

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2015

Vendula Krahulíková



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vliv agonistů PPARs na růstový potenciál buněčných linií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Vendula Krahulíková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	4. 5. 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Vendula Krahulíková
Název práce	Vliv agonistů PPARs na růstový potenciál buněčných linií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Ústav histologie a embryologie
Vedoucí práce	Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá problematikou vlivu agonistů jaderných receptorů PPAR na růstový potenciál buněčných linií. Teoretická část se převážně věnuje významu jaderných receptorů PPAR, jejich ligandům, zejména fibrátům, a jakou úlohu hrají PPAR v karcinogenezi a chemoprevenci. Experimentální část se zabývá stanovením viability u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění fibráty. Stanovení bylo prováděno na základě WST testu. Dále byla stanovována exprese vybraných antigenů v buněčných liniích HEK 293 a HeLa po ovlivnění fibráty. Stanovení bylo provedeno na základě imunocytochemie.
Klíčová slova	PPAR, fenofibrát, gemfibrozil, bezafibrát, chemoprevence, buněčná linie HEK293, buněčná linie HeLa, WST, imunocytochemie
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Vendula Krahulíková
Title of thesis	Effect of PPARs agonists to the growth potential of cell lines
Type of thesis	Diploma
Department	Faculty of Medicine Palacky University in Olomouc, Institute of Histology and Embryology
Supervisor	Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>The diploma thesis deals with the effect of PPAR agonists of nuclear receptors on the growth potential of the cell lines. The theoretical part mainly deals with the importance of PPAR nuclear receptors, their ligands, especially fibrates, and role of PPAR in carcinogenesis and chemoprevention. The experimental part focuses on viability in cell lines HEK293 and HeLa, after influencing by fibrates. The assay was performed by using WST assay. Also was focused on the expression of selected antigens in cell lines HEK293 and HeLa, after influencing by fibrates. The assay was performed by using imunocytochemistry.</p>
Keywords	PPAR, fenofibrate, bezafibrate, gemfibrozil, chemoprevention, cell line of HEK293, cell line of HeLa, WST, imunocytochemistry
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Čestně prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Prof. MUDr. Jiřího Ehrmanna, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 4. 5. 2015

.....

Vendula Krahulíková

Děkuji vedoucímu diplomové práce panu Prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. a slečně Mgr. Kateřině Čížkové, za odborný dohled, přístup a cenné rady, které mi poskytli při zpracování tohoto úkolu.

Dále děkuji paní Evě Pimrové za pomoc při práci v laboratoři. Velké poděkování patří také mé rodině a příteli za trpělivost a podporu při psaní diplomové práce.

Obsah

Seznam použitých obrázků, schémat, tabulek a grafů	7
Seznam použitých symbolů a zkratek	9
Cíle práce	10
Teoretická část	11
Úvod	12
1. Jaderné receptory	13
2. Receptory PPAR	14
2. 1. Struktura PPAR	14
2. 2. Aktivace PPAR	15
2. 3. Izoformy PPAR a jejich exprese ve tkáních	16
2. 3. Ligandy PPAR	17
3. PPAR v karcinogenezi a chemoprevenci	22
3. 1. Ligandy PPAR- α v karcinogenezi	22
3. 2. Ligandy PPAR a chemoprevence	26
Experimentální část	27
4. Stanovení viability u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění různými koncentracemi ligandů jaderného receptoru PPAR-α.	28
4. 1. Biologický materiál	28
4. 2. Přístrojové vybavení	28
4. 3. Použité chemikálie	28
4. 4. Pracovní postup	29
5. Stanovení exprese vybraných antigenů pomocí imunocytochemie v buněčných liniích po ovlivnění ligandy PPAR-α	31
5. 1. Biologický materiál	31
5. 2. Přístrojové vybavení	31
5. 3. Použité chemikálie	31
5. 4. Pracovní postup	33
6. Výsledky	35
6. 1. Stanovení viability u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění různými koncentracemi ligandů jaderného receptoru PPAR- α	35
6.2. Stanovení exprese vybraných antigenů pomocí imunocytochemie v buněčných liniích po ovlivnění ligandy PPAR- α	49

7. Diskuse	53
Závěr	55
Seznam použité literatury	56
Seznam použitých obrázků	60

Seznam použitých obrázků, schémat, tabulek a grafů

Obrázek

Obrázek 1: Schematické znázornění struktury PPAR.

Obrázek 2: Struktura vybraných přírodních ligandů PPAR.

Obrázek 3: Struktura vybraných syntetických ligandů PPAR (TZD).

Obrázek 4: Struktura vybraných látek ze skupiny fibrátů.

Schéma

Schéma 1: Aktivace PPAR a specifických genů.

Schéma 2: Duální agonismus PPAR- α/γ .

Schéma 3: Potenciální cílení PPAR- α pro prevenci a léčbu nádorů.

Tabulka

Tabulka 1: Průměrné hodnoty absorbance IC[90] při použití různých koncentrací vybraných fibrátů na buněčné linie HEK293 a HeLa.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty absorbance nejvyšší viability při použití různých koncentrací vybraných fibrátů na buněčné linie HEK293 a HeLa.

Tabulka 3: Výsledné hodnoty fold change pro změnu exprese cyklinu A, cyklinu E a Cdc25A po působení vybraných fibrátů ve dvou různých koncentracích (IC[90] a koncentrace s nejvyšší viabilitou buněk) v buněčných liniích HEK293 a HeLa.

Graf

Graf 1a-c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích fenofibrátu.

Graf 2a-c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích bezafibrátu.

Graf 3a-c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích gemfibrozilu.

Graf 4a-c: Závislost viability buněčné linie HeLa na různých koncentracích fenofibrátu.

Graf 5a-c: Závislost viability buněčné linie HeLa na různých koncentracích bezafibrátu.

Graf 6a-c: Závislost viability buněčné linie HeLa na různých koncentracích gemfibrozilu.

Graf 7a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích fenofibrátu.

- Graf 8a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích bezafibrátu.
- Graf 9a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích gemfibrozilu.
- Graf 10a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HeLa při různých koncentracích fenofibrátu.
- Graf 11a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HeLa při různých koncentracích bezafibrátu.
- Graf 12a-c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HeLa při různých koncentracích gemfibrozilu.
- Graf 13: Změna exprese cyklinu A v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.
- Graf 14: Změna exprese cyklinu E v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.
- Graf 15: Změna exprese Cdc25A v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.
- Graf 16: Změna exprese cyklinu A v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.
- Graf 17: Změna exprese cyklinu E v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.
- Graf 18: Změna exprese Cdc25A v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.

Seznam použitých symbolů a zkratek

12-HETE	12-hydroxyeicosatetraenová kyselina
13-HODE	13-hydroxyoktadekadienová kyselina
15-d-PGJ2	Prostaglandin J2
15-HETE	15-hydroxyeicosatetraenová kyselina
8-HETE	8-hydroxyeicosatetraenová kyselina
9-HODE	9-hydroxyoktadekadienová kyselina
AA	arachidonová kyselina
BCL-6	buněčný lymfom 6
CDK	cyklin-dependentní kinázy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EE	epoxyeicosatrienová kyselina
FXR	farnesoid X receptor
HDL	high density lipoprotein
HNF4 α	hepatic nuclear factor (hepacytární jaderný faktor 4 α)
HRP	křenová peroxidáza
LXR	liver X receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinases (proteinové kinázy)
NF- κ B	skupina transkripčních faktorů
NcoR	Nuclear Receptor Co-repressor (jaderný korepresor receptorů)
PBP	PPAR Binding Protein (PPAR vázající protein)
PGD2	Prostaglandin D2
PPAR	receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
PPER	responzivní elementy pro peroxizómové proliferátory
RNA	ribonukleová kyselina
SMRT	The Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors (tlumící mediátor pro retinoidy a thyroidní receptor)
SRC-1	Steroid Receptor Co-activator (koaktivátor steroidních receptorů)
TZD	thiazolidindiony
X-RXR	retinoid X faktor

Cíle práce

1. Teoreticky zpracovat literární rešerši.
2. Stanovit viabilitu u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění různými koncentracemi ligandů jaderného receptoru PPAR- α .
3. Stanovit expresi vybraných antigenů pomocí imunocytochemie v buněčných liniích po ovlivnění ligandy PPAR- α .

Teoretická část

Úvod

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů, PPAR, řadíme do skupiny jaderných receptorů. Tyto receptory se podílí na regulaci celé řady biologických funkcí.

PPAR byly poprvé identifikovány v 90. letech a název je odvozen od jejich schopnosti proliferovat peroxizomy. Skupina PPAR zahrnuje tři izoformy – PPAR- α , PPAR- β/δ a PPAR- γ . Jednotlivé izoformy se liší tkáňovou expresí, biologickou funkcí i specifitou k ligandům. PPAR jsou aktivované transkripční faktory a díky tomu se podílí na regulaci důležitých procesů, jako je metabolismus, apoptóza, nádorové bujení nebo regenerace tkáni. K samotné aktivaci receptorů dochází po navázání specifického ligandu a vytvoření heterodiméru s receptorem pro retinoid X. Ten se váže na specifickou sekvenci DNA cílového genu. Mezi přírodní ligandy aktivující PPAR řadíme například kyselinu linoleovou nebo prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). Nejvýznamnější skupinu syntetických ligandů představují tzv. thiazolidindiony (TZD) a fibráty. [28]

Dříve byly PPAR ligandy terapeuticky využívány při léčbě rezistence na inzulín a to jako modulátory exprese genů, jejichž produkty se podílejí na regulaci metabolismu glukózy a lipidů. [9]

V současnosti PPAR receptory poutají pozornost kvůli možnému využití v protinádorové terapii. Ligandy PPAR jsou považovány za možná protirakovinová terapeutika s relativně nízkou toxicitou. Objevují se důkazy antiproliferačních, proapoptických, protizánětlivých a potenciálně také protimetastázových vlastností PPAR ligandů. Mohou tedy být zajímavými kandidáty nejen pro terapii, ale i pro chemoprevenci některých typů rakoviny. Existují ovšem i studie, které popisují nežádoucí pronádorové působení PPAR ligandů. [9]

1. Jaderné receptory

Jaderné receptory patří mezi nejrozšířenější skupinu transkripčních regulátorů u mnohobuněčných organismů a jsou charakteristické svou vysokou funkční různorodostí, přičemž si zachovávají jednotnou strukturní organizaci.

Jaderné receptory fungují jako transkripční faktory, které jsou charakterizovány dvěma vlastnostmi:

1. váží se pomocí DNA-vazebné domény na specifický element umístěný v blízkosti promotoru cílových genů těchto receptorů
2. jsou aktivovány po navázání specifického ligandu

Hlavní funkcí těchto receptorů je v dané buňce upravit genovou expresi na základě signálů přijímaných ve formě specifických ligandů. Receptory mohou inhibovat nebo naopak zvyšovat transkripci cílových genů, a to navázáním řady proteinů, tzv. korepresorů a koaktivátorů, na transkripční komplex. Analýzou lidského genomu bylo identifikováno 48 genů kódujících jaderné receptory, z nichž každý dá vzniknout vždy alespoň jedné izoformě. Jaderné receptory můžeme rozdělit do tří samostatných skupin.[1], [7]

Mezi jaderné receptory s ligandy hormonálního charakteru řadíme klasické steroidní hormony, například estrogeny, androgeny, glukokortikoidy, thyroïdní hormony T3/T4, retinoidy a vitamín D. Další skupinou jsou tzv. „orphan“ sirotčí receptory, doposud však nebyl identifikován žádný jejich ligand. Pravděpodobně jde o produkty intracelulárního metabolismu, které se běžně v buňkách vyskytují. [3], [4]

Třetí skupinu receptorů představují receptory, které působí jako senzory metabolismu. Receptory váží aktivované meziproducty či konečné producty metabolismu, jako jsou například mastné kyseliny, deriváty cholesterolu, žlučové kyseliny a další. [2] Mezi tyto receptory řadíme například HNF4 α (hepatic nuclear factor 4 α) a skupina PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), a v metabolismu cholesterolu působící LXR (liver X receptor) a FXR (farnesoid X receptor). [5]

Jaderné receptory, jako molekuly silně zapojené do metabolických procesů a ontogeneze, mohou představovat potencionální terapeutické cíle u řady onemocnění, jako například onemocnění srdce, endokrinních a metabolických poruch a u nádorových onemocnění. [6]

2. Receptory PPAR

PPAR jsou receptory aktivované peroxizomovými proliferátory. PPAR ovlivňují expresi mnoha genů, jejichž produkty jsou zapojeny do metabolismu lipidů, rovnováhy glukózy, regulace zánětu, imunitních dějů, nádorového bujení, buněčné diferenciaci, proliferace a apoptózy. [9]

Název této skupiny látek byl odvozen od jejich schopnosti stimulovat proliferaci peroxizomů, což bylo poprvé popsáno u myši a potkanů. [8] Peroxizomy jsou malé kulovité buněčné organely, které se nacházejí v blízkosti endoplazmatického retikula. Účastní se β -oxidace mastných kyselin, metabolismu prostaglandinů a syntézy cholesterolu a žlučových kyselin. Při proliferaci peroxizomů dochází k výrazným změnám v morfologii, počtu i v jejich aktivitě. S peroxizomy rovněž souvisí celá řada dědičných onemocnění, které mohou být způsobeny ztrátou funkce enzymu přítomného v peroxizomu. [28]

2. 1. Struktura PPAR

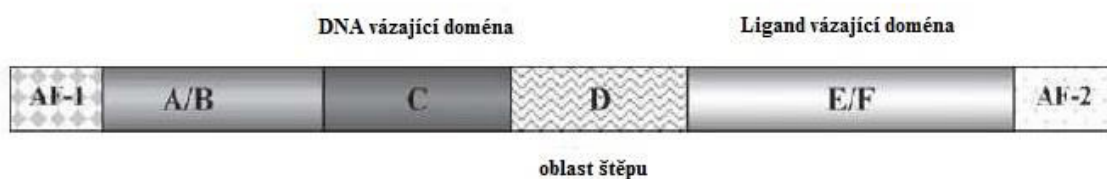
Receptory PPAR se skládají z několika funkčních a strukturních domén, typické pro většinu jaderných receptorů. Jak můžeme vidět na obrázku 1, PPAR obsahují čtyři hlavní domény, které jsou kódovány šesti exony (A-F). N-koncová A/B doména je nejvariabilnější oblastí, označována jako AF-1 (Ligand-Independent Activation Function 1). DNA vázající doména (DNA- Binding Domain, DBD), je naopak vysoce konzervovaná oblastí. Díky ní receptor rozpozná specifickou sekvenci DNA, na kterou se naváže, tzv. PPRE (PPAR Response Element). DBD hraje taky významnou roli při tvorbě heterodimerů s receptory pro retinoid X. [9],[31]

DNA vázající doména je tvořena 71 aminokyselinami, které formují dva zinkové prsty. Ty jsou pro jaderné receptory typické a nevyskytují se u žádných jiných proteinů vázajících se k DNA. [28]

Variabilní oblast D je označována jako tzv. oblast čepu (hinge region). Tato oblast slouží jako spojka mezi DNA vázající doménou a ligand vázající doménou. Ligand vázající doména, též doména E (Ligand-Binding Domain, LBD), představuje multifunkční doménu. Umožňuje vazbu ligandu a aktivaci receptoru, zprostředkovává heterodimerizaci a interaguje s heat-shock proteiny. [4], [32]

LBD doména obsahuje COOH-koncovou doménu AF-2 (Ligand-Dependent Activation Function 2). Ta je zodpovědná za transkripční aktivitu a je důležitá pro interakci s koaktivátory. [28], [34]

LBD doména má trojvrstvou strukturou, která je tvořena dvanácti α -helixy (označovanými H1-H12) a jedním β -skládaným listem. Součástí této struktury je i ligand vázající kapsa (Ligand-Binding Pocket), do které se ligand váže. [28], [34]



Obrázek 1: Schematické znázornění struktury PPAR. [33], [1]

2. 2. Aktivace PPAR

K aktivaci PPAR dojde po navázání PPAR agonistů a to buď přírodních nebo syntetických. K aktivaci PPAR receptorů dochází po tvorbě heterodiméru s retinoidním jaderným receptorem X-RXR (retinoid X faktor), který je členem jaderných hormonálních receptorů, zahrnující tři izoformy genů – RXR- α , RXR- β , RXR- γ . Vytvořený heterodimér se naváže do promotorové oblasti cílového genu na specifický úsek DNA. Tyto úseky se nazývají responzivní elementy pro peroxizómové proliferátory (PPRE). [28] Na schématu 1 vidíme vazbu heterodiméru na PPRE, vedoucí k aktivaci transkripce specifických genů s následnou syntézou příslušných proteinů, které zprostředkují vlastní biologický účinek PPAR. [9]

PPARs bez navázaného ligandu interagují s korepresorovým komplexem. Ten obsahuje histondeacetylázu. V tomto komplexu brání korepresor receptorům vazbě na DNA a inhibuje tím transkripci genu. Po vazbě ligandu dojde ke konformačním změnám, které způsobí uvolnění tohoto represoru a PPAR vytvoří heterodimer s receptorem pro retinoid X (RXR). [28]

Tento heterodimér se po vazbě RNA polymerázy II a koaktivátoru s histonacetyltransferázovou aktivitou naváže na DNA cílového genu a to prostřednictvím PPRE. Tím dojde ke zvýšené transkripci tohoto genu. Mezi korepresory bránící vazbě PPAR na DNA řadíme např.:

jaderný korepresor receptorů (NcoR), thyroideální receptor (SMRT) nebo transkripční represor BCL-6. Mezi koaktivátory patří koaktivátor steroidních receptorů (SRC-1), PPAR vázající protein (PBP). [28]

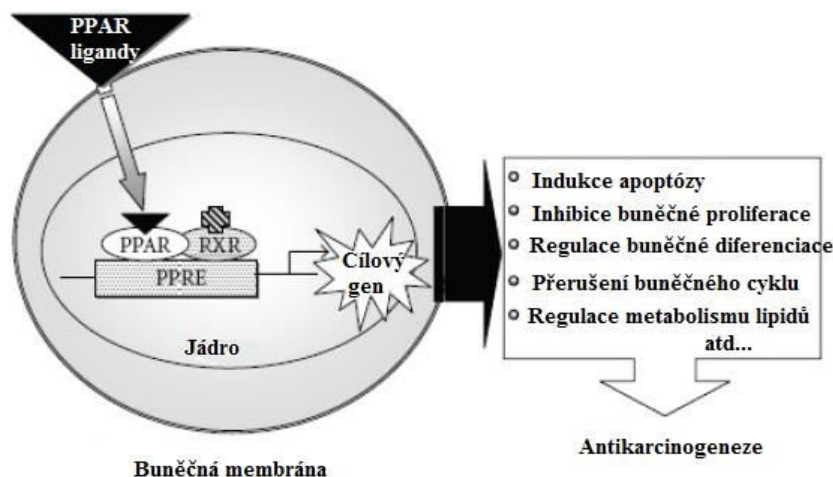


Schéma 1.: Aktivace PPAR a specifických genů. Po vazbě příslušného ligandu vytvoří molekula PPAR heterodimér s molekulou retinoidního receptoru X. V této aktivované podobě se molekula PPAR váže do oblasti promotoru různých genů a ovlivňuje tak jejich transkripci. Vazebné místo pro PPAR je označováno jako PPRE. [9], [16], [2]

K aktivaci PPAR může docházet také například fosforylací nebo ubikvitinací. Vliv fosforylace závisí na buněčném typu, typu receptoru a také na metabolizované látce. Například fosforylace PPAR- α pomocí MAPK dráhy vede v hepatocytech ke zvýšení jeho aktivity. Fosforylace PPAR- γ v adipocytech vede naopak k inhibici. [54] Aktivita jaderných receptorů může být dále regulována ubikvitin-proteazomovým degradačním systémem. [15]

2. 3. Izoformy PPAR a jejich exprese ve tkáních

V současné době jsou známy tři izoformy, PPAR- α (též označován jako NR1C1), PPAR- β (NR1C2) a PPAR- γ (NR1C3), kódované třemi různými geny. Receptory se vzájemně liší svou funkcí ve fyziologických procesech, mírou exprese ve tkáních a specifitou k ligandům. [28]

Gen pro PPAR- α byl objeven v roce 1990 u myši a později i u člověka. [8] Tento gen je u člověka lokalizován na 22. chromozómu. [10]

Gen pro PPAR- γ byl poprvé identifikován u žáby drápatky (*Xenopus laevis*), u člověka je lokalizován na 3. chromozómu. [8],[11] Gen pro PPAR- β je lokalizován na 6. chromozómu. [12]

Receptory PPAR jsou hojně exprimované ve tkáních a orgánech po celém těle. Proto jsou častými cílovými transkripčními faktory mnoha signálních drah. [28] Díky tomu mohou regulovat transkripci genů zapojených v celé řadě důležitých metabolických procesů. Všechny tři izoformy jsou zapojeny především v metabolismu lipidů, glukózy a svou roli hrají také při vývoji nádorů. [28]

Zvýšená exprese PPAR byla nalezena v mnoha nádorových buněčných liniích, a to v mozkových, plicních, prostatických buněčných liniích, v liniích odvozených od nádorů mléčné žlázy, žaludku a tlustého střeva. [15], [37],[38],[39],[40]

Hlavními místy exprese PPAR- α jsou játra, srdce, příčně pruhované svalstvo, ledviny a trávicí trakt, tedy místa, kde ve velké míře probíhá β -oxidace mastných kyselin. Podílí se na proliferaci peroxizomů, regulaci lipidového metabolismu, snižuje hladinu triglyceridů a podílí se na regulacích zánětlivých reakcí endotelových buněk a v patogenezi aterosklerózy. [13]

PPAR- β se vyskytuje téměř ve všech tkáních, nejvíce se však vyskytují v placentě, teném střevě, slezině a v nervovém systému. Tato izoforma se podílí na regulaci β -oxidace mastných kyselin a zpětném transportu cholesterolu, metabolismu glukózy a lipoproteinů. [28] Jejich další význam je především diferenciaci buněk a tkání v embryonálním vývoji. [13]

Expres PPAR- γ se liší v typu izoformy a tkáně, v které se nachází. Isoforma PPAR- γ 1 se nachází v mnoha tkáních, izoforma PPAR- γ 2 se nachází pouze v tukové tkáni a izoforma PPAR- γ 3 se hojně vyskytuje v tlustém střevě a v bílé tukové tkáni. [28] Receptory se podílí na ukládání triglyceridů, mají vliv na inzulínovou senzitivitu a hrají důležitou roli v zánětlivých onemocněních, v kardiovaskulárních chorobách, v selhání činnosti srdce a v ateroskleróze. [14]

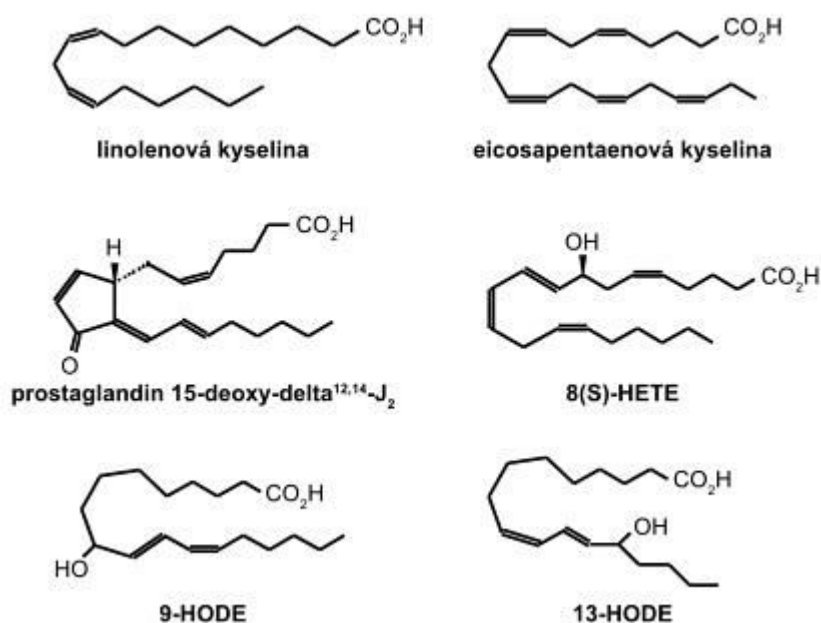
2. 3. Ligandy PPAR

Byla identifikována celá řada přírodních (endogenních) a farmakologických (syntetických) ligandů, aktivujících PPAR. Krystalografická analýza LBD domény prokázala, že ligand vázající kapsa je u receptorů PPAR- α a PPAR- γ mnohem větší než u jiných receptorů. Tato skutečnost může být jedním z vysvětlení schopnosti těchto receptorů vázat skupinu jak přírodně se vyskytujících tak syntetických látek. [28]

2.3.1. Přírodní ligandy

Mezi přírodní ligandy, vážící se na všechny izoformy PPAR, řadíme celou škálu volných mastných kyselin a jejich deriváty, tedy eicosanoidy a prostaglandiny. PPAR- α je aktivována mimo zmíněné proliferátory peroxizomů, například esenciálními mastnými kyselinami, jako jsou kyselina palmitová, olejová, stearová, arachidonová apod., některé eicosanoidy, prostaglandinem A₂ nebo kyselinou 8-hydroxyeicosatetraenovou (8-HETE). [15], [17], [28], [35]

Přirozenými ligandy PPAR- γ je řada polynenasycených mastných kyselin a jejich deriváty, včetně kyseliny linoleové, arachidonové a eicosapentaenové. Tyto kyseliny se vykytují v lidském organismu v mikromolárních koncentracích v plazmě. Dalším ligandem je například prostaglandin D₂ (PGD₂), 9- a 13-hydroxyoktadekadienová kyselina (9-HODE, 13-HODE), 12- a 15-hydroxyeicosatetraenová kyselina (12-HETE, 15-HETE) a prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$, prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) [15],[35] Mezi přirozené ligandy PPAR- β řadíme prostacykliny. [15]

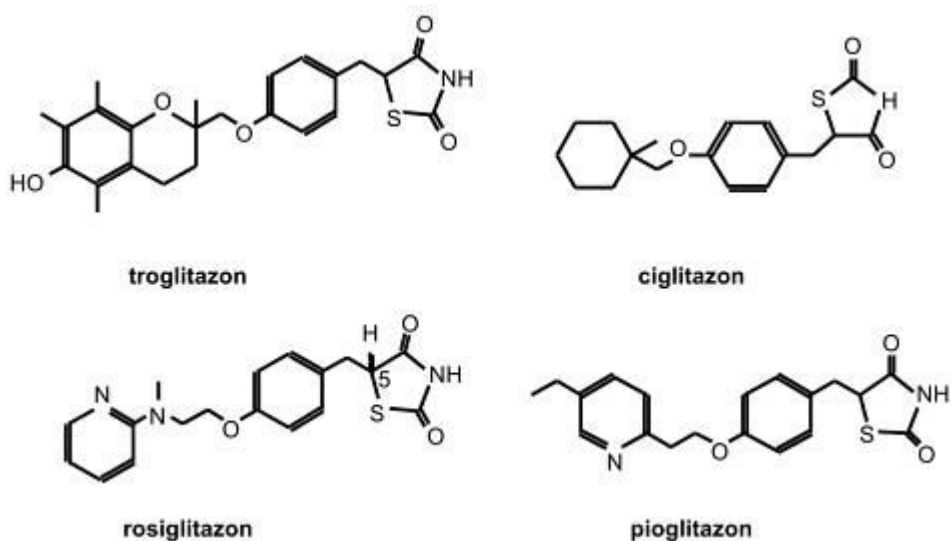


Obrázek 2: *Struktura vybraných přírodních ligandů PPAR.* [35], [3]

2.3.2. Syntetické ligandy

Syntetické ligandy začaly být vyráběny za účelem léčby onemocnění, jako jsou například cukrovka nebo metabolický syndrom. [28]

Stejně jako přírodní ligandy, tak i syntetické, aktivují receptory PPAR, tedy převádějí tyto receptory do transkripčně aktivních forem. Nejstudovanější skupinou syntetických ligandů jsou thiazolidindiony (TZD) glitazary a fibráty. Většina TZD jsou ligandy receptorů PPAR- γ . Mezi hlavní zástupce řadíme pioglitazon, rosiglitazon, troglitazon, ciglitazon a další. Hlavním účinkem je snižování koncentrace hladin glukózy v krvi, snižují glykosylovaný podíl hemoglobinu, hladinu inzulínu v séru a také krevní tlak. Pro svůj antidiabetický účinek jsou TZD užívány při léčbě diabetu II. typu. U ciglitazonu a troglitazonu byl prokázán antiproliferační účinek u buněčných liniích odvozených od celé řady nádorů. Stejně jako u PPAR- α , tak u PPAR- γ existuje řada nových ligandů, například oxidované alkyl-fosfolipidy, ibuprofen, indometacin, ale také xenobiotika, jako ftaláty, herbicidy, pesticidy a další. [9], [15] Dalšími ligandy PPAR- α jsou například kyselina pseudolarová. [15], [28]



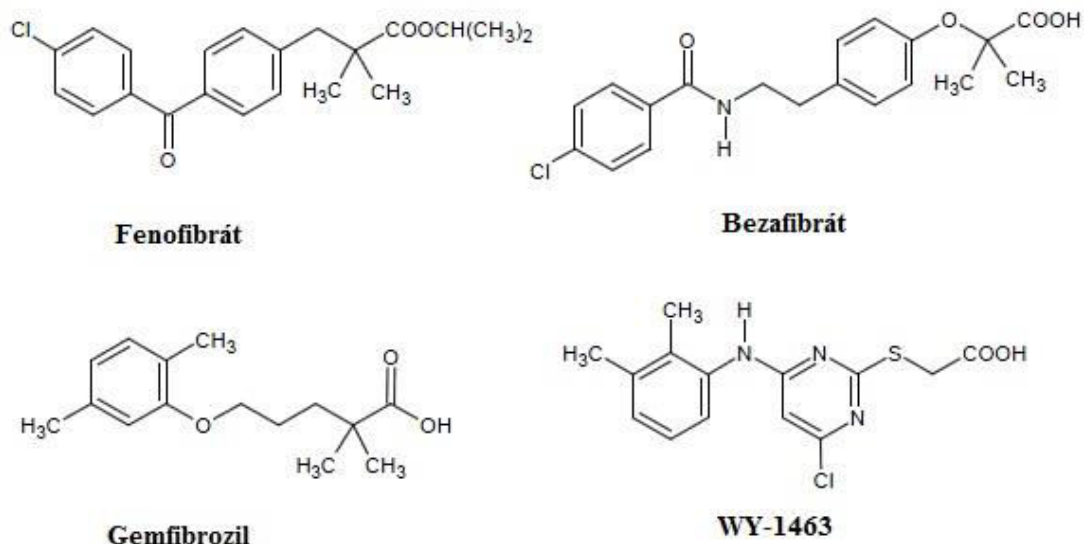
Obrázek 3: Struktura vybraných syntetických ligandů PPAR (TZD). [35], [4]

2.3.2.1. Fibráty

Fibráty patří mezi skupinu syntetických ligandů PPAR. Byly objeveny v 60. letech při experimentálních výzkumech zaměřených na hledání látek snižující sérové koncentrace lipidů. Dnes je řadíme mezi nejvýznamnější skupinu léků v této oblasti. [35]

Mechanismus působení je veden přes receptory PPAR. Právě receptory PPAR- α regulují expresi genů, které ovlivňují důležité enzymy a proteiny v metabolismu lipidů. Hlavním účinkem fibrátů je tedy snížení triglyceridů a zvýšení ochranného HDL cholesterolu. Fibráty působí příznivě na koagulační faktory, dále byl prokázán vliv na regresi aterosklerózy v koronárních tepnách a na zlepšení endoteliální dysfunkce. [36] Jako první byl v roce 1962 popsán klofibrát. Teprve další výzkumy vedly k vytvoření řady dalších zástupců této lékové skupiny. [28], [35], [36]

Zmíněný klofibrát a novější zástupci jako fenofibrát jsou agonisti PPAR- α a PPAR- γ , avšak afinita k PPAR- α je několikanásobně vyšší. Dalšími zástupci jsou gemfibrozil a bezafibrát, ten je agonistou všech tří izoform PPAR. Další fibrát, WY-1463, často používaný především v experimentálních studiích, je také agonistou PPAR- α . [35], [36]



Obrázek 4: *Struktura vybraných látek ze skupiny fibrátů.* [35], [5]

2.3.3. Duální agonisté

Duální agonisté jsou takové ligandy, které současně aktivují více izoformem PPAR. [15] Duální agonisté PPAR- α/γ nabízejí terapeutické využití. Tyto látky mohou jednak snižovat hladinu glukózy, ale také omezovat vývoj a vznik aterosklerózy. [15], [18], [19]

Jak můžeme vidět na schématu 2, běžně užívané thiazolidindiony jsou specifickými agonisty PPAR- γ a vykazují inzulin-senzitizující efekt, ovšem téměř zcela postrádají účinky na hladiny lipidů. [20]

Na druhé straně stojí fibráty, jejichž významný hypolipidemický účinek, je připisován aktivaci PPAR- α . Oproti prokázané účinnosti agonistů PPAR- α na parametry lipidového metabolismu, je jejich efekt na inzulinovou senzitivitu spíše opačný. [20] Z těchto pozorování vyplývá hypotéza, že pokud by bylo možné cíleně syntetizovat látky s definovanou afinitou současně k PPAR- α i PPAR- γ , mohly by působit současně jako antidiabetika a hypolipidemika. [20]

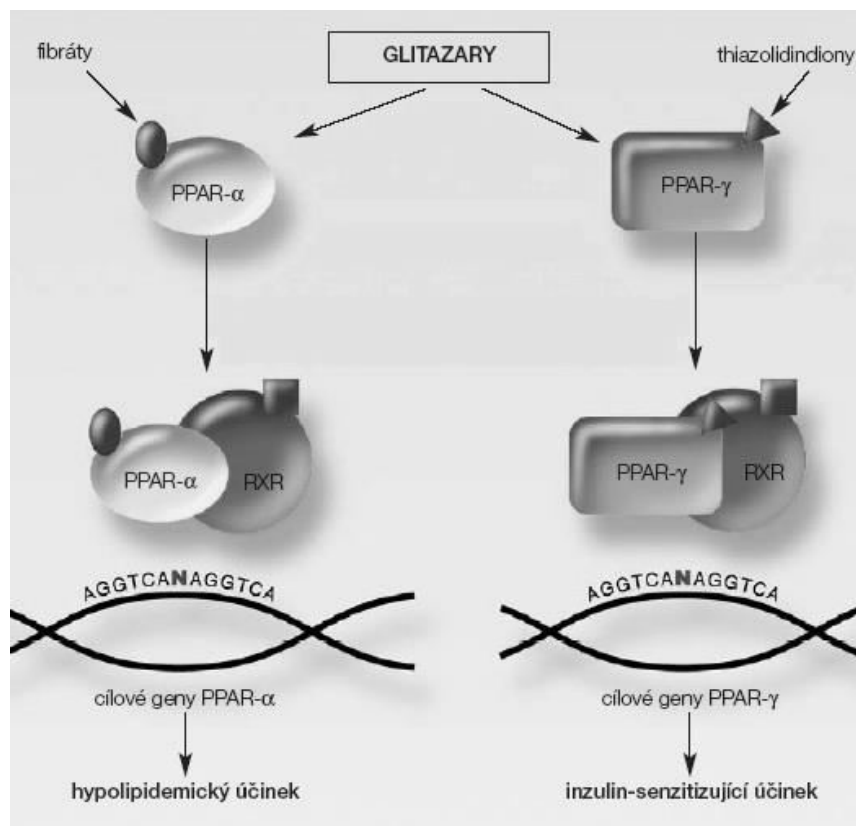


Schéma 2: Duální agonismus PPAR- α/γ [20], [6]

3. PPAR v karcinogenezi a chemoprevenci

Nádorové onemocnění je charakterizováno jako neregulovatelný růst buněk spojený s poruchami kontrolních mechanismů a buněčné diferenciace. Nekontrolovatelný růst buněk vede k zvětšení poškozené tkáně, která může stlačovat okolní struktury nebo k postupné invazi do okolní tkáně a vzniku metastáz. Ukázalo se, že nádor vzniká z jedné společné buňky. Většinou trvá desítky let, než dojde k mutagení iniciaci a ke vzniku metastázuujícího nádoru. Maligní transformace této buňky probíhá přes akumulaci mutací ve specifických genech kontrolující buněčný cyklus a DNA reparaci. Tento proces je také podporován uvolněním prozánětlivých cytokinů, které spouští proliferaci a zároveň kontrolují přežívání nádorových buněk a angiogenezi. [9], [41]

Protoonkogeny podporují proliferaci buňky, naopak nádorové supresorové geny její růst inhibují. Jestliže mutují nebo jsou aktivovány, stávají se protoonkogeny karcinogenními onkogeny. Mutace způsobí, že protoonkogen většinou poskytuje příliš mnoho růst stimuluujícího proteinu nebo jeho nadměrně aktivní formu, kdežto nádorové supresorové geny přispívají k rakovině, jestliže jsou mutací inaktivovány. [9], [41]

Předmětem studia jsou metody, které by vedly k inhibici procesu karcinogeneze. Mezi tyto metody patří například indukce diferenciace nebo apoptózy, inhibice angiogeneze a inhibice proliferace. [9]

3. 1. Ligandy PPAR- α v karcinogenezi

Receptory PPAR jsou exprimovány v celé řadě nádorů. Četné studie dokazují, že PPAR ligandy mohou být zajímavým kandidátem nejen pro terapii, ale i pro chemoprevenci některých typů rakoviny. [9], [18]

Do současnosti bylo publikováno několik studií dokládajících působení ligandů PPAR- α na nádorová onemocnění. Konkrétně, ligandy PPAR- α zabraňují růstu několika nádorovým buněčným liniím, řadí se mezi ně buněčné linie odvozené od nádorů tlustého střeva, dělohy, melanomu, karcinomu plic, glioblastomu a fibrosarkomu. [21],[22],[23],[43]

Na piedestal se dostává debata o potencionálním využití fibrátů na léčbu nádorových onemocnění. Fibráty podporují epidermální diferenciaci, zvyšují apoptózu a inhibují buněčnou proliferaci u normálních a hyperproliferujících myších epidermů. [9]

Prvním a nejvýznamnějším zástupcem je fenofibrát. Tento agonista PPAR- α byl po desetiletí využíván k léčbě hypertriglyceridémii a smíšeným dyslipidemií. Nedávné studie ukázaly, že fenofibrát může mít protinádorové účinky, mechanismus ale není zcela objasněn. Tyto protinádorové účinky byly prokázány u B-buněčného lymfomu, rakoviny prostaty, glioblastom, karcinom dlaždicových buněk, hepatocelulárního karcinomu, gliomu, melanomu, u rakoviny plic, fibrosarkomu. [29],[42],[43],[44],[45],[46],[47],[48],[49] Bylo potvrzeno, že fenofibrát při koncentraci nad 25 μ M inhibuje proliferaci a zvyšuje apoptózu rakovinových endometriálních buněčných linií. Fenofibrát má tedy pozitivní účinky na progresi nádorů. Rakovinové buňky jsou jeho působením oslabeny a výsledkem je inhibice růstu nádoru. [29],[42],[44]

Bezafibrát je také agonistou PPAR- α , který snižuje hladinu cholesterolu a triglyceridů v krvi, což vede ke snížení systémové dostupnosti mastných kyselin. Tyto účinky přispěly také k inhibici růstu střevních nádoru u hlodavců a u člověka. [51] Dále bylo zjištěno, že svým působením na buněčné linie akutní promyelocytární leukémie, vyvolává mitochondriální poruchy. Toto zjištění naznačuje další možné terapeutické využití. [50]

Další zástupce, gemfibrozil, agonista PPAR- α , je často předepisován pacientům ke snížení hladiny triglyceridů. Tento lék snižuje riziko koronárních srdečních onemocnění snížením hladiny cholesterolu. Gemfibrozil vykazuje protizánětlivé účinky. Mechanismem účinku je inhibice prozánětlivých cytokinů. Předmětem výzkumu bylo ovlivnění životaschopnosti buněk. Gemfibrozil v různých použitých koncentracích (100, 200, a 300 μ M) nesnižoval životaschopnost. Proto inhibice exprese prozánětlivých molekul nebylo způsobeno změnou v životaschopnosti buněk. [52]

Existují ale rovněž studie, které popisují nežádoucí pronádorové působení PPAR- α ligandů. [9], [18] Bylo zjištěno, že v karcinomu potkaních mléčných žláz epiteliálních buněk, byla významně zvýšena PPAR- α exprese mRNA, což naznačuje možnou roli této izoformy v karcinogenezi prsní žlázy u hlodavců. Pro zjištění přítomnosti PPAR- α v buněčných liniích, byly použity ligandy WY-14643 a klofibrát. Podpora proliferace v buněčných liniích rakoviny prsu po aktivaci PPAR- α je v ostrém kontrastu s účinky PPAR- γ , které naopak snižují proliferaci buněk u rakoviny prsu. Tyto výsledky stanovily přítomnost PPAR- α v lidských nádorových buněčných liniích prsu a ukázaly, že jejich aktivace vede k proliferaci. [53]

3.1.1. Mechanismy působení ligandů PPAR- α v nádorových buňkách

Nádorové buňky vykazují stejné metabolické vlastnosti jako normální tkáň, s charakteristicky zvýšenou aerobní glykolýzou, glutaminázou a zvýšenou syntézou lipidů. PPAR- α mají velký potenciál, kterým se běžně doplňují protinádorové léčby modulací energetického metabolismu nádorových buněk a signálních drah. Tato skutečnost je založena na několika pozorováních. PPAR- α zprostředkovávají inhibici dvou významných onkogenů: c-myc a Akt. U této inhibice PPAR- α potlačuje tvorbu glukózy, glutaminu v mitochondriích, a zároveň podporuje oxidaci mastných kyselin. [30]

Byla identifikována zvýšená exprese PPAR- α a snížená exprese retinoidního X receptoru δ . [24] Agonisté RXR umocňují inhibiční vliv ligandů PPAR- α na růst buněk. [22] Synergický účinek agonistů RXR a PPAR byl podobně popsán například u nádorů prsu. [23], [9]

Některé studie přímo prokazují spojení mezi aktivací PPAR- α a epidermální diferenciací. Myši s nádorovým bujením byly vystaveny působení selektivního ligandu PPAR- α , čímž došlo ke snížení hladiny proangiogenních epoxygenázových metabolitů a následné redukci růstu nádoru. Tyto účinky se neprojevily u těch myší, u kterých byla zjištěna absence PPAR- α . PPAR- α tedy inhibují také angiogenezi. Tyto účinky jsou zprostředkovány inhibicí proliferace endotelových buněk a PPAR- α , závislých na regulaci cytochromu P450 CYP2C, což je enzym, který katalyzuje epoxidaci kyseliny arachidonové (AA) na kyseliny epoxyeicosatrienová (EET), které podporují angiogenezi. PPAR- α ligandy mohou zvýšit syntézu PPAR- γ agonistů, např. 15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2), který může způsobit inhibici buněčné proliferace a zvýšit apoptózu v nádorových buňkách.

K dispozici jsou další potenciační dráhy, které mohou inhibovat vznik nádorů nebo nádorový růst. Za prvé, PPAR- α inhibuje zánětlivé signalizace prostřednictvím represivních mechanismů zprostředkovaných interakcí s p65, podjednotkou NF- κ B (jde o transkripční faktory, které se váží na promotory RNA polymerázy II a ovlivňují tak expresi genů důležitých pro imunitu, zánětlivou odpověď, buněčný růst a buněčnou smrt). Za druhé, agonisté PPAR- α také negativně ovlivňují Warburgův efekt, zásahem do metabolických drah. Německý biochemik Oto Warburg zjistil, že nádorové buňky metabolicky preferují anaerobní glykolýzu, tedy že konečným produktem metabolismu glukózy je kyselina mléčná. Toto zjištění následně interpretoval tak, že primární příčinou nádorů je mitochondriální porucha metabolismu. Aktivace receptoru PPAR- α může zvýšit mitochondriální oxidaci mastných kyselin a inhibici exprese glutaminázy,

což snižuje hladiny glutaminu a omezuje tak růst rakovinných buněk. Mastné kyseliny a glutamin jsou enzymaticky vyrobeny Warburgerovým efektem.

Vzhledem k těmto účinkům, by mohly být agonisté PPAR- α použity pro prevenci a k léčbě více typů nádorů.

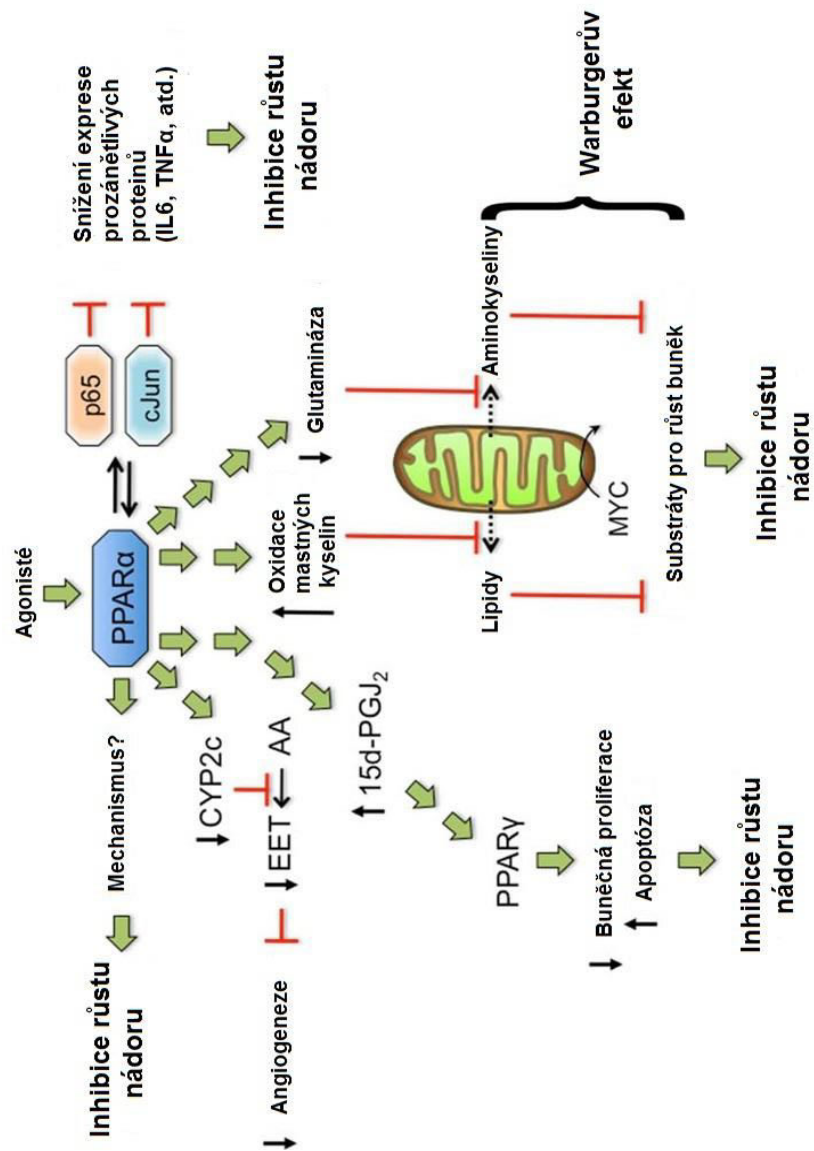


Schéma 3: Potenciální cílení PPAR- α pro prevenci a léčbu nádorů. [26], [7]

3. 2. Ligandy PPAR a chemoprevence

Bezpochyby nejúčinnější cesta k omezení výskytu nádorových onemocnění je prevence vzniku. Celoživotní riziko vzniku nádorového onemocnění je přibližně 40%. Předpokládá se, že prostá úprava dietních návyků, změna životního stylu, udržování přiměřené tělesné hmotnosti a dostatek tělesné aktivity, by mohly vést ke snížení prevalence nádorových onemocnění o 30-40%. [27]

Chemoprevencí pak rozumíme použití přirozených či syntetických látek za účelem prevence vzniku nádoru nebo jeho zpomalení, zastavení nebo zvratu již započatého karcinogenního procesu. [27]

Nejstudovanější skupinou látek jsou retinoidy. Jde o přirozené nebo syntetické deriváty retinolu (vitamín A). Retinoidy do buňky pronikají difuzí, v cytoplazmě mohou účinkem izomeráz vznikat jejich deriváty, které se po průniku do jádra váží na specifické jaderné receptory (RAR-retinoid acid receptor, RXR-retinoid X receptor). Receptory pak vytvářejí homo- a heterodiméry. RXR receptory vytvářejí heterodiméry s dalšími jadernými receptory, příkladem mohou být právě PPAR.

Retinoidy vykazují účinky antiproliferační, diferenciační a proapoptické. Chemopreventivní účinek retinoidů byl popsán jen u některých typů nádorových onemocnění, například u akutní promyelocytární leukémie. [27]

Experimentální část

4. Stanovení viability u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění různými koncentracemi ligandů jaderného receptoru PPAR- α .

4. 1. Biologický materiál

Buněčná linie lidských epitelových buněk HeLa je odvozená od maligního karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové, v roce 1951.

Buněčná linie HEK293 je odvozena z primárních lidských ledvinných buněk potracených embryí. Poprvé byla vytvořena roku 1970 v Nizozemí Dr. Frankem Grahamem. Jde tedy o nenádorovou linii.

4. 2. Přístrojové vybavení

Termostat Series II water jacket CO2 Incubator (Thermo Scientific, USA), vodní lázeň (Julabo, USA), sterilní flowbox safety class II (Thermo Scientific, USA), inverzní mikroskop Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Nizozemí), centrifuga (Jouan, USA), Elisa reader Powerwave XS (Bio Tek Instruments, Inc., USA), analytické váhy (Sartorius, Německo) počítač, pipetátor s 5 a 10 ml sterilními sérologickými pipetami, automatické jednoduché pipety, multikanálové a opakovací pipety, sterilní špičky, kultivační lahvičky, 10 a 15 ml zkumavky, 1,5 a 2 ml sterilní eppendrofky, Elisa destičky, kalkulačka, počítadlo.

4. 3. Použité chemikálie

Standardní kultivační médium DMEM 10%

Složení: Dulbecco's Modified Eagle Medium, 100 IU/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% (v/v) fetální sérum, 0,25 mg/ml glutamin

Pro přípravu 500 ml 10% DMEM bylo sterilně přidáno k 440 ml DMEM média 50 ml fetálního séra, 5 ml penicilinu/streptomycinu a 5 ml glutaminu.

PBS

Složení: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ . 12 H₂O; 2 mM KH₂PO₄

Pro přípravu 1l 10x PBS bylo smícháno 32,1 g Na₂HPO₄; 2 g KH₂PO₄; 80 g NaCl; 2 g KCl a rozpuštěno v 950 ml dH₂O. Hodnota pH byla upravena na 7,6. Roztok byl doplněn do objemu 1l dH₂O.

WST

[2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Dodáván firmou Roche, Švýcarsko.

Trypsin, dodáván firmou PAA, Rakousko.

CryoSure DMSO, dodáván firmou WAK-Chemie Medical GmbH, Německo.

Fenofibrát, dodáván firmou Cayman Chemical, USA. Bylo naváženo 5,3 mg fenofibrátu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

Gemfibrozil, dodáván firmou Sigma Aldrich, USA. Bylo naváženo 3,75 mg gemfibrozilu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

Bezafibrát, dodáván firmou Cayman Chemical, USA. Bylo naváženo 5,41 mg bezafibrátu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

4. 4. Pracovní postup

4.4.1. Kultivace buněk

Buněčné linie HeLa a HEK293 byly kultivovány v CO₂ inkubátoru v kultivačních lahvích v kultivačním médiu 10% DMEM při teplotě 37 °C a obsahu CO₂ 5 %. Byly pasážovány 3x týdně, za použití standardních trypsinizačních metod.

4.4.2. Stanovení IC₅₀ pro různé ligandy PPAR- α v buněčných liniích HEK293 a HeLa

Buňky HeLa a HEK293 byly v kultivační nádobě ztrypsinizovány a spláchnuty médiem do 15 ml sterilní zkumavky a stočeny na centrifuze (1200 rpm, 5 min). Supernatant byl odsán a pelet byl rozpuštěn kultivačním médiem DMEM na objem 1 ml. Následně bylo odebráno 10 μ l vzniklé suspenze a přeneseno do sterilní eppendorfky, poté bylo přidáno 90 μ l kultivačního média DMEM. Vše bylo řádně rozsuspendováno. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 10 μ l a přeneseno do Bürknerovy komůrky, kde byly buňky spočítány a naředěny na požadovanou koncentraci. Pro HEK293 byla požadovaná koncentrace 62 500 buněk/ 1 ml, u HeLa byla požadovaná koncentrace 125 000 buněk/ 1 ml. Buňky o dané koncentraci byly vyředěny na jamku s 80 μ l média a vysety na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Do jamek sloužících jako blank bylo pipetováno pouze čisté kultivační médium o objemu 80 μ l, do jamek sloužících jako pozitivní kontrola byly pipetovány buňky, které nebyly následně ovlivněny fibráty. Po 24 hodinách od výsevu byly k buňkám přidány fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil o různých koncentracích. Inkubace probíhala 72 hodin při teplotě 37 °C. Po

inkubaci bylo do každé jamky přidáno opakovací pipetou 10 μ l WST, dle pokynů výrobce. Následovala inkubace 1-1,5 hodiny. Absorbance byla měřena na Elisa readeru při vlnové délce 450 nm. Test viability (životaschopnosti buněk) byl prováděn ve třech opakováních. Na základě získaných průměrných hodnot absorbancí byly stanoveny hodnoty IC[90].

Principem metody je posouzení účinku vybraných fibrátů na buněčné linie HeLa a HEK93. Pro stanovení inhibiční koncentrace (IC[90]) byla použita modifikovaná metoda kolorimetrického MTT testu s použitím tetrazoliové soli [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] (WST). MTT test slouží k měření cytotoxicity látek. Podstatou testu je redukce tetrazoliové soli na barevný, ve vodě nerozpustný formazan. Přeměna probíhá pouze u metabolicky aktivních, tedy živých buněk, za přítomnosti mitochondriálních enzymů, přičemž množství vznikajícího formazanu je přímo úměrné počtu buněk, které přežily. Intenzita zbarvení formazanu je měřena spektrofotometricky.

4.4.2. Stanovení nejvyšší viability buněčných linií

Princip metody zůstává stejný jako u MTT testu. Požadovaná koncentrace pro HEK293 byla 62 500 buněk/ 1 ml, u HeLy byla požadovaná koncentrace 120 000 buněk/1 ml. Po vysetí na 96 jamkovou mikrotitrační destičku, byly buňky po 24 hodinách ovlivněny fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem o různých koncentracích. Inkubace probíhala 72 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno opakovací pipetou 10 μ l WST, dle pokynů výrobce. Následovala inkubace 1-1,5 hodiny. Absorbance byla měřena na Elisa readeru při vlnové délce 450 nm. Test byl prováděn ve třech opakováních. Na základě získaných průměrných hodnot absorbancí, byly stanoveny hodnoty nejvyšší viability buněčných linií, které byly použity při imunocytochemii.

5. Stanovení exprese vybraných antigenů pomocí imunocytochemie v buněčných liniích po ovlivnění ligandy PPAR- α

5. 1. Biologický materiál

Buněčná linie lidských epitelových buněk HeLa je odvozená od maligního karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové, v roce 1951.

Buněčná linie HEK293 je odvozena z primárních lidských ledvinných buněk potracených embryí. Poprvé byla vytvořena roku 1970 v Nizozemí Dr. Frankem Grahamem. Jde tedy o nenádorovou linii.

5. 2. Přístrojové vybavení

Termostat Series II water jacket CO2 Incubator (Thermo Scientific, USA), vodní lázeň (Julabo, USA), sterilní flowbox safety class II (Thermo Scientific, USA), box s laminárním prouděním vzduchu (Merci, ČR), magnetické míchadlo (Laboratorní přístroje, Praha), Rapid Microwave Histoprocessor (Milestone, USA), mikroskop s CCD kamerou (Olympus DP71, Japan), počítač, podložní skla, krycí skla, Petriho misky, barvicí květy, hydrofobní fix, pipetátor s 5 a 10 ml sterilními sérologickými pipetami, automatické jednoduché pipety, sterilní špičky, kádinky, odměrné válce, 1,5 a 2 ml sterilní eppendorfky, filtrační papír, buničina, kalkulačka, počítadlo.

5. 3. Použité chemikálie

Standardní kultivační médium DMEM 10%

Složení: Dulbecco's Modified Eagle Medium, 100 IU/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin, 10% (v/v) fetální sérum, 0,25 mg/ml glutamin

Pro přípravu 500 ml 10% DMEM bylo sterilně přidáno k 440 ml DMEM média 50 ml fetálního séra, 5 ml penicilinu/streptomycinu a 5 ml glutaminu.

Citrátový pufr, pH 6

Složení: 9 ml 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ a 41 ml 0,1M $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, doplněno do objemu 0,5 l dH₂O

PBS

Složení: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 mM KH₂PO₄

Pro přípravu 1 l 10x PBS bylo smícháno 32,1 g Na₂HPO₄; 2 g KH₂PO₄; 80 g NaCl; 2 g KCl a rozpuštěno v 950 ml dH₂O. Hodnota pH byla upravena na 7,6. Roztok byl doplněn do objemu 1 l dH₂O.

Primární protilátky:

Cyklin A, rabbit polyclonal IgG;

Cyklin E, mouse monoclonal IgG;

Cdc25A, mouse monoclonal IgG;

všechny dodávány firmou Santa Cruz Biotechnology Inc., USA.

Sekundární protilátka:

DAKO REAL EnVision HRP Mouse/Rabbit, dodávána firmou DAKO, USA.

DAB (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System), dodáván firmou DAKO, USA

ProteinBlock DAKO, dodáván firmou DAKO, USA.

DAKO antibody diluent, dodáván firmou DAKO, USA.

Hematoxylin Mayerův (čerstvě připravený, na 100 ml destilované vody: 0,1 g hematoxylin, 0,02 g jodičnan sodný, 5 g síran hlinito-draselný, 0,1 g kys. citronová, 5 g chlorhydrát)

CryoSure DMSO, dodáván firmou WAK-Chemie Medical GmbH, Německo.

Fenofibrát, dodáván firmou Cayman Chemical, USA. Bylo naváženo 5,3 mg fenofibrátu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

Gemfibrozil, dodáván firmou Sigma Aldrich, USA. Bylo naváženo 3,75 mg gemfibrozilu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

Bezafibrát, dodáván firmou Cayman Chemical, USA. Bylo naváženo 5,41 mg bezafibrátu a rozpuštěno v 1,5 ml DMSO.

xylene (Chemopol, Praha), etanol (Penta, Chrudim), methanol (Penta, Chrudim), aceton (ML chemica, Troubsko), Tween (Sigma-Aldrich), dH₂O, peroxid vodíku (Lach-Ner), pertex

5. 4. Pracovní postup

5.4.1. *Imunocytochemie*

Buněčné linie HEK293 a HeLa byly vysety na sterilní podložní skla v Petriho miskách, požadovaná koncentrace pro HEK293 byla 120 000 buněk/ 1 ml, u HeLy byla požadovaná koncentrace 240 000 buněk/1 ml. Po dobu 6 hodin buňky adherovaly na podložní skla v termostatu o teplotě 37°C. Poté byly buňky ovlivněny fenofibrátem, gemfibrozilem a bezafibrátem o koncentracích, stanovených na základě testu nejvyšší viability buněčných linií a IC[90]. Pak byly Petriho misky přelity DMEM. Po 72 hodinách byla skla opláchnuta PBS a následně vložena do kyvety, kde byla po dobu 15 minut fixována ledovou směsí metanol/acetone v poměru 1:1. Po tomto kroku lze buněčné linie uchovat pro pozdější analýzu při – 20°C.

Podložní skla byla po dobu 5 min oplachována pod tekoucí vodou. Poté 0,3% H₂O₂ (ředěným v destilované vodě), byla blokována endogenní peroxidáza, po dobu 15 minut. Pak byly preparáty opláchnuty pod tekoucí vodou. Následoval krok antigen retrieval, skla byla vložena do nádoby s citrátovým pufrům o pH 6 a vložena do přístroje Histos pro/Rapsial Microwave Histoprocessor na dobu 15 minut. Poté byla skla opláchnuta 5 minut pod tekoucí vodou a 5 minut v PBS. Skla byla osušena buničinou a okolí preparátu bylo označeno hydrofobním fixem. Nespecifické pozadí bylo blokováno ProteinBlock DAKO po dobu 10 min. Následně byly aplikovány primární protilátky cyklin A, cyklin E a Cdc25A. Protilátky byly ředěny s DAKO antibody diluentem v poměru cyklin A 1:100, cyklin E 1:50 a Cdc25A 1:50. Inkubace probíhala za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly preparáty opláchnuty 3x5 minut v PBS. Následně byla aplikována příslušná sekundární protilátka DAKO REAL EnVision HRP M/R. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poté byla skla opláchnuta v PBS. Na skla byl aplikován čerstvě připravený DAB (na 1 ml substrátového pufru 1 kapka chromogenu), po dobu 5 minut. Poté byla skla opláchnuta 5 minut pod tekoucí vodou. Jádra byla kontrastně dobarvena Mayerovým hematoxylinem po dobu 10 minut. Poté byla skla ponechána v kyvetě pod tekoucí vodou po dobu 5 min, aby došlo ke zmodrání jader. Následně byla skla odvodněna vzestupnou řadou alkoholu (1x5 min. 70% alkohol, 1x5 min. aceton), převedeny do xylenu (1x5 min. směs aceton-xylen 2:1) a projasněny (1x5 min. xylen 3, 1x5 min. xylen 4). Poté byly vzorky montovány pertexem a uzavírány pod krycí

sklíčko. Ze vzorků byly CCD kamerou Olympus DP71 pořízeny fotografie, při zvětšení 200x.

Z fotografií bylo určeno procento buněk, které exprimují studované proteiny a následně byla změna exprese vyjádřena pomocí fold change. Fold change je parametr, který udává kolikrát se v poměru ke kontrole zvýšila/ snížila sledovaná protilátka.

Imunocytochemická analýza se využívá k detekci proteinů v buněčných preparátech. Metoda využívá vazby primární protilátky na studovaný protein (antigenní determinant). Na primární protilátku se následně váže protilátka sekundární, která je značená křenovou peroxidasou (HRP). HRP přeměňuje substrát DAB (3,3'-diaminobenzidin) na hnědě zbarvený produkt. Jádra dobarvená hematoxylinem mají barvu modrou.

6. Výsledky

6. 1. Stanovení viability u buněčných linií HEK293 a HeLa po ovlivnění různými koncentracemi ligandů jaderného receptoru PPAR- α .

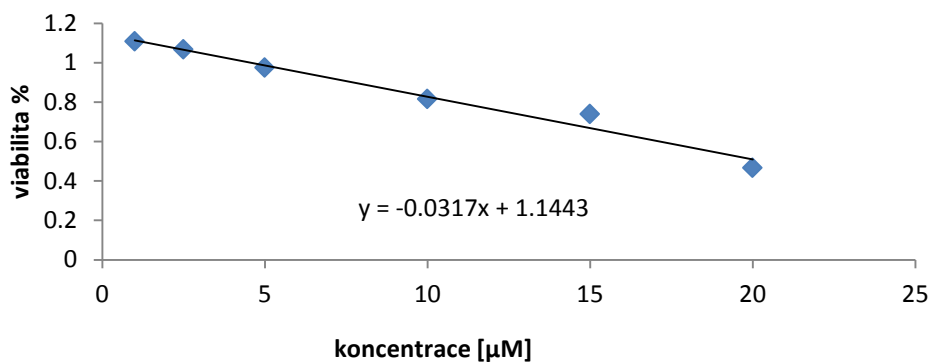
6.1.1. Stanovení IC[90] pro různé ligandy PPAR- α v buněčných liniích HEK293 a HeLa

Test viability buněk byl proveden ke stanovení hodnot IC[90] pro buněčné linie HEK293 a HeLa. Z průměrných hodnot naměřených absorbancí při vlnové délce 450 nm, byly stanoveny počty přeživších buněk pro každou koncentraci. Grafy 1-6 ukazují, že k inhibici viability buněk dochází v závislosti na použité koncentraci daného fibrátu. Z rovnic byla vypočtena hodnota IC[90]. Průměrné hodnoty inhibiční koncentrace IC[90] pro studované buněčné linie jsou shrnuty v tabulce 1. Stanovené průměrné hodnoty IC[90] byly použity pro ovlivnění buněk pro následné stanovení změny exprese vybraných regulačních proteinů buněčného cyklu pomocí imunocytochemie.

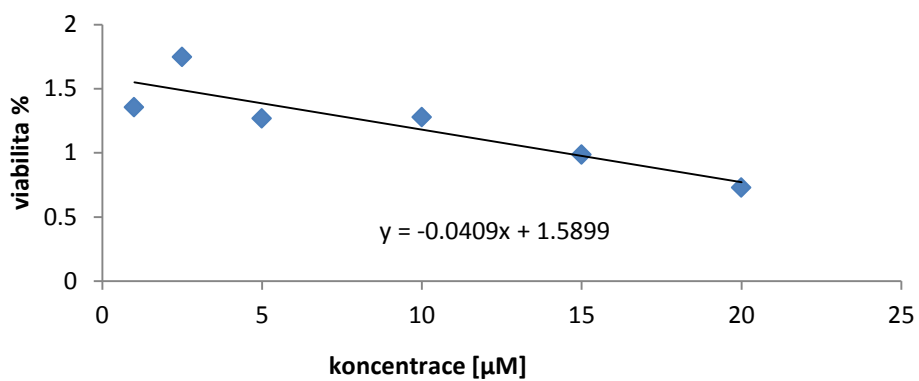
Tabulka 1: Průměrné hodnoty absorbance IC[90] při použití různých koncentrací vybraných fibrátů na buněčné linie HEK293 a HeLa.

	HEK293	HeLa
	IC[90]	IC[90]
Fenofibrát	14 $\mu\text{M} \pm 0.098$	312 $\mu\text{M} \pm 0.034$
Bezafibrát	106 $\mu\text{M} \pm 0.036$	182 $\mu\text{M} \pm 0.029$
Gemfibrozil	122 $\mu\text{M} \pm 0.121$	265 $\mu\text{M} \pm 0.119$

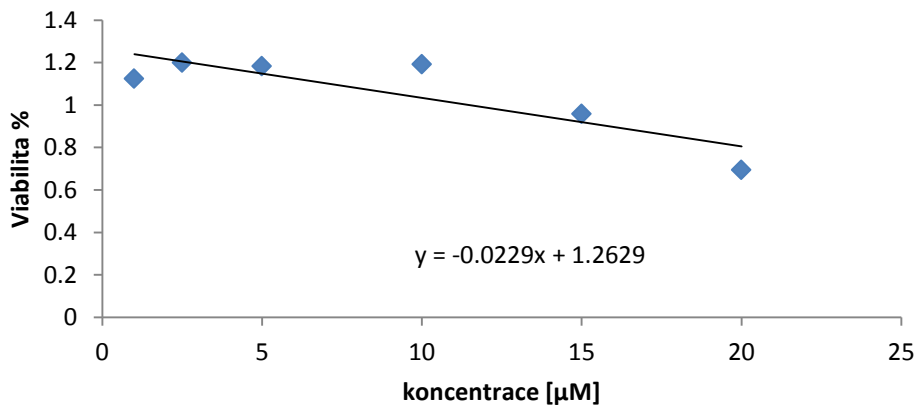
Graf 1a: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích fenofibrátu, 1. měření.



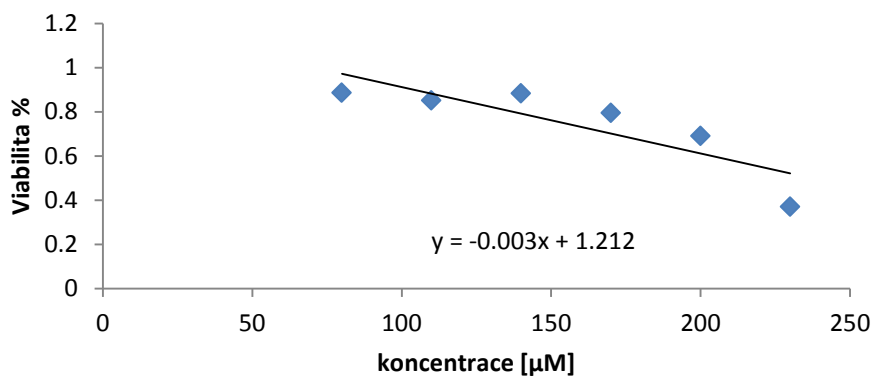
Graf 1b: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích fenofibrátu, 2. měření.



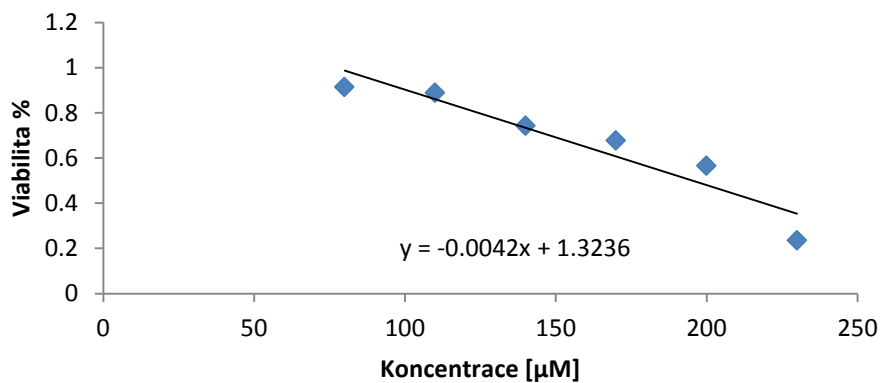
Graf 1c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích fenofibrátu, 3. měření.



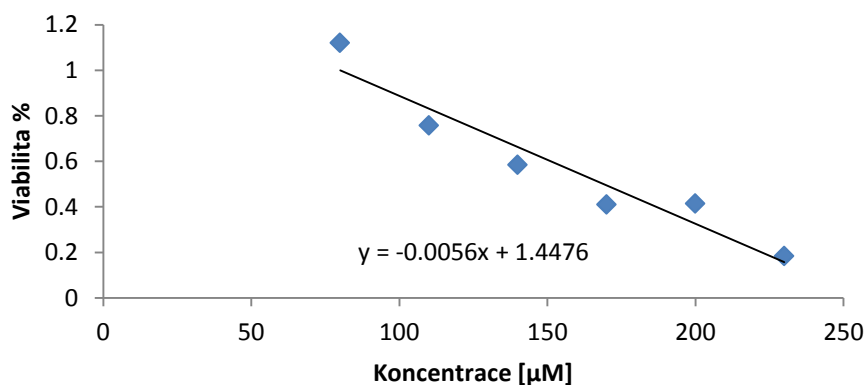
Graf 2a: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích bezafibrátu, 1. měření.



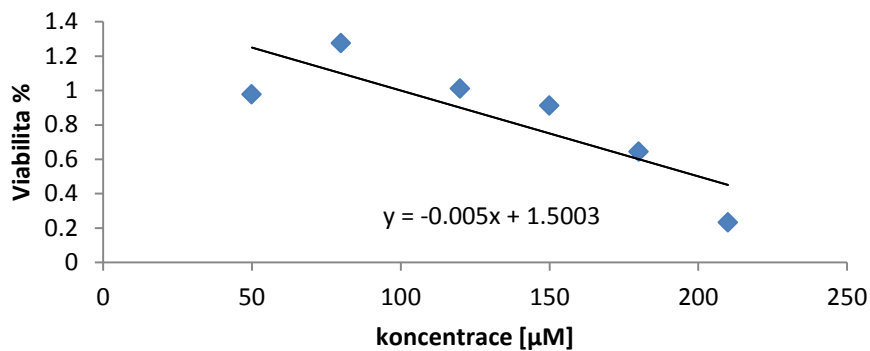
Graf 2b: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích bezafibrátu, 2. měření.



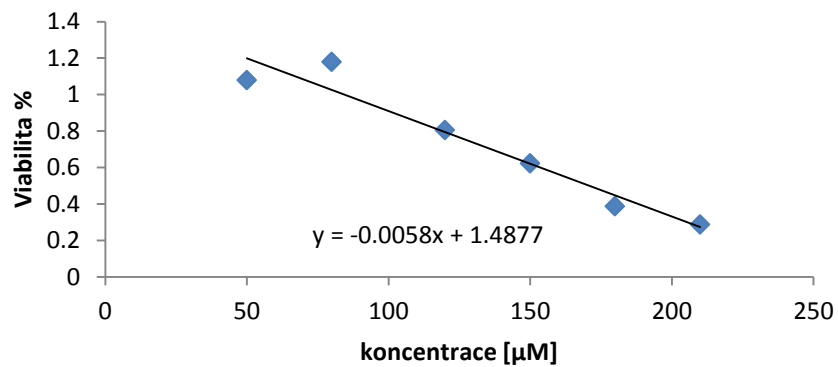
Graf 2c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích bezafibrátu, 3. měření.



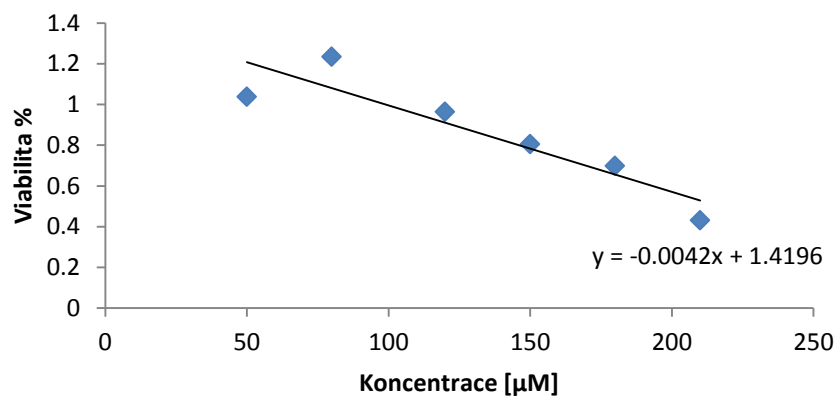
Graf 3a: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích gemfibrozilu, 1. měření.



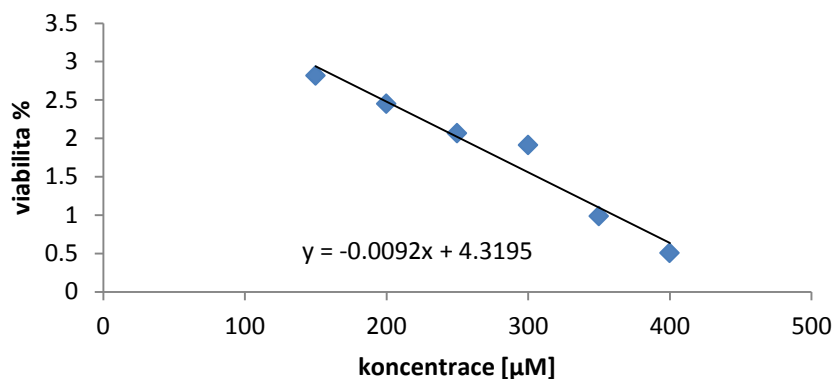
Graf 3b: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích gemfibrozilu, 2. měření.



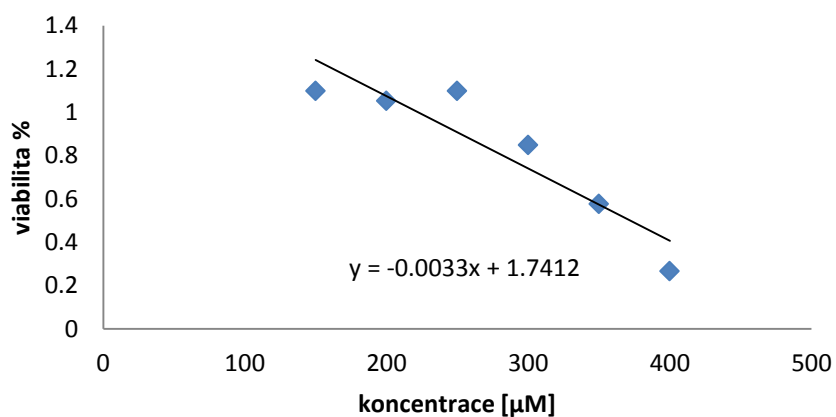
Graf 3c: Závislost viability buněčné linie HEK293 na různých koncentracích gemfibrozilu, 3. měření.



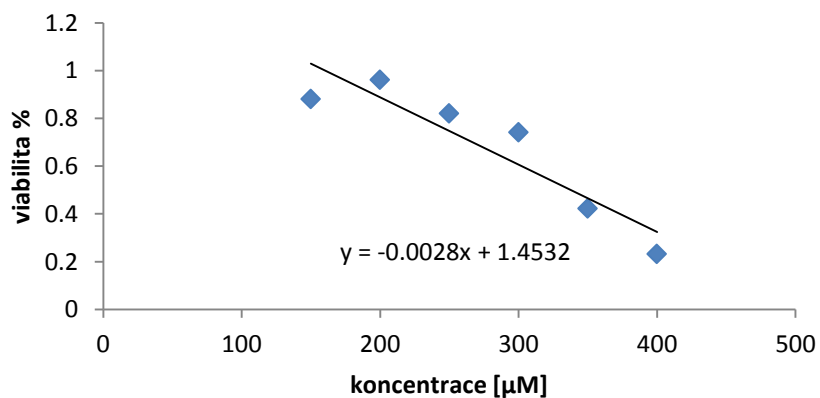
Graf 4a: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích fenofibrátu,
1. měření.



Graf 4b: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích fenofibrátu,
2. měření.

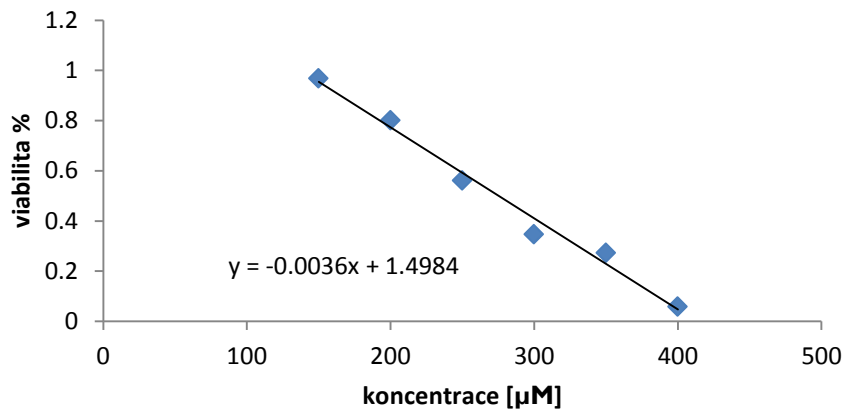


Graf 4c: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích fenofibrátu,
3. měření.



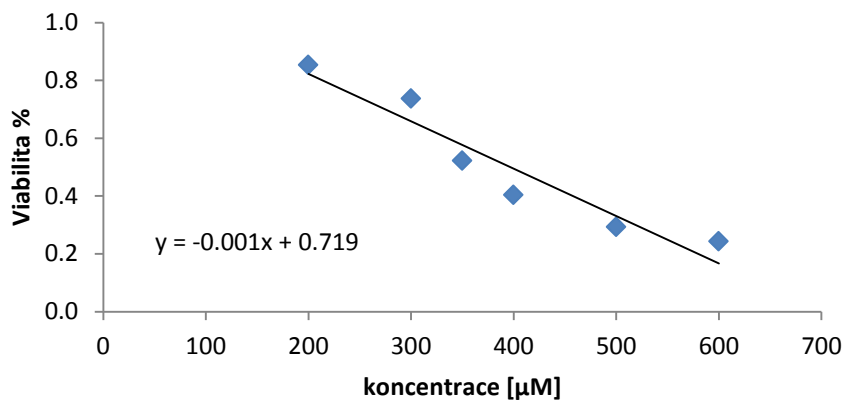
Graf 5a: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích bezafibrátu,

1. měření.



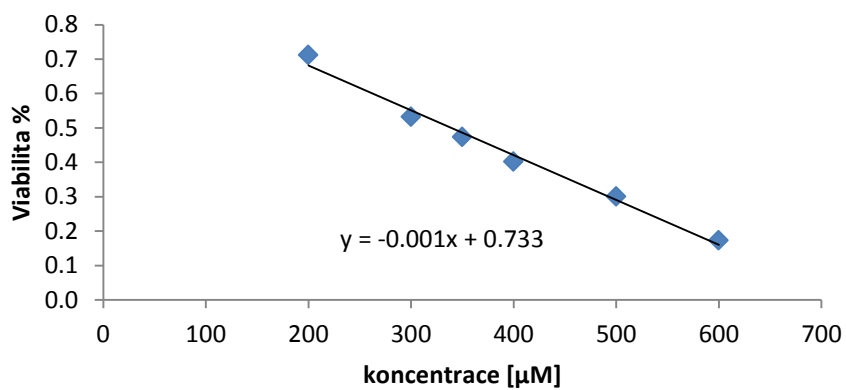
Graf 5b: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích bezafibrátu,

2. měření.

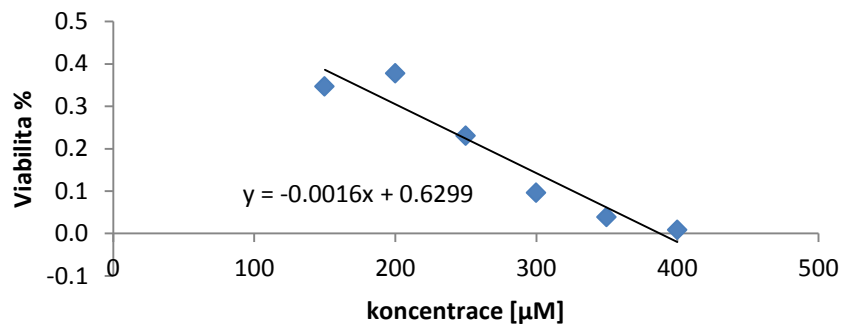


Graf 5c: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích bezafibrátu,

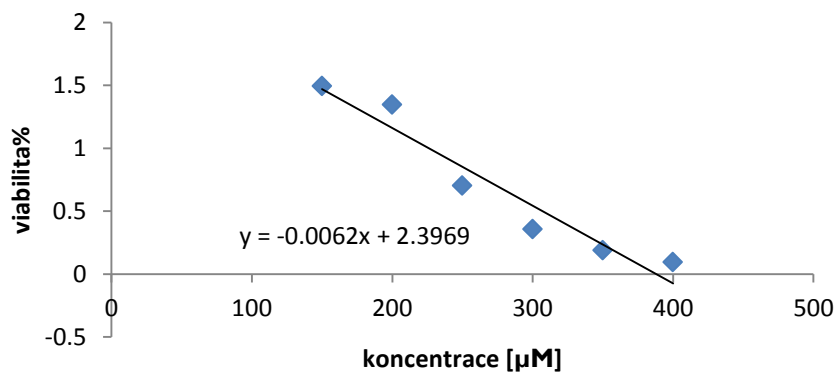
3. měření.



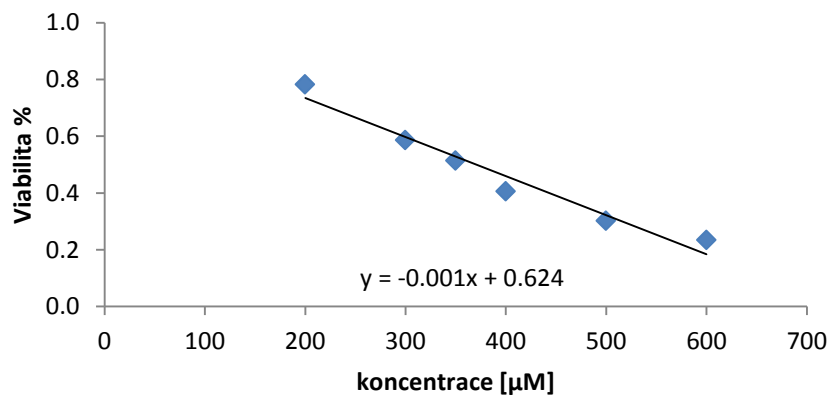
Graf 6a: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích gemfibrozilu, 1. měření.



Graf 6b: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích gemfibrozilu, 2. měření.



Graf 6c: Závislost viability buněčné linie Hela na různých koncentracích gemfibrozilu, 3. měření.



6.1.2. Stanovení koncentrace ligandů s nejvyšší viabilitou buněčných linií

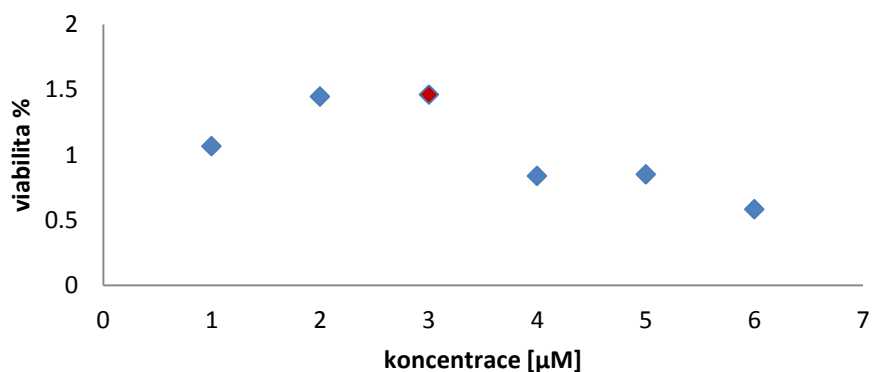
Předchozí testy viability ukázaly, že fibráty v nízkých koncentracích zvyšují viabilitu buněk. Proto se stanovila kromě IC[90] i koncentrace fibrátů, při které byla viabilita buněčných linií HEK293 a HeLa nejvyšší. Z průměrných hodnot naměřených absorbancí při vlnové délce 450 nm, byly stanoveny počty přeživších buněk pro každou koncentraci. Grafy 7-12 ukazují, že k proliferaci buněk dochází v závislosti na použité koncentraci daného fibrátu. V grafech byla hodnota nejvyšší viability buněčných linií barevně zvýrazněna. Tyto hodnoty byly následně použity pro ovlivnění pro stanovení změn exprese vybraných regulačních proteinů buněčného cyklu pomocí imunocytochemie.

Průměrné hodnoty proliferační koncentrace pro studované buněčné linie jsou shrnuty v tabulce 2.

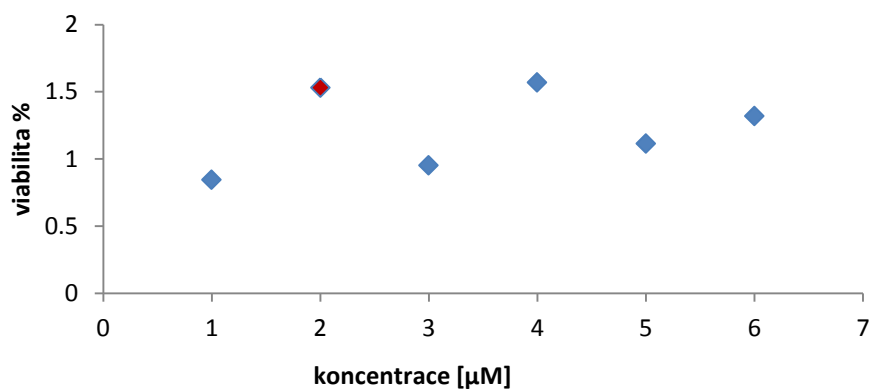
Tabulka 2: *Naměřené hodnoty absorbance nejvyšší viability při použití různých koncentrací vybraných fibrátů na buněčné linie HEK293 a HeLa.*

	HEK293	HeLa
	Nejvyšší viabilita	Nejvyšší viabilita
Fenofibrát	3 $\mu\text{M} \pm 0.122$	30 $\mu\text{M} \pm 0.084$
Bezafibrát	20 $\mu\text{M} \pm 0.184$	50 $\mu\text{M} \pm 0.107$
Gemfibrozil	30 $\mu\text{M} \pm 0.038$	50 $\mu\text{M} \pm 0.066$

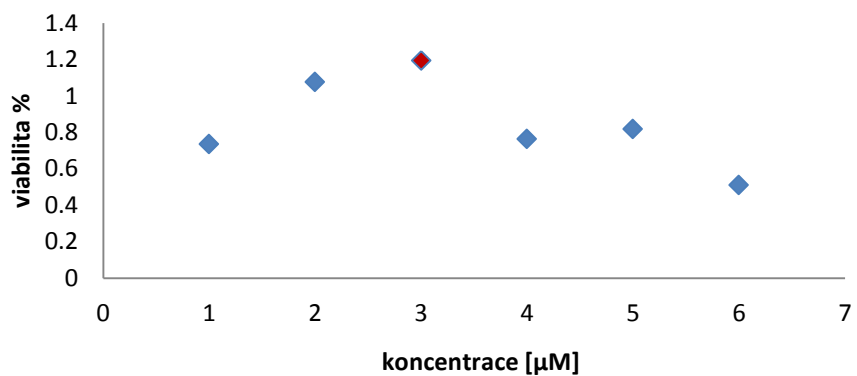
Graf 7a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích fenofibrátu, 1. měření.



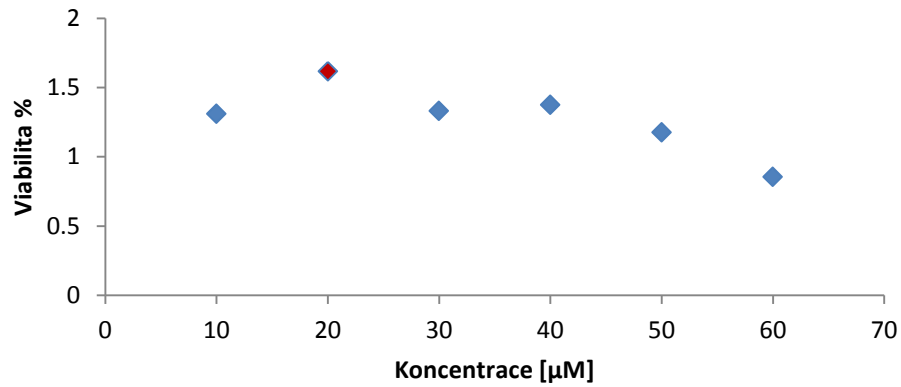
Graf 7b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích fenofibrátu, 2. měření.



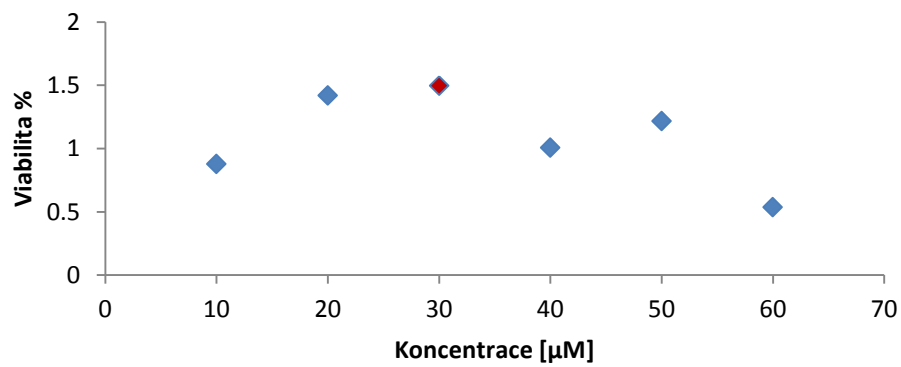
Graf 7c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích fenofibrátu, 3. měření.



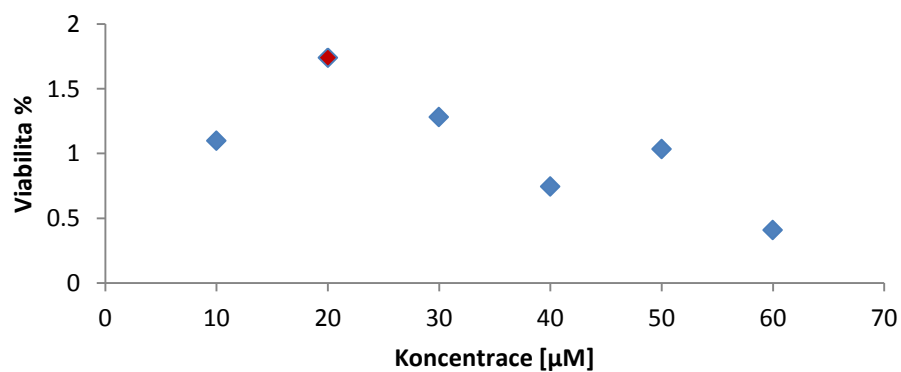
Graf 8a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích bezafibrátu, 1. měření.



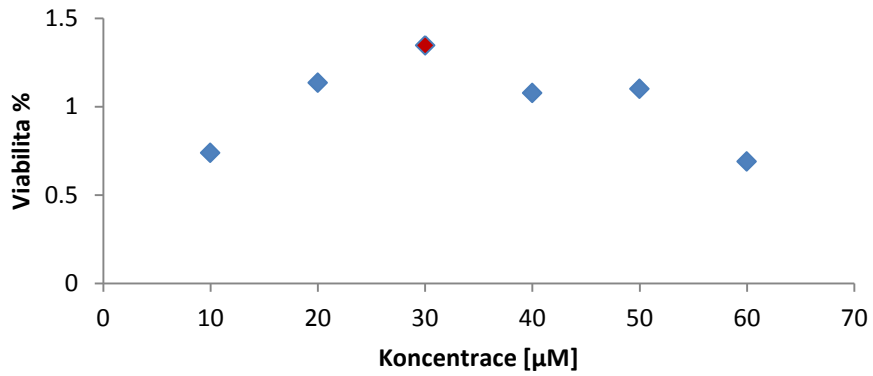
Graf 8b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích bezafibrátu, 2. měření.



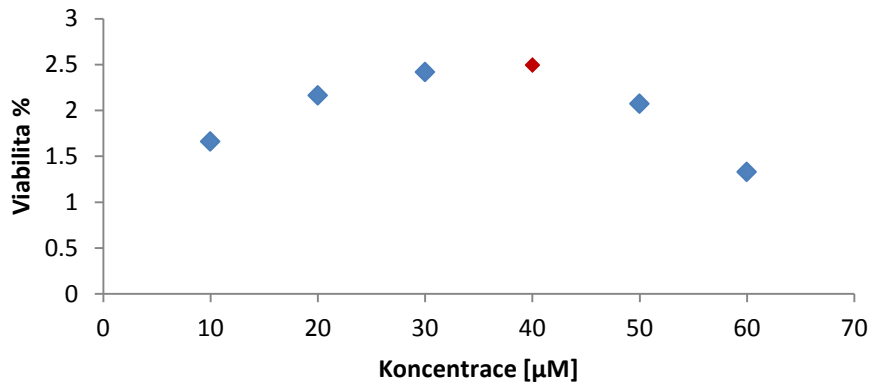
Graf 8c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích bezafibrátu, 3. měření.



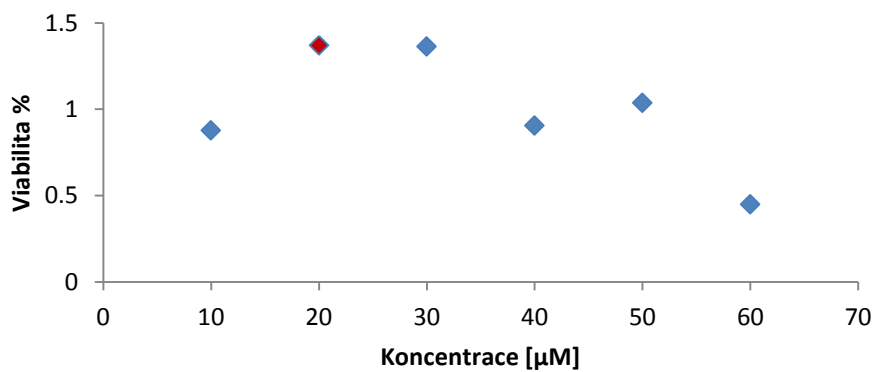
Graf 9a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích gemfibrozilu, 1. měření.



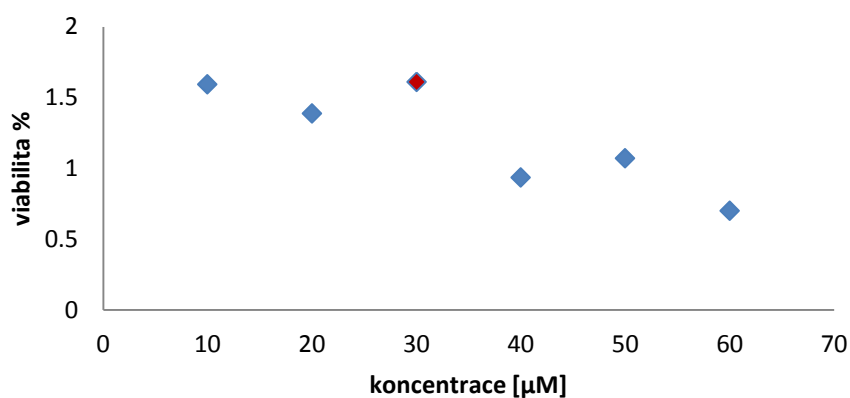
Graf 9b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích gemfibrozilu, 2. měření.



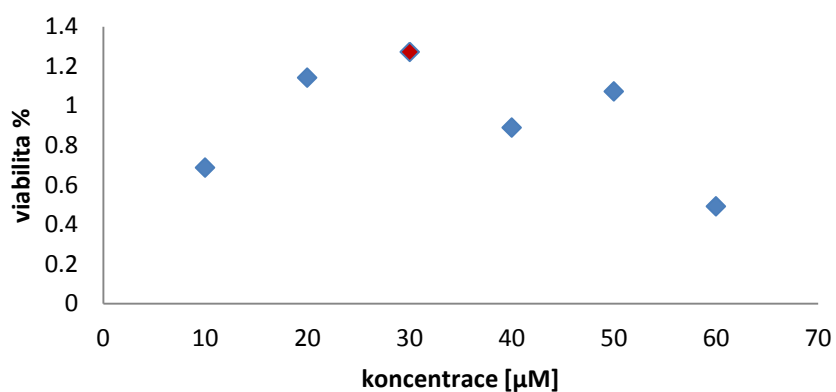
Graf 9c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie HEK293 při různých koncentracích gemfibrozilu, 3. měření.



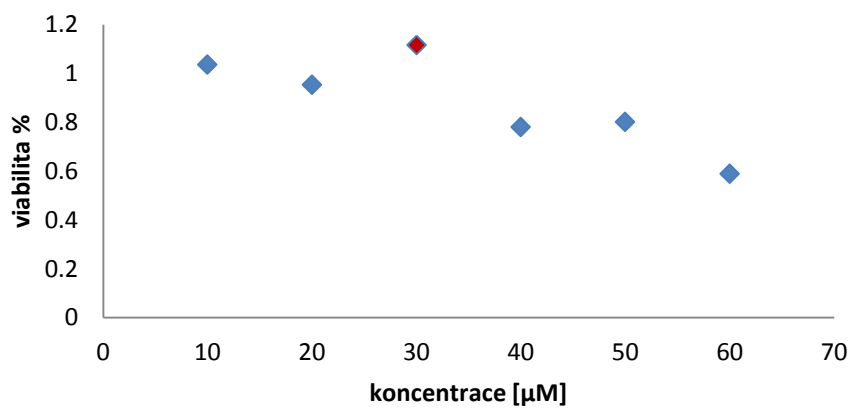
Graf 10a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích fenofibrátu, 1. měření.



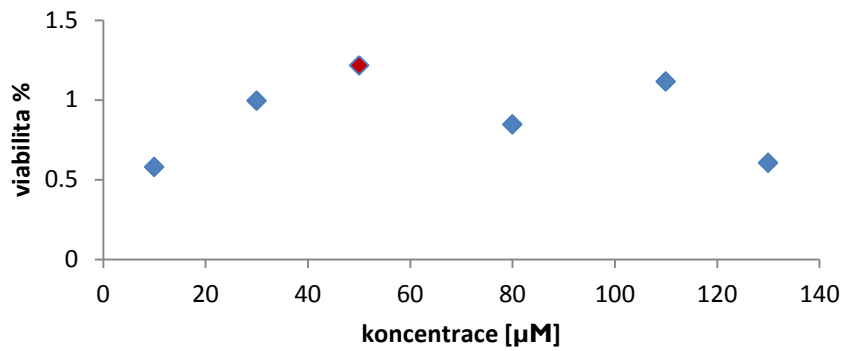
Graf 10b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích fenofibrátu, 2. měření.



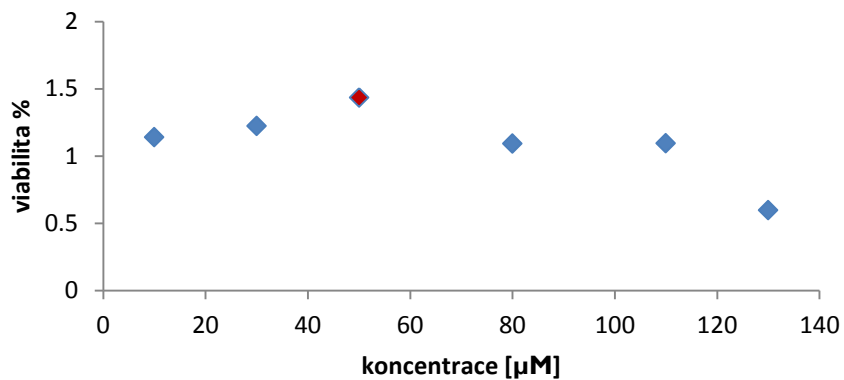
Graf 10c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích fenofibrátu, 3. měření.



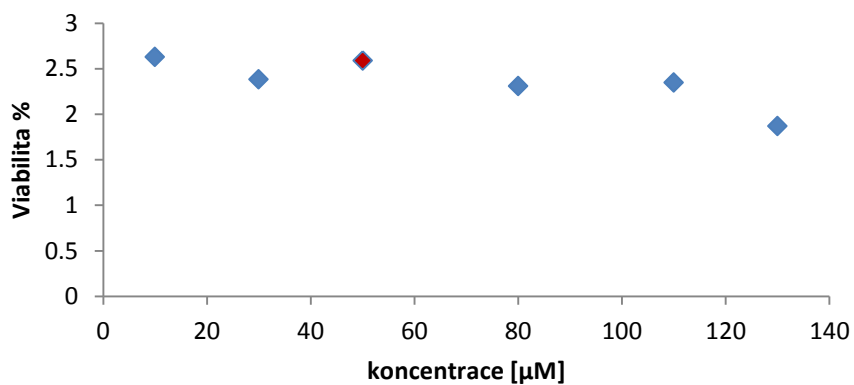
Graf 11a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích bezafibrátu, 1. měření.



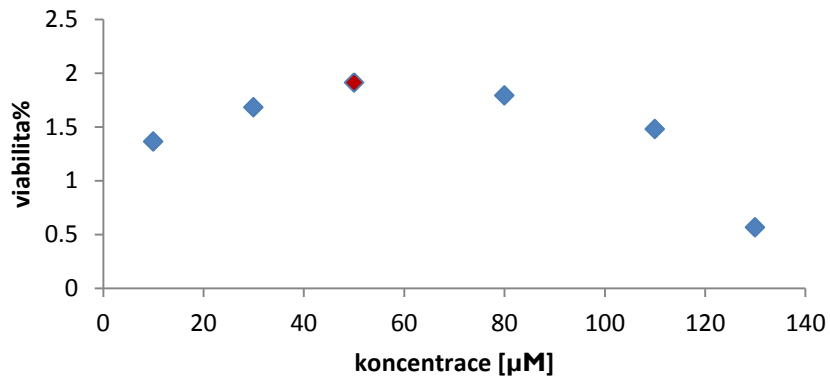
Graf 11b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích bezafibrátu, 2. měření.



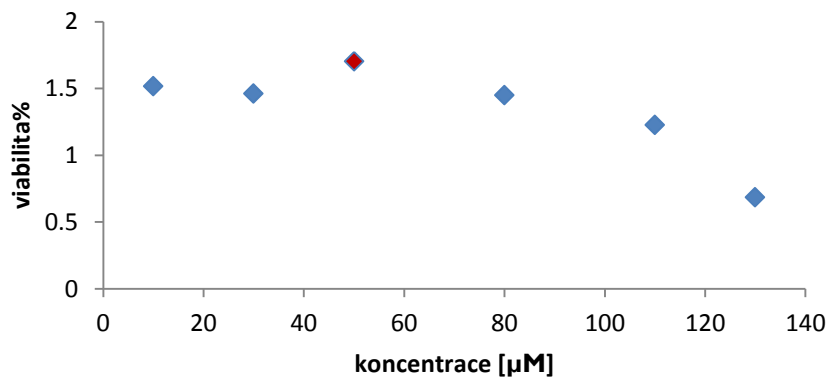
Graf 11c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích bezafibrátu, 3. měření.



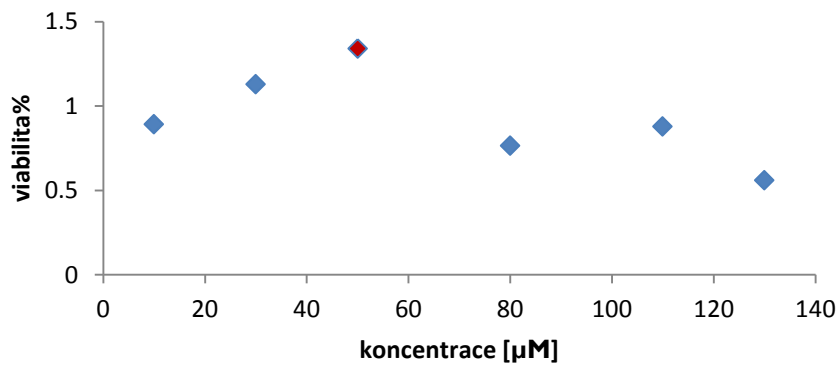
Graf 12a: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích gemfibrozilu, 1. měření.



Graf 12b: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích gemfibrozilu, 2. měření.



Graf 12c: Stanovení nejvyšší viability buněčné linie Hela při různých koncentracích gemfibrozilu, 3. měření.



6.2. Stanovení exprese vybraných antigenů pomocí imunocytochemie v buněčných liniích po ovlivnění ligandy PPAR- α .

6.2.1. Imunocytochemie

K potvrzení exprese vybraných antigenů v buněčných liniích HEK293 a HeLa, byla vybrána metoda imunocytochemie. Průměrné hodnoty proliferačních koncentrací a IC[90] po ovlivnění fenofibrátem, bezafibrátem a gemfibrozilem, byly použity pro ovlivnění buněk po jejich vysetí na podložní skla. Následně byla u těchto buněk detekována změna exprese cyklinu A, cyklinu E a Cdc25A. Souběžně byly zpracovávány kontroly, které posloužily k výpočtu fold change. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3 a v grafech 13-18.

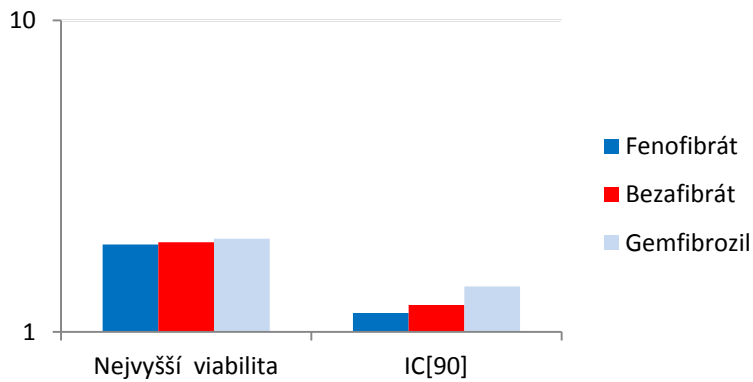
Zvýšená exprese u buněčné linie HEK293 byla detekována u cyklinu A a cyklinu E. Nejvyšší počet buněk, které exprimují cyklin A, byl zjištěn u buněk ovlivněných gemfibrozilem, jak při použití koncentrace IC[90], tak koncentrace s nejvyšší viabilitou. Nejvyšší počet buněk s expresí cyklinu E, byl detekován v buňkách ovlivněných bezafibrátem v koncentraci, kdy je viabilita buněk nejvyšší. U buněk ovlivněných koncentracemi IC[90], byl nejvyšší počet buněk exprimující cyklin E detekován po ovlivnění gemfibrozilem. Naopak u buněčné linie HEK293 byla detekována snížená exprese proteinu Cdc25A.

U buněčné linie HeLa byla v buňkách ovlivněných různými ligandy PPAR- α detekována zvýšená exprese u cyklinu A a cyklinu E. Nejvyšší počet buněk pozitivních na cyklin A byl detekován u buněk ovlivněných fenofibrátem při koncentraci s nejvyšší viabilitou a gemfibrozilem při koncentraci IC[90]. Nejvyšší počet buněk s expresí cyklinu E, byl detekován v buňkách ovlivněných fenofibrátem v koncentraci, kdy je viabilita buněk nejvyšší. U buněk ovlivněných koncentracemi IC[90], byl nejvyšší počet buněk detekován po ovlivnění bezafibrátem. Snížená exprese byla detekována u Cdc25A.

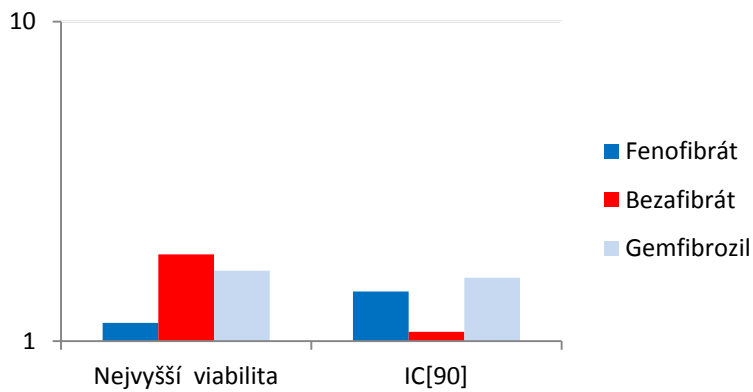
Tabulka 3: Výsledné hodnoty *fold change* pro změnu exprese cyklinu A, cyklinu E a *Cdc25A* po působení vybraných fibrátů ve dvou různých koncentracích (*IC*[90] a koncentrace s nejvyšší viabilitou buněk) v buněčných liniích HEK293 a HeLa.

Cyklin A	HEK293		HeLa	
	Nej. viabilita	IC90	Nej. viabilita	IC90
Fenofibrát	1.91	1.15	1.56	1.12
Bezafibrát	1.94	1.22	1.48	1.3
Gemfibrozil	1.99	1.4	1.52	1.19
Cyklin E	HEK293		HeLa	
	Nej. viabilita	IC90	Nej. viabilita	IC90
Fenofibrát	1.14	1.43	1.6	1.28
Bezafibrát	1.87	1.07	1.21	1.61
Gemfibrozil	1.66	1.58	1.37	1.29
Cdc25A	HEK293		HeLa	
	Nej. viabilita	IC90	Nej. viabilita	IC90
Fenofibrát	0.64	0.93	0.6	0.59
Bezafibrát	0.71	0.6	0.67	0.59
Gemfibrozil	0.84	0.79	0.43	0.57

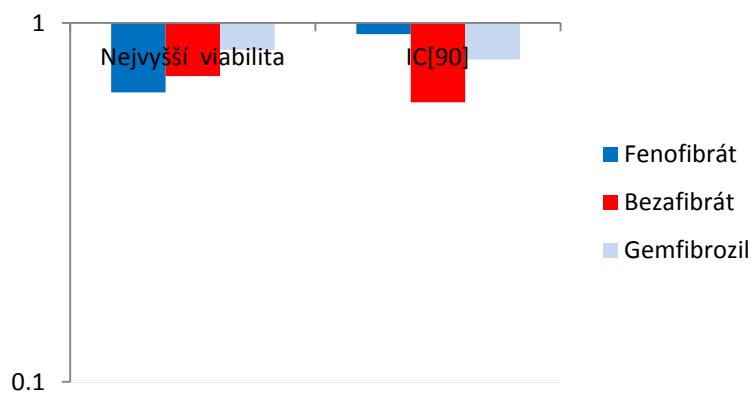
Graf 13: Změna exprese cyklinu A v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.



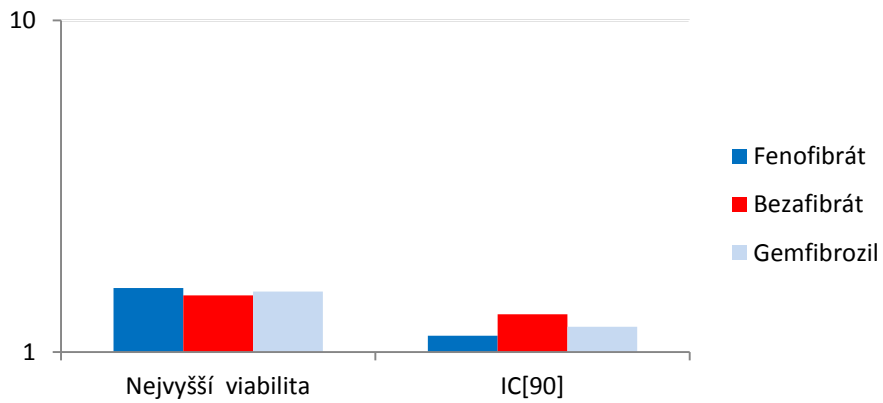
Graf 14: Změna exprese cyklinu E v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.



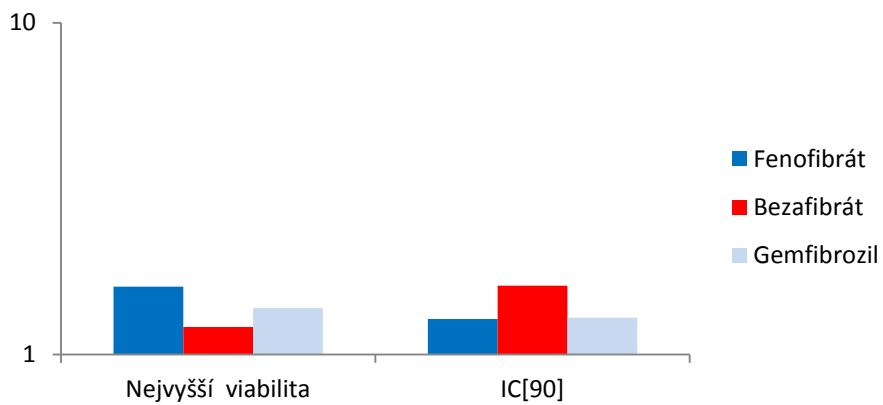
Graf 15: Změna exprese Cdc25A v buněčné linii HEK293 po působení studovaných látek.



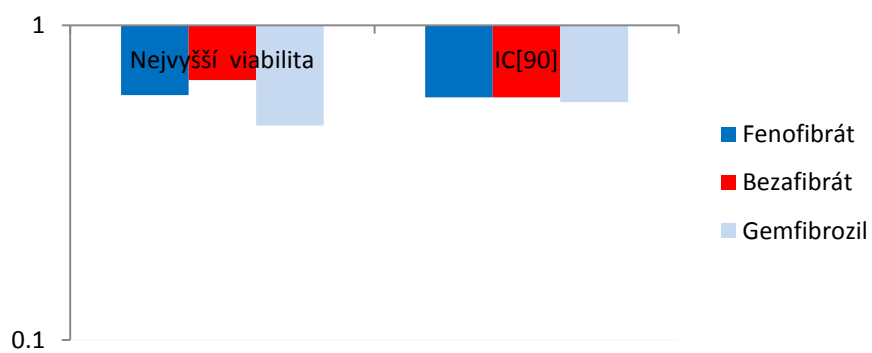
Graf 16: Změna exprese cyklinu A v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.



Graf 17: Změna exprese cyklinu E v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.



Graf 18: Změna exprese Cdc25A v buněčné linii HeLa po působení studovaných látek.



7. Diskuse

PPAR, ligandy aktivované transkripčními faktory, se účastní celé řady biologických procesů. Jejich role byla prokázána mimo jiné také v rozvoji různých typů nádorů. Řada autorů publikovala mnoho článků, které poukazují na schopnost ligandů PPAR potlačovat buněčný růst, proliferaci a diferenciaci nádorových buněk. [9], [18], [28]

Test viability buněčných linií byl proveden za účelem posouzení vlivu vybraných zástupců fibrátů na buněčnou linii HEK293 a nádorovou linii HeLa, pro stanovení jejich inhibičních koncentrací IC₉₀. Buněčná linie HEK293 je odvozena z primárních lidských ledvinných buněk a nádorová linie HeLa je odvozena z maligního karcinomu děložního čípku. Fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil jsou vybraní zástupce ze skupiny fibrátů. Fibráty jsou syntetické ligandy, které jsou schopné aktivovat PPAR. Prostřednictvím testu se podařilo prokázat, že po působení vybraných fibrátů dochází k poklesu životaschopnosti jak nenádorových, tak nádorových buněk, v závislosti na použité koncentraci daného fibrátu (viz grafy 1-6). Tímto se potvrdili dřívější experimenty prováděné u nádorů tlustého střeva, dělohy, melanomu, karcinomu plic, glioblastomu a fibrosarkomu, které rovněž popisují efekt ligandů PPAR- α na životaschopnost buněk. [21],[22],[23],[43] Díky těmto výsledkům se nabízí možnost využívat receptory PPAR- α jako novou cílenou léčbu pro prevenci a léčbu rakoviny.

Protože test viability ukázal, že při nižších koncentracích fibrátů dochází nejprve ke zvýšení proliferace buněk, než jejich viabilita začne klesat, stanovovala se taková koncentrace fibrátů, při které byla viabilita buněk HEK293 a HeLa nejvyšší. Stanovené koncentrace IC₉₀ a koncentrace s nejvyšší viabilitou pro jednotlivé fibráty byly využity pro ovlivnění buněk určených pro sledování změn exprese vybraných regulátorů buněčného cyklu.

Buněčný cyklus je posloupnost vzájemně koordinovaných procesů, který je definován obdobím od vzniku buňky, až do stádia, kdy dojde k dalšímu rozdělení na dvě buňky dceřiné. Regulace buněčného cyklu je klíčová a poruchy mohou vést až k nádorovému bujení. Kontrolní systém buněčného cyklu je založen na rostoucí nebo klesající aktivitě příslušných kinázových podjednotek, které jsou proto nazývány cyklin-dependentní kinázy (CDK), ty vytvářejí komplexy s cykliny. Funkce cyklinů je založen na skutečnosti, že v průběhu buněčného cyklu dochází k cyklickým změnám jejich koncentrace v důsledku měnící se míry jejich exprese a degradace.

V buněčných liniích HEK293 a HeLa byla sledována změna exprese cyklinu A, cyklinu E a Cdc25A. Expresе proteinů cyklin A, cyklin E a Cdc25A byla v experimentu zaznamenána ve všech analyzovaných vzorcích.

Cyklin A je jediný cyklin, který reguluje buněčný cyklus více kroky, a to prostřednictvím interakcí s cyklin-dependentními kinázami. Vazba cyklinu A na CDK2 je nutná pro průchod buňky do S-fáze a vazba na CDK1 je nutná pro vstup buňky do M-fáze. Řada publikací naznačuje, že by mohl hrát roli v regulaci proliferace, která souvisí např. s kontrolou kontaktní inhibice. Snížená exprese cyklinu A a s tím související pokles aktivity CDK2, hraje velmi významnou roli v navození a udržení inhibice. Bylo také prokázáno, že uměle navozená exprese cyklinu A můžeme sama o sobě nastartovat buněčnou proliferaci. [56] Hladina exprese proteinu cyklin A byla vůči kontrole zvýšená u koncentrací s nejvyšší viabilitou i u koncentrací IC[90], jak u buněčné linie HEK293, tak u buněčné linie HeLa.

Cyklin E hraje klíčovou roli v komplexu s CDK2 pro správný přechod buňky s G1 fáze do S-fáze. Jeho zvýšená exprese vede k poruše regulace buněčného cyklu a může tedy dojít ke vzniku nádorové buňky. [55] U cyklinu E byla hladina exprese zvýšená vůči kontrole u koncentrací s nejvyšší viabilitou i u koncentrací IC[90], jak u buněčné linie HEK293, tak u buněčné linie HeLa.

Protein Cdc25A, člen rodiny proteinů Cdc25, je nutný pro postup buňky z G1 fáze do S-fáze buněčného cyklu, ale také ve stabilizaci buněk v M-fázi. Cdc25A bývá považován za onkogen. Zvýšená exprese byla analyzována například u rakoviny prsu, proto jeho nadměrná exprese může být důsledkem vzniku nádorového onemocnění. [55] Expresе proteinu Cdc25A byla v obou buněčných liniích po ovlivnění fibráty snížena. Protein Cdc25A je schopen několika nezávislými cestami zastavit buněčný cyklus. Tato downregulace by mohla hrát významnou roli v prevenci a vzniku nádorového onemocnění. [57]

Prostřednictvím imunocytochemie se prokázalo, že fibráty, syntetické ligandy PPAR, ovlivňují expresi proteinů regulujících buněčný cyklus. Vzhledem k tomu, že při nízkých koncentracích byla proliferace buněk zvýšená, musí být jejich potencionální využití pro léčbu nádorů důkladně prozkoumáno.

Závěr

Agonisté všech tří izoform PPAR mohou vyvolat mnoho fyziologických změn, včetně zvýšené oxidace mastných kyselin, která přispívá ke snížení hladiny lipidů v séru, zlepšení inzulinové rezistence a inhibici zánětlivé signalizace. Metabolický syndrom, obezita, dyslipidémie, nesnášenlivost glukózy a chronické záněty jsou spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny. To je také důvod, proč uvažovat o agonistech PPAR jako o potenciálních kandidátech pro léčbu a prevenci rakoviny.

Test životaschopnosti buněk prokázal účinek vybraných fibrátů na životnost buněčné linie HEK293 a lidské nádorové linie HeLa, odvozené od karcinomu děložního čípku. Působením vybraných fibrátů došlo k poklesu životaschopnosti buněk, a to v závislosti na použité dávce fibrátu. Tento experiment tedy potvrdil jejich antiproliferační účinky.

Expres proteinů cyklin A, cyklin E a Cdc25A byla zaznamenána ve všech analyzovaných vzorcích. Hladina exprese proteinu cyklin A a cyklin B byla vůči kontrole zvýšená u koncentrací s nejvyšší viabilitou i u koncentrací IC₉₀, jak u buněčné linie HEK293, tak u buněčné linie HeLa. Expres proteinu Cdc25A byla v obou buněčných liniích po ovlivnění fibráty snížena. Jelikož se při nízkých koncentracích proliferace buněk zvyšovala, otvírá se zde nový prostor pro další výzkumy.

Receptory PPAR jsou pokládány za terapeutické cíle v léčbě jak inzulinové rezistence, tak nádorového bujení. Velké naděje jsou proto vkládány do pokračujícího výzkumu. Po objasnění přesného mechanismu protinádorových, proapoptických, protizánětlivých a antiproliferačních účinků receptorů PPAR, se výzkum v protinádorové terapii může těšit velkému pokroku a v budoucnu mohou být PPAR receptory běžně využívány jako protinádorová terapeutika.

Seznam použité literatury

- [1] YONG L., LAMBERT M.H., Xu H.E. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 11: 741-46 (2003).
- [2] PRIVALSKI M.L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66: 315-60 (2004).
- [3] WANG, Z., et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*. 2003, vol. 423, no. 6939, s. 555-60.
- [4] ARANDA A., PASCUAL A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-304 (2001).
- [5] JUMP, B. D. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. 2002, vol. 13, no. 2, s. 155-64.
- [6] KLIEWER, S. A., et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res*. 2001, vol. 56, no. 1, s. 239-63.
- [7] FINCK, B. N., KELLY, D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006, vol. 116, no. 3, s. 615-22.
- [8] ISSEMAN I., GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-50 (1990).
- [9] PEKARČÍKOVÁ, L.: Význam PPAR v protinádorové terapii. Bakalářská práce, 2009, Masarykova Univerzita v Brně
- [10] SHER T., YI H.F., McBRIDE O.W., GONZALEZ F.J. 1993. cDNA cloning, chromosomal mapping and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 32:5598–5604.
- [11] DREYER G., KREY H., KELLERF., GIVEL G., HELFTENBEIN W., Wahli. 1992. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 68:31
- [12] YOSHIKAWA T., BRKANAC Z., DUPONT B.R., XING G.Q., LEACH R.J., Detera-Wadleigh S.D. 1996. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPAR δ), to chromosome 6p21.1–p21.2. *Genomics*. 35:637–638.
- [13] BRAISSANT O., WAHLI W. 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α , - δ , - γ during rat embryonic development. *Endocrinology*. 139:2748-2754.
- [14] DESVERGNE B., WAHLI W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev*. 20:649–688.
- [15] EHRMANN J. J.r., VAVRUSOVA N., COLLAN Y., KOLAR Z. Peroxisome proliferatoractivated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomed Pap Med Fac University Palacky Olomouc Czech Republic* 146: 11-4 (2002).

- [16] YUMIKO Y., MIHYIE K., TAKUJI T., 2008. PPAR ligands for Cancer Chemoprevention. *Review Article*.
- [17] FORMAN B. M., CHEN J., and EVANS R. M. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acid, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 94,9:4312–4317.
- [18] VANDEN HEUVEL J.P. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and carcinogenesis. *Toxicol Sci* 47: 1-8 (1999).
- [19] MIYAHARA T., SCHRUM L., RIPPE R., XIONG S., YEE HF J.r., MOTOMURA K., ANANIA F.A., WILLSON T.M., TSUKAMOTO H. Peroxisome proliferator-activated receptors.
- [20] ŠEDO VÁ L., ŠEDA O., Duální agonisté napříč PPAR. Dostupný online na www.remedia.cz. [cit. 2015-03-14].
- [21] TANAKA T., KOHNO H., YOSHITANI S. et al. 2001. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Research*. 61:2424–2428.
- [22] SAIDI S.A., HOLLAND C.M., CHARNOCK-JONES D.S., SMITH S.K. 2006. In vitro and in vivo effects of the PPAR- α agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer*. 6:13.
- [23] MEHTA R.G., WILLIAMSON E. et al. 2000. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer*. 92:418-23.
- [24] HOLLAND C.M., SAIDI S.A. et al. 2004. Transcriptome analysis of endometrial cancer identifies peroxisome proliferator-activated receptors as potential therapeutic target. *Mol Cancer Ther*. 3:993-1001.
- [25] http://cs.wikipedia.org/wiki/Warburg%20efekt_%28onkologie%29 [cit. 2015-03-16].
- [26] PETERS J.M, SHAH Y.M, GONZALEZ F.J. 2012. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nature Reviews. Cancer*. 12: 181-195
- [27] KLENER P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada Publishing a.s. 2009. 232s., ISBN- 8024769883
- [28] BUKVOVÁ, R.: Role PPARs ve vyvíjejícím se tlustém střevě. Diplomová práce, 2012, Univerzita Palackého v Olomouci.
- [29] TING L., QUNLING Z., JIAN Z., GONG Y., ZHIMIN S., JIANMIN L., MINHAO F., CHEN N., ZHENHUA W., XINCHUN H.. Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF- κ B pathway *BMC Cancer*. 2014; 14: 96. Published online 2014 February 16. doi: 10.1186/1471-2407-14-96

- [30] GRABACKA M., PIERZCHALSKA M., REISS K. Peroxisome Proliferator Activated Receptor A Ligands as Anticancer Drugs Targeting Mitochondrial Metabolism. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013 Mar 1; 14(3): 342–356.
- [31] EVANS R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, Vol. 240: 889-895.
- [32] MANGELSDORF D.J., THUMMEL C., BEATO M., HERRLICH P., SCHUTZ G., UMESONO K., BLUMBERG B., KASTNER P., MARK M., CHAMBON P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9 (1995).
- [33] KOTA B. P., HUANG T. H.-W., ROUFOGALIS B. D. (2005): An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, Vol. 51: 85-94.
- [34] WURTZ J.-M., BOURGUET W., RENAUD J.-P., VIVAT V., CHAMBON P., MORAS D., GRONEMEYER H. (1996): A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, Vol. 3: 87-94.
- [35] HALUZÍK M., SVACINA Š. *Metabolický syndrom a nukleární receptory*. Grada Publishing a.s. 2005. 136s. ISBN- 8024762463
- [36] PÍŤHA J., Lesk a bída fibrátů. *Interní medicína pro praxi*. 2001/4. 170-174s. Dostupný online na www.prakticka-medicina.cz. [cit. 2015-03-14].
- [37] BLANQUART C., BARBIER O., FRUCHART J.C., STAELS B., GLINEUR C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 267-73 (2003).
- [38] COLLET G.P., BETTS A.M., JOHNSON M.I., PULIMOOD A.B., COOK S., NEAL D.E., ROBSON C.N. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is an androgen-responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 3241-8 (2000).
- [39] CHHATTOPADHYAY N., SINGH D.P., HEESE O., GODBOLE M.M., SINOHARA T., BLACK P.M., BROWN E.M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in human astrocytic cells: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61: 67-74 (2000).
- [40] TAKAHASHI N., OKUMARA T., MOTOMURA W., FUJIMOTO Y., KAWABATA I., KOHGO Y. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 455: 135-9 (1999).
- [41] http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html [cit. 2015-03-14].
- [42] HUANG J., DAS SK., JHA P., AL ZOUGHBI W., SCHAUER S., CLAUDEL T., SEXL V., VESELY P., BIRNER-GRUENBERGER R., KRATKY D., TRAUNER M., HOEFLER G.: The PPARalpha agonist fenofibrate suppresses B-cell lymphoma in mice by modulating lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1831(10):1555-1565.
- [43] ZHAO H., ZHU C., QIN C., TAO T., LI J., CHENG G., LI P., CAO Q., MENG X., JU X., SHAO P., HUA L., GU M., YIN C.: Fenofibrate down-regulates the expressions of androgen receptor (AR) and AR target genes and induces oxidative stress in the prostate cancer cell line LNCaP. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 432(2):320-325.

- [44] WILK A., URBANSKA K., GRABACKA M., MULLINAX J., MARCINKIEWICZ C., IMPASTATO D., ESTRADA J.J., REISS K.: Fenofibrate-induced nuclear translocation of FoxO3A triggers Bim-mediated apoptosis in glioblastoma cells in vitro. *Cell Cycle* 2012, 11(14):2660-2671
- [45] ZAK Z., GELEBART P., LAI R.: Fenofibrate induces effective apoptosis in mantle cell lymphoma by inhibiting the TNFalpha/NF-kappaB signaling axis. *Leukemia* 2010, 24(8):1476-1486.
- [46] CHANG N.W., TSAI M.H., LIN C., HSU H.T., CHU P.Y., YEH C.M., CHIU C.F., YEH K.T.: Fenofibrate exhibits a high potential to suppress the formation of squamous cell carcinoma in an oral-specific 4-nitroquinoline 1-oxide/arecoline mouse model. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1812(4):558-564
- [47] YAMASAKI D., KAWABE N., NAKAMURA H., TACHIBANA K., ISCHIMOTO K., TANAKA T., ABURATANI H., SAKAI J., HAMAKUBO T., KODAMA T., DOI T.: Fenofibrate suppresses growth of the human hepatocellular carcinoma cell via PPARalpha-independent mechanisms. *Eur J Cell Biol* 2011, 90(8):657-664.
- [48] KUBOTA T., YANO T., FUJISAKI K., ITOH Y., OISHI R.: Fenofibrate induces apoptotic injury in cultured human hepatocytes by inhibiting phosphorylation of Akt. *Apoptosis* 2005, 10(2):349-358
- [49] DRUKALA J., URBANSKA K., WILK A., GRABACKA M., WYBIERALSKA E., DEL V.L., MADEJA Z., REISS K.: ROS accumulation and IGF-IR inhibition contribute to fenofibrate/PPARalpha -mediated inhibition of glioma cell motility in vitro. *Mol Cancer* 2010, 9:159.
- [50] SCATENA R., BOTTONI P., VIENCENZONI F., MESSANA I., MARTORANA G.E., NOCCA G., DE SOLE P., MAGIANNI N., CASTANGNOLA M., GIARDINA B.: Bezafibrate induces a mitochondrial derangement in human cell lines: A PPAR-Independent Mechanism for a Peroxisome Proliferator. *Chem. Res. Toxicol.*, 2003, 16 (11), pp 1440–1447
- [51] TENENBAUM A., BOYKO V., FISHMAN Z.E., GOLDENBERG I., ADLER Y., FEINBERG S.M., MOTRO M., TANNE D., SCHWAMMENTHAL H., BEHAR S.: Does the lipid-lowering peroxisome proliferator-activated receptors ligand bezafibrate prevent colon cancer in patients with coronary artery disease?. *Cardiovasc Diabetol.* 2008; 7: 18.
- [52] MALABENDU J., KALIPADA P.: Gemfibrozil, a lipid lowering drug, inhibits the activation of primary human microglia via peroxisome proliferator-activated receptor β . *Neurochem Res.* 2012 Aug; 37(8): 1718–1729.
- [53] SUCHANEK K.M., MAY F.J., ROBINSON J.A., LEE W.J., HOLMAN N.A., MONTEITH G.R., ROBERTS-THOMSON S.J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB- 231. *Mol Carcinog* 34: 165-71 (2002)
- [54] BURNS K.A., HEUVEL J.P.V. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771 (2007) 952–960
- [55] http://che1.lf1.cuni.cz/html/Bun_cyklus_sm.pdf , [cit. 2015-04-20].
- [56] http://is.muni.cz/th/44259/prif_m/diplomka_3.pdf , [cit. 2015-04-20].

[57] ROTHER K., KIRSCHNER R., SÄNGER K., BÖHLIG L. p53 downregulates of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A. *Oncogene* (2007) 26, 1949-1953

Seznam použitých obrázků

[1] Schematické znázornění struktury PPAR. [online], [cit. 2015-02-27]. Původní obrázek ve formátu JPEG.

Dostupné z: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PPARGID383ch3p25.html>

[2] Aktivace PPAR a specifických genů. [online], [cit. 2015-03-15]. Původní obrázek ve formátu JPEG.

Dostupné z: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2377329_PPAR2008-548919.001&req=4

[3] Struktura vybraných přírodních ligandů PPAR. [online], [cit. 2015-03-16]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=23NaAgAAQBAJ&pg=PA11&dq=metabolicky+syndrom+a+nuklearni+receptory&hl=cs&sa=X&ei=Qro4VfmjJ4GusAH45oCAAw&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=metabolicky%20syndrom%20a%20nuklearni%20receptory&f=false>

[4] Struktura vybraných syntetických ligandů PPAR (TZD). [online], [cit. 2015-03-16]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=23NaAgAAQBAJ&pg=PA11&dq=metabolicky+syndrom+a+nuklearni+receptory&hl=cs&sa=X&ei=Qro4VfmjJ4GusAH45oCAAw&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=metabolicky%20syndrom%20a%20nuklearni%20receptory&f=false>

[5] Struktura vybraných látek ze skupiny fibrátů. [online], [cit. 2015-03-16]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z:

<https://books.google.cz/books?id=23NaAgAAQBAJ&pg=PA11&dq=metabolicky+syndrom+a+nuklearni+receptory&hl=cs&sa=X&ei=Qro4VfmjJ4GusAH45oCAAw&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=metabolicky%20syndrom%20a%20nuklearni%20receptory&f=false>

[6] Duální agonismus PPAR- α/γ . [online], [cit. 2015-03-16]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmakogenetika/Dualni-agoniste-receptoru-PPAR/8-Z-eE.magarticle.aspx>

[7] Potenciální cílení PPAR- α pro prevenci a léčbu nádorů. [online], [cit. 2015-03-25]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322353/>