechny používané buněčné linie byly získány z pacientů ve věku 26–65 let europoidní rasy, a každá je specifická svou proliferací, diferenciací, schopností tvořit metastázy atd. Mezi tyto buněčné linie patří například: As PC-1, Bx PC-3, MIA PaCa-2 aj. (Deer a kol., 2010).

3.3.4.1 BX PC-3

Buněčná nádorová linie BX PC-3 byla získána z adenokarcinomu těla pankreatu 61leté ženy. Pro tuto linii je charakteristická mutace pro *TP53*, homozygotní delece *SMAD4* a wildtype genu *KRAS*. *CDKN2A* se vyskytuje také buď jako wildtype, nebo je homozygotně deletován (Deer a kol., 2010).

3.3.4.2 MIA PaCa-2

MIA PaCa-2 je buněčná linie pocházející z nádorové tkáně 65letého muže s duktálním adenokarcinomem pankreatu. Tato linie je specifická mutacemi v genech *KRAS* a *TP53*, obsahuje homozygotní deleci *CDKN2A* a je wildtypem pro gen *SMAD4* (Sasaki a kol., 2020).

3.4 Role steroidních receptorů u karcinomu slinivky břišní

Tkáň slinivky břišní přirozeně exprimuje jak androgenní, tak i estrogenový a progesteronový receptor. Tyto receptory hrají, mimo jiné, také roli v rozvoji nádorových onemocnění (Kanda a kol., 2014).

Nádorové buňky pankreatu vykazují zjevnou hormonální nerovnováhu, přičemž exokrinní karcinom pankreatu vykazuje vyšší výskyt u mužů než u žen cca v poměru 1,25–1,75:1 (Andrén-Sandberg a kol., 1999). Tyto buňky totiž exprimují detekovatelné hladiny AR,

a *in vitro* reagují na léčbu testosteronem, kde vykazují mírné zvýšení buněčné proliferace. Naopak při užívání léku flutamidu, blokátoru AR, používanému k léčbě tumorů prostaty, byla zaznamenána buněčná proliferace nižší. Aktivita AR je taktéž modulována interleukinem-6 (IL6), zánětlivým cytokinem, který je u karcinomu pankreatu nadměrně exprimován. IL-6 zvyšuje STAT3 a MAPK dráhy, které zase zvyšují transkripční aktivitu AR. Dále IL-6 také podporuje migraci buněk nádorů pankreatu. Přestože však nádorové buňky exprimují AR, jsou obvykle již v hormonálně refrakterním proliferativním stavu a odpovědi léčiv na AR jsou nedostatečné (Polvani a kol., 2014).

Expresce receptorů ER- α i - β byla v buňkách karcinomu pankreatu taktéž popsána. *In vitro* nádorové buňky reagují na léčbu látkami modulujícími estrogenu. Při nižších koncentracích obvykle indukují buněčnou proliferaci, zatímco vyšší koncentrace zastavují buněčné dělení. Jak jsem již zmiňovala v kapitole o estrogenovém receptoru, mezi ER- α a ER- β existuje jakási rovnováha, pro jejich správné fungování v buňce. Proto jejich buněčná odpověď závisí na poměru jejich exprese. Při analýze ER v karcinomu pankreatu byla detekována výrazně nižší hladina ER- α mRNA, zatímco hladiny ER- β mRNA byly zásadně vyšší. Z tohoto lze tedy usoudit, že ER- β může hrát při nádorových onemocněních slinivky břišní důležitější roli (Damaskos a kol., 2014; Polvani a kol., 2014).

Progesteronové receptory a jejich analogy ovlivňují proliferaci buněk a jejich apoptózu. PR jsou exprimovány v ostrůvkových buňkách slinivky břišní, kde hrají významnou roli v normální funkci těchto buněk (Goncharov a kol., 2021). Ztráta exprese PR je obvykle spojována s nádory v pokročilejších stádiích s horšími prognózami. V kapitole o progesteronovém receptoru jsem zmínila, že existují dvě izoformy PR, a to PR-A a PR-B. Bylo zjištěno, že aktivací PR-B prostřednictvím ligandu progesteronu došlo k aktivaci transkripčních faktorů a následné overexpresi genu *CCND1*, kódujícího cyklin D₁ protein, což zapříčinilo vznik pankreatických neuroendokrinních tumorů. Dále bylo prokázáno, že PR-A v progesteronové signální dráze inhiboval tumorigenezi potlačením promotoru PR-B (Kim a kol., 2017).

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Biologický materiál

Experimenty byly provedeny na adherentních buněčných Bx PC-3 a MIA PaCa-2 odvozených od adenokarcinomu pankreatu a na adherentní nenádorové buněčné linii BJ (lidské kožní fibroblasty). Veškerá manipulace s buňkami byla provedena ve sterilních podmínkách ve flowboxu s vertikálním prouděním vzduchu.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) - Abcam (kat. č. ab228549)
- Aceton - Lachema
- Akrylamid/bis-akrylamid 30% (AA+BIS) - Sigma-Aldrich (kat. č. E344)
- Bradfordovo činidlo - Bio-Rad (kat. č. 5000006)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) - Sigma-Aldrich (kat. č. D2650)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) - Serva (kat. č. 20767.02)
- Deoxycholát sodný - Sigma-Aldrich (kat. č. D2510)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - Invitrogen (kat. č. 392-0413)
- Ethanol 70% - Lachema
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - Sigma-Aldrich
- Fetální bovinní sérum (FBS) - Invitrogen (kat. č. S1810-500)
- Glutamin - Sigma-Aldrich (kat. č. 055-100)
- Hovězí sérový albumin (BSA) - Sigma-Aldrich (kat. č. P6154-10GR)
- Inhibitor fosfatáz - Roche (kat. č. 4906837001)
- Inhibitor proteáz - Roche (kat. č. 4693124001)
- Methanol - Lachema
- Mowiol - Calbiochem (kat. č. 475904)
- MTT činidlo - Serva (kat. č. 20395.04)
- N-Butanol - Lachema
- Nonidet P-40 - Sigma-Aldrich (kat. č. 74385)
- Penicilin - Sigma-Aldrich (kat. č. L0018-100)
- Peroxodisíran amonný (APS) - Sigma-Aldrich (kat. č. A3678)
- Ponceau S - Sigma-Aldrich (kat. č. K793-500mL)
- Propidium jodid - Sigma-Aldrich (kat. č. P4170)

- Proteinový marker (Full-Range rainbow) - Amersham (kat. č. GERPN800E)
- Pyruvát sodný - Sigma-Aldrich (kat. č. S8636)
- RNasa A - Qiagen (kat. č. 19101)
- RPMI 1640 - Sigma-Aldrich (kat. č. 3920425)
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) - Serva (kat. č. 35930)
- Tris(hydroxymethyl)aminometan (TRIS) - Sigma-Aldrich (kat. č. 3719002)
- Triton X-100 - Sigma-Aldrich (kat. č. T8787)
- Trypsin-EDTA - Sigma-Aldrich (kat. č. T4049)
- Tween 20 - Serva (kat. č. MILF655204-100ml)

4.2.2 Použité roztoky

- **1,5 M TRIS/HCl pH 8,8:** 18,17 g TRIS/100 ml H₂O, upravit pH pomocí HCl na pH 8,8
- **10% APS:** 0,1 g (NH₄)₂ S₂O₈/1 ml H₂O
- **10% DMEM:** 10% fetální bovinní sérum (FBS) (v/v), 2 mM L-glutamin, penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml)
- **20% DMEM:** 20% FBS (v/v), 2,5% koňské sérum, 2 mM L-glutamin, penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml)
- **10% RPMI:** 10% FBS (v/v), 2 M L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný, penicilin (1 U/ml), streptomycin (1 U/ml)
- **10% SDS:** 5g SDS/ 50 ml H₂O
- **1M TRIS/HCl pH 6,8:** 12,11 g TRIS/100 ml H₂O, upravit pH pomocí HCl na pH 6,8
- **20% transferový pufr:** 5,8 g glycin; 11,6 g TRIS; 0,74 g TRIS; 400 ml methanol/2 l H₂O
- **5x elektroforetický pufr:** 15,1 g TRIS; 5,09 g SDS; 72 g glycin/ 1 l H₂O
- **4x Laemliho pufr s β-merkapt ethanolom:** 3,5 ml H₂O; 0,5 ml 1M TRIS pH 6,8; 1,6 ml glycerolu; 1,6 ml 10% SDS; 0,4 ml 0,5% bromfenolová modř, 0,4 ml β-merkapt ethanol
- **Mowiol:** 2,4 g mowiol; 6 g glycerol; 6 ml H₂O; 12 ml 0,2 TRIS pH 8,5
- **PBS 10x:** 160 g NaCl; 4 g KCl; 64,2 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 4g K₂HPO₄/2 l H₂O, upravit na pH 7,4
- **Permeabilizační roztok:** 0,1% Triton X-100 a 0,1% citrát sodný v PBS
- **RIPA pufr:** 8,33 ml 0,3 M TRIS-HCl pH 8,0; 0,44 g NaCl; 0,5 ml Nonidet P-40; 0,5 ml 10% SDS; 2,5 ml 10% deoxycholát sodný doplnit do 50 ml H₂O, před použitím přidat inhibitory proteáz a fosfatáz

- **TBS 1x:** 8,72 g NaCl; 1,22 g TRIS base/ 1 l H₂O; upravit na pH 6,8

4.2.3 Použité protilátky

Primární protilátky

Tab. 1: Přehled použitých primárních protilátek.

Protilátka (klon)	Zdroj	Ředění	WB/IF výrobce
AR (N-20)	Králík	1:200/1:50	Santa Cruz
cas-3 (-)	Králík	1:1000	Cell Signaling
ER- α (D-12)	Myš	1:200/1:50	Santa Cruz
ER- β (H-150)	Myš	1:100/1:50	Cell Signaling
mcm-7 (141.2)	Myš	1:500	Santa Cruz
p21(12D1)	Králík	1:1000	Cell Signaling
p53 (-)	Králík	1:800	Cell Signaling
PARP (46D11)	Králík	1:800	Cell Signaling
PR (C-19)	Králík	1:100/1:50	Cell Signaling

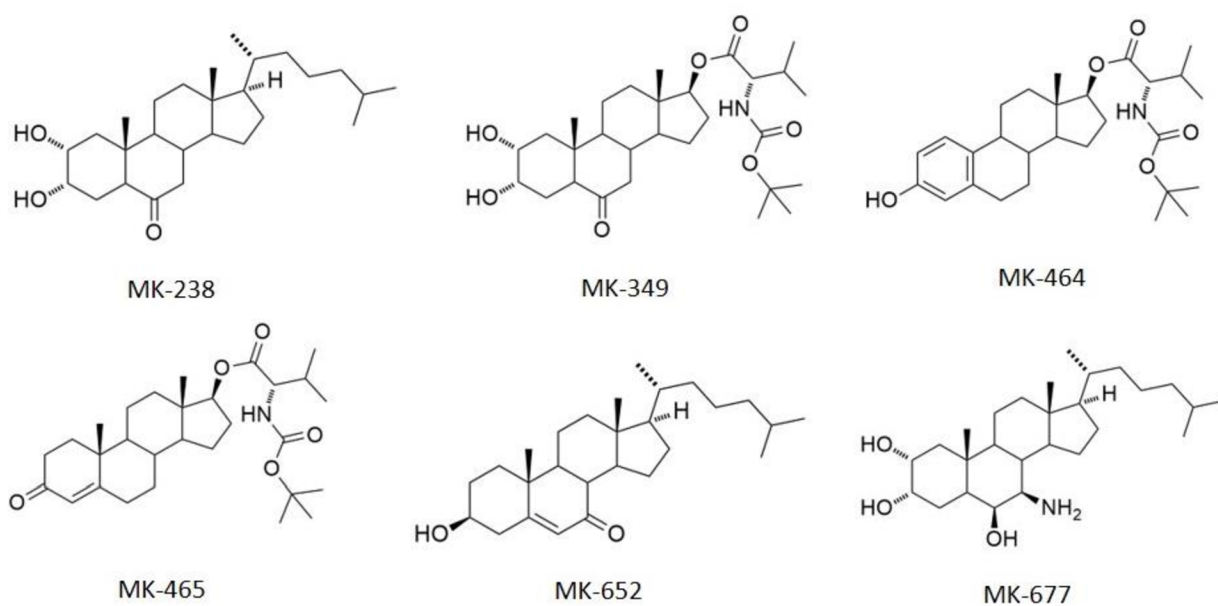
Sekundární protilátky

Tab. 2: Přehled použitých sekundárních protilátek.

Protilátka (klon)	Zdroj	Ředění	WB/IF výrobce
HRP mouse anti-rabbit Ig (monoklonální)	Králíčí proti myším Ig	1:6000	Cell Signaling
HRP rabbit anti-goat Ig (polyklonální)	Kozí proti králíčím Ig	1:6000	Cell Signaling
Alexa Fluor 594 (monoklonální)	Kozí proti myším Ig	1:1000	Life Technologies
Alexa Fluor 488 (polyklonální)	Kozí proti králíčím Ig	1:1000	Life Technologies

4.2.4 Testované cholestanové deriváty

Testované cholestanové deriváty jsou součástí knihovny syntetických cholestanů příbuzných brassinosteroidům, které nám byly dodány Laboratoří růstových regulátorů PřF UP v Olomouci. Velké poděkování patří dr. Miroslavu Kvasnicovi, který se syntézou derivátů zabývá. Strukturální vzorce testovaných cholestanů a jejich analogů znázorňuje Obr. 8. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na 10 mM zásobní koncentraci. Požadované koncentrace testovaných látek byly následně připraveny přidáním zásobních roztoků do příslušného média.



Obr. 8: Strukturální vzorce testovaných derivátů cholestanu a jejich analogů.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

4.3.1 Přístrojové vybavení

- Aparatura pro vertikální elektroforézu - Bio-Rad
- Autokláv - Microjet
- Blotovací systém Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell - Bio-Rad
- Centrifuga 3K30 - Sigma
- Centrifuga MR22i - Jouan
- CO₂ inkubátor Heracell - Thermo Scientific
- Elektroforetický zdroj MP-300V - Major Science
- Flow-box s vertikálním prouděním vzduchu - Thermo Scientific
- Fluorescenční mikroskop BX50F - Olympus
- Odyssey Fc detekční systém - Li-Cor Biotechnology
- Odsávací systém - Millipore
- Průtokový cytometr BD FACSVerser™ - Becton Dickinson
- Spektrofotometr PowerWave XS - BIOTEK® Instruments
- Stolní minicentrifuga MiniSpin - Eppendorf
- Světelný mikroskop Eclipse TS100 - Nikon
- Termoblok AccuBlock™ Digital Dry Bath - Labnet
- Třepačka SHAKER S-3.16 L - SKYLine
- Vakuová pumpa - Millipore
- Vodní lázeň TW8 - Julabo
- Vortex MaXiMix™ II - Thermolyne

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Pro vypracování praktické části bakalářské práce byly použity níže popsané experimentální a vyhodnocovací metody.

4.4.1 Kultivace a pasážování buněk

Každá z výše uvedených buněčných linií (Bx PC-3, MIA PaCa-2 a BJ) nese pro svou kultivaci určitá specifika a požadavky. Buňky Bx PC-3 byly kultivovány v RPMI médiu, obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (FBS), 2 M L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný a antibiotika penicilin (1 U/ml) a streptomycin (1 U/ml). Buněčná linie MIA PaCa-2 byla kultivována v médiu DMEM s obsahem 20% FBS, 20,5% koňského séra, 2 mM L-glutaminu a antibiotik penicilinu (1 U/ml) a streptomycinu (1 U/ml). Nenádorová buněčná linie BJ byla kultivována v DMEM s obsahem 10% FBS, 2 mM L-glutaminu a antibiotik penicilinu (1 U/ml) a streptomycinu (1 U/ml). Všechny tři buněčné linie jsou adherentní, rostou v monovrstvě v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37°C, za přítomnosti 5% oxidu uhličitého a 100 % vlhkosti. Buňky se v kultuře dělí, tzv. proliferují a je nutné je pasážovat. Pasážování představuje periodické “ředění buněk“ obecně spojené s výměnou starého média za čerstvé. Frekvence pasážování se odvíjela dle konkrétních potřeb dané linie na prostor a přísun živin. K provedení pasáže byly buňky 3× promyty roztokem PBS a následně byl použit 0,25% trypsin-EDTA, který enzymaticky uvolní buňky od podkladu. Po 5–10 min v inkubátoru bylo k uvolněným buňkám přidáno příslušné médium s obsahem FBS a tím je působení enzymu zastaveno. Buněčná suspenze byla centrifugována při otáčkách 1500 rpm po dobu 5 min při 25 °C. Po stočení bylo médium odstraněno a k peletu přidáno nové médium a buňky byly resuspendovány.

4.4.2 Ovlivnění buněk testovanými deriváty

Námi kultivované buněčné linie byly po pasáži spočítány prostřednictvím Bürkerovy komůrky a z matematického vztahu byl určen počet buněk nacházející se v 1 ml. Poté byla každá linie podle počtu nasazena do příslušných kultivačních nádob podle experimentu. Po 24 h bylo médium vyměněno za médium obsahující testované látky, jejichž inkubace probíhala 24 a příp. 48 h. V případě kontrolních buněk bylo do kultivačního média přidáno DMSO, jehož koncentrace nepřesáhla 0,3 %.

4.4.3 Test viability buněk

Test buněčné viability byl proveden pomocí MTT testu. Jedná se o kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity, díky kterému lze stanovit závislost účinku

koncentrace námi testované látky na životaschopnost buněk. K MTT testu byly použity kultivované buněčné linie (Bx PC-3, MIA PaCa-2, BJ), které byly nasazeny podle typu buněčné linie ve 100 μ l kultivačního média v počtu 5 000 buněk (Bx PC-3), 4 000 buněk (MIA PaCa-2), a 7 000 buněk (BJ) na každou jamku 96-jamkových mikrotitračních destiček. Staré médium bylo následující den buňkám z jamek odsáto, načež bylo přidáno 100 μ l nového média obsahující testovanou látku v sestupné koncentrační řadě po dobu 24 nebo 48 h. Jako kontrola sloužily buňky kultivované v médiu bez testovaných látek, resp. s přídatkem roztoku DMSO, přičemž jeho koncentrace nepřesáhla 0,3 % v médiu. Po uplynutí inkubace testovaných látek bylo do jamek přidáno 10 μ l 0,5% činidla MTT, jedná se o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid. Po přidání MTT činidla došlo u buněk s metabolickou aktivitou ke vzniku fialových krystalů formazanu. Ty poté byly rozpuštěny ve 100 μ l 10% dodecylsulfátu sodného (SDS). Po uplynutí inkubační doby byla spektrofotometricky změřena absorbance roztoku jednotlivých jamek při 570 nm. Absorbance přímo úměrně odpovídala množství živých buněk. Na tomto podkladu byla určena hodnota IC₅₀, což je koncentrace testované látky, která z 50 % inhibuje viabilitu buněk.

4.4.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Před analýzou buněčného cyklu na průtokovém cytometru byla provedena kultivace buněčných linií Bx PC-3 a MIA PaCa-2 ve sterilních Petriho miskách s průměrem 60 mm. Buněčná linie Bx PC-3 v počtu 5×10^5 buněk a linie MIA PaCa-2 byla nasazena v počtu 4×10^5 buněk. Druhý den byly buňky ovlivněny testovaným derivátem v koncentracích 2, 4 a 6 μ M. Ovlivnění bylo provedeno po dobu 24 a 48 h. Ke kontrolním buňkám bylo místo testované látky přidáno DMSO.

Po kultivaci bylo kultivační médium odsáto a buňky v misce 2 \times promyty 3 ml PBS. Následně byly buňky sklizeny trypsinizací, kdy byl na 5 min přidán 0,25% trypsin-EDTA, čímž došlo k jejich uvolnění ze dna misek. Za pomoci příslušného média byly buňky z Petriho misek opláchnuty a stočeny při otáčkách 1500 rpm po dobu 10 min při 4 °C ve zkumavkách s kónickým dnem. Médium bylo poté opatrně odsáto a pelet resuspendován ve 3 ml PBS. Následně byla zopakována centrifugace za shodných podmínek. Supernatant byl opět odpipetován a pelet resuspendován v 50 μ l PBS. Za nepřetržitého jemného míchání byl ke vzorkům po kapkách přidáván 1 ml vychlazeného 70% ethanolu. Tímto byly membrány buněk permeabilizovány pro snadný průnik DNA sondy membránou do buňky. Pro další postup byly zafixované buňky uloženy do -20 °C.

Před samotnou průtokovou cytometrií byly vzorky centrifugovány při otáčkách 1200 rpm po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 3 ml PBS s obsahem 2 % FBS. Poté byly vzorky ponechány 10 min na ledu. Centrifugace byla zopakována při 1200 rpm, po dobu 5 min při 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a pelet resuspendován v 50 µl PBS s 0,2 mg/ml RNasy A. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkuhavky, ve které byla 15 min inkubována ve vodní lázni při 37 °C. Po přidání propidium jodidu (100 µg/ml) o objemu 200 µl, následovalo 15 min inkubace na ledu ve tmě. Poté přišla na řadu analýza vzorků za pomoci průtokového cytometru BD FACSVerserTM. Analýza spočívá v excitaci DNA sondy a následné emisi záření, která koreluje s množstvím DNA v buňce. Z tohoto lze určit v jaké fázi buněčného cyklu se buňky nacházejí. Ovlivněné buňky byly porovnány s buňkami kontrolními.

4.4.5 Western blot analýza

Pro tuto analýzu byly buněčné linie Bx PC-3 (v počtu 9×10^5) a MIA PaCa-2 (v počtu $7,5 \times 10^5$) nasazeny do kultivačních misek s průměrem 100 mm. Po adheraci buněk následovala inkubace, po které byly buňky ovlivněny testovanou látkou v koncentraci 2, 4 a 6 µl po dobu 24 a 48 h. Experiment zahrnovaly také kontrolní vzorky kultivované jen s médiem a s DMSO. Po inkubaci byl proveden 3× oplach pomocí PBS roztoku. Důkladně odsáté misky byly zamrazeny při teplotě 80 °C pro další zpracování.

Dalším krokem bylo sklizení buněk. Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna na ledu, a to proto, aby nedocházelo k případné denaturaci proteinů. Centrifuga a používané roztoky byly taktéž chlazeny, konkrétně na 4 °C. Z misek byly pomocí sterilní škrabky seškrábány buňky do sterilních mikrozkuhovek. K tomuto byl použit protein extrakční pufr PEX (0,3 M TRIS/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1%; 10% SDS; 10% deoxycholát sodný v deionizované vodě) s přidanými inhibitory fosfatáz (10× koncentrovaný roztok) a proteáz (7× koncentrovaný roztok). Objem lyzačního pufru byl zvolen na základě množství buněk, aby nedošlo k případnému naředění proteinů. Vzorky byly poté inkubovány po dobu 60 min na ledu a každých 10 min intenzivně vortexovány, čímž došlo k lyzaci membrán buněk a uvolnění proteinů do pufru. Následovala centrifugace při otáčkách 20 000 rpm po dobu 30 min při 4 °C. Supernatant byl poté přenesen do čistých mikrozkuhovek.

Pro určení koncentrace proteinů v získaných vzorcích bylo využito Bradfordovy metody. Bradfordovo činidlo bylo naředěno deionizovanou vodou v poměru 1:4. Do čistých mikrozkuhovek bylo napipetováno po 1 ml roztoku Bradfordova činidla a 1 µl vzorku.

Byly připraveny také standardy, na které byl použit hovězí sérový albumin (BSA, 1 mg/ml) v koncentrační řadě 0,5 µl; 1,0 µl; 2,0 µl a 5,0 µl na 1 ml Bradfordova činidla. Blank byl tvořen pouze činidlem. Vzorky, standardy a blank byly napipetovány v tripletech do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Jejich absorbance byla měřena pomocí spektrofotometru PowerWave XS při vlnové délce 595 nm. Pomocí nejnižší hodnoty absorbance a absorbancí standardů byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. Následně byl ke vzorkům lyzátů přidán 4× koncentrovaný Laemmliho LSB pufr (1M TRIS pH 6,8; glycerol; 10% SDS; β-merkapt ethanol, 0,5% bromfenolová modř). Poté byl přidán 1× koncentrovaný LSB pufr, který sloužil k dorovnání objemu všech vzorků. Výsledná koncentrace proteinů ve vzorcích byla 18 µg/10 µl. Nakonec byly vzorky na 2 min zahřáty na 96 °C v termobloku AccuBlock™ Digital Dry Bath a takto připravené vzorky byly poté uloženy do -20 °C k dalšímu použití.

Dalším krokem byla elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu. Pro tuto separaci bylo nutné nejprve připravit elektroforetickou aparaturu, elektroforetický pufr a polyakrylamidový gel, který byl tvořen dvěma vrstvami – 12% dělicím gelem a 10% zaostřovacím gelem. Gely byly připraveny za použití deionizované vody, směsi akrylamidu-bisakrylamidu (29:1), 1,5 M TRIS pufru (pH 8,8), 10% SDS, 10% persulfátu amonného a N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED). Nejprve byl nanesen dělicí gel, na který byl navrstven N-butanol, díky kterému byla vrstva gelu vyrovnána a bez vzduchových bublin. Po zhruba 40 minutách byl gel ztuhlý a N-butanol byl pomocí filtračního papíru odsát do sucha. Následovalo nanesení zaostřovacího gelu (za použití deionizované vody, směsi akrylamidu-bisakrylamidu (29:1), 1 M TRIS pufru (pH 6,8), 10% SDS, 10% persulfátu amonného a TEMED), do kterého byl okamžitě vložen 15-jamkový hřebínek. Po 20 minutách byl zaostřovací gel ztuhlý a hřebínek odstraněn. Již připravená elektroforetická aparatura byla naplněna elektroforetickým pufrem (25 mM TRIS; 250 mM glycin; 0,1% SDS, pH 8,3). Následovalo nanesení LSB pufru do krajních jamek a markeru molekulové hmotnosti Full-Range Rainbow do jamky v pořadí druhé. Dále byly nanесeny vzorky, čemuž předcházelo zahřátí na 96°C. Separace proteinů probíhala zhruba 120 min při napětí 120 V. Separace byla náležitě hlídána, aby nedošlo ke ztrátě proteinů.

Po separaci byl gel opatrně přemístěn do transferového pufru (39 mM glycin; 48 mM TRIS-báze; 0,037% SDS a 20% methanol) a 40 min za mírných otáček třepán na třepače. Poté byl připraven tzv. blotovací sendvič, který se skládal z vlhkého filtračního papíru, nitrocelulosové membrány, gelu a opět vlhkého filtračního papíru. Pomocí blotovacího systému Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell byl proveden přenos proteinů

na nitrocelulózovou membránu, a to po dobu 30 min při napětí 10 V. Následně byla membrána vyjmuta a 5 min barvena roztokem Ponceau S, čímž došlo k vizualizaci přenesených proteinů. Dále byla membrána opláchnuta destilovanou vodou a odbarvena roztokem kyseliny octové ředěné destilovanou vodou v poměru 1:10. Pro další práci byla membrána vysušena.

Nitrocelulózová membrána byla nařezána na proužky, a to dle molekulových hmotností proteinů našeho zájmu. Pro zabránění nespecifických vazeb byly nařezané proužky blokovány po dobu 2 hod v 5% roztoku BSA naředěném v TBS-T (0,01 mM TRIS; 0,0137 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,6) nebo v 5% blokovacím mléku (sušené odtučněné mléko, 1,3 % tuku, PML; PBS; 0,1% Tween 20) podle typu protilátky. Na proužky byly poté nanесeny primární protilátky viz Tab. 1 ředěné opět buď v 5% roztoku BSA v TBS, anebo v 5% mléku. Inkubace primárních protilátek probíhala přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Druhý den byly proužky hodinu promývány na třepače, čímž se odmyly nenavázané primární protilátky. Každých 10 min po dobu 1 hod byl promývací roztok (PBS s Tweenem, nebo případně TBS-T) pravidelně vyměňován za čistý. Proužky byly následně vyjmuty a byly na ně aplikovány sekundární protilátky viz Tab. 2. Inkubace trvala 45 min při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly nenavázané protilátky odmyvány 1 h v promývacím roztoku (PBS s Tweenem či TBS-T) a každých 10 min byl roztok měněn za čistý. Poté byly již proužky nachystány na detekci. Byl využit chemiluminiscenční systém DURO (1:1), popř. FEMTO (1:1). Díky křenové peroxidáze, navázané na sekundární protilátce, která reaguje s chemiluminiscenčním substrátem a enzymaticky jej štěpí, vzniká nestabilní produkt. Při stabilizaci tohoto produktu dochází k vyzáření světla, což detekujeme jako chemiluminiscenční signál, přičemž intenzita signálu koreluje s množstvím detekovaného proteinu. Tento signál byl detekován pomocí systému Odyssey Fc.

4.4.6 Imunofluorescenční barvení buněk

Sterilní kulatá krycí sklíčka byla vložena do Petriho misek s průměrem 60 mm. Na tato sklíčka byly nasazeny buňky Bx PC-3 a MIA PaCa-2 ve stejném počtu jako v kapitole 4.4.4. Následovala inkubace, poté odsátí starého média a opláchnutí buněk PBS pufrem. Buňky jsme dále ovlivnili testovanou látkou o koncentracích 2, 4 a 6 μM po dobu 24 a 48 h. Po inkubaci bylo médium s testovanou látkou odsáto. Buňky byly promyty 3 \times pufrem PBS a následně fixovány po dobu 10 min vychlazeným roztokem aceton/methanol (1:1). Po důkladném odsátí a vypaření fixačního roztoku byly misky uloženy na -20 °C pro další zpracování.

Při detekci byly buňky fixované na sklíčku zavodněny PBS pufrem a za použití 1% BSA při laboratorní teplotě byly 30 min blokovány. Na sklíčko bylo nanášeno 80 μ l primární protilátky (Tab. 1), která byla inkubována přes noc ve tmě ve vlhké komůrce při 4 °C. Následovalo další promytí v PBS pufrem. Poté byla aplikována fluorescenčně značená sekundární protilátka o objemu 80 μ l na sklíčko (Alexa Fluor 594 kozí anti-myší IgG nebo Alexa Fluor 488 kozí anti-králičí IgG). Sekundární protilátka byla inkubována 90 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po této době byla protilátka promyta PBS pufrem, po kterém následovalo barvení buněčných jader pomocí 50 μ g/ml barvičky DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) o objemu 100 μ l na sklíčko při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 10 min. Po promytí PBS pufrem a finálně destilovanou vodou byla sklíčka přichycena pomocí vodního média mowiolu na podložní skla. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byla provedena detekce. Byla porovnána exprese a umístění jaderných receptorů v buňkách ovlivněných testovaným cholestanovým derivátem a buňkách neovlivněných kontrolních.

4.4.7 Statistické zpracování dat

Experimenty byly nezávisle zopakovány alespoň třikrát. Z každé série dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno Studentovým t-testem a v programu GraphPad Prism 8.

5 VÝSLEDKY

Pro naše experimenty jsme použili buněčné linie karcinomu pankreatu Bx PC-3 a MIA PaCa-2. K porovnání účinku testovaných látek sloužila nenádorová linie BJ. Tyto buněčné linie byly ovlivňovány cholestanovými deriváty, které jsou vyobrazeny výše na Obr. 8. Pozorovali jsme účinek testovaných látek na viabilitu buněk, kterou jsme analyzovali pomocí MTT testu. Sledovali jsme účinek vybrané testované látky na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie a Western blot analýzy. Dále jsme detekovali expresi a lokalizaci některých steroidních receptorů pomocí imunofluorescenčního barvení a Western blot analýzy.

5.1 Vliv cholestanových derivátů na viabilitu buněk

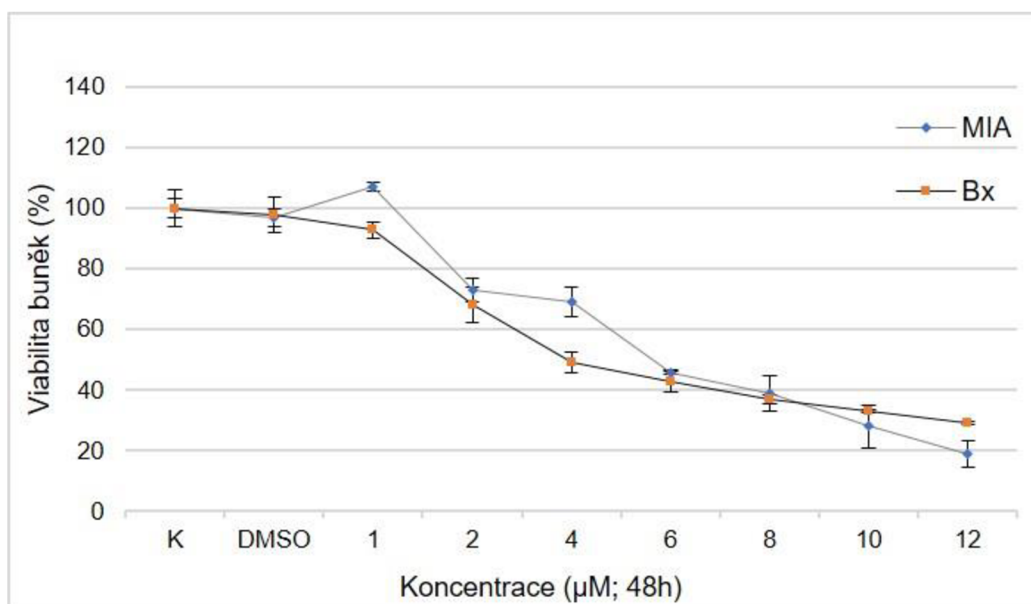
Po ovlivnění buněčných linií testovanými cholestanovými deriváty (**1-6**) byla pomocí MTT testu stanovena koncentrace IC_{50} , která inhibovala buněčnou viabilitu z 50 %. Účinek látek byl porovnán s nenádorovou buněčnou linií BJ. Výsledky MTT testu jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Výsledná cytotoxicita cholestanových derivátů a jejich analogů po 48 h inkubaci.

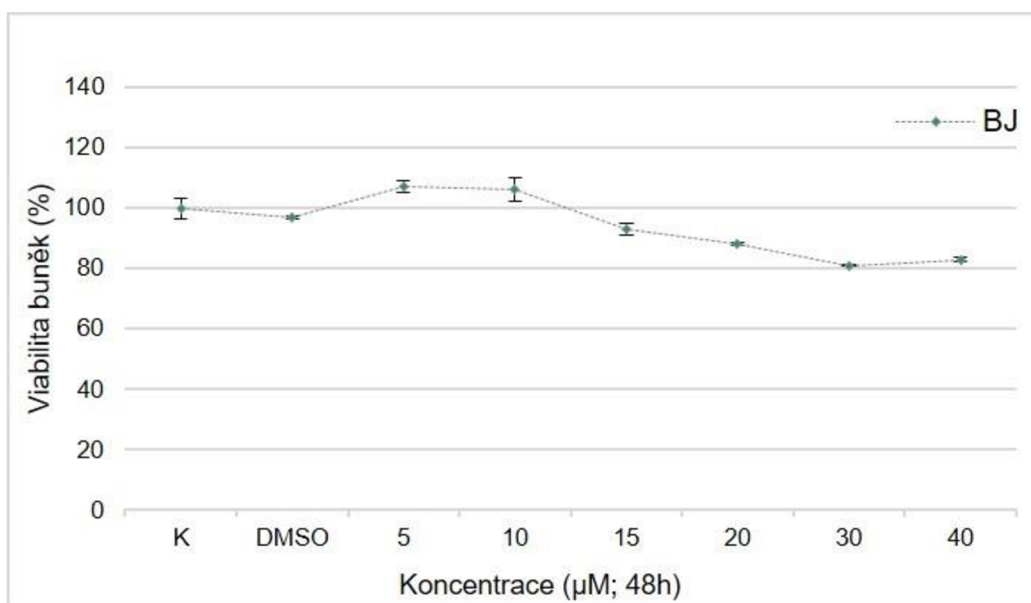
Testované látky	Cytotoxicita; IC_{50} (μ M); 48 h		
	Bx PC-3	MIA PaCa-2	BJ
(1) MK-238	>50	>50	>50
(2) MK-265	45,1 \pm 0,6	48,5 \pm 1,9	49,6 \pm 2,9
(3) MK-349	>50	>50	>50
(4) MK-464	45,2 \pm 0,8	35,4 \pm 2,2	32,2 \pm 0,6
(5) MK-465	48,4 \pm 1,1	47,1 \pm 1,5	42,8 \pm 2,6
(6) MK-677	4,2 \pm 1,6	5,1 \pm 0,6	>50

Testované látky **1–5** měly na nádorové i nenádorové buňky podobně cytotoxický účinek. Ze všech testovaných látek vyšla nejlépe látka **6** (MK-677), která měla silný cytotoxický účinek na nádorové buňky, a zároveň neovlivnila viabilitu buněk nenádorových. Hodnota IC_{50} látky **6** byla stanovena na 4,2 μ M u linie Bx PC-3 a 5,1 μ M u linie MIA PaCa-2 (Obr. 9A). U nenádorové linie BJ viabilita buněk neklesla pod 50 %, proto koncentrace IC_{50} vyšla vyšší než 50 μ M (Obr. 9B). Rozhodli jsme se, že účinek vybrané látky **6** budeme sledovat v časových intervalech 24 a 48 h u obou nádorových buněčných linií ve třech stejných koncentracích, které zahrnují stanovené koncentrace IC_{50} . Změny v morfologii nádorových buněk po ovlivnění látkou **6** o koncentracích 2, 4 a 6 μ M, jsou znázorněny na Obr. 10.

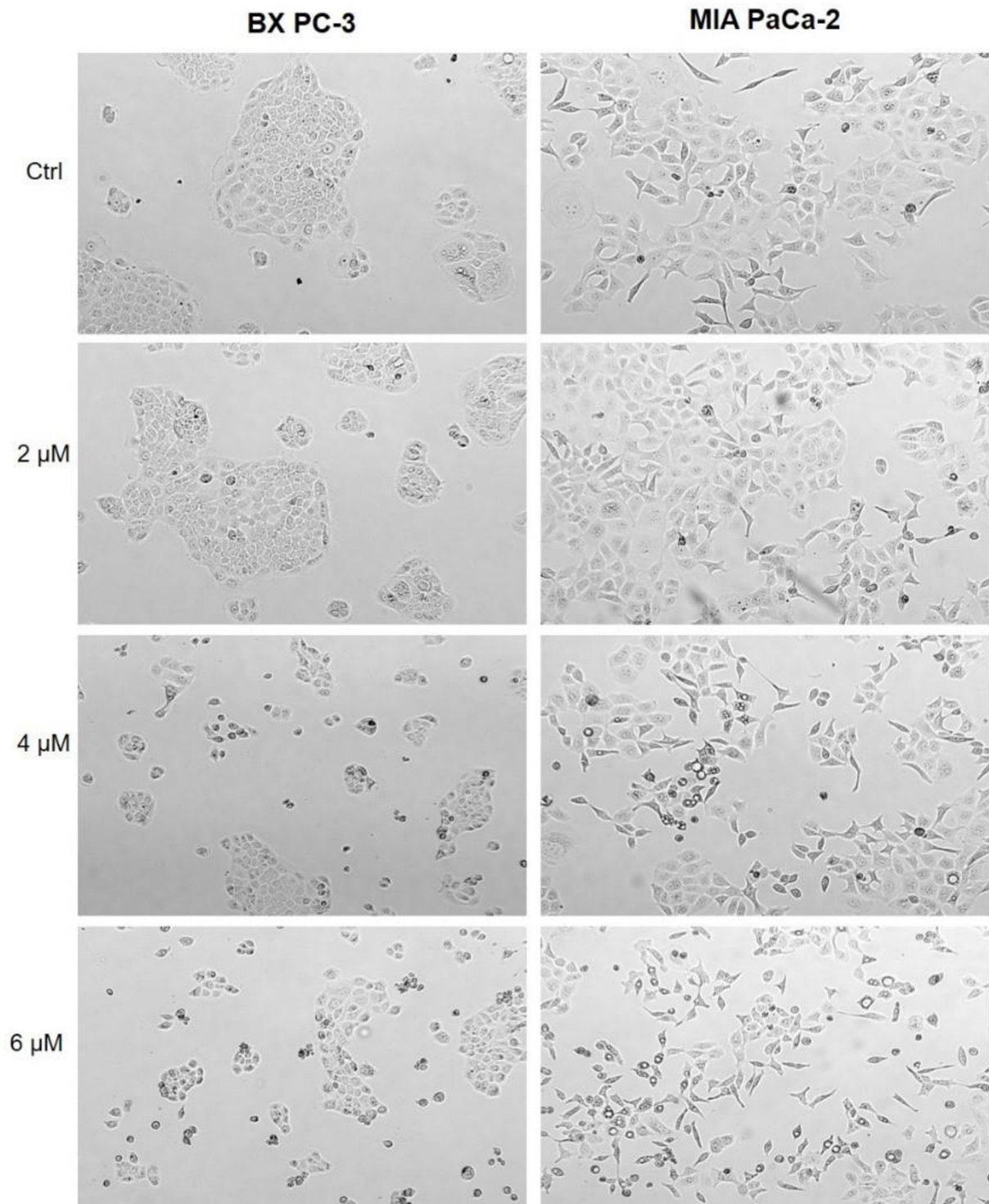
A)



B)



Obr. 9: Vliv testovaného derivátu 6 (A) v koncentracích 1–12 μM na buněčnou viabilitu nádorových buněk Bx PC-3 a MIA PaCa-2 a (B) v koncentracích 5–50 μM na viabilitu BJ buněk nenádorových po dobu 48 h.



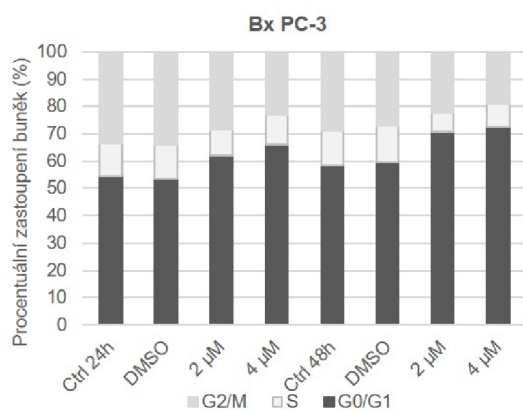
Obr. 10: Změny morfologie buněk po ovlivnění testovanou látkou 6 v koncentracích 2, 4 a 6 μM (48 h) vzhledem ke kontrolním (Ctrl) buňkám (zvětšení 20x).

5.2 Vliv testovaného derivátu na buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie a Western blot analýzy

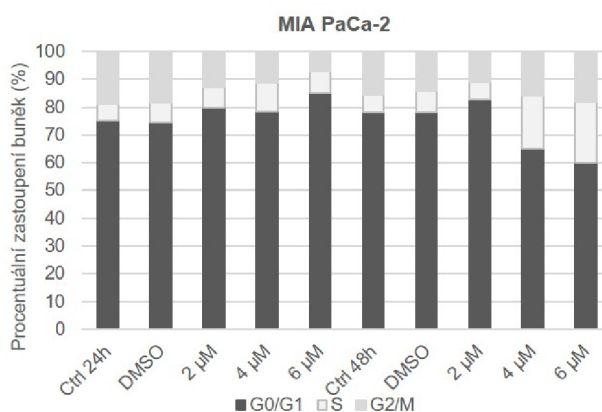
Následujícím experimentem, který byl proveden, byla analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Buněčné linie Bx PC-3 a MIA PaCa-2 byly ovlivněny testovanou látkou **6** ve třech koncentracích (2, 4 a 6 μM) po dobu 24 a 48 h. Na základě průtokové cytometrie byl v jednotlivých vzorcích obarvených propidiem jodidem změřen obsah buněčné DNA, který byl následně převeden na procentuální vyjádření množství buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Buňky Bx PC-3 ovlivněné testovaným derivátem v koncentraci 6 μM v obou časech nebyly do analýzy zahrnuty z důvodu malého počtu buněk.

U obou buněčných linií byla pozorována akumulace buněk v G_1 fázi buněčného cyklu po obou časových intervalech, výrazněji po 24h působení testované látky v 4 a 6 μM koncentraci (Obr. 11). U buněk MIA PaCa-2 jsme zaznamenali po 48h působení látky pokles zastoupení buněk v G_1 fázi buněčného cyklu doprovázený akumulací buněk v S-fázi (Obr. 11B).

A)



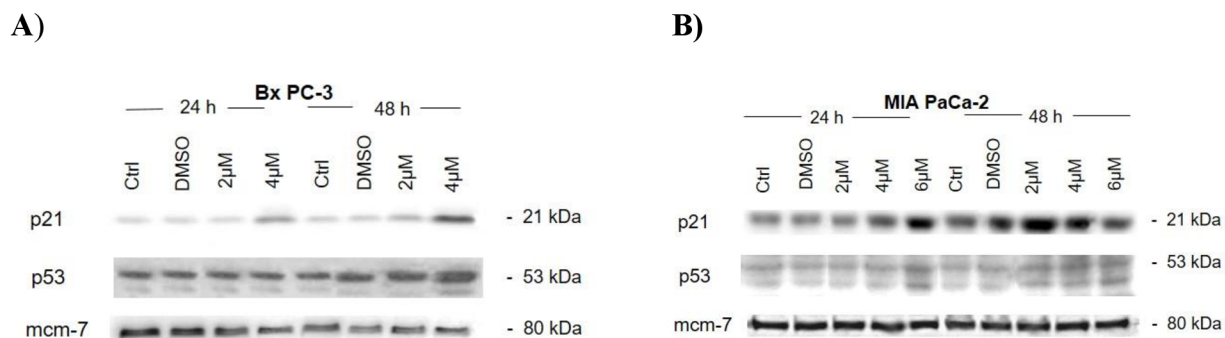
B)



Obr. 11: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u buněčné linie (A) Bx PC-3 a (B) MIA PaCa-2.

Pomocí Western blot analýzy byly výsledky z průtokové cytometrie doplněny o sledování exprese proteinů pro p21 (21 kDa) a p53 (53 kDa). Buněčné linie Bx PC-3 a MIA PaCa-2 byly ovlivněny testovanou látkou **6** o koncentraci 2, 4 a 6 μM po dobu 24 a 48 h (Obr. 12). U buněčné linie Bx PC-3 ovlivněných látkou v 6 μM koncentraci v obou časech bylo

bohužel získáno málo proteinů, a proto tato koncentrace nebyla do WB detekce zařazena. Protein mcm-7 sloužil ke kontrole, zda došlo k nanesení rovnoměrného množství proteinů.

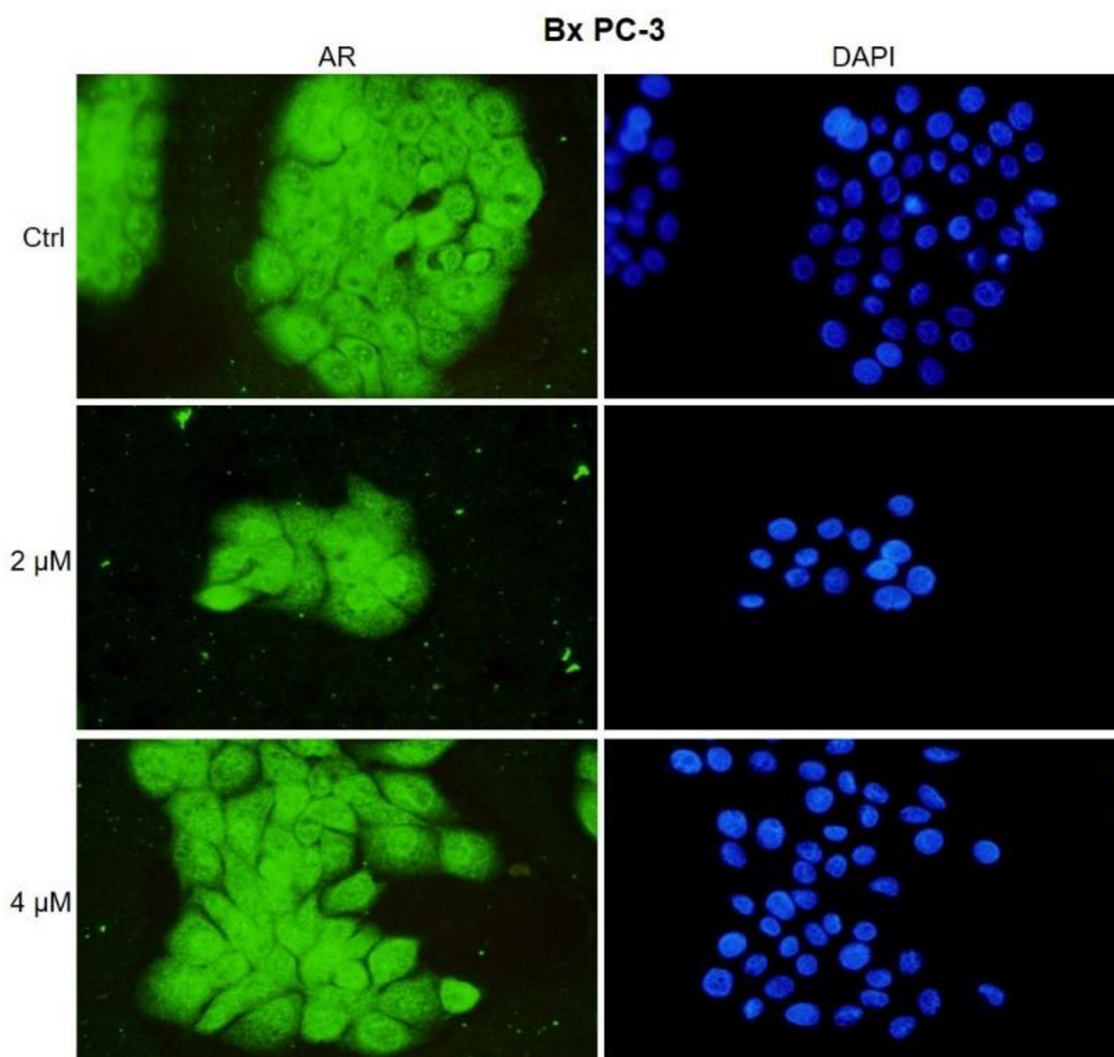


Obr. 12: Imunodetekce proteinů podílejících se na kontrole buněčného cyklu u buněčné linie (A) Bx PC-3 v koncentracích 2 a 4 μM po dobu 24 a 48 h a (B) MIA PaCa-2 ovlivněných testovanou látkou v koncentracích 2, 4 a 6 μM po dobu 24 a 48 h. Expze byla hodnocena v porovnání s kontrolními buňkami (Ctrl, DMSO).

Výsledky detekce proteinu p21 (21 kDa), který v buněčném cyklu inhibuje činnost komplexu tvořeného z cyklin-dependentní kinázy a příslušného cyklinu (CDK/cyklin), vyšly zajímavě. U obou linií aplikace látky vedla ke zvýšení expze tohoto proteinu v porovnání s expzí u kontrolních buněk v obou časových intervalech. U buněk MIA PaCa-2 po 48 h působení testované látky zvýšená expze p21 při 2 μM koncentraci postupně u dalších koncentrací klesala. Nádorový supresorový protein p53 (53 kDa) byl detekován ve zvýšené expzi ve vzorcích ovlivněných 4 μM koncentrací látky 48 h u buněk Bx PC-3 a ve vzorcích ovlivněných 6 μM koncentrací 24 a 48 h u buněk MIA PaCa-2.

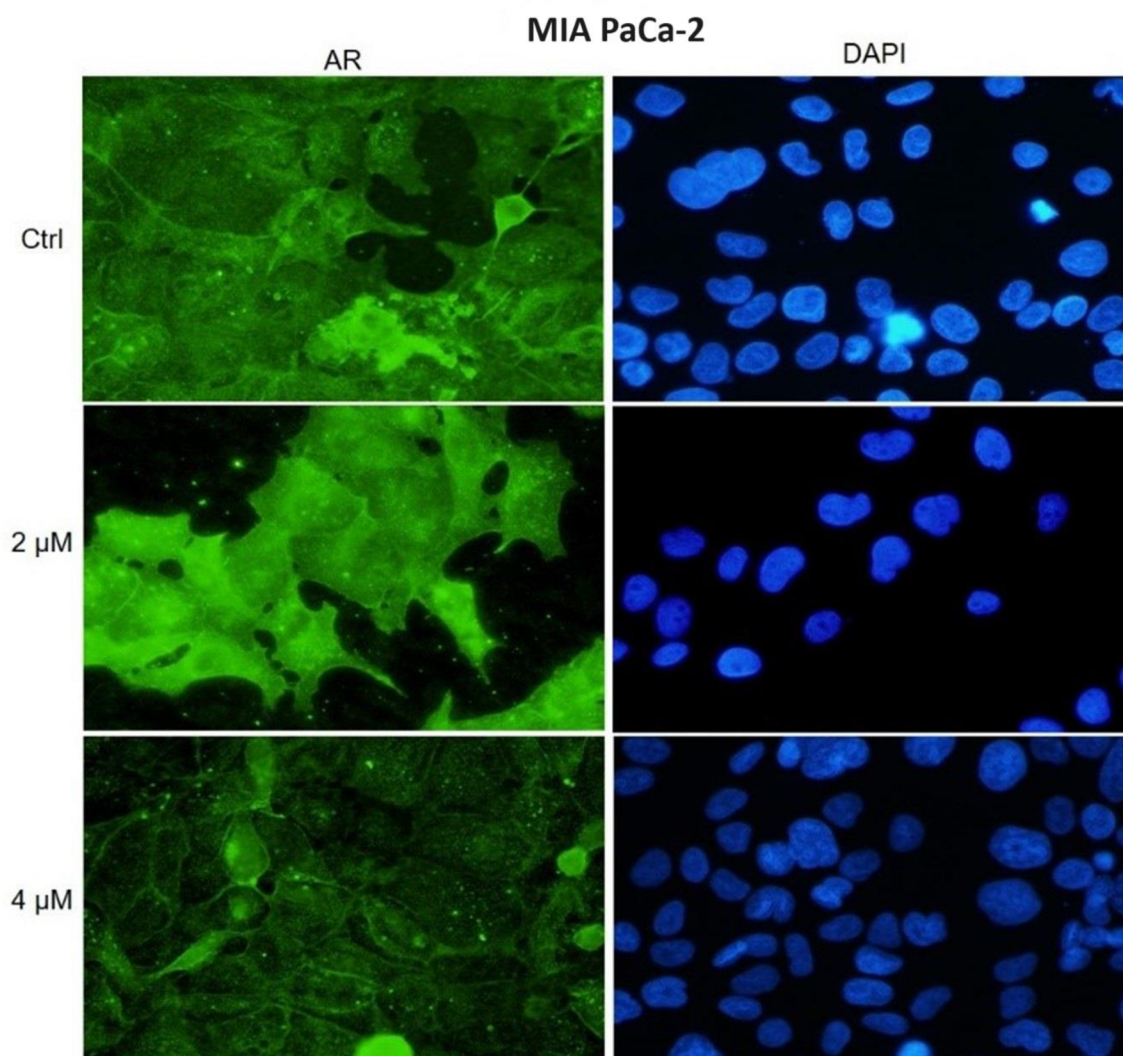
5.3 Vliv testovaného derivátu na expresi receptorů pro steroidní hormony metodou imunofluorescenčního barvení a Western blot analýzou

Pro studium exprese a lokalizace receptorů pro steroidní hormony byla použita metoda imunofluorescenčního barvení. U buněčné linie Bx PC-3 byla u kontrolního vzorku detekována exprese androgenového receptoru (AR) zejména v cytoplazmě. Po ovlivnění látkou **6** o koncentraci 2 a 4 μM byl AR pozorován v cytoplazmě i v jádře viz Obr. 13. Buňky ovlivněné testovanou látkou o koncentraci 6 μM nebyly detekovány z důvodu špatné fixace buněk.



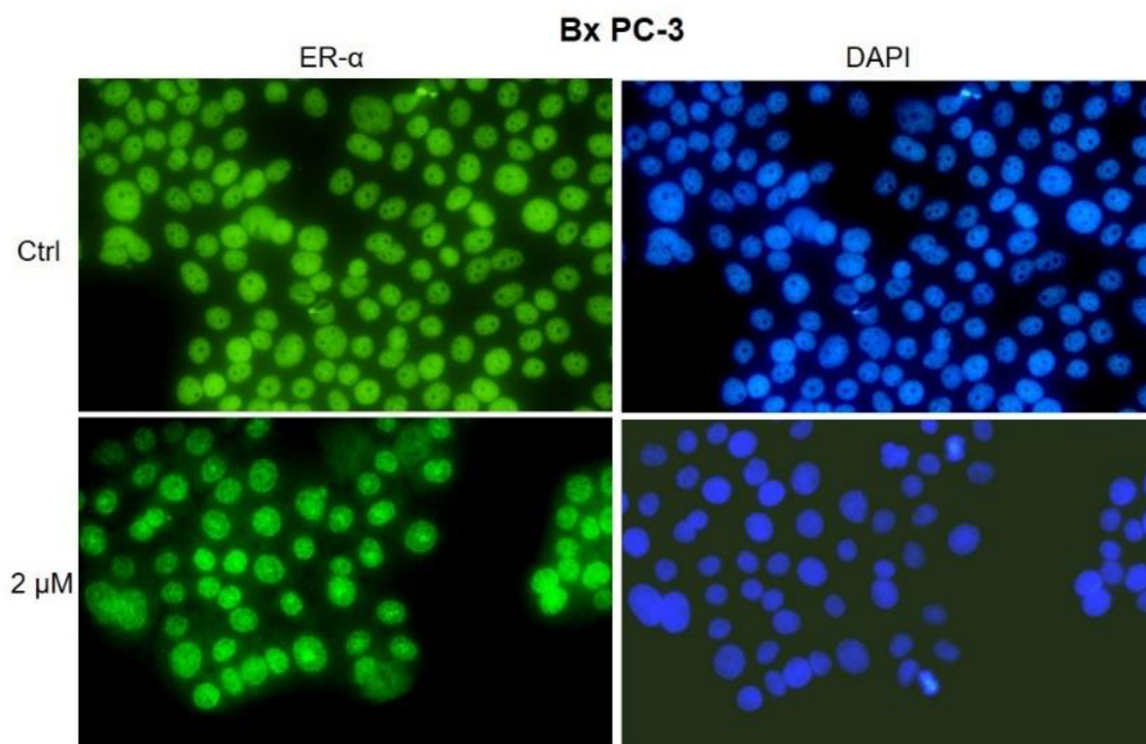
Obr. 13: Imunofluorescenční detekce AR buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou **6** o koncentraci 2 a 4 μM svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Kontrolní vzorek buněčné linie MIA PaCa-2 vykazuje slabou expresi AR. Po ovlivnění látkou 6 o koncentraci 2 μM byla exprese tohoto receptoru výraznější, byla pozorována zejména v cytoplazmě. Ovlivnění buněk koncentrací 4 μM výrazně snížilo expresi AR v buňkách, lokalizace receptoru je lehce patrná po okrajích cytoplazmy (Obr. 14). Buňky ovlivněné testovanou látkou o koncentraci 6 μM nebyly detekovány z důvodu špatné fixace buněk.



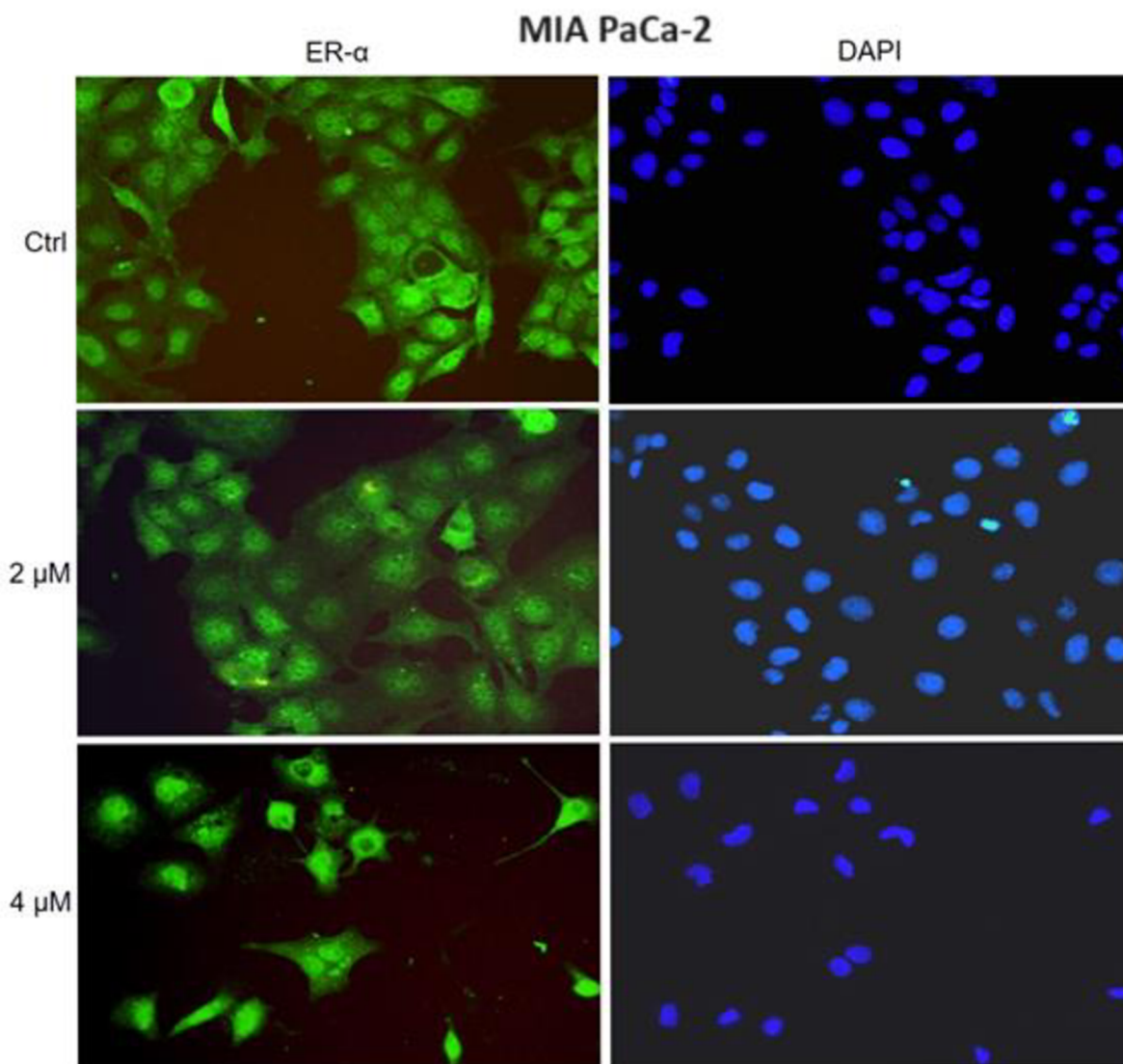
Obr. 14: Imunofluorescenční detekce AR buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 a 4 μM svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Při detekci estrogenového receptoru α (ER- α) buněčné linie Bx PC-3 nebyla po ovlivnění látkou **6** o 2 μ M koncentraci pozorována výraznější změna exprese tohoto receptoru ve srovnání s kontrolním vzorkem, viz Obr. 15. Detekce ER- α u buněk ovlivněných koncentrací 4 a 6 μ M nebyla úspěšná.



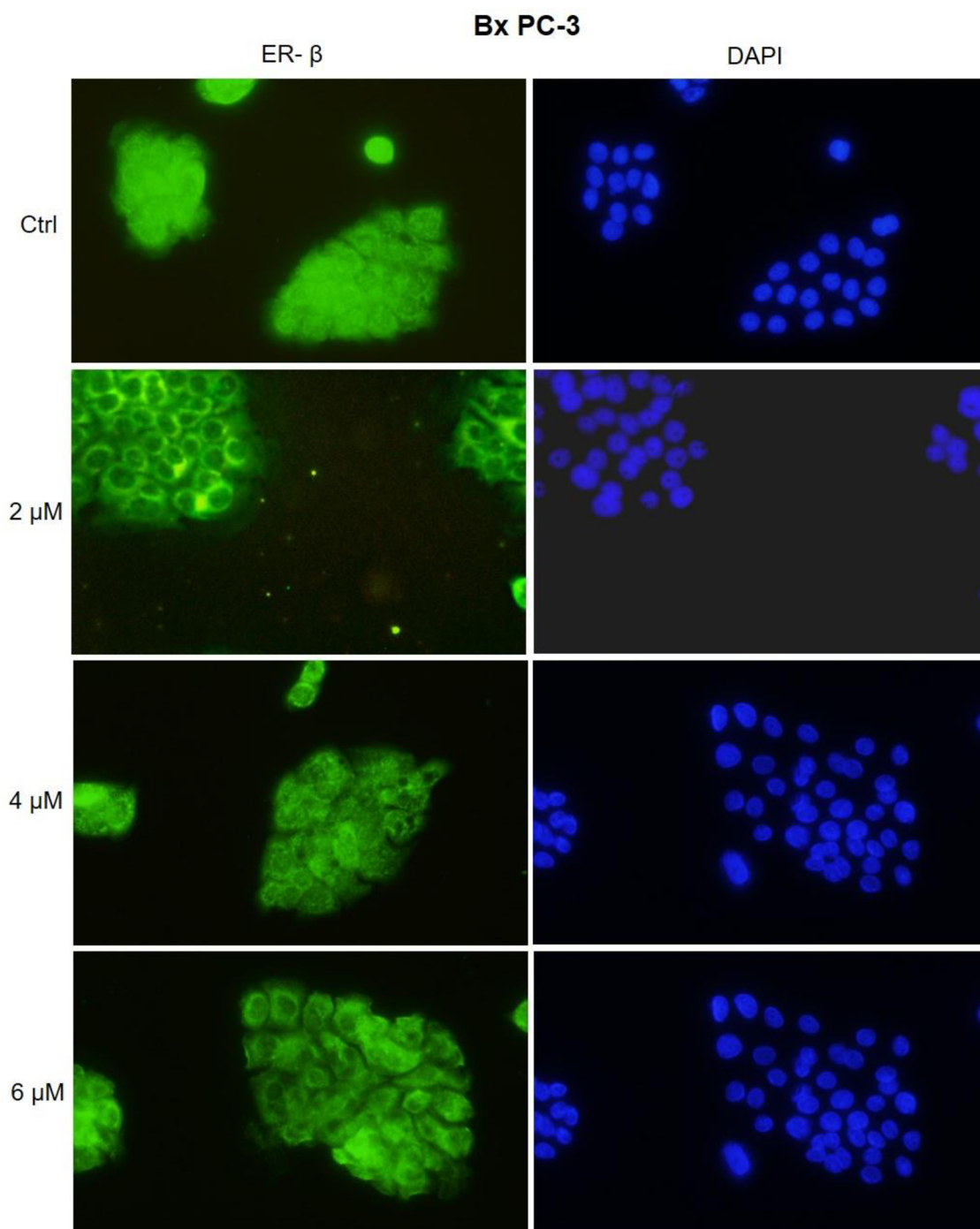
Obr. 15: Imunofluorescenční detekce ER- α buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou **6** o koncentraci 2 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

ER- α byl taktéž přítomen u buněčné linie MIA PaCa-2. Kontrolní vzorek vykazoval expresi v jádře a lehce v cytoplazmě. Po ovlivnění 2 a 4 μ M látkou byla exprese receptoru podobná jako u kontrolních buněk (Obr. 16). Buňky ovlivněné testovanou látkou o koncentraci 6 μ M nebyly detekovány z důvodu špatné fixace buněk.



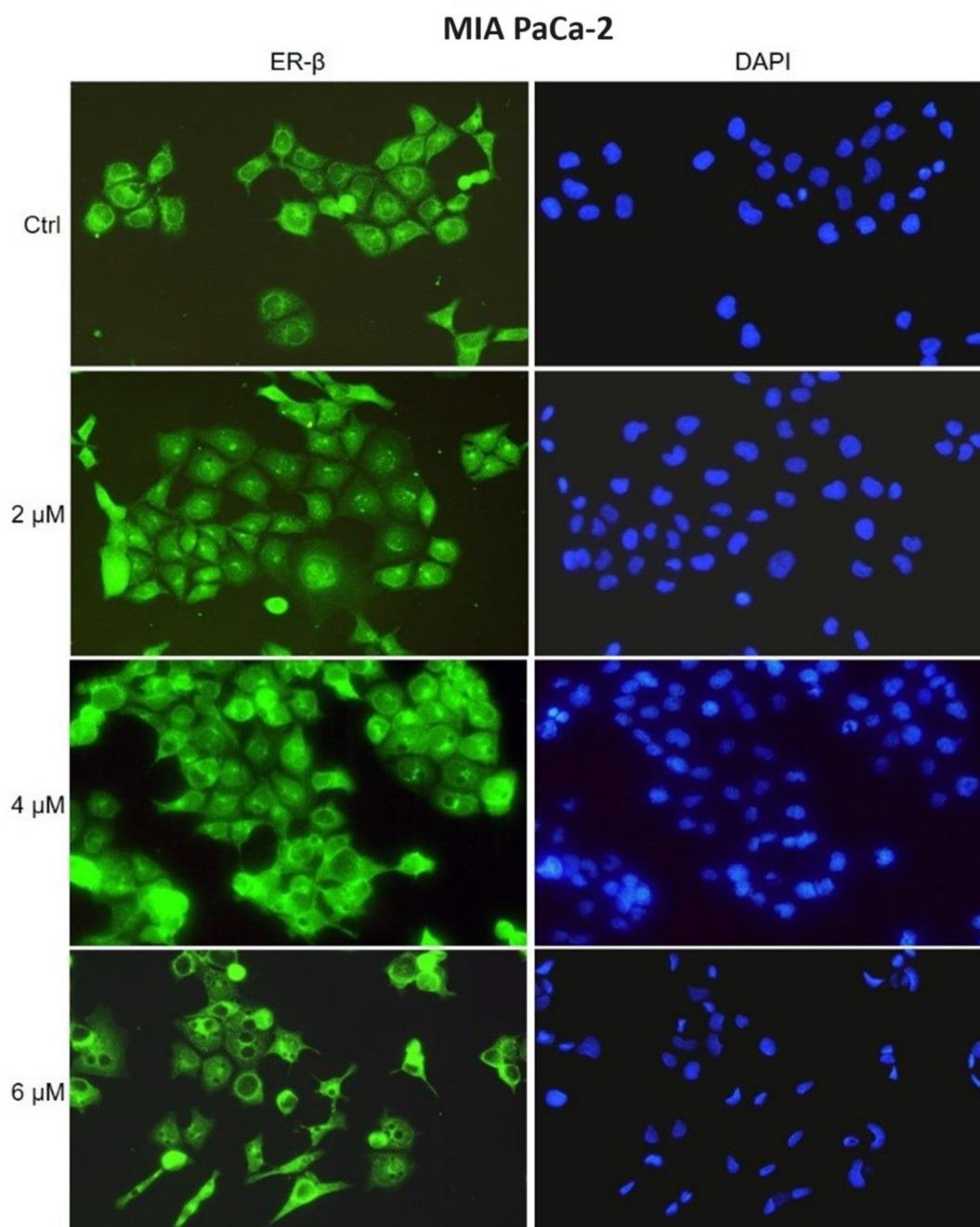
Obr. 16: Imunofluorescenční detekce ER- α buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2 a 4 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Estrogenový receptor β (ER- β) byl u kontrolních buněk Bx PC-3 výrazně lokalizován v jádře i cytoplazmě. Ovlivnění buněk látkou o koncentracích 2, 4 a 6 μM způsobilo navýšení exprese a lokalizaci tohoto receptoru perinukleárně, v okolí jaderné membrány (Obr. 17).



Obr. 17: Imunofluorescenční detekce ER- β buněk Bx PC-3 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou 6 o koncentraci 2, 4 a 6 μM svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

Expres ER- β buněčné linie MIA PaCa-2 byla detekována v jádře i cytoplasmě buněk kontrolních. U ovlivněných buněk látkou **6** o koncentraci 2 μ M byla exprese tohoto receptoru zaznamenána zejména v jádře. U buněk ovlivněných 4 μ M testovanou látkou byla exprese ER- β patrná v jádře ale i perinukleárně. U buněk ovlivněných 6 μ M testovanou látkou byla exprese receptoru převážně pouze perinukleární. (Obr. 18).

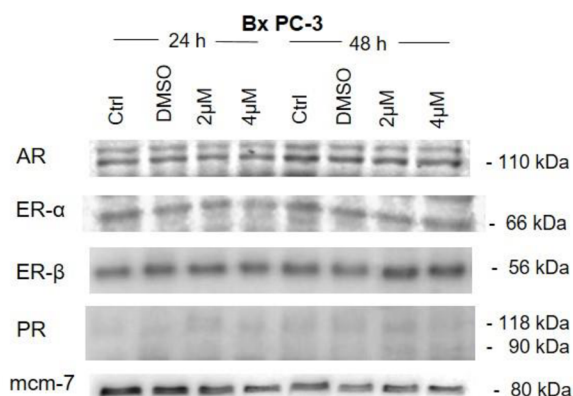


Obr. 18: Imunofluorescenční detekce ER- β buněk MIA PaCa-2 kontrolních (Ctrl) a ovlivněných látkou **6** o koncentraci 2, 4 a 6 μ M svítí zeleně, jádra buněk obarvená pomocí DAPI svítí modře. Zvětšení 40x.

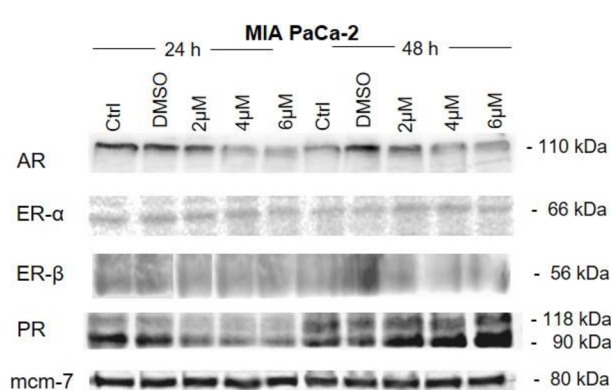
Pomocí Western blot analýzy byly výsledky z imunofluorescence doplněny o sledování exprese proteinů pro androgenový receptor (AR, 110 kDa), estrogenový receptor α (ER- α , 66 kDa), estrogenový receptor β (ER- β , 56 kDa) a progesteronový receptor (PR, 118-90 kDa). Buněčné linie Bx PC-3 a MIA PaCa-2 byly ovlivněny testovanou látkou **6** o koncentraci 2, 4 a 6 μ M po dobu 24 a 48 h. U buněčné linie Bx PC-3 ovlivněných látkou v 6 μ M koncentraci v obou časech bylo bohužel získáno málo proteinů, a proto tato koncentrace nebyla do WB detekce zařazena. Protein mcm-7 představuje rovnoměrné nanesení proteinů ve vzorcích (Obr. 19).

U buněčné linie Bx PC-3 nebyly zaznamenány výraznější změny exprese sledovaných proteinů steroidních receptorů po ovlivnění testovanou látkou vzhledem ke kontrolním buňkám. Pouze exprese ER- β byla u buněk ovlivněných testovanou látkou po 48 h v obou koncentracích zvýšená v porovnání s kontrolními buňkami (Obr. 19A). U buněk MIA PaCa-2 byl detekován AR, u kterého jsme pozorovali snížení exprese s rostoucí koncentrací testované látky po 24 h i 48 h. Oba receptory ER- α a ER- β byly pouze slabě exprimovány v obou časech inkubace s testovanou látkou, a to ve stejné míře. Expresse PR po 24 h byla již o něco vyšší, s rostoucí koncentrací látky se ale i tato exprese snižovala. Pozoruhodné však bylo navýšení exprimovaného PR po 48 h s rostoucí koncentrací testované látky (Obr. 19B).

A)



B)



Obr. 19: Imunodetekce proteinů steroidních receptorů u buněčné linie A) Bx PC-3 ovlivněných testovanou látkou v 2 a 4 μ M koncentracích po dobu 24 a 48 h a B) MIA PaCa-2 ovlivněných testovanou látkou v 2, 4 a 6 μ M koncentracích po dobu 24 a 48 h. Expresse byla vyhodnocena v porovnání s kontrolními buňkami (Ctrl, DMSO).

6 DISKUSE

V předkládané bakalářské práci jsme se zaměřili na působení látek odvozených od cholesterolu na modelu nádorových buněčných linií pankreatu a pokusili se objasnit některé mechanismy účinků, zejména úlohu jaderných receptorů pro steroidní hormony. Tyto receptory jsou členy velké skupiny evolučně konzervovaných ligandem aktivovaných transkripčních faktorů. Zastávají v buňce důležité funkce od regulace metabolismu, udržení buněčné rovnováhy, růst a vývoj až po buněčnou smrt. Vzhledem k těmto schopnostem se staly jaderné receptory velmi slibným cílem pro vývoj léčiv širokého spektra onemocnění, a to včetně těch nádorových (Polvani a kol. 2014). Steroidní hormony jsou již známy svou důležitou rolí v buněčné proliferaci a vývoji mnoha typů nádorů. V rámci hormonální terapie významně přispěly k léčbě několika druhů tumoru a měly vliv na delší přežití a snížení míry recidivy. Jejich schopnost modulace receptorů a tím také genové exprese je nadále předmětem výzkumu a vývoje nových chemoterapeutik (Ahmad a Kumar, 2011). V naší práci jsme uvažovali nad tím, že molekulární mechanismus testovaných látek by mohl vycházet z interakcí s receptory pro steroidní hormony.

Receptory steroidních hormonů hrají klíčovou roli v patogenezi různých adenokarcinomů, jako jsou adenokarcinomy prostaty, prsu či tlustého střeva. Existuje i domnělá úloha těchto receptorů v patogenezi adenokarcinomu pankreatu. Dosud však existují velmi omezené informace o antiproliferativních a protinádorových účincích steroidních derivátů u nádorů pankreatu, zejména o jejich mechanismu účinku na jaderné receptory. Z tohoto důvodu by bylo zajímavé studovat mechanismus selektivních steroidních derivátů na proliferaci buněk a buněčný cyklus na modelech odvozených od adenokarcinomu pankreatu. Je možné, že by tyto steroidní deriváty mohly ovlivňovat steroidní receptory, přičemž vybrané steroidní látky by mohly být použity pro pilotní studie s případnými syntetickými modifikacemi účinných látek, které by vedly ke zvýšení terapeutického indexu.

Experimentální část této práce se zaměřila na sledování účinku vybraných cholestanových derivátů a jejich analogů, které byly dodány Laboratoří růstových regulátorů PřF UP v Olomouci (Obr. 8), na buněčné linie Bx PC-3 a MIA PaCa-2 odvozené od adenokarcinomu pankreatu. Účinek látek byl porovnán s účinkem na nenádorovou buněčnou linii BJ. Vliv vybraných látek byl testován na buněčnou viabilitu, buněčný cyklus a expresi jaderných receptorů. V práci bylo testováno 6 cholestanových derivátů a jejich analogů (Obr. 8). Pomocí MTT testu buněčné viability byla stanovena hodnota IC_{50} testovaných látek u nádorových

a nenádorových buněk. Podle získaných výsledků byla z testovaných látek vybrána látka **6** – MK-677, která výrazně inhibovala viabilitu nádorových buněk, a zároveň nepůsobila cytotoxicky na buňky nenádorové. Hodnota IC_{50} u této látky byla 4,2 μM u linie Bx PC-3 a 5,1 μM u linie MIA PaCa-2. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben odlišnou genetickou podstatou obou linií. Pro další experimenty jsme se rozhodli použít koncentrace vybraného derivátu v intervalu 2, 4 a 6 μM . Také by bylo vhodné zařadit testování látek na nenádorové pankreatické buněčné linie, Laboratoř molekulární patologie má do budoucna v plánu zakoupit alespoň jednu nenádorovou linii H6c7, což je imortalizovaná epiteliální buněčná linie odvozená z normálních lidských epiteliálních buněk vývodu slinivky břišní. V porovnání s prací od Bölüka a kol. (2023), ve které se zabývali možným protinádorovým účinkem andarinu, jakožto modulátoru androgenového receptoru, vůči nádorovým buňkám pankreatu, byly na buněčnou linii MIA PaCa-2 použity různé koncentrace této látky, a to od 0,0001 mM až do 0,4 mM, které působily 24 a 48 h. Hodnota IC_{50} se po inkubaci 24 h pohybovala mezi 0,05 a 0,4 mM. Při působení 48 h se hodnota IC_{50} pohybovala mezi 0,01 a 0,4 mM. Studie prokázala vliv andarinu na snížení životaschopnosti buněk s tumorigenním potenciálem a indukci zástavy buněčného cyklu v G_0/G_1 fázi (Bölük a kol., 2023). Studie provedená Juráškem a kol. (2017) se zabírala účinky seskviterpenu laktonu – trilobolidu (Tb), izolovaného z timoje trojlaločného (*Laser trilobum* (L.) Borkh.), a jeho steroidních konjugátů. Tato studie prokázala cytotoxický účinek a preferenční selektivitu na nádorové buňky derivátu Tb-pregnanu. Deriváty testosteronu a estradiolu vykazovaly antimykobakteriální aktivitu při IC_{50} 10,6 μM . Při působení přírodního trilobolidu byla hodnota IC_{50} po inkubaci 72 h u linie MIA PaCa-2 1,5 μM (Jurášek a kol., 2017).

V další části práce byl sledován průběh buněčného cyklu po ovlivnění nádorových buněk cholestanovým derivátem pomocí průtokové cytometrie. Buněčný cyklus představuje složitý a přesně regulovaný proces, který je u nádorových buněk pozměněn, dochází ke změnám tempa cyklu a narušení či ztrátě kontrolních bodů. Po ovlivnění testovanou látkou **6** ve třech koncentracích (2, 4 a 6 μM) po dobu 24 a 48 h, byla sledována distribuce buněk Bx PC-3 a MIA PaCa-2 v rámci buněčného cyklu. Výsledky analýzy buněčného cyklu byly pomocí Western blot analýzy doplněny o detekci exprese dvou důležitých proteinů p21 a p53, které se uplatňují při kontrole buněčného cyklu. Buňky obou linií byly v obou časech akumulovány v G_1 fázi, testovaná látka bránila vstupu buněk do S-fáze buněčného cyklu, čemuž také nasvědčovala zvýšená exprese proteinu p21 a p53. V případě buněk MIA PaCa-2 došlo po 48 h působení látky k akumulaci buněk v S-fázi.

Kontrolní body buněčného cyklu mezi fázemi G₁ a G₂ jsou řízeny proteinem p21 (Gomez-Manzano a kol., 1997). Zvýšená hladina proteinu p21 byla detekována u obou buněčných linií v obou časových intervalech. Expres byla výrazně silnější u linie MIA PaCa-2. WB analýzou byla u obou typů buněk, zejména po 48 h působení látky, také zjištěna zvýšená exprese nádorového supresoru p53, který je označován za strážce genomu odpovídající na poškození buňky.

Práce Jang a kol., 2021 se zabývala sledováním účinku isochinolinového alkaloidu, chelidoninu, izolovaného z vlašovičnicku většího (*Chelidonium majus L.*), který se používá v tradiční čínské medicíně a západní fytoterapii již několik století (Pan a kol., 2017). Chelidonin je známý pro své široké farmakologické aktivity s protizánětlivými, antivirovými a protinádorovými účinky. V této studii sledovali účinky chelidoninu (v koncentracích 0,5 a 1 uM po dobu 24 h) na buňky Bx PC-3 a MIA PaCa-2, a hodnotili změny v expresi proteinů p21, p53 pomocí WB analýzy. Proteiny p21 a p53 byly zvýšeny po ovlivnění chelidoninem v obou buněčných liniích. Konkrétně 0,5 uM chelidonin vyvolal více než 2-násobné zvýšení exprese p21 a p53 v buňkách MIA PaCa-2 než v buňkách Bx PC-3 (Jang a kol., 2021).

V práci Husseina a Mo (2009) byla studována suprese proliferace buněčných linií odvozených od nádoru pankreatu PANC-1, MIA PaCa-2 a BxPC-3 prostřednictvím d-δ-Tocotrienolu, který se řadí do rodiny vitamínu E, a lovastatinu, který se využívá jako lék při kornatění tepen a zvýšené hladině cholesterolu. Je známo, že tyto látky potlačují aktivitu HMG CoA reduktázy, která je esenciální při mevalonátové dráze, díky níž je buňka schopna syntetizovat látky jako např. cholesterol, lipoproteiny nebo steroidní hormony (Buhaescu a Hassane, 2007). d-δ-Tocotrienol indukoval zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi všech použitých nádorových buněčných linií pankreatu. V koncentracích, které potlačovaly růst navíc d-δ-Tocotrienol indukoval apoptózu (Hussein a Mo, 2009).

Proces buněčného cyklu je dán správným načasováním aktivace cyklin-dependentních kináz (CDK), které tvoří komplexy s příslušnými cykliny. Vytvoření komplexu CDK-cyklin umožní průchod kontrolními body buněčného cyklu (Matthews a kol., 2020). V G₀/G₁ fázi buněčného cyklu působí zejména cykliny D, které tvoří funkční komplexy s kinázami CDK4 a CDK6. Na stimulaci přechodu G₁/S buněčného cyklu se podílí cyklin E ve spojení s kinázou CDK2. Do budoucna by bylo vhodné zaměřit se i na analýzu exprese těchto cyklinů a jejich CDK kináz pomocí Western blot detekce. Je známo, že inhibice buněčného růstu může souviset

se zvýšenou apoptotickou programovanou smrtí buněk. Právě detekce indukce apoptózy je rovněž v plánu k doplnění charakterizace účinku testované látky. V souvislosti se strukturou testovaných látek, která je podobná živočišným hormonům odvozených od cholesterolu, byl v této práci sledován vliv testovaného cholestanového derivátu na expresi a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony AR, ER- α , ER- β a PR u pankreatických nádorových buněčných linií Bx PC-3 a MIA PaCa-2 na základě imunofluorescenční detekce a WB analýzy. U buněčné linie Bx PC-3 byla zaznamenána změna lokalizace pouze u ER- β , kdy u ovlivněných buněk ve všech koncentracích způsobilo navýšení exprese a lokalizace tohoto receptoru perinukleárně, do blízkosti jaderné membrány. U ostatních receptorů nebyly po ovlivnění testovaným derivátem zjištěny žádné výrazné změny jak v jejich lokalizaci, tak v expresi. Výsledky doplněné Western blot analýzou u této linie také neukázaly žádné změny v porovnání s kontrolními buňkami. U buněčné linie MIA PaCa-2 byly výraznější změny zaznamenány rovněž u detekce ER- β , kdy u buněk ovlivněných 4 μ M testovanou látkou byla exprese receptoru patrná v jádře ale i perinukleárně. U buněk ovlivněných 6 μ M testovanou látkou byla exprese receptoru již převážně jen perinukleární. Detekce AR u kontrolních buněk MIA PaCa-2 byla převážně difúzní. Po ovlivnění testovanou látkou o koncentraci 4 μ M byla zaznamenána lokalizace AR především po okrajích cytoplazmy. Výsledky doplněné Western blot analýzou u MIA PaCa-2 buněk ukázaly sníženou expresi AR v obou časových intervalech, exprese ER- α a ER- β nebyla vzhledem ke kontrole změněna. Zajímavě vyšla detekce exprese PR, která se s rostoucí koncentrací látky po 24 h působení snižovala. Pozoruhodná však byla exprese PR po 48 h působení látky, která měla opačný trend, s rostoucí koncentrací testované látky se naopak exprese zvyšovala.

Karcinom pankreatu zůstává významnou globální výzvou, především kvůli pozdní detekci, omezeným terapeutickým možnostem a odolnosti vůči léčbě, což vede k vysoké úmrtnosti. Bylo zjištěno, že blokování signalizace AR pomocí flutamidu může vést k prodloužení přežití pacientů s karcinomem pankreatu (Konduri a kol., 2007). Přesná molekulární souvislost mezi progresí AR a karcinomem pankreatu však zůstává neznámá (Negi a kol., 2006). Aktivace AR reguluje přechod G₁-S a deprivace androgenu kulminuje zastavením buněčného cyklu ve fázi G₁ v buňkách karcinomu prostaty (Balk, 2008). Podobně aktivace AR pomocí dihydrotestosteronu v buňkách karcinomu vaječníků vede ke zvýšenému podílu buněk v S-fázi a léčba antiandrogeny vrací proliferační dopad (Sheach a kol., 2009). Agonismus AR, nikoli antagonismus, u buněk karcinomu prsu s pozitivními estrogenovými receptory vede k nižšímu proliferačnímu indexu a působí jako tumor supresor (Hickey a kol., 2021). Literatura naznačuje,

že různé malignity reagují na androgeny různě a výsledek se mezi různými typy nádorových buněk po stimulaci androgeny liší.

Expres ER byla detekována téměř před 50 lety v benigních i maligních buňkách slinivky břišní (Sandberg a kol., 1973; Pettersen a kol., 1986). Ve studii Liu a kol. (2020) popisují, že ER- α je významně exprimován ve tkáních nádoru slinivky břišní a souvisí s velikostí nádoru, vzdálenými metastázami a špatnou prognózou nádoru. ER- α podporuje buněčnou proliferaci, růst nádoru, migraci a invazi aktivací epiteliálně-mezenchymální transformace. Knockdown ER- α indukoval apoptózu a zastavení buněčného cyklu G₀/G₁ v nádorových buňkách pankreatu. Tato studie dále prokázala, že ER- α zvyšuje transkripci PAI1 (inhibitor aktivátoru plazminogenu 1) a aktivuje dráhu MEK/ERK, čímž podporuje progresi nádoru. Tato zjištění naznačují, že ER- α může být novým diagnostickým a terapeutickým cílem u nádorových onemocnění pankreatu (Liu a kol., 2020). Nedávné studie ukázaly, že ER- β je exprimován hlavně v maligních buňkách a je považován za negativní prognostický faktor a možný terapeutický cíl pro adenokarcinom pankreatu (Seeliger a kol, 2018; Lykoudis a Contis, 2021). Hladina exprese ER- β byla u některých buněčných linií zjištěna vyšší, přičemž byly zjištěny příznivé prognostické faktory související s vyššími hladinami exprese ER- β (Estrella a kol., 2014). Bylo zjištěno, že raloxifen, který se řadí mezi selektivní modulátory estrogenových receptorů, redukuje buňky adenokarcinomu pankreatu narušením exprese ER- β a inhibicí signální dráhy IL-6/gp130/STAT3, což naznačuje, že ER- β může mít u nádorů pankreatu význam (Pozios a kol., 2021).

Je zřejmé, že souhra mezi hormonálními faktory a nádory slinivky je složitá a zdaleka není plně pochopena. Pouze několik předchozích studií zkoumalo expresi ER a PR u pankreatických nebo jiných periampulárních adenokarcinomů (Georgiadou a kol., 2016).

Praktická část bakalářské práce přinesla zajímavé výsledky v oblasti studia protinádorových účinků cholestanových derivátů na nádorové buňky slinivky břišní. Proto by mohlo být přínosné na tuto práci navázat a pokračovat i v budoucnu, např. provést experimenty na trojrozměrných buněčných modelech, jako jsou sféroidy či organoidy, a porovnat je s našimi výsledky na buněčných liniích kultivovaných v monovrstvě.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studovat a charakterizovat účinek cholestanových derivátů a jejich analogů na buňky karcinomu pankreatu (Bx PC-3 a MIA PaCa-2), zejména na jejich viabilitu, buněčný cyklus, expresi proteinů účastnících se kontroly buněčného cyklu a expresi a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony.

Na základě výsledných hodnot MTT testů byla vybrána látka s označením MK-677, jejíž hodnota IC_{50} po 48 h činila 4,2 μ M u linie Bx PC-3, a 5,1 μ M u linie MIA PaCa-2, přičemž viabilita nenádorové buněčné linie BJ nebyla touto látkou ovlivněna. Látka MK-677 způsobila u obou buněčných linií zastavení buněčného cyklu v G_0/G_1 fázi. Buněčná linie MIA PaCa-2 se po 48 h působení dostala i do S-fáze. Po aplikování testované látky byla u obou linií zaznamenána vyšší exprese proteinů p21 a p53. Při zvýšených koncentracích se exprese p21 postupně snižovala. Vliv derivátu na jaderné receptory pro steroidní hormony se u některých projevil změnou jejich exprese a lokalizace, jejich úloha u karcinomu pankreatu bude předmětem dalšího výzkumu.

Výsledky této práce mohou v budoucnu posloužit jako odrazový můstek pro další studium protinádorových, antiproliferativních a proapoptických účinků cholestanových derivátů, a také k lepšímu pochopení genetických a proteomických změn v nádorových buňkách pankreatu.

8 LITERATURA

AbuMweis, Suhad S., a Peter J. H. Jones. „Cholesterol-Lowering Effect of Plant Sterols". *Current Atherosclerosis Reports* 10, č. 6 (prosinec 2008): 467–72. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0073-4>.

Ahmad, Nihal, a Raj Kumar. „Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics". *Cancer Letters* 300, č. 1 (1. leden 2011): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.008>.

Andrén-Sandberg, Å., D. Hoem, a Pia Lena Bäckman. „Other Risk Factors for Pancreatic Cancer: Hormonal Aspects". *Annals of Oncology* 10 (1999): S131–35. https://doi.org/10.1093/annonc/10.suppl_4.S131.

Balk, Steven P., a Karen E. Knudsen. „AR, the Cell Cycle, and Prostate Cancer". *Nuclear Receptor Signaling* 6 (1. únor 2008): e001. <https://doi.org/10.1621/nrs.06001>.

Bölük, Aydın, Mervenur Yavuz, Maryam Sabour Takanlou, Çığır Biray Avcı, a Turan Demircan. „In vitro anti-carcinogenic effect of andarine as a selective androgen receptor modulator on MIA-PaCa-2 cells by decreased proliferation and cell-cycle arrest at G0/G1 phase". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 671 (3. září 2023): 132–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.016>.

Buhaescu, Irina, a Hassane Izzedine. „Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications". *Clinical Biochemistry* 40, č. 9 (1. červen 2007): 575–84. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016>.

Cade, Jennifer E., a James Hanison. „The pancreas". *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 18, č. 10 (1. říjen 2017): 527–31. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.06.021>.

Cole, Timothy J., Kelly L. Short, a Stuart B. Hooper. „The science of steroids". *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, ANTENATAL AND POSTNATAL CORTICOSTEROIDS TO IMPROVE OUTCOMES IN NEWBORN INFANTS*, 24, č. 3 (1. červen 2019): 170–75. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>.

Conroy, Thierry, Pascal Hammel, Mohamed Hebbar, Meher Ben Abdelghani, Alice C. Wei, Jean-Luc Raoul, Laurence Choné, et al. „FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer". *The New England Journal of Medicine* 379, č. 25 (20. prosinec 2018): 2395–2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>.

Davey, Rachel A., a Mathis Grossmann. „Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside". *The Clinical Biochemist. Reviews* 37, č. 1 (únor 2016): 3-15.

Dawson, Mark A., Tony Kouzarides, a Brian J.P. Huntly. „Targeting Epigenetic Readers in Cancer". *New England Journal of Medicine* 367, č. 7 (16. srpen 2012): 647–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1112635>.

Deer, Emily L., Jessica González-Hernández, Jill D. Coursen, Jill E. Shea, Josephat Ngatia, Courtney L. Scaife, Matthew A. Firpo, a Sean J. Mulvihill. „Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines". *Pancreas* 39, č. 4 (květen 2010): 425–35. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963>.

Estrella, Jeannelyn S., Ly T. Ma, Denái R. Milton, James C. Yao, Huamin Wang, Asif Rashid, a Russell R. Broaddus. „Expression of Estrogen-Induced Genes and Estrogen Receptor β in Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Implications for Targeted Therapy". *Pancreas* 43, č. 7 (říjen 2014): 996–1002. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000203>.

Frigo, Daniel E., Maria Bondesson, a Cecilia Williams. „Nuclear Receptors: From Molecular Mechanisms to Therapeutics". *Essays in Biochemistry* 65, č. 6 (26. listopad 2021): 847–56. <https://doi.org/10.1042/EBC20210020>.

Gao, Wenqing, Casey E. Bohl, a James T. Dalton. „Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor". *Chemical Reviews* 105, č. 9 (1. září 2005): 3352–70. <https://doi.org/10.1021/cr020456u>.

Georgiadou D, Sergentanis TN, Sakellariou S, Vlachodimitropoulos D, Psaltopoulou T, Lazaris AC, Gounaris A, Zografos GC. Prognostic role of sex steroid receptors in pancreatic adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2016 Jan;212(1):38-43.

Gomez-Manzano, Candelaria, Juan Fueyo, Athanassios P. Kyritsis, Peter A. Steck, Victor A. Levin, W. K. Alfred Yung, a Timothy J. McDonnell. „Characterization of p53 and p21 Functional Interactions in Glioma Cells en Route to Apoptosis". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 89, č. 14 (16. červenec 1997): 1036–44. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.14.1036>.

Goncharov, Alexey I., Inna S. Levina, Viktoriia L. Shliapina, Ivan A. Morozov, Petr M. Rubtsov, Igor V. Zavarzin, Olga V. Smirnova, a Tatiana A. Shchelkunova. „Cytotoxic Effects of the Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells BxPC3". *Biochemistry (Moscow)* 86, č. 11 (listopad 2021): 1446–60. <https://doi.org/10.1134/S0006297921110080>.

Grimm, Sandra L., Sean M. Hartig, a Dean P. Edwards. „Progesterone Receptor Signaling Mechanisms". *Journal of Molecular Biology* 428, č. 19 (září 2016): 3831–49. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.020>

Gruber, Christian J., Walter Tschugguel, Christian Schneeberger, a Johannes C. Huber. „Production and Actions of Estrogens". *The New England Journal of Medicine* 346, č. 5 (31. leden 2002): 340–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000471>.

Heinlein, Cynthia A., a Chawnshang Chang. „Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview". *Endocrine Reviews* 23, č. 2 (1. duben 2002): 175–200. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0460>.

Heldring, Nina, Ashley Pike, Sandra Andersson, Jason Matthews, Guojun Cheng, Johan Hartman, Michel Tujague, et al. „Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets". *Physiological Reviews* 87, č. 3 (červenec 2007): 905–31. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>.

Hickey, Theresa E., Amy R. Dwyer, a Wayne D. Tilley. „Arming Androgen Receptors to Oppose Oncogenic Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer". *British Journal of Cancer* 125, č. 12 (prosinec 2021): 1599–1601. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01478-8>.

Hlavsa, Jan; Man, Martin a Kala, Zdeněk. *Nádory pankreatu. Online. Med. Pro Praxi.* Roč. 2008, č. 5(10), s. 388-392. Dostupné z: <https://solen.cz/artkey/med-200810-0011.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Donkologie%26sfrom%3D960%26spage%3D30> [cit.2023-11-21].

Hussein, Deema, a Huanbiao Mo. „D- δ -Tocotrienol-Mediated Suppression of the Proliferation of Human PANC-1, MIA PaCa-2, and BxPC-3 Pancreatic Carcinoma Cells". *Pancreas* 38, č. 4 (květen 2009): e124. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181a20f9c>.

Christos Damaskos, Theodore Karatzas, Ioannis D. Kostakis, Lampros Nikolidakis, Alkiviadis Kostakis, A Gregory Kouraklis. „Nuclear Receptors in Pancreatic Tumor Cells". *Anticancer Research* 34, č. 12 (1. prosinec 2014): 6897. <http://ar.iiarjournals.org/content/34/12/6897.abstract>.

Jahangir, Ghulam Zahara, Faiza Saleem, Shagufta Naz, Neelma Munir, Rukhama Haq, a Aleena Sumrin. „Thyroid Hormone Dependent Gene Expression". *Advancements in Life Sciences* 3, č. 4 (25. srpen 2016): 119–24. <https://www.submission.als-journal.com/index.php/ALS/article/view/232>.

Jang, Hyun-Jin, Jae Ho Yang, Eunmi Hong, Eunbi Jo, Soon Lee, Sanghun Lee, Jong Soon Choi, Hwa Seung Yoo, a Hyuno Kang. „Chelidonine Induces Apoptosis via GADD45a-p53 Regulation in Human Pancreatic Cancer Cells". *Integrative Cancer Therapies* 20 (22. duben 2021): 15347354211006191. <https://doi.org/10.1177/15347354211006191>.

Jurášek, Michal, Petr Džubák, Silvie Rimpelová, David Sedlák, Petr Konečný, Ivo Frydrych, Soňa Gurská, et al. „Trilobolide-steroid hybrids: Synthesis, cytotoxic and antimycobacterial activity". *Steroids, SI: Isoprenoids*, 117 (1. leden 2017): 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.08.011>.

Kalkhoff, Ronald K. „Metabolic Effects of Progesterone". *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142, č. 6 (březen 1982): 735–38. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(16\)32480-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(16)32480-2).

Kamisawa, Terumi, Laura D. Wood, Takao Itoi, a Kyoichi Takaori. „Pancreatic Cancer". *The Lancet* 388, č. 10039 (2. červenec 2016): 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0).

Kanda, Tatsuo, Xia Jiang, a Osamu Yokosuka. „Androgen Receptor Signaling in Hepatocellular Carcinoma and Pancreatic Cancers". *World Journal of Gastroenterology* 20, č. 28 (28. červenec 2014): 9229–36. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9229>.

Karpińska, Monika, a Marian Czauderna. „Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism". *Frontiers in Physiology* 13 (30. březen 2022). <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>.

Kim, Sung Joo, Soyeon An, Jae Hoon Lee, Joo Young Kim, Ki-Byung Song, Dae Wook Hwang, Song Cheol Kim, Eunsil Yu, a Seung-Mo Hong. „Loss of Progesterone Receptor Expression Is an Early Tumorigenesis Event Associated with Tumor Progression and Shorter Survival in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Patients". *Journal of Pathology and Translational Medicine* 51, č. 4 (15. červenec 2017): 388–95. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.03.19>.

Klein, Alison P. „Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors". *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18, č. 7 (červenec 2021): 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>.

Konduri, Srivani, Margaret A. Schwarz, Danielle Cafasso, a Roderich E. Schwarz. „Androgen Receptor Blockade in Experimental Combination Therapy of Pancreatic Cancer". *Journal of Surgical Research* 142, č. 2 (1. říjen 2007): 378–86. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.09.034>.

Leopold, W.R., Alex Bridges, Stuart Decker, David W. Fry, Alan Kraker, a Judith Sebolt-Leopold. „GROWTH FACTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION TARGETS FOR CANCER THERAPY". In *Anticancer Drug Development*, 31–53. Elsevier, 2002. <https://doi.org/10.1016/B978-012072651-6/50004-8>.

Levin, Ellis R. „Invited Review: Cell Localization, Physiology, and Nongenomic Actions of Estrogen Receptors". *Journal of Applied Physiology* 91, č. 4 (1. říjen 2001): 1860–67. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.4.1860>.

Liu, Shi-Lei, Xiang-Song Wu, Feng-Nan Li, Wen-Yan Yao, Zi-You Wu, Ping Dong, Xue-Feng Wang, a Wei Gong. „ERR α Promotes Pancreatic Cancer Progression by Enhancing the Transcription of PAI1 and Activating the MEK/ERK Pathway". *American Journal of Cancer Research* 10, č. 11 (2020): 3622–43.

Lykoudis, Panagis M., a John Contis. „Estrogen Receptor Expression in Pancreatic Adenocarcinoma: Time to Reconsider Evidence". *Pancreas* 50, č. 9 (1. říjen 2021): 1250–53. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001921>.

Mahadevan, Vishy. „Anatomy of the pancreas and spleen". *Surgery (Oxford)* 37, č. 6 (1. červen 2019): 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.04.008>.

Matthews, Helen K., Cosetta Bertoli, a Robertus A. M. de Bruin. „Cell Cycle Control in Cancer". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23, č. 1 (leden 2022): 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.

Mizrahi, Jonathan D, Rishi Surana, Juan W Valle, a Rachna T Shroff. „Pancreatic Cancer". *The Lancet* 395, č. 10242 (červen 2020): 2008–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30974-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30974-0).

Mulac-Jericevic, B., R. A. Mullinax, F. J. DeMayo, J. P. Lydon, a O. M. Conneely. „Subgroup of Reproductive Functions of Progesterone Mediated by Progesterone Receptor-B Isoform". *Science (New York, N.Y.)* 289, č. 5485 (8. září 2000): 1751–54. <https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1751>.

Negi, Sanjay Singh, Anil Agarwal, a Adarsh Chaudhary. „Flutamide in Unresectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial". *Investigational New Drugs* 24, č. 3 (květen 2006): 189–94. <https://doi.org/10.1007/s10637-005-3536-2>.

Neoptolemos, John P., Daniel H. Palmer, Paula Ghaneh, Eftychia E. Psarelli, Juan W. Valle, Christopher M. Halloran, Olusola Faluyi, et al. „Comparison of Adjuvant Gemcitabine and Capecitabine with Gemcitabine Monotherapy in Patients with Resected Pancreatic Cancer (ESPAC-4): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial". *Lancet (London, England)* 389, č. 10073 (11. březen 2017): 1011–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6).

Pan, Jialiang, Yang Yang, Rui Zhang, Hanwen Yao, Kangkang Ge, Manyin Zhang, a Ling Ma. „Enrichment of Chelidonine from Chelidonium Majus L. Using Macroporous Resin and Its Antifungal Activity". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1070 (1. prosinec 2017): 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.029>.

Partyka, Olga, Monika Pajewska, Daria Kwaśniewska, Aleksandra Czerw, Andrzej Deptała, Michał Budzik, Elżbieta Cipora, et al. „Overview of Pancreatic Cancer Epidemiology in Europe and Recommendations for Screening in High-Risk Populations". *Cancers* 15, č. 14 (15. červenec 2023): 3634. <https://doi.org/10.3390/cancers15143634>.

Pearce, Sandra Timm, a V.Craig Jordan. „The Biological Role of Estrogen Receptors α and β in Cancer". *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50, č. 1 (duben 2004): 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.003>.

Petterson A, Lea O, Bakkevold K, Arnesjø B. Progress in pancreatic of estrogen receptors. *Eur J Surg Oncol.* 1986 Dec;12(4):321-4.

Polvani, Simone, Mirko Tarocchi, Sara Tempesti, a Andrea Galli. „Nuclear Receptors and Pathogenesis of Pancreatic Cancer". *World Journal of Gastroenterology* 20, č. 34 (14. září 2014): 12062–81. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12062>.

Pozios, Ioannis, Nina N. Seel, Nina A. Hering, Lisa Hartmann, Verena Liu, Peter Camaj, Mario H. Müller, et al. „Raloxifene Inhibits Pancreatic Adenocarcinoma Growth by Interfering with ER β and IL-6/Gp130/STAT3 Signaling". *Cellular Oncology (Dordrecht)* 44, č. 1 (únor 2021): 167–77. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00559-9>.

Ritter, Megan J., Izuki Amano, Norihiro Imai, Lorraine Soares De Oliveira, Kristen R. Vella, a Anthony N. Hollenberg. „Nuclear Receptor CoRepressors, NCOR1 and SMRT, are required for maintaining systemic metabolic homeostasis". *Molecular Metabolism* 53 (12. srpen 2021): 101315. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101315>.

Russell, D. W., a J. D. Wilson. „Steroid 5 Alpha-Reductase: Two Genes/Two Enzymes". *Annual Review of Biochemistry* 63 (1994): 25–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.000325>.

Sandberg, Avery A., Rashad Y. Kirdani, Michael J. Varkarakis, a Gerald P. Murphy. „Estrogen receptor protein of pancreas". *Steroids* 22, č. 2 (1. srpen 1973): 259–71. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(73\)90090-1](https://doi.org/10.1016/0039-128X(73)90090-1).

Sasaki, Norihiko, Fujiya Gomi, Fumio Hasegawa, Kazumi Hirano, Masakazu Fujiwara, Masashi Toyoda, a Toshiyuki Ishiwata. „Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 522, č. 4 (19. únor 2020): 881–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.120>.

Seeliger, Hendrik, Ioannis Pozios, Gerald Assmann, Yue Zhao, Mario H. Müller, Thomas Knösel, Martin E. Kreis, a Christiane J. Bruns. „Expression of Estrogen Receptor Beta Correlates with Adverse Prognosis in Resected Pancreatic Adenocarcinoma". *BMC Cancer* 18, č. 1 (29. říjen 2018): 1049. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4973-6>.

Sheach, L. A., E. M. Adeney, A. Kucukmetin, S. J. Wilkinson, A. D. Fisher, A. Elattar, C. N. Robson, a R. J. Edmondson. „Androgen-Related Expression of G-Proteins in Ovarian Cancer". *British Journal of Cancer* 101, č. 3 (4. srpen 2009): 498–503. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605153>.

Shimada, Kazutake, Kuniko Mitamura, a Tatsuya Higashi. „Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids". *Journal of Chromatography A, Gas and Liquid Chromatography of Non-Saponifiable Lipids. Part I*, 935, č. 1 (23. listopad 2001): 141–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00943-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00943-8).

Stanczyk, F. Z. (2009). Production, clearance, and measurement of steroid hormones. *The Global, Library of Women's Medicine*. <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10278>.

Šafanda, Martin; Oliverius, Martin a Trsková, Kristina. Erlotinib v léčbě metastatického karcinomu slinivky břišní – naše zkušenosti. *Online. Onkologie*. Roč. 2010, č. 4(1), s. 51-52. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/01/11.pdf>. [cit. 2023-11-21].

Tan, Mh Eileen, Jun Li, H Eric Xu, Karsten Melcher, a Eu-leong Yong. „Androgen Receptor: Structure, Role in Prostate Cancer and Drug Discovery". *Acta Pharmacologica Sinica* 36, č. 1 (leden 2015): 3–23. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>.

Taraborrelli, Stefania. „Physiology, Production and Action of Progesterone". *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 94, č. S161 (listopad 2015): 8–16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>.

Tuckey, Robert C. „Progesterone synthesis by the human placenta". *Placenta* 26, č. 4 (1. duben 2005): 273–81. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.06.012>.

Verrijdt, G. „Selective DNA Recognition by the Androgen Receptor as a Mechanism for Hormone-Specific Regulation of Gene Expression". *Molecular Genetics and Metabolism* 78, č. 3 (březen 2003): 175–85. [https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(03\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(03)00003-9).

Wallimann, Peter, Thomas Marti, Andreas Fürer, a François Diederich. „Steroids in Molecular Recognition". *Chemical Reviews* 97, č. 5 (1. srpen 1997): 1567–1608. <https://doi.org/10.1021/cr960373b>.

Yilma, Petr (2019). Jaderné receptory v regulaci genové exprese, vývoje a metabolismu *Caenorhabditis elegans*. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

Cleveland Clinic. „Pancreas: What It Is, How It Works & Living Without One". Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21743-pancreas>. [cit.2024-04-23]

Remedia. „Aktuální možnosti léčby karcinomu pankreatu v roce 2022 | Remedia",2022; 32: 225–231. <https://www.remedia.cz/rubriky/aktuality/aktualni-moznosti-lecby-karcinomu-pankreatu-v-roce-2022-12907/>. [cit.2024-05-02]

World Health Organization. The top 10 causes of death. Online. 2020. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [cit.2023-11-30]