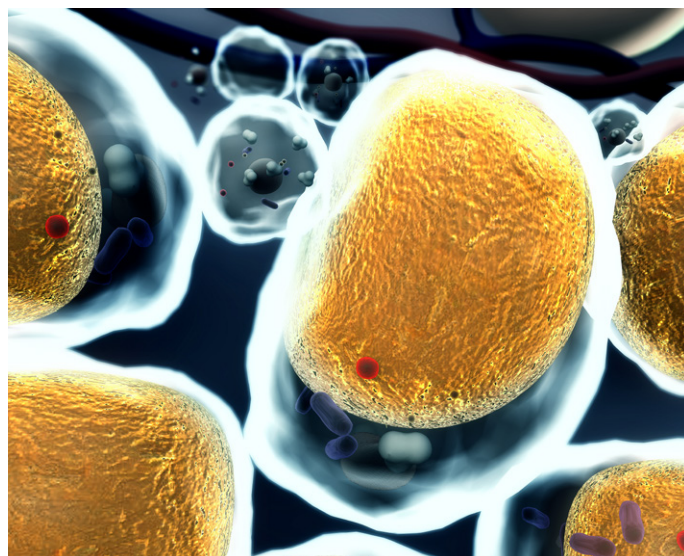


# Účinek melatoninu, interleukinu-10 a interleukinu-4 v nízkých dávkách na mechanismy lipolýzy a adipogeneze

*Porucha regulace produkce cytokinů a aktivace zánětlivé signalizace představují klíčové charakteristiky obezity, stejně jako metabolického syndromu. Tuková tkáň není pouhou zásobárnou tuku, ale endokrinním orgánem schopným regulovat různé metabolické cesty. Deficit sekrece cytokinů vede k patologickým stavům, z nichž je nejdůležitějším chronický zánět. Za účelem obnovení fyziologického stavu pacientů byla v nedávné době navržena řada přípravků s obsahem cytokinů v nízkých dávkách odpovídajících dávkám fyziologickým. V této předběžné studii jsme studovali účinky dlouhodobého vystavení (až do 11 dní) působení cytokinům IL-4, IL-10, melatoninu a kombinaci melatoninu s IL-4 na myši preadipocyty 3T3-L1. Cytokiny negativně neovlivnily přežívání buněk, ukázalo se však, že fungovaly jako cytoskelet a modulovaly působení proteinů jako je cadherin a vimentin.*



Tyto experimenty přinesly kontroverzní výsledky. Došlo sice k redukci obarvení barvivem Oil Red O u buněk vystavených působení cytokinů, nikoli však ke snížení akumulace triglyceridů. Neprokázalo se, že by cytokiny ovlivnily na lipolýzu, zde jsou však nezbytné další experimenty, které umožní hlubší pochopení této problematiky. Hlavním prokázaným účinkem vystavení buněk působení cytokinů byla schopnost těchto cytokinů chránit buňky před stresovými faktory LPS a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Budou provedeny další studie umožňující lepší pochopení účinku cytokinů v nízkých dávkách na modely 3T3L1 in vitro podrobnějším zkoumáním odpovídajících molekulárních cest.

## Klíčová slova

**Lipolýza, adipogeneze, melatonin, Interleukin-10, Interleukin-4.**

## Úvod

Tato studie si klade za cíl stát se východiskem zkoumání mechanismů účinku medicíny nízkých dávek (low dose medicine) na buněčných modelech in vitro, jež by umožnilo odhalení molekulárních drah zapojených do tohoto typu stimulace. Zde předkládaná data je třeba považovat za předběžná; představují určité východisko pro interpretaci v současnosti již probíhajících studií.

Vzhledem k celkovému nárůstu kvality lidského života a vyšší průměrné délce života došlo k tak širokému rozšíření některých chronických onemocnění v populaci, že je lze považovat za skutečné a mimořádné ohrožení zdraví. Zvláště obezita se považuje nejen za jeden z hlavních zdravotních problémů, ale také za jeden z hlavních rizikových faktorů vzniku závažných metabolických chorob, např. diabetu, hypertenze, aterosklerózy, neurodegenerativních onemocnění a mnoha dalších (1-4).

Pro obezitu je charakteristická nerovnováha mezi kalorickou hodnotou přijímané potravy a energetickým výdejem jedince; dochází při ní ke zvýšené akumulaci lipidů (triglyceridů) a nárůstu zastoupení adipocytů v tukové tkáni, zvláště v břišní oblasti. Vzestup objemu tukové tkáně závisí na různých faktorech: na buněčné proliferaci s následným nárůstem počtu buněk (hyperplazie), na změně jejich objemu (hypertrofie), na tvorbě nových buněk (adipogeneze) (5).

Tuková tkáň nepředstavuje pouze úložné místo „tuku“, jedná se rovněž o endokrinní orgán, schopný vylučovat velké množství biologicky aktivních molekul – adipokinů. Tyto molekuly se podílí na regulaci energetického metabolismu, svou roli však hrají také v regulaci kardiovaskulárního tonu a imunitní odpovědi (6). Produkce a sekrece těchto messengerů je u obezných jedinců pozměněná, což má závažné důsledky pro celkový metabolismus (7).

Obezitu je možné považovat za „benigní“, pokud neprogreduje směrem k metabolickému syndromu. Tímto pojmem se označuje souhrn poruch, který zahrnuje hypertenzi, inzulínovou rezistenci, hypertriglyceridemii, sníženou hladinu HDL cholesterolu, zvýšenou hladinu LDL cholesterolu a mikroalbuminurii (8); všechny tyto faktory přispívají ke vzniku kardiovaskulárních chorob, diabetu a onkologických onemocnění.

Souhrn těchto poruch přispívá ke vzniku zánětlivých procesů. Za normálních okolností představuje zánět obranný mechanismus, fyziologickou reakci organismu na vnější (fyzikální, chemické, biologické) stimuly; reakci, která slouží k uchování homeostázy. Normální akutní zánětlivá odpověď představuje koordinovanou činnost různých buněčných typů a molekulárních mediátorů. Zahrnuje migraci leukocytů a složek plazmy do místa poškození, tento proces je důsledkem aktivace tkáňově specifických makrofágů a mastocytů, které produkují různé molekulární mediátory (9).

Klíčovou úlohu při zánětech hrají cytokiny, které představují třídu chemických mediátorů, jejichž syntéza a uvolňování jsou spojeny s aktivací

makrofágů, ale i jiných buněk, např. neutrofilů, fibroblastů, lymfocytů a endoteliálních buněk. Hlavními prozánětlivými cytokiny jsou interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) a faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Zánětlivý proces je spouštěn cytokiny IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , jejichž hladina roste v prvních 24-48 hodinách a poté se vrací na svou normální fyziologickou hodnotu. Následně je zánětlivý proces udržován aktivní uvolňováním IL-6 a posléze ukončený aktivací interleukinu-10 (IL-10) a transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (10). Pokud proces aktivní zánětlivé odpovědi nemůže dospět ke svému konci z důvodu přítomnosti škodlivého faktoru či nějakého zásahu do normálního procesu uzdravování, dochází k přechodu k chronickému zánětu.

Chronický zánět tedy představuje dlouhotrvající odpověď, během které koexistují zánět, poškození tkáně a snahy o její opravu. Chronický zánět nízkého stupně (chronic low-grade inflammation), který doprovází metabolický syndrom a obecněji obezitu, nesouvisí s infekcí a nezabraňuje poškození tkáně. Jeho příčinou je samotná obezita a souvisí především s nárůstem objemu břišní tukové tkáně.

Jak jsme již zmínili, tuková tkáň představuje důležitý endokrinní orgán tvořený různými typy buněk jako jsou adipocyty, fibroblasty, endoteliální buňky a imunitní buňky, které mohou produkovat různé mediátory schopné ovlivňovat své okolí, zvláště cytokiny a adipokiny, jako je adiponektin, IL-6, IL-8, leptin, resistin a mnohé další. Mezi těmito látkami můžeme rozlišovat prozánětlivé a protizánětlivé molekuly. Například leptin je prozánětlivý mediátor, který indukuje produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12), podporuje fagocytózu makrofágů a indukuje aktivaci, proliferaci a migraci monocytů. Naproti tomu adiponektin má protizánětlivý účinek, neboť potlačuje produkci TNF- $\alpha$  a interferonu  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) a spouští produkci protizánětlivých cytokinů (např. IL-10) (11). Hypertrofie adipocytů u obézních jedinců vede ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů tukovou tkání, např. leptinu a resistinu.

Lokální makrofágy uvolňují chemoatraktanty, tedy molekuly, které přitahují další makrofágy, což je příčinou chronické povahy zánětu. Akumulace těchto buněk totiž hraje důležitou roli v nárůstu prozánětlivých mediátorů, např. IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$ . Tyto cytokiny přispívají k udržování inzulínové rezistence, dyslipidémie a nedostatečné funkčnosti endotelu (12).

V posledních desetiletích se velká pozornost věnovala úloze IL-6: různé studie prokázaly, že zvýšené hladiny tohoto cytokinu, např. při obezitě, korelují se zvýšenou mortalitou z kardiovaskulárních příčin. V současnosti se posuzují různé kardioprotektivní terapie, které se zaměřují na snižování hladiny cirkulujícího IL-6 (13). Většina terapeutických návrhů léčby těchto patologických stavů se zaměřuje na obnovu rovnováhy imunitního systému prostřednictvím podávání cytokinů, možnosti aplikace těchto molekul ve vysokých dávkách je však omezená vzhledem k velkému množství nežádoucích vedlejších účinků, včetně rizika vzniku závažných chorob jako je autoimunitní tyreoiditida, psoriáza či roztroušená skleróza.

Současné studie ukázaly, že použití nízkých dávek cytokinů, aktivovaných prostřednictvím metody SKA (Sequential Kinetic Activation) má menší počet nežádoucích účinků spojených s větší prospěšností léčby psoriázy ve srovnání s využitím standardních dávek rekombinantních cytokinů (resp. jejich blokátorů, např. infliximabu, blokátoru TNF- $\alpha$ ) (14). Další studie in vitro prokázala natolik výrazný imunomodulační účinek cytokinu IFN- $\gamma$  aktivovaného SKA, že byl navržen jako prostředek zlepšení protinádorové aktivity NK-buněk u pacientů s karcinomem tlustého střeva (15).

Farmaceutická technika SKA umožňuje, aby nanokoncentrace (koncentrace nižší než hodnota definovaná jako minimální účinná dávka) působily

aktivně, čím se překonává problém nízké biologické dostupnosti těchto signálních molekul při perorálním podání. Cytokiny využívané v této studii byly v koncentracích považovaných za fyziologické, ve vodním roztoku a aktivované prostřednictvím procedury SKA. Zvláště bylo ve studii hodnoceno působení IL-4, IL-10, melatoninu a kombinace melatoninu a IL-4.

IL-10 představuje nejúčinnější protizánětlivý cytokin, jakým lidský organismus disponuje; jeho imunomodulační účinek je zprostředkován aktivací dráhy JAK/STAT (16), má ochranný účinek vedoucí k ukončení zánětlivé reakce. U obézních jedinců dochází ke snížení syntézy IL-10 ve slezině, pravděpodobně v důsledku snížení počtu beta buněk, způsobeném oxidačním stresem a procesy apoptózy, k nimž v tomto orgánu dochází (17). K produkci IL-4 dochází v lymfocytech T CD4+ Th2; IL-4 představuje první stimul k produkci protilátek IgE a vývoji Th2 buněk T pomocnými naivními CD4+ lymfocyty. Rozsáhlé genetické studie ukázaly, že změny v genech kódujících tyto cytokiny jsou spojeny s vzrůstem predispozice k obezitě (18). IL-4 se ukázal účinným v modulaci chronické i akutní zánětlivé odpovědi, např. mediací upregulace IL-10.

Dále se studie se zaměřila na melatonin, ubikvitní hormon, který je zapojen do velkého množství metabolických procesů organismu. Melatonin je například nezbytný pro správnou syntézu, sekreci a účinek inzulínu. Jedná se také o základní chronobiologickou látku, která prostřednictvím cyklu bdělost/spánek reguluje různé časové fáze energetického metabolismu. Snížení hladiny melatoninu vede k inzulínové rezistenci, intoleranci glukózy, poruchám spánku a obezitě (19).

## Materiál a metody

### Cytokiny

V této studii byly využity následující přípravky obsahující cytokiny: **GUNA-Interleukin 4 (IL-4)**, **GUNA-Interleukin 10 (IL-10)**, **GUNA-Melatonin**, **GUNA-Melatonin + GUNA-Interleukin 4**.

Přípravky byly podávány každý den v dávce 2 fg na každých 106 buněk.

### Buněčný model

Buňky použité v této studii byly 3T3-L1, buňky odvozené z linie myších fibroblastů 3T3-NIH, které jsou při příslušné stimulaci schopné diferenciaci na adipocyty. Buňky se udržují v kultuře v živné půdě DMEM High Glucose (EuroClone) doplněné antibiotiky (Penicilin-Streptomycin, EuroClone, 1%), L-glutaminem (EuroClone, 2%) a dialyzovaným FBS (EuroClone, 10%).

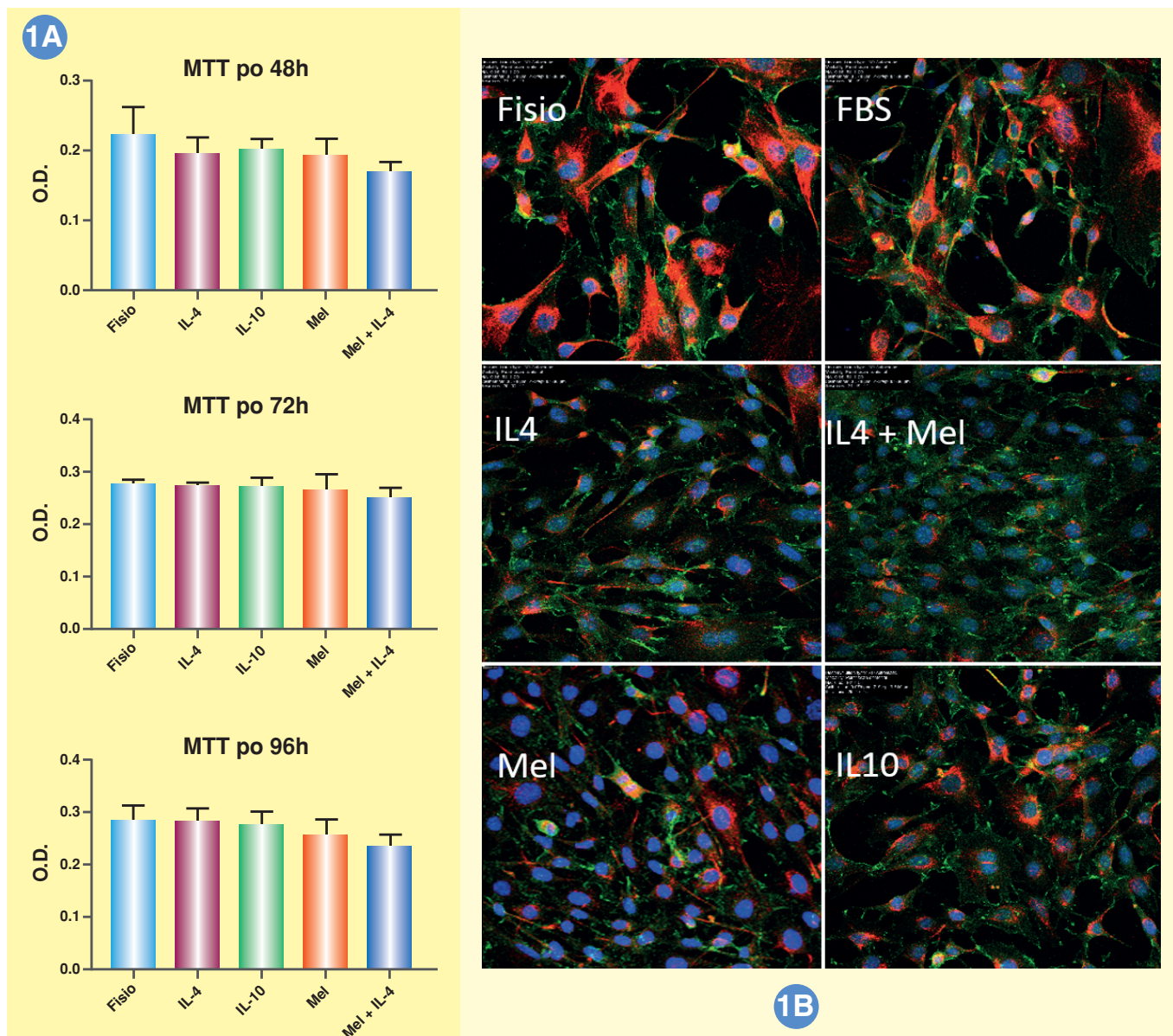
V den výsevu (G0) byly k buňkám aplikovány cytokiny IL-4, IL-10, melatonin a melatonin + IL-4. Aplikace cytokinů v nízkých dávkách byla opakována každý den, živná půda se obměňovala každý druhý den.

### Indukce adipogenní diferenciaci

Šestý den (G6) byly buňky vyjmuty, vysety do substrátových destiček s 48 jamkami s hustotou 10.000 buněk na cm<sup>2</sup> a udržovány v kompletní živné půdě s každodenním přidáváním cytokinů. Osm dní po vysetí (G8) byl k buňkám přidán indukční substrát pro adipogenní diferenciaci, tvořený kompletní živnou půdou doplněnou dexometazonem (1  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin, 0,5 mM, Sigma-Aldrich) a inzulínem (10  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) po dobu 48 hodin. Buňky 3T3-L1 byly udržovány v kultuře až do doby analýzy udržovacího substrátu (DMEM HG 10% dialyzovaný FBS s 5  $\mu$ g/mL inzulínu). Cytokiny se do systému přidávaly každý den a živná půda se měnila každý druhý den.

### Hodnocení růstu a fenotypu

Buněčný růst se hodnotil ode dne G0 prostřednictvím testu metabo-



**Obr. 1. Účinek vystavení buněk 3T3-L1 působení cytokinů v nízkých dávkách.**

1A. Absorbance určovaná po 48, 72 a 96 hodinách působení cytokinů. Na ose X jsou znázorněny použité cytokiny, výrazem „Fio“ jsme označili kontrolní skupinu. Na ose Y se nacházejí zjištěné hodnoty absorbance (O.D.). Není zjistitelný žádný statisticky významný rozdíl mezi vzorky vystavenými působení cytokinů a kontrolní skupinou. Rostoucí hodnota absorbance v čase prokazuje rostoucí počet buněk v čase.

1B. Imunofluorescence buněk vystavených působení cytokinů po dobu 8 dní. Červeně je vybarven vimentin, zeleně N-cadherin. Jádra jsou vybarvená modře. V každém obrázku je vyznačený použitý cytokin, kontrolní skupina je označena „Fio“, zatímco FBS označuje nedialyzované sérum.

lické aktivity MTT. MTT (tetrazoliová sůl, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich) žluté barvy se dodává buňkám, kde díky působení mitochondriálních enzymů vzniká formazanová sůl fialové barvy. Na konci celé procedury trvající 3 hodiny se určila absorbance MTT při vlnové délce 490 nm. Buněčný fenotyp byl vyhodnocen v den G8 prostřednictvím imunofluorescence. Buňky umístěné na sklíčka se fixovala paraformaldehydem v koncentraci 4%, opláchly a obarvily specifickými protilátkami pro vimentin a N-cadherin (Cell Signaling). K vizualizaci došlo pod fluorescenčním mikroskopem (A1-Nikon) prostřednictvím software NIS (Nikon).

#### Určení míry adipogeneze a lipolýzy

Pro vyhodnocení adipogeneze v den G12 se jako první metoda použila

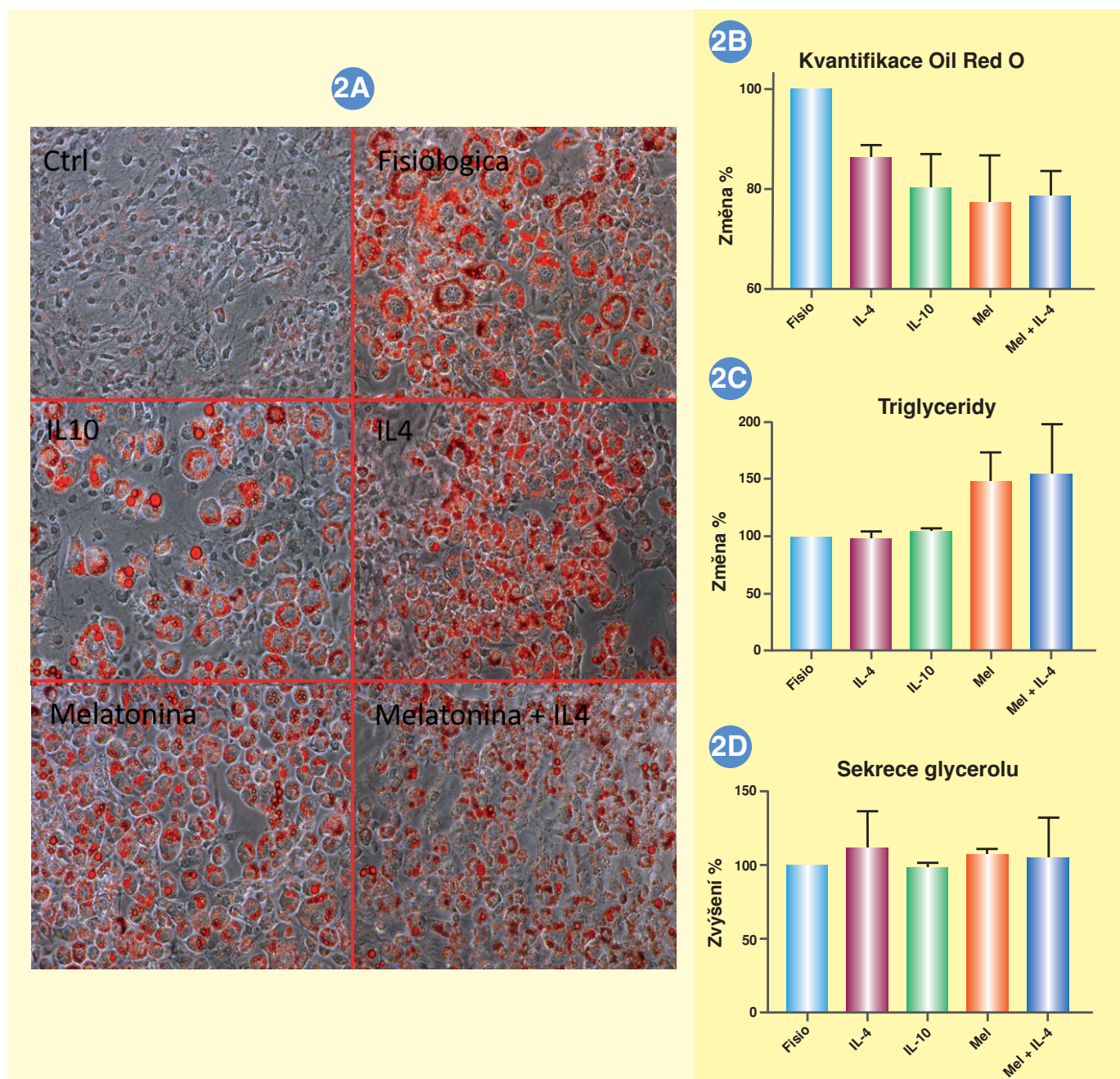
kvantifikace barviva Oil Red O (Sigma-Aldrich). Toto lipofilní barvivo proniká do buňky a trvale se váže na mastné kyseliny. Buňky byly nejdříve vyfotografovány při mikroskopickém zobrazení (TS100, Nikon), posléze omyté a rozdrcené. Množství barviva Oil Red O z vnitřku buněk bylo určeno spektrofotometricky. Druhý vzorek byl posouzený prostřednictvím speciálního kitu (Adipogenesis Detection Assay Kit – Abcam), jenž umožňuje určení množství triglyceridů akumulovaných buňkami. Buňky se rozruší, triglyceridový obsah rozpustí v glycerolu, které je posléze schopný oxidovat chromogenní sondu (O.D.max = 570 nm). Míra lipolýzy byla určena prostřednictvím lipolytické buněčné aktivity stanovené kitem Lipolysis Assay Kit (Abcam), jenž dokáže měřit množství glycerolu uvolněného po indukci lipolýzy Isoprenalinem (100 nM).



### Indukce stresu a jeho význam

Buňky byly vystaveny stresu v den G6 dvěma odlišnými procedurami. První z nich bylo vystavení působení lipopolysacharidu (LPS, 20 ng/mL, Sigma-Aldrich) po dobu 24 hodin. Následně se hodnotila sekrece IL-6 prostřednictvím testu ELISA (Booster) supernatantů. V průběhu několika

samostatných experimentů byly buňky označeny barvivem CellROX® Orange Reagent (Thermo Fisher); vzorek získává více či méně intenzivní barvu v závislosti na obsahu volných radikálů v buňkách, které se posléze ošetřily roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM) po dobu 30 minut a nakonec se pozorují pod fluorescenčním mikroskopem.



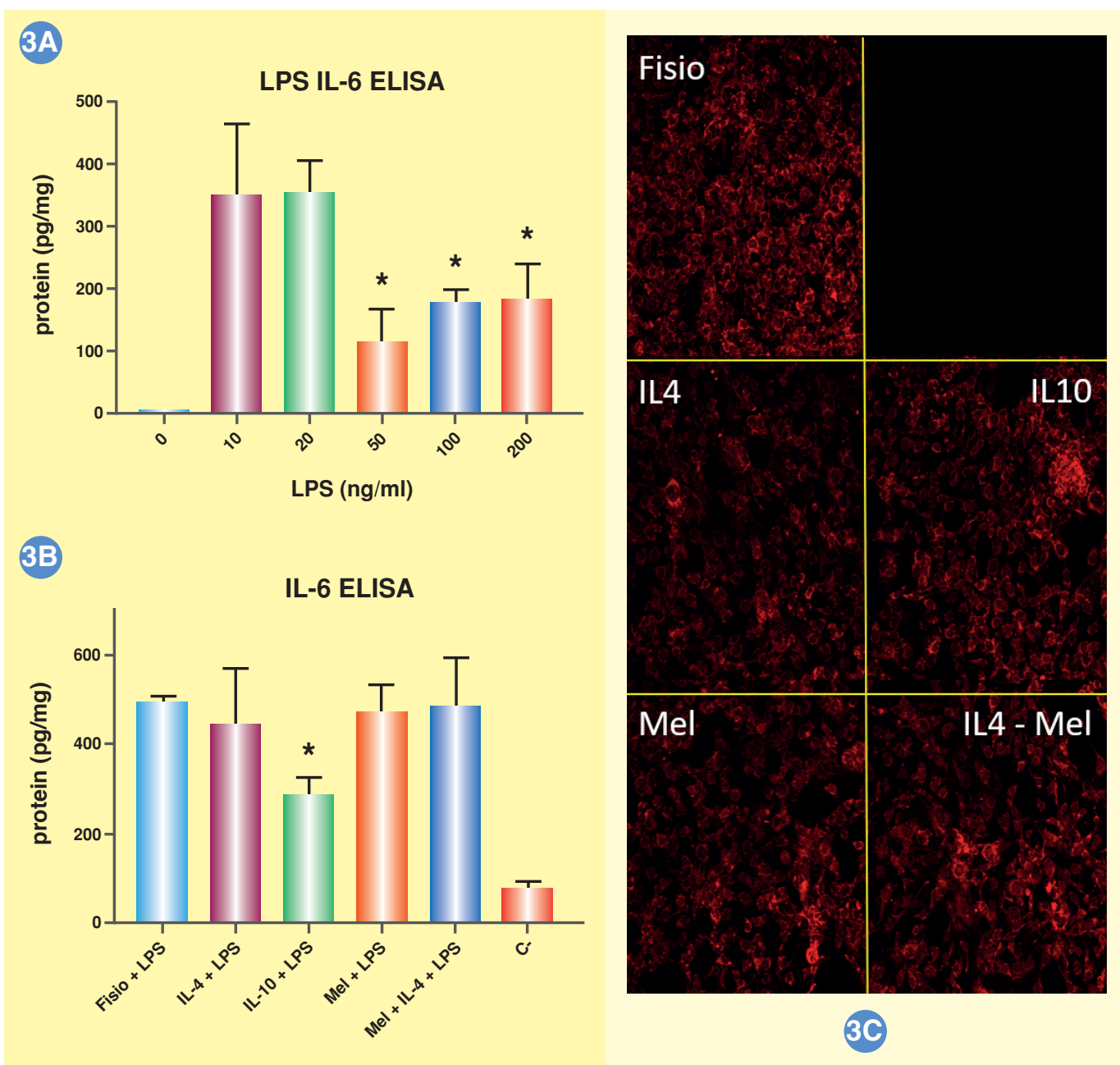
**Obr. 2. Účinek působení cytokinů v nízkých dávkách na diferenciaci na adipocyty a na lipolýzu.**

2A. Zobrazení diferenciací v osmém dni. Ctrl: negativní kontrolní kontrola, Fisiologica: pozitivní kontrola s fyziologií, IL-10, IL-4, melatonin, melatonin + IL-4.

2B. Na ose X jsou znázorněny aplikované cytokiny, Fisio: pozitivní kontrola, na ose Y jsou znázorněny změny v absorpci Oil Red O vyhodnocené spektrofotometricky.

2C. Určení míry adipogeneze, vyhodnocené prostřednictvím stanovení množství vnitrobuněčných triglyceridů, určených jako procentuální rozdíl vzhledem ke kontrolní skupině, Fisio: pozitivní kontrola.

2D. Lipolýza vyhodnocená prostřednictvím určení míry sekrece glycerolu, Fisio: pozitivní kontrola.



**Obr 3. Účinek působení cytokinů v nízkých dávkách na buňky vystavené stresu.**

3A. Stimulace buněk 3T3-L1 prostřednictvím LPS za účelem navození sekrece IL-6. Vyhodnocení sekrece bylo provedeno testem ELISA. Na ose X jsou zobrazeny koncentrace použitého LPS, na ose Y množství vylučovaného cytokinu.

3B. Určení míry sekrece IL-6 prostřednictvím testu ELISA, po delším vystavení působení cytokinů a stimulaci s LPS.

C – kontrolní skupina, nestimulovaná LPS, Fisio je kontrolní skupina stimulovaná LPS, na obrázcích jsou vyznačeny použité cytokiny, statistická významnost je označena \* v případě, kdy  $p < 0.05$ .

3C. Fluorescenční zobrazení buněk obarvených CellROX® Orange Reagent po přidání  $H_2O_2$ . Zřetelné je méně výrazné zbarvení u vzorků vystavených působení cytokinů, zvláště v případě vzorku s IL-4. Fisio: kontrola.

## Výsledky a diskuse

### Účinek aplikace cytokinů v nízkých dávkách na kultury buněk

Nejdříve se hodnotila vitalita buněk po aplikaci cytokinů a případný dopad těchto cytokinů na proteinové markery. Obrázek 1 ukazuje, že žádný z cytokinů neovlivňuje výrazné změny absorbance (O.D.) v MTT, což

znamená, že aplikace cytokinů nijak neovlivnila přežití a proliferaci buněk. K dokončení charakterizace buněk byly vyhodnoceny rovněž specifické markery tohoto buněčného typu; některé z nich nalezneme v obrázku 1B.

Vimentin, protein náležící do rodiny intermediárních filament, byl výraznou měrou exprimován v kontrolních vzorcích, ukázalo se však, že jeho exprese byla slabá v buňkách vystavených působení cytokinů po dobu 8 hodin. Vimentin je jednou ze složek cytoskeletu, který je zapojený nejen

do syntézy steroidů (20), ale také do transportu glukózy a jejího uptake (21). Podílí se rovněž na procesu diferenciaci adipocytů, při které dochází k delokalizaci proteinu, který se přesouvá z buňky do oblasti kolem vznikajících lipidových kapek (22).

Ačkoliv se v různých vzorcích neprokázaly kvantitativní rozdíly v diferenciaci N-cadherinu, je zřejmě jiným způsobem organizován v buňkách vystavených působení cytokinů – obrázek 1B ukazuje, že má kompaktnější strukturu. Z literatury víme, že se hladiny cadherinu v krvi mění u obézních živočichů a lidí a stabilizuje se až po snížení váhy. Některé izoformy cadherinu navíc ovlivňují diferenciaci potenciál adipocytů v takové míře, že je možné je považovat za biomarkery zdravotního stavu tukové tkáně (23). Reorganizace tohoto proteinu uvnitř buněk vystavených působení cytokinů, kterou ukazují naše předběžná data, se stane objektem dalšího výzkumu, neboť se jedná o velmi zajímavou skutečnost, která nemá snadné vysvětlení. Data o vitalitě buněk, společně se získanými imunofluorescenčními obrázky nás vedou k hodnocení, že vystavení buněk cytokinům je pro buňky zcela bezpečné a dochází k rozdílům v expresi některých markerů ve srovnání s kontrolními skupinami.

### Účinek cytokinů na diferenciaci adipocytů

Dospěli jsme k určitým předběžným závěrům ohledně buněk 3T3-L1 indukovaných k diferenciaci na adipocyty, s přidáním cytokinů v nízkých dávkách ve dnech předcházejících a následujících proces navozené diferenciaci. Jak je vidět z obrázku 2A, cytokiny neinhibují diferenciaci a z obrázků je také zřejmé, že je obtížné najít rozdíly mezi buňkami vystavenými cytokinům, kontrolním vzorkům a mezi buňkami s různými typy cytokinů. Barvivo proniknuté do buněk bylo proto rozpuštěno, aby byla možné spektrofotometrické měření (Obrázek 2B). Třebaže počet vzorků nedovoľoval získat statisticky významná data, zdá se, že sledované druhy cytokinů mohou diferenciaci omezit. Neočekávali jsme, že tento výsledek nepotvrdí další typ testu, ELISA, určený k vyhodnocení množství nitro-buněčných triglyceridů. Test ELISA ukázal, že se množství triglyceridů v buňkách do určité, třebaže ne výrazné míry, zvýšilo v buňkách vystavených melatoninu či kombinace melatoninu + IL-4 (Obrázek 3C).

Hodnotili jsme rovněž schopnost lipolýzy triglyceridů v buňkách předem vystavených cytokinům, které se diferencovaly za přítomnosti cytokinů po dobu 6 dní a stimulovaných isoprenalinem v den G12. Nezjistili jsme žádný rozdíl mezi skupinami (Obrázek 2D), což naznačuje, že předchozí vystavení buněk cytokinům nijak neovlivňuje regulaci tří hlavních enzymů (lipáz) zapojených do této metabolické cesty: triglyceridlipázy tukové tkáně (ATGL), hormonsenzitivní lipázy (HSL) a monoacylglycerollipázy (MGL)(24).

Tato předběžná data naznačují, že delší vystavení buněk 3T3-L1 stimulovaných směrem k diferenciaci na adipocyty cytokinům v nízkých dávkách má určité účinky, ale jejich přesnější charakteristika vyžaduje pokračování tohoto výzkumu, které již v naší laboratoři probíhá.

### Účinek působení cytokinů v nízkých dávkách na buňky vystavené stresu

Nakonec jsme v této předběžné studii hodnotili, zda předchozí vystavení buněk cytokinům v nízkých dávkách může zlepšit přežívání buněk vystavených stresu. V první skupině experimentů byl hodnocena sekrece prozánětlivého cytokinu IL-6 v buňkách stimulovaných LPS, generickým aktivátorem zánětlivé odpovědi (Obrázek 3A). Předběžné výsledky, zobrazené na obrázku 3B, ukazují, že v tomto kontextu je nej-

slibnějším cytokinem IL-10. Z grafu si můžeme všimnout, že sekrece IL-6 je výraznou měrou snižena v případě, že 3T3-L1 jsou vystaveny působení IL-10 v nízkých dávkách po dobu 6 dní.

Byla hodnocena rovněž reakce na oxidační stres (působení volných radikálů) prostřednictvím stimulace buněk pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a určení množství volných radikálů v buňkách obsažených pomocí barviva CellROX, jež umožňuje měřit oxidační stres prostřednictvím fluorogenní sondy vytvořené k měření volných radikálů (ROS) v živých buňkách. V tomto případě obrázky získané imunofluorescencí ukazují, že cytokin IL-4 je nejspolehlivější eliminovat volné radikály, jak vidíme na základě méně intenzivního zbarvení vzorku s IL-4 ve srovnání s kontrolní skupinou. Méně intenzivní zbarvení je však přítomné i na obrázcích ze vzorků vystavených působení ostatních cytokinů.

## Závěr

Třebaže jsou data získaná v této studii pouze předběžná a je třeba je dále ověřit buď opakovaním experimentů či hlubším zkoumáním mechanismů účinku, jsou slibná a ukazují velmi zajímavé možnosti. Buňky 3T3-L1 představují široce využívaný buněčný model studia adipogeneze a lipolýzy; stojí velmi málo a snadno se s nimi manipuluje. Tyto buňky nepředstavují dokonalý model lidské fyziologie, neboť pocházejí z jedné buněčné linie, lze je považovat za model vhodný pro iniciační metabolické studie in vitro. Vzhledem k tomu, že se jedná o široce přijímaný model, jsou metodiky indukce a inhibice adipogeneze u těchto buněk velmi dobře konsolidované. Většina studií využívá velká množství molekul, ať již cytokinů, syntetických či přírodních látek, po dobu 24/48 hodin a téměř nikdy po delší dobu, navzdory tomu, jaké je fyziologické trvání těchto procesů, v nichž jsou zapojeny látky s výrazně nižší koncentrací, které však vydrží déle. Jsme přesvědčeni, že metodologie krátkodobého vystavování buněk látkám neodpovídá přirozenému působení endogenních cytokinů, neboť v těchto typech modelů je stimulus velmi intenzivní a časově velmi omezený. Rozhodli jsme se proto předem vystavit buňky nízkým koncentracím cytokinů po delší dobu, dokonce i v průběhu stimulace k diferenciaci.

Jak jsme uvedli výše, v těchto koncentracích cytokiny neovlivňují vitalitu buněk, mají však účinek na buněčný fenotyp, neboť modifikují expresi a lokalizaci dvou markerů, jimiž je vimentin a N-cadherin. Když jsou tyto buňky vystaveny působení molekul v nízkých dávkách indukované k adipogenezi, pozorujeme působení, které navzdory zatím nedostatečné velikosti vzorku zřejmě mají – třebaže jen částečný – inhibiční charakter. Nejsilnější data se týkají IL-10, který podle testu s barvivem Oil Red O zřejmě má inhibiční účinek a poskytuje koherentnější data ohledně sekrece triglyceridů. Nezdá se však, že se projevuje nějaký účinek ve smyslu ovlivnění schopnosti lipolýzy. I tento aspekt budeme dále vyhodnocovat prostřednictvím odlišného protokolu experimentálního setu.

Zajímavý je rovněž výsledek týkající se reakce na stres. U buněk předem vystavených cytokinům se ukazuje omezená aktivace při stimulaci s LPS (vystavení cytokinu IL-10), čímž se snižuje sekrece prozánětlivých cytokinů, jak prokazuje snížení obsahu ROS (vlivem cytokinu IL-4) při vystavení působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V současné době v naší laboratoři provádíme další experimenty pro potvrzení těchto výsledků a k upřesnění s nimi souvisejících mechanismů účinku.

*(La Medicina Biologica 2018(4):57-64)*