

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Inhibícia jadrového receptoru PPAR α v bunkách čreva
diferencovaných *in vitro***

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Ivana Želikovská
Študijný program:	B1501 Experimentálna biológia
Študijný obor:	Experimentálna biológia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
Termín odovzdania práce:	2020

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Ivana Želikovská
Názov práce	Inhibícia jadrového receptora PPAR α v bunkách čreva diferencovaných <i>in vitro</i>
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Ústav embryológie a histológie, Lekárska fakulta UPOL
Vedúca práce	Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>K získaniu nových vedomostí o mechanizmoch a metabolizme rôznych látok a k vývoju nových metód k liečbe onkologických chorôb je dôležité štúdium diferenciácie buniek. V tejto diplomovej práci bola v teoretickej časti zhrnutá histologická a všeobecná stavba čreva, rola PPARα, všeobecné informácie o CYP epoxygenázach a solubilnej epoxydhydroláze. Experimentálna časť zahŕňa stanovenie viability buniek po ovplyvnení bunkovej línie HT-29 inhibítorom GW6471. Nasledovalo ovplyvnenie nediferencovaných a butyrátom diferencovaných buniek bunkovej línie HT-29 inhibítorom jadrového receptora PPARα (inhibítor GW6471). V tejto časti boli zaznamenané výsledky inhibičných koncentrácií (IC₁₀, IC₅₀), ktoré vyšli vyššie u diferencovaných buniek. Vyhodnotenie bolo uskutočnené pomocou WST-1 testu. Následne boli sledované rozdielne zmeny expresie markeru diferenciácie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy pomocou metódy In-Cell-Elisy. Poslednou úlohou bolo stanovenie vilínu pomocou imunohistochemického farbenia vo vzorkách pacientov.</p>

Kľúčové slová	Cytochrómy P450, PPAR α , kolorektálny karcinóm, inhibítor GW6471
Počet strán	65
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Ivana Želikovská
Title of thesis	Inhibition of the PPAR α nuclear receptor differentiated intestinal cells <i>in vitro</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of embryology and histology, Faculty of medicine
Supervisor	Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The study of cell differentiation is important to gain new knowledge about mechanisms and metabolism of various substances and to develop new methods for the treatment of cancer. In the theoretical part, were summarized the histological and general structure of intestine, role of PPARα, general information about CYP epoxygenases and soluble epoxydhydrolase. The experimental part includes determination of cell viability after treatment of the HT-29 cell line with GW6471 inhibitor. The next task was treatment of undifferentiated and butyrate differentiated HT-29 cell line with a PPARα nuclear receptor inhibitor (GW6471). In this section, the results of inhibitory concentrations (IC₁₀, IC₅₀) were higher for differentiated cells. Evaluation was performed by using WST-1 test. Subsequently, different changes in the expression of marker of differentiation (villin), CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 and soluble epoxydhydrolase were observed by using In-Cell-Elisa method. The last task was to determine villin by immunohistochemical staining in samples of patients.</p>

Keywords	cytochromes P450, PPAR α , kolorectal carcinoma, inhibitor GW6471
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlasujem, že predloženú diplomovú prácu som vypracovala samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

podpis

Moje poďakovanie patrí vedúcej práce, Mgr. Kataríne Čížkovej, PhD. za jej čas, poskytnutie vedomostí, priateľský prístup a odborné jednanie. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ústavu histológie a embryológie LF UP a Ústavu molekulárnej a klinickej patológie LF UP. V neposlednej rade, ďakujem mojej rodine a priateľovi za psychickú podporu.

Zoznam použitých skratiek

AA	kyselina abscisová
AF-1	aktivátor funkcie -1
APC	adenomatous polyposis coli
CBP	CREB-viazaný proteín CBP
CDK4	cyklín dependetná kináza 4
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	chromozonálna nestabilita
CLL	bunky chronickej lymfocytárnej leukémie
COUP-TFII	kurací transkripčný faktor II transkripcie promotora valbumínu
COX	cyklooxygenázy
CRC	kolorektálny karcinóm
DAP	diaminobenzidín
DBD	centrálna DNA viažúca doména
DR1	prvok priameho opakovania 1
EDHF	hyperpolarizačný faktor
EET	kyselinu epoxieikosatriénovú
FAO	oxidácia mastných kyselín
FAP	familiárna adenomatózna polypóza
FAS	Fas cell surface death receptor
HAT	histonacetyltransferázou
HDAC	uvoľnenie histondeacetylázy
HEK293	embyronálna bunková línia ľadvín
HepG2	pečeňová bunková nádorová línia
HETE	kyselina hydroxyekosatetraenová

HNF4	hepacytový jadrový faktor 4
HNPGL	paraganglomy hlavy a krku
HRP	enzým chrenová peroxidáza
Hsp90	proteín tepelného šoku 90
CHEK1	checkpoint kinase 1
LBD	ligandom viažúca doména
LOX	lipooxygenázy
LPA	kyselina lyzofosfatidová
MMR	mismatch reparačné gény
N-CoR22	jadrový ko-receptor
NR1C1	ľudský PPAR α gén
P450	cytochróm 450
PEA	palmitoyletanolamid
PGC-1 α	PPAR γ koaktivátor 1 α
PPAR	receptory aktivované proliferátormi peroxizómov
PPRE	responzivný element proliferátoru peroxizómov
RIS	reciproká inenzita chromogénu
RXR	receptor kyseliny retinovej
sEH	solubilná epoxydhydroláza
SMRT	umlčovací mediátor pre receptory retinoidných a tyroidných hormónov
SRC-1	steroidný koaktivačný receptor
TGFBR2	transforming growth factor beta receptor 2

Obsah

1 Úvod a ciele práce.....	12
2 Teoretická časť	13
2.1 Histologická stavba tráviacej trubice a všeobecná stavba tenkého a hrubého čreva	13
2.1.1 Histologická stavba.....	13
2.1.2 Všeobecná stavba	17
2.2 Kolorektálny karcinóm.....	18
2.2.1 Molekulárna podstata vzniku kolorektálneho karcinómu	19
2.3 Receptory aktivované proliferátormi peroxyzómov (PPARs)	20
2.3.1 Všeobecné informácie o PPAR	20
2.3.2 PPAR α	21
2.4 Rola PPAR α v karcinogénzii	24
2.5 Inhibítory PPAR α	26
2.5.1 Inhibitor MK886.....	26
2.5.2 Inhibitor GW6471	27
2.6 CYP epoxygenázy a solubilní epoxidhydroláza.....	28
2.6.1 Metabolizmus kyseliny arachidonovej	29
2.6.2 Výskyt a využitie CYP epoxygenáz	29
2.6.3 Charakteristika CYP epoxygenázy	30
2.6.4 Charakteristika sEH.....	33
2.7 PPAR vo vzťahu s CYP 450 epoxygenázami	33
3 Experimentálna časť.....	36
3.1 Použitý materiál	36
3.1.1 Biologický materiál	36
3.1.2 Použité prístroje.....	36
3.1.3 Pomôcky	36
3.1.4 Chemikálie	37
3.1.5 Použité súpravy	38
3.1.6 Zloženie roztokov.....	38
3.2 Použité experimentálne metódy a vyhodnocovacie postupy	38
3.2.1 Kultivácia bunkovej línie.....	38
3.2.2 Oplyvnenie buniek inhibítorom.....	39
3.2.3 WST-1 test	39
3.2.4 In Cell ELISA.....	39
3.2.5 Imunohistochemické farbenie	41
3.2.6 Štatistické hodnotenie.....	44

3.3 Výsledky	45
3.3.1 WST-1 test	45
3.3.2 In-Cell-Elisa	46
3.3.3 Imunohistochemické farbenie	51
4 Diskusia	54
5 Záver	57
6 Literatúra	58

1 Úvod a ciele práce

Štúdium diferenciácie buniek je potrebné k získaniu vedomostí o mechanizmoch a metabolizme rôznych látok a k vývoju nových metód k liečbe onkologických chorôb. V Českej republike je najčastejšie vyskytujúcim sa nádorom práve kolorektálny karcinóm.

Receptormi aktivované proliferáty peroxizómov (PPARs) hrajú dôležitú úlohu pri regulácii energetickej homeostázy, metabolizme lipidov a glukózy, zápale a sú zodpovedné za proliferáciu a diferenciáciu buniek. Tieto receptory patria medzi jadrové receptory a sú ligandom aktivované transkripčné faktory.

V teoretickej časti je zhrnutá histologická a všeobecná stavba čreva, rola PPAR α , všeobecné informácie o CYP epoxygenázach a solubilnej epoxydhydroláze.

V experimentálnej časti diplomovej práce boli študované bunky nediferencované a bunky diferencované pomocou butyrátu sodného. Bunky patrili do bunkovej línie HT-29 a boli ovplyvnené inhibítorom GW6471. Tento inhibítor znižuje životaschopnosť buniek, narušuje bunkový cyklus, indukuje apoptózu závislú od kaspázy. Prvým cieľom bolo stanoviť proliferáciu aktivitu buniek po ovplyvnení bunkovej línie inhibítorom. Ďalším cieľom bolo sledovať zmeny expresie markeru diferenciácie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy. Posledným cieľom bolo zmerať mieru vilínu vo vzorkách pacientov s kolorektálnym karcinómom.

Verím, že získané výsledky by mohli slúžiť k zlepšeniu liečby nádorových ochorení hrubého čreva a takisto k zlepšeniu výberu terapeutických látok na túto liečbu.

2 Teoretická časť

2.1 Histologická stavba tráviacej trubice a všeobecná stavba tenkého a hrubého čreva

Začiatok tráviacej trubice tvorí dutina ústna, slinné žľazy, nasleduje hltan, pažerák, žalúdok, tenké črevo a hrubé črevo, ktoré je zakončené ritným otvorom. Stenu tráviacej trubice tvoria štyri vrstvy. Prvou je sliznica (tunica mucosa), pod ňou je uložené podslizničné väzivo (tela submucosa), nasleduje vrstva svaloviny (tunica muscularis) a povrchová vonkajšia vrstva, ktorá je buď väzivová (tunica adventitia) alebo tvorí lesklú podbrušnú výstelku (tunica serosa). Tráviaci trakt obsahuje takisto aj žľazy, ktoré sa vytvorili ako deriváty a vychlípeniny epitelu tráviacej trubice. Väčšina patrí medzi žľazy exokrinné, ktoré vytvárajú vývody ale iba pankreas je žľaza endokrinná. Žľazy sa nachádzajú buď priamo v epitele a vytvárajú pohárikovité bunky alebo sú ponorené do slizničného a podslizničného väziva. Existuje ešte ďalší typ žliaz tráviaceho traktu a to sú žľazy extramurálne, ktoré sú charakteristické svojím uložením mimo steny tráviaceho traktu. Do tejto skupiny žliaz patria veľké slinné žľazy a pečeň (Čihák, 2002).

2.1.1 Histologická stavba

2.1.1.1 Sliznica

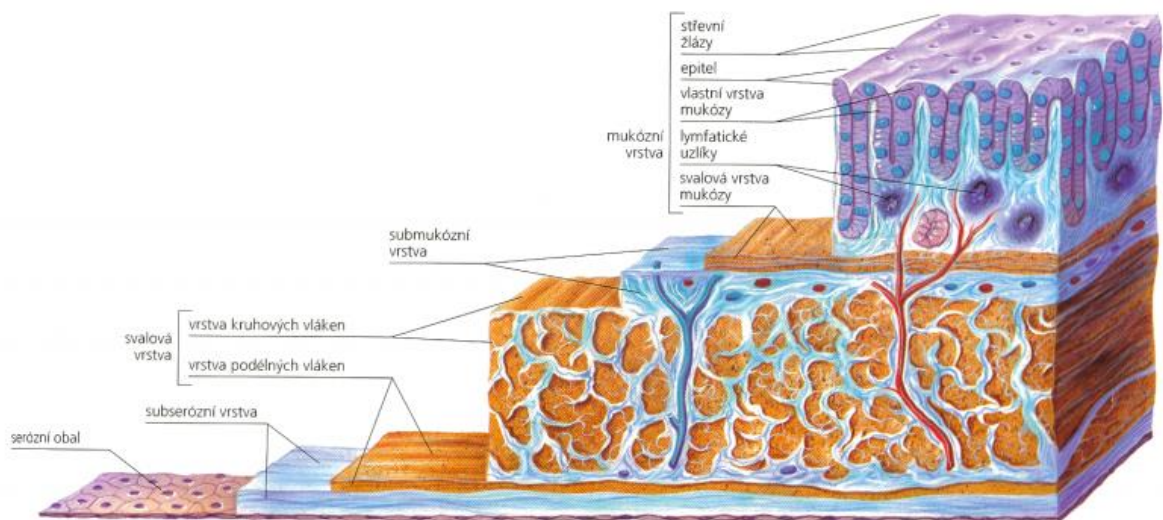
Sliznica tráviacej trubice slúži ako výstelka a je tvorená tromi vrstvami: epitelom, podslizničným väzivom a svalovou vrstvou. Na povrchu sa nachádza epitel (lamina epithelialis), ktorého organizácia sa mení na základe funkcie daného úseku trubice. Vrstevnatý dlaždicový epitel pokrýva dutinu ústnu, hltan, pažerák a oblasť ritného otvoru. Jednovrstevnatý cylindrický epitel pokrýva zvyšné úseky tráviacej trubice. Vrstva slizničného väziva (lamina propria mucosae) je uložená pod vrstvou epitelu a je tvorená riedkym kolagennym väzivom. Táto vrstva obsahuje krvné a lymfatické cievy a žľazky. Bunky hladkej svaloviny zaisťujú samostatný pohyb sliznice. Sliznica tráviacej trubice je chránená pred pôsobením baktérii veľkým počtom vyskytujúcich sa makrofágov, lymfocytov a plazmatických buniek produkujúcich protilátky (Konrádová et al., 2000).

2.1.1.1.1 Sliznica tenkého čreva

Sliznica tenkého čreva je pokrytá jednovrstevnatým cylindrickým epitelom s resorpčnými vlastnosťami. Cirkulárne riasy (plicae circulares) inak nazývané špirálovité alebo polkruhové výbežky sliznice a submukózy vyčnievajúce do lumen čreva, sú typické pre duodenum a jejunum

(Lüllmann – Rauch, 2012). Sliznica taktiež vybieha do črevných klkov (villi intestinales). V duodene sa vytvárajú najdlhšie klky a naopak najkratšie v distálnom tenkom čreve (Barker, 2014). Klky majú listkovitý alebo kužeľovitý tvar a spolu s cirkulárnymi riasami výrazne zväčšujú plochu sliznice. Krvné cievy, lymfatické cievy a nervové vlákna sú uložené v oblasti slizničného väziva lamina propria mucosae, ktoré oddeľuje bázu klkov od lamina muscularis mucosae. Arterioly vstupujú do každého klku, ktoré pod epitelom prechádza v sieť fenestrovanej kapilár a na vrchole klkov vytvára jednu alebo viac venul. Venulou je krv odvádzaná do vrátnice (vena portae) a lymfa lymfatickými kapilármi do lymfatických ciev uložených v stene čreva (Konrádová *et al.*, 2000).

Lieberkühnove krypty (gladulae intestinales) sú krátke tubulózne žľazy tenkého čreva, ktoré ústia medzi bázami klkov. Vo všetkých oddieloch tenkého čreva sú tvorené vo forme krypt, ktoré prenikajú do slizničného väziva (lamina propria mucosae) a dosahujú až do blízkosti buniek hladkej svaloviny (lamina muscularis mucosae).



Obr.1. Detailná schéma sliznice tenkého čreva (prevzaté z : <https://slideplayer.cz/slide/11295204/>)

Rytmický pohyb a tým absorpciu živín klkov umožňujú bunky hladkého svalstva. Na tvorbe imunologickej bariéry sa podieľa vrstva lymfocytov produkujúcich imunoglobulíny IgA. Táto vrstva sa nachádza pod bazálnou laminou epitelu. Na vrchole klkov je vytvorený mostík (arteriolovenózna anastomosa) umožňujúci spojenie obehu v prípade, kedy neprebíha proces

vstrebávania. Enterocyty, pohárikovité bunky, membránové epitelové bunky (M-bunky) a enteroendokrinné bunky sa nachádzajú v epiteli na povrchu klkov. Enterocyty sa radia medzi črevné cylindrické absorpčné bunky zodpovedné za posledné kroky trávenia a v sliznici tenkého čreva majú najvyššie zastúpenie.

Enterocyty vylučujú hydrolytické enzýmy, ktoré uľahčujú rozloženie čiastočne natráveného žalúdočného obsahu a vstrebávajú väčšinu živín elektrolytov a vody z tenkého čreva. Na povrchu sliznice sa nachádzajú mikroklky, ktoré zväčšujú povrch a ten je chránený glykokalyxom. Povrch je miestom aktivity disacharáz, enzýmov štiepiacich disacharidy, peptidáz a alkalickéj fosfatázy (Konrádová *et al.*, 2000).

Pohárikovité bunky sú vmedzerené medzi enterocyty a vyskytujú sa predovšetkým v epiteli krátkych klkov. Pohárikovité bunky patria k sekréčným bunkám a produkujú mucín, čím vytvárajú ochrannú hlienovú vrstvu (Konrádová *et al.*, 2000). V miestach nahromadeného lymfatického tkaniva sa vyskytujú M - bunky, ktoré sa zapájajú do obranných mechanizmov črevnej sliznice. M - bunky patria do skupiny špecializovaných antigén prezentujúcich buniek a umožňujú interakciu rôznych antigénov s imunokompetentnými bunkami. Miesto mikroklkov vytvárajú na svojom povrchu mikrozáhby (Čihák, 2002). Poslednou zložkou, ktorá sa nachádza v epiteli na povrchu klkov sú enteroendokrinné bunky, ktoré produkujú črevné hormóny tzv. enterohormóny. Enteroendokrinné bunky sú súčasťou difúzneho neuroendokrinného systému a môžu hormóny vylučovať buď priamo do krvného riečiska, tento proces sa nazýva endokrinná sekrécia, alebo pôsobením na susedné bunky umožňujú sekréciu parakrinnú (Lüllmann – Rauch, 2012). Panethove bunky sú bunky exokrinné a sú prítomné v bazálnych oblastiach krypt. Panethove bunky sekreujú ochranné mikrobiálne proteíny a lysozym čím sa účastnia na regulácii črevnej mikroflóry (Čihák, 2002; Konrádová *et al.*, 2000). Bunky tenkého čreva žijú približne 5 dní, následne dochádza k ich diferenciacii v kryptách a vzniku nových buniek (Lüllmann – Rauch, 2012). Po vzniknutí nových buniek dochádza k ich migrácii smerom nahor a diferencujú sa v enterocyty a sekréčne bunky. K ich apoptóze dochádza na povrchu klku a uvoľňujú sa z epiteli. Epitel čreva sa obnovuje po celý život (Sancho *et al.*, 2004). V slizničnom väzive tenkého čreva sa nachádza lymfatické tkanivo vyskytujúce sa v dvoch formách. V prvej forme, môžu byť bunky poukladané do jednotlivých lymfatických folikulov, ktoré vytvárajú samostatné drobné uzličky roztrúsené po sliznici tenkého čreva a nazývajú sa folliculi lymphatici solitarii. Druhá forma je charakteristická predovšetkým pre ileum tenkého čreva a nazýva sa folliculi lymphatici aggregati a predstavuje zhľuky uzlíkov vytvárajúce belavé povlaky (Peyerové plaky) (Čihák, 2002).

2.1.1.1.2 Sliznica hrubého čreva

Vzhľad sliznice hrubého čreva je bledý a relatívne hladký. Rozdiel v porovnaní so sliznicou tenkého čreva je že, neobsahuje klky ani cirkulárne riasy. Čo má spoločné s tenkým črevom sú

početné Lieberkühnové krypty, ktoré sú ale hlbšie a hustejšie rozmiestnené. S výnimkou apendixu, krypty neobsahujú Panethové bunky. Povrch sliznice je pokrytý jednovrstevnatým cylindrickým epitelom, ktorý je tvorený vysokými bunkami s krátkymi mikrovlnkami nazývanými kolonocyty, ktorých funkcia je vstrebávanie vody no niektoré kolonocyty sú schopné vodu aj vylučovať. Veľké zastúpenie majú pohárikovité bunky, ktoré produkujú mucín a v menšej miere sa tu vyskytujú aj M-bunky. Keďže je známe, že sa v hrubom čreve nachádza veľké množstvo baktérii, tak sa v slizničnom väzive vyskytuje veľké množstvo lymfocytov a lymfatických uzlíkov zasahujúcich často až do submukózy (Čihák, 2002; Lüllmann – Rauch, 2012). Jedinou zvláštnosťou oproti ostatným úsekom hrubého čreva je prechod jednovrstevnatého cylindrického epitelu nad análnym otvorom v epitel vrstevnatý dlaždicový (Konrádová *et al.*, 2000).

2.1.1.2 Podslizničné väzivo

Vrstva podslizničného väziva, inak nazývaná submukóza (tela submucosa), naväzuje na slizničné väzivo. Submukóza je tvorená riedkym kolagénym väzivom a umožňuje posunlivosť sliznice. Nachádza sa v nej veľké množstvo krvných a lymfatických ciev. Nervový systém steny gastrointestinálneho traktu je zložený z nervového pletenca (plexus sumucosus meissneri), ktorý vytvára vegetatívne a senzitivne nervové vlákna a vegetatívne gangliové bunky (Čihák, 2002). Brunnerove žľazy (glandulae duodenales Brunneri), ktoré vyplňujú vrstvu submukózy sa nachádzajú v duodenu a majú charakter rozvetvených tuboalveolárnych žliazok. Žliazky produkujú výrazne alkalický sekrét o pH 8,1 – 9,3, ktorý chráni duodenum pred pôsobením kyslého žalúdočného obsahu. Sú vystlané cylindrickými mucinóznymi bunkami a len ojedinele enteroendokrinnými bunkami (Čihák, 2002; Konrádová *et al.*, 2000).

2.1.1.3 Svalová vrstva

Dutina ústna, hltan, časť pažeráku a následne okolie ritného otvoru pokrýva vrstva priečne pruhovaného svalstva následne zvyšok tráviacej trubice je tvorený hladkou svalovinou. Svalová vrstva je rozdelená do dvoch vrstiev. Prvá, vnútorná vrstva obsahuje svalové bunky usporiadané cirkulárne (stratum circulare), Druhá, vonkajšia vrstva je zložená z buniek, ktoré sú usporiadané longitudinálne (stratum longitudinale). Tenké črevo obsahuje svalovinu, ktorá tvorí súvislý plášť a naopak svalovina hrubého čreva má vrstvu cirkulárnych vlákien a vrstvu s pozdĺžnymi vláknami tvorenú tromi pozdĺžnymi pruhmi (taeniae coli) avšak, pozdĺžna svalovina apendixu nie je členená do taenií ale vytvára súvislý plášť. Nachádza sa tu aj nervový pletenec (plexus myentericus) medzi cirkulárnou a longitudinálnou vrstvou, kde okrem pletenca sa nachádza aj riedke kolagénne väzivo, krvné cievy a lymfatické cievy. V svalovej vrstve sa nachádzajú intersticiálne Cajalové bunky spojené s hladkými svalovými bunkami. Tieto bunky sú zodpovedné za vznik elektrickej aktivity

a generácie pomalej depolarizačnej vlny, na ktorú následne nasadajú akčné potenciály (Lüllmann – Rauch, 2012).

2.1.1.4 Povrchová vonkajšia vrstva

Vonkajšia povrchová vrstva inak nazývaná tunica serosa, pokrýva povrch orgánov v pobrušnej dutine. Tunica adventitia je povrchová vonkajšia vrstva, ktorá pokrýva miesta tráviacej dutiny mimo pobrušnicovej dutiny. Povrch vonkajšej vrstvy je pokrytý jednovrstvovým epitelom (mezotelom), pod ktorým sa nachádza tenká vrstva subserózneho väziva (Čihák, 2000).

2.1.2 Všeobecná stavba

2.1.2.1 Tenké črevo

V skorých fázach vývoja, embryonálne črevo je zložené z viacvrstvovej endodermálnej bunkovej steny obklopenej mezenchýmom. Počas embryonálneho vývoja bunkové delenie poskytuje rast rôznym charakteristickým epiteliálnym bunkovým fenotypom. Rôzne nezrelé bunkové typy diferencujú progresívne po tom, čo migrujú z krýpt smerom ku špičke klkov. Následne sú potlačené do lumen okrem Panethových buniek, ktoré ostanú v kryptách. Distálna časť čreva je charakteristická podlhovastými žľazami lemovanými jednoduchým epitelom v ktorom sú vo vyššej miere absorpčné bunky a sekréčné pohárikovité bunky. Bolo zistené, že dynamické recipročné interakcie medzi epiteliálnym a mezenchymatickým tkanivom sú potrebné pre morfo genetické a diferenciacné procesy. Črevný epitel je zaujímavé tkanivo v tom, že sa obnovuje z kmeňových buniek lokalizovaných v kryptách, ktoré s podkladovými fibroblastami, výklenkami kmeňových buniek a pluripotentnými kmeňovými bunkami, tie dávajú vznik 4 typom buniek: enterocytom, sekréčným pohárikom, enteroendokrinným bunkám a Panethovým bunkám (Simon-Assmann; 2006). Enterocyty zodpovedajú za sekréciu hydrolytických enzýmov na rozklad živín a ich následnú absorpciu. Funkciou sekréčných pohárikov, je sekrécia slizu. Enteroendokrinné bunky produkujú hormóny. Panethove bunky sekretujú antimikrobiálne substancie a lyzozým. V čreve je vnútorné epiteliálne podložie aranžované do viacerých krýpt zoskupených do plochého luminálneho povrchu. V čreve dospelého človeka, je jedna vrstva epiteliálnych buniek organizovaná do jednotiek klkov, v ktorých bunky proliferujú a sú prichytené ku kryptám, v ktorých sú lokalizované kmeňové bunky (Čížkova *et al.*, 2019).

2.1.2.2 Hrubé črevo

Hrubé črevo sa delí na vlastné hrubé črevo (colon) a rektum. Medzi intraperitoneálne časti hrubého čreva patria slepé črevo (caecum), priečna časť (colon transversum) a sigmoideálna slučka (colon sigmoideum). Časti, ktoré majú svoj posteriórny povrch v retroperitoneu, sú vzostupné

črevo, klesajúce črevo, splénická a hepatická flexúra (ohyb) a začiatok a koniec sigmoidea. Výraznými znakmi hrubého čreva sú jeho veľký priemer, haustrá a prítomnosť apendických epiploiceí a ténii. Ténie sú tvorené pozdĺžnymi vláknami hladkej svaloviny, ktoré začínajú pri základni apendixu a pokračujú pozdĺž hrubého čreva, tvoriac svalovinový obal hornej časti rekta. Ako haustrá sa označujú vyduté steny hrubého čreva, oddelené zhybmi. Prvou časťou vlastného hrubého čreva je slepé črevo (caecum) a apendix, ktorý býva niekedy nesprávne označovaný ako slepé črevo, ktoré sú na jeho spodnej časti. Nasleduje vzostupné črevo, ktoré sa nachádza v pravej časti retroperitonea a siaha až po pečenevú kľučku (flexura hepatica). Tá leží blízko žlčníkovej jamy a pečenevej brány, nabieha na spodnú časť pravej obličky a dvanástnika. Vzostupné črevo prechádza do priečneho čreva, pričom tento segment hrubého čreva môže mať variabilnú dĺžku. Nasleduje pečenevú kľučku, ktorá leží pod ľavou bránicou a opiera sa o bránu sleziny a koniec pankreasu. Vzostupné črevo leží pozdĺž ľavého retroperitonea. Je ukončené sigmoideom. Sigmoideálna slučka je najužšou časťou hrubého čreva, končí sa spojmom s horným rektom. Hrubé črevo je pripevnené ku zadnej stene brušnej dutiny pomocou mezokolónu. Je to zdvojená vrstva peritonea. Obsahuje krvné a lymfatické cievy, nervy a lymfatické uzliny, ktoré zásobujú a odvádzajú všetky segmenty hrubého čreva. Okrajové artérie a žily tvoria oblúky pozdĺž mezokolickej strany čreva. Hlavnými arteriálnymi zásobovateľmi hrubého čreva sú arteria mesenterica superior a arteria mesenterica inferior. Arteria mesenterica superior sa krátko po svojom odstupe delí na ďalšie artérie, ktoré následne formujú oblúky v transverzálnej časti mezokolónu. Paralelne ku krvnému zásobovaniu hrubého čreva je jeho drenáž. Drenáž mezenterických artérií superior a inferior vedie do portálnej žily. Táto skutočnosť zvyšuje pravdepodobnosť pečenevých metastáz (DeVita *et al.*, 2001).

2.2 Kolorektálny karcinóm

Kolorektálny karcinóm (CRC) inak nazývaný rakovina hrubého čreva a konečníka je rozšírený po celom svete a v Českej republike je u mužov zastúpený na prvom mieste. Toto ochorenie je najčastejšie diagnostikované u osôb medzi 60 - 80 rokom a u pacientov mladších ako 60 rokov toto ochorenie predstavuje 23 %. V súčasnej dobe existujú screeningové programy usilujúce sa o zachytenie kolorektálneho karcinómu v skorých a teda dobre liečiteľných štádiách no u viac než 45 % pacientov je ochorenie diagnostikované v neskorších štádiách a liečebné možnosti sú u týchto pacientov obmedzené (Mattick & Makunin, 2006). Vznik kolorektálneho karcinómu podlieha viacstupňovému modelu karcinogénzie. Toto ochorenie je heterogénne a môže vzniknúť na základne vrodenej alebo spontánnej mutácie. Väčšina prípadov sa javí ako následok spontánnej genetickej udalosti prostredníctvom série genetických modifikácií, ktoré normálne transformujú epitel hrubého čreva na adenóm a nakoniec na adenómkarcinóm. Adenóm

je benígny intramukózný nádor epitelového pôvodu. Po vzniku adenómu dochádza k jeho rastu a zvyšuje sa riziko maligného zvratu, ktorého výsledkom je adenokarcinóm. Rýchla obnova črevného epitelu zároveň prispieva ku zvýšenému riziku vzniku genetických zmien, ktoré môžu byť trvalo kódované v genóme buniek a prispievať tak ku vzniku prekancerózných polypov či zápalových ochorení čriev, akými sú Crohnova choroba alebo ulcerózna kolitída. Kolorektálny karcinóm sa rozdeľuje z etiopatogenetického hľadiska na sporadický, familiárny a hereditárny. Po 50. roku života jedinca sa vyskytuje sporadický typ a tvorí 70-80 % všetkých nádorov hrubého čreva a konečníka. Výskyt genetických zmien v rodine pacienta je spojovaný s familiárnym typom, ktorý býva diagnostikovaný u necelých 20 % pacientov. Títo pacienti, ktorí majú pozitívnu rodinnú anamnézu by mali podstúpiť preventívne vyšetrenie už v mladšom veku. Posledným typom je hereditárna forma, ktorou trpí približne 10 % pacientov. Hereditárny nepolypózny kolorektálny karcinóm patrí medzi najčastejšie dedičné ochorenia a vzniká v dôsledku mutácie takzvaných „mismatch“ reparačných génov (MMR), ktorých úlohou je rozpoznanie a oprava chýb vzniknutých nesprávnym párovaním báz. Familiárna adenomatózna polypóza je ďalším autozomálne dominantným dedičným ochorením, ktoré sa vyznačuje veľkým množstvom črevných polypov a je etiologicky spojené s mutáciou génu pre APC (adenomatous polyposis coli) (Costa, 2010). Dôkazy získané predošlými štúdiami naznačujú, že kyselina lyzofosfatidová (LPA) je silným induktorom progresie rakoviny na niekoľkých úrovniach (Leea & Juna; 2010).

2.2.1 Molekulárna podstata vzniku kolorektálneho karcinómu

Tri základné mechanizmy genetickej nestability vedú ku premenám normálneho črevného epitelu v hyperplastické či adenomové polypy a následne k prepuknutiu kolorektálneho karcinómu. Chromozonálna nestabilita (CIN) sa vyznačuje zmenami v počte chromozómov, prestavbami chromozómov, či stratami častí chromozómov, ktorých súčasťou sú dôležité nádorová supresory súvisiace s vývojom kolorektálneho karcinómu. Túto prvú cestu podieľajúcu sa na vzniku CRC tvorí približne 70 % prípadov vzniknutých práve vplyvom CIN. Skupinu najvýznamnejších génov asociovaných s CIN tvoria APC, p53, SMAD2/4 či DCC (deleted in colorectal cancer) (Katada *et al.*, 2009). Mikrosatelitová nestabilita (MSI) tvorí druhú významnú cestu podieľajúcu sa na vzniku CRC. MSI sa vyskytuje približne u 15 % pacientov a je spojená s poruchami MMR génov. Úlohami týchto génov sú opravy náhodných chýb, ktoré vznikajú pri nesprávnom párovaní báz pri replikácii DNA. Rozdiel medzi CIN a poruchami MMR génov je ten, že zatiaľčo CIN vedie k stratám dôležitých supresorov, poruchy MMR génov súvisia so zmenou čítacieho rámca a akumuláciami mutáciami v génoch, ktoré kontrolujú dôležité biologické procesy ako sú bunečný cyklus a apoptóza. Mutované gény APC a BRAF sú najčastejšími mutovanými génmi u pacientov s CRC a s vysokou MSI. Mutácie onkogénu KRAS sú menej časté (Slaby *et al.*, 2007). Do skupiny

génov, ktoré sú spojované s MSI patria predovšetkým TGFBR2 (transforming growth factor beta receptor 2) PTEN, FAS (Fas cell surface death receptor) či CHEK1 (checkpoint kinase 1) (Brenner *et al.*, 2011).

Nadmerná metylácia CpG ostrovčekov, ktorá býva označovaná ako CIMP (CpG island methylator phenotype) je tretím mechanizmom genetickej nestability. Tento fenotyp býva detekovaný u 30-40 % pacientov s proximálnou lokalizáciou nádoru. Vysoká miera metylácie CpG ostrovčekov bola asociovaná s častými mutáciami onkogénu BRAF naopak nízka metylácia bola pozorovaná u pacientov s MSS a mutáciami onkogénu KRAS (Lin *et al.*, 2012).

2.3 Receptory aktivované proliferátormi peroxyzómov (PPARs)

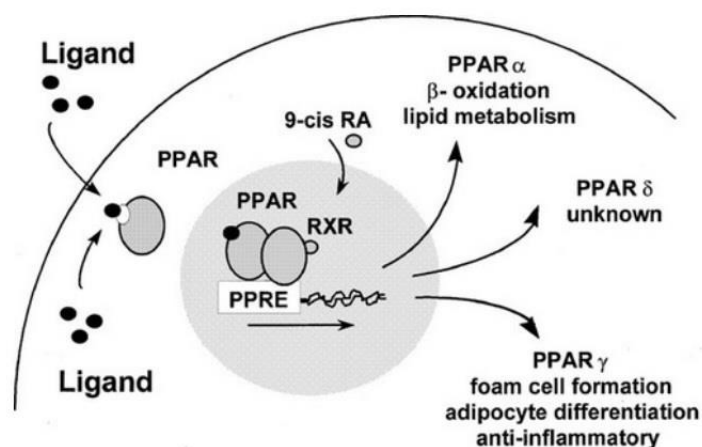
2.3.1 Všeobecné informácie o PPAR

PPAR sú transkripčné faktory, ktoré patria do rodiny jadrových receptorov. Do tejto rodiny patria napríklad receptory pre kyselinu retínovú, estrogén, vitamín D a receptory glukokortikoidov a niekoľko ďalších proteínov zapojených do xenobiotického metabolizmu PPAR. Od objavenia peroxyzóm proliferujúcich aktivačných receptorov PPARs v roku 1990, tieto receptory reprezentujú dôležitý farmakologický cieľ na moduláciu metabolických ciest v organizme. Sú transkripčnými faktormi, ktoré sa viažu na DNA a sú schopné kontrolovať fyziologické cesty v bunkách. Existujú tri PPAR izotopy (PPAR α , PPAR γ , PPAR β/δ), ktorých distribúcia má rôzne efekty v pečeni, obličkách, srdci, svaloch kostry a v tukovom tkanive (Berger *et al.*, 2005). Po heterodimerizácii s 9-cis receptorom kyseliny retinovej (RXR), PPARs podliehajú konformácii stimulujúcej expresiu cieľových génov, zapojených v glukóze, tukoch a energetickej homeostáze (Etgen *et al.*, 2003). PPAR α je zapojený hlavne v lipidovom metabolizme vedúcom k zvýšeniu k oxidácii mastných kyselín. PPAR γ sa ďalej delí do štyroch izoformiem: γ 1, ktorý je exprimovaný prakticky vo všetkých tkanivách vrátane srdca, obličiek, pečene, hrubého čreva, pankreasu, sleziny a svalov; γ 2 je exprimovaný hlavne v tukovom tkanive; γ 3 exprimovaný v makrofágoch a v hrubom čreve a posledná izoforma γ 4 je exprimovaná v endotelových bunkách (Evans *et al.*, 2004). Agonisti PPAR α boli objavení nedávno ako účinné lieky na liečenie hypercholesterolémie a príbuzných metabolických chorôb. Agonisti PPAR γ hrajú významnú rolu v senzitive inzulínu a diferenciácii adipocytov (Katsiki *et al.*, 2013). V poslednej dobe rastie záujem o možnosť zasahovať pomocou metabolických ciest do rakovinotvorných buniek, ktoré sa vystavujú rôznym energickým potrebám na prežitie a proliferáciu s aberentnou glykolýzou a oxidáciou mastných kyselín (FAO). PPAR α sa objavujú ako nové ciele interferujúce s metabolickými potrebami

rakovinotvorných buniek, ktoré využívajú oxidáciu mastných kyselín (FAO) pre ATP tvorbu (Benedetti *et al.*, 2017).

2.3.1.1 Mechanizmus účinku PPAR jadrových receptorov

Uvoľnenie histondeacetylázy (HDAC) a korepresorov predchádza konformačná zmena v PPARs po väzbe ligandu. Tento dej umožní heterodimerizáciu PPARs s retinoidným X receptorom (RXR). Na heterodimér sa naviažu RNA polymeráza a koaktivatory s histonacetyltransferázou (HAT) aktivitou II. Do skupiny koaktivátorov PPARs patria PPAR viazajúci proteín (PBP), SRC-1, p300, CBP, PGC-1 α . Tento komplex sa viaže na DNA sekvenciu nazývanú ako sekvencia PPRE (responzívny element proliferátoru peroxizómov). Následne dochádza k remodelácii a k zvýšeniu transkripcie cieľových génov. V situácii, pri ktorej chýbajú ligandy, sú tieto heterodiméry spojené s korepresorovým komplexom, ktorý blokuje gény transkripcie. Inhibíciu expresie cieľových génov spôsobujú korepresory ako SMRT a N-CoR (Kota *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2012). PPARs patria do skupiny fosfoproteínov a z tohto dôvodu môže byť ich transkripčná aktivita ovplyvnená fosforyláciou a defosforyláciou (Burns & Vanden Heuvel, 2007).



Obr.2. schématický diagram na ktorom sú znázornené jednotlivé funkcie PPAR (prevzaté: www.researchgate.net)

2.3.2 PPAR α

2.3.2.1 Štruktúra

Ľudský gén PPAR α (NR1C1) je umiestnený na chromozóme 22 a kóduje proteín zložený z 468 aminokyselín (Sher *et al.*, 1993). Myši gén PPAR α sa nachádza na chromozóme 15 a kóduje proteín zložený taktiež z 468 aminokyselín (Issemann & Green, 1990). Rovnako ako myši, ľudská

mRNA je kódovaná génom PPAR α a je odvodená z 8 exónov s 5' nepreloženou oblasťou kódovanou exónmi 1,2 a časťou exónu 3. Zvyšný podiel exónu 3 a exónov 4 - 8 prispieva do kódujúcej oblasti PPAR α (Desvergne & Wahli, 1999; Sher *et al.*, 1993). Posledných 232 párov báz exónu 8 pripisuje sa k 3' nepreloženej oblasti (Vohl *et al.*, 2000). Receptor aktivovaný proliferatmi peroxizómov α má štruktúru funkčnej domény analogickú so štruktúrou ostatných členov jadrových receptorov PPAR. Rovnako ako steroidné receptory, PPAR α interaguje s hsp90 (proteín tepelného šoku 90) (Sumanasekera *et al.*, 2003). Centrálna DNA viažúca doména (DBD) PPAR α je lemovaná N-terminálnou oblasťou nazývanou aktivátor funkcie -1 (AF-1), ktorá je aktivovaná fosforyláciou. DBD udeľuje PPAR α schopnosť viazať sa na PPAR reakčné prvky (PPRE) v promotore cieľových génov ako obligátny heterodimér s izotopmi retinoidného X receptora (RXR) (Wan *et al.*, 2000). PPRE sú zvyčajne zostavené ako priame repetície jadrovej sekvencie AGGTCA oddelené 1 alebo 2 nukleotidmi (DR1 a DR2), ohraničené proti smeru toku sekvencií bohatých na A/T. Kým PPRE geometria zaisťuje špecifickosť pre heterodiméry PPAR/RXR, DR1 PPRE sú rozpoznávané homodimérami RXR alebo receptormi kyseliny retinovej (RAR)/RXR, čo naznačuje krížovú komunikáciu s RAR a RXR, to môže viesť k ovplyvneniu metabolickej kontroly (Ijpenberg *et al.*, 2004). C-koniec PPAR α , ktorého 3D štruktúra obsahuje ligandom regulovanú E doménu alebo AF-2 alebo ligandom viažúcu doménu (LBD), ktorá obsahuje miesto na väzbu ligandu v tvare T na umiestnenie rôznych prírodných a syntetických ligandov (Xu *et al.*, 2002).

2.3.2.2 Výskyt receptoru aktivovaným peroxyzómovým proliferátom alfa

Expresia PPAR α je relatívne vysoká v hepatocytoch, enterocytoch, v typoch vaskulárnych a imunitných buniek ako sú napríklad monocyty alebo makrofágy, v endoteliálnych bunkách, v hladkom svalstve alebo v lymfocytoch (Heneka *et al.*, 2007). V pečeni hrá kľúčovú úlohu pri oxidácii mastných kyselín, pri ktorej je dodávaná energia periférnym tkanivám (Rigamonti *et al.*, 2008). V posledných desaťročiach sa uskutočnilo niekoľko štúdií, ktoré prebiehali v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach a ukazujú, že PPAR α hrá ústrednú úlohu v metabolizme lipidov a lipoproteínov a tým znižuje dyslipidémiu s metabolickým syndrómom (Barter *et al.*, 2008). Nalačno je PPAR α aktivovaný pomocou mastných kyselín odvodených z tukového tkaniva čím sa zvyšuje tvorba ketónov oxidáciou mastných kyselín v pečeni a mononukleárných buniek v periférnej krvi (Bouwens *et al.*, 2007). Rozličné sady proteínov ako sú napríklad transkripčné faktory, sú určené na vstup do jadra, zatiaľčo novo syntetizované proteíny ostávajú v cytoplazme. V tejto súvislosti, rozčlenenie a dynamika translokácie transkripčných faktorov zahrňujúca jadrové receptory sa preukázala ako jeden z hlavných krokov potrebných pre realizáciu transkripčno-regulačnej funkcie. Okrem toho, bolo objasnené, že modulácia jadrovo-cytoplazmatického transportu je kľúčovým mechanizmom pomocou ktorého je kontrolovaná činnosť a pohyb transkripčných faktorov, preto je

dôležitá v dlhodobějších procesoch zmeny bunecného fentoypu ako je diferenciácia a transformácia.

Na porozumenie kde a ako sú receptory aktivované proliferátom aktivované a regulované, tým Umemoto vynašiel molekulárne mechanizmy regulácie ich transportu medzi jadrom a cytoplazmou. Ich výsledky ukazujú, že PPARs neustále kolísajú medzi jadrom a cytoplazmou pomocou aktívneho jadrovo-cytoplazmatického transportu ako je uvedené pre iné receptory napríklad pre estrogénový receptor (Umemoto *et al.*, 2012).

2.3.2.3 Regulácia

Zatiaľ čo PPAR α reguluje veľa cieľových génov, expresia samotného génu je pod kontrolou iných transkripčných faktorov (Pineda Torra *et al.*, 2002). U hlodavcov je PPAR α regulované rôznymi fyziologickými stavmi ako je stres, hormóny (vrátane rastových hormónov), glukokortikoidmi, inzulínom a leptínom (Inoue *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2002). Expresia PPAR α je tiež uvádzaná, že súvisi so starnutím (Poynter & Daynes, 1998) a je indukovaná počas diferenciácie adipocytov (Kelly *et al.*, 1998). Ľudský PPAR α je tiež regulovaný na transkripčnej úrovni pomocou jadrových receptorov, ako je napr. hepatocytový jadrový faktor 4 (HNF4) a kurací transkripčný faktor II transkripcie promotóra ovalbumínu II (COUP-TFII). HNF4 pozitívne reguluje expresiu PPAR α prvkom priameho opakovania 1 (DR1), ktorý sa skladá z konsenzuálnej postupnosti AGG(A/T)CA oddelenej jedným chýbajúcim nukleotidom medzi dvomi opakovaniami. Na druhej strane, prvok DR1 v ľudskom PPAR α promotóre je antagonizovaným receptorom COUP-TFII (Pineda Torra *et al.*, 2002). V pečeni u ľudí môžu byť hladiny mRNA PPAR α rozdielne medzi jednotlivými jedincami a sú považované za nižšie ako hladiny zaznamenané u hlodavcov ale to môže čiastočne súvisieť s odchýlkami pri odbere vzoriek pečene pre zmrazenú archívnu pečňovú banku (Palmer *et al.*, 1998; Walgren *et al.*, 2000). PPAR α transkripčné levely sú taktiež indukované počas diferenciácie makrofágov vysokými glukozovými hladinami (Rigamonti *et al.*, 2008). Regulácia PPAR α môže prebiehať aj proteómovou degradáciou ubiquitínového systému (Genini *et al.*, 2008).

2.3.2.4 Mechanizmus pôsobenia

Po aktivácii PPAR α dochádza k transkripcii génov kódujúcich proteíny, ktoré majú funkciu v transporte mastných kyselín cez mitochondriálnu membránu a na α , β , ω oxidáciu mastných kyselín. K poklesu sekrécie triglycerolov a voľných mastných kyselín z pečene dochádza po zvýšení oxidácie mastných kyselín v pečňových bunkách a to vedie aj k sníženiu ich koncentrácie v krvi. K lepšiemu pochopeniu funkcie PPAR α boli vytvorené transgénne myši so selektívnym vyradením PPAR α (knock-out). Tieto myši mali úplnu absenciu stimulačného efektu PPAR α

agonistov na proliferácii pečňových peroxizómov a indukcii príslušných pečňových enzýmov. Po podávaní PPAR α agonistov normálnym myšiam došlo ku viac ako dvojnásobnému zväčšeniu hmotnosti pečene, zatiaľčo u myší PPAR α knock-out nedošlo k žiadnej zmene. Výrazne zmeny sa objavili pri dlhodobom hladovaní, keďže je známe, že dlhodobé hladovanie za normálnych okolností vedie k stimulácii lipolýzy a následne k výraznému vzostupu hladiny voľných mastných kyselín a takisto k takmer dvojnásobnému vzostupu expresie mRNA pre tento receptor v pečeni. Myši, u ktorých bol prevedený PPAR α knock-out mohli využiť jediný zdroj energie a to glykogén, keďže v dôsledku hladovania došlo k vzostupu voľných mastných kyselín a ku chýbajúcej oxidácii mastných kyselín. Došlo k veľkému poklesu glykémie, pretože zásoby sú rýchle vyčerpané ak sa nevyužíva iný zdroj energie. Knock-out myši teda neboli prakticky schopné prežiť ani reaktívne krátkodobé hladovanie (Kersten *et al.*, 1999).

2.4 Rola PPAR α v karcinogézi

PPAR α hrá kľúčovú rolu v metabolizme mastných kyselín a lipoproteínov a môže byť aktivovaný veľkým množstvom exogénnych a endogénnych ligandov vrátane mastných kyselín, eikozanoidov, fibrátov a mnohými inými. Rola receptorov aktivovaných proliferátormi peroxyzómov (PPARs) sú rozsiahlo študované v rôznych chorobách ako napríklad zápal, obezita, cukrovka. Presná rola PPAR α v procese karcinogenézy zostáva stále nejasná. Na jednej strane existujú štúdiá popisujúce jeho použitie v protinádorovej liečbe a v chemoprevenii (Jiaming *et al.*, 2015). Navyše existujú práce, v ktorých sa tvrdí, že agonisti PPAR α majú protinádorový účinok rovnako ako inhibítory (Tauber *et al.*, 2019). Ligandy PPAR α zabraňujú rastu niekoľkým nádorovým líniam *in vivo* a/alebo *in vitro*. Medzi tieto bunkové línie patria línie odvodené od nádoru hrubého čreva (Tanaka *et al.*, 2001), maternice (Saidi *et al.*, 2006) a pľús (Metha *et al.*, 2000). V roku 2004 bola identifikovaná zvýšená expresia PPAR α a PPAR γ a znížená expresia retinoidného X receptora δ v endometriálnych rakovinatvorných bunkových líniah použitím fenofibrátov (syntetické ligandy PPAR), pomocou nich sa aktivovali PPAR receptory a došlo k zníženiu bunecnej proliferácie a zvýšenej apoptóze. V roku 2006 Saidi a kolektív potvrdili, že fenofibráty v dávke nad 25 μ M inhibujú proliferáciu a zvyšujú apoptózu rakovinatvorných endometriálnych bunkových línii *in vitro*. Inhibičný vplyv ligandov PPAR na rast buniek umocňujú napríklad kyselina trans-retinová alebo jej 9-cis izomér (agonisti RXR). U nádorov pľús bol popísaný synergistický účinok agonistov RXR a PPAR (Metha *et al.*, 2000). Spojenie medzi aktiváciou PPAR α a epidermálnou diferenciáciou potvrdzujú niektoré štúdie ako napríklad, že fibráty podporujú epidermálnu diferenciáciu, inhibujú bunecnú proliferáciu u normálnych a hyperproliferujúcich myších epidermov a zvyšujú apoptózu (Kömüves *et al.*, 2000). Ďalšie štúdie dokazujú, že PPAR sú exprimované taktiež v melanocytoch. Štúdiá dokazujú, že aktiváciou

PPAR α prostredníctvom WY14643 a PPAR γ ciglitazónom dochádza k inhibícii proliferácie melanocytov a ku zvýšeniu syntézy melanínu. Z toho plynie predpoklad, že PPAR α aktivátory majú protirakovinové vlastnosti u karcinogenézy kože (Kang *et al.*, 2004).

Suchanek a kolektív popísali zvýšenie proliferácie v bunkových líniiach ľudského karcinómu prsníka po pôsobení PPAR α ligandov (Suchanek *et al.*, 2002). Pri pozorovaní, kedy došlo k aktivácii PPAR α , ktorý podporuje proliferáciu buniek rakoviny prsníka je jasné, že PPAR α aktivátory zahrňujú hypolipidemické fibrátové lieky, ktoré sú promotórmii vývoja nádoru v mliečnej žľazy u hlodavcov, ďalej zahrňujú herbicidy a kyselinu linolovú (Freedman *et al.*, 1990). Združenie medzi PPAR α a tumorgenézou prsníka bolo pozorované v predchádzajúcich štúdiách s izolovanými bunkami z mliečnej žľazy, kde PPAR α mRNA je výrazne zvýšená u karcinómov prsných žliaz v porovnaní s normálnymi mliečnými žľazami (Roberts – Thomson *et al.*, 2000). Bolo opísaných mnoho účinkov ligandov PPAR α na nádorové bunky a nádory. Čížková a kolektív skúmali účinky rôznych koncentrácií PPAR α ligandov ako fenofibrátu, bezafibrátu, gemfibrozilu a WY-14643 na životaschopnosť troch ľudských bunkových línii : HEK293, HepG2 a HT-29. Ich výsledky ukazujú koncentračnú závislosť agonistov PPAR α na proliferáciu buniek. Pri nižšej koncentrácii všetkých testovaných fibrátov je pozorovaná zvýšená proliferácia, na druhej strane, pri vyššej koncentrácii je viditeľná represia (Čížková *et al.*, 2016). Okrem iného PPAR α hrá úlohu v regulácii enzýmov cytochrómu P450 (CYP) nazývaných CYP epoxygenázy (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). Z týchto enzýmov CYP2C a CYP2J konverjú kyselinu arachidónovú na kyselinu epoxieikosatriénovú (EET), ktorá má všeobecne cytoprotektívne účinky (Shen *et al.*, 2008).

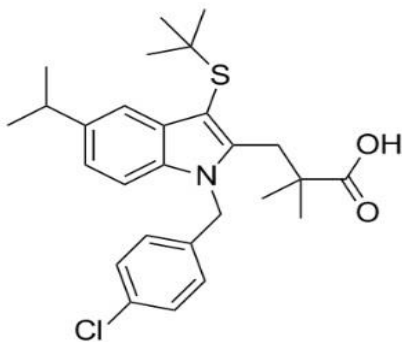
Tauber a kolektív preukázali, že nízke dávky fibrátov stimulujú proliferáciu bunkovej línie MCF7 rakoviny prsníka zatiaľčo vyššie dávky potlačujú proliferáciu. Stimulácia bunkovej línie MCF7 bola sprevádzaná zvýšením CYP2C8, CYP2C9 a hladiny CYP2J2. Tieto enzýmy zodpovedajú za syntézu kyseliny epoxieikosatriénovej (EET), ktorá syntetizuje enzýmy, ktoré podporujú proliferáciu buniek a znižujú hladiny sEH degradáciou EETs. Takisto bolo preukázané, že celkový obsah PPAR α v bunkovej línii MCF7 nebol zmenený po aplikácii nízkeho množstva WY-14643 fibrátu no presunul sa do jadra, čo naznačuje jeho aktiváciu. Rovnako v tkanivách tumoru od pacientov s rakovinou prsníka, bola preukázaná vyššia jadrová pozitivita PPAR α v porovnaní so zdravým tkanivom. Hoci tieto výsledky naznačujú potenciálnu rolu PPAR α v bunečnej proliferácii, presná rola v karcinogenéze zatiaľ nie je jasná (Tauber *et al.*, 2019). Pokusy na zvieratách poskytujú sľubné výsledky v oblasti regulácii PPAR α závislej na CYP epoxygenázach a následným znížením objemu nádoru a vaskularizácii u myší (Pozzi *et al.*, 2010).

2.5 Inhibítory PPAR α

2.5.1 Inhibítor MK886

Tento inhibítor bol pôvodne vyvinutý v USA v roku 1990 ako silný inhibítor biosyntézy leukotriénov a bol použitý pre jeho schopnosť indukovať apoptózu v rôznych biologických systémoch (Anderson *et al.*, 1996). Počas dôkladných štúdií bola zistená jeho antiapoptická aktivita ako aj inhibičná aktivita proti PPAR α (Kehrer *et al.*, 2001). Posledných desať rokov sa používa tento inhibítor vo funkčných štúdiách zameraných na overenie zapojenia PPAR α v niektorých signálnych dráhach ako napríklad pri zvýšenej transkripcii génu apoA-I, pri inhibícii expresie cyklooxygenázy-2 (COX-2) (Pandey *et al.*, 2008) pomocou kyseliny 20-hydroxyekosatetraenovej (20-HETE) (Liang *et al.*, 2011).

Spaner a kolektív v roku 2013 zistili, že MK886 zabíja cirkulujúce bunky chronickej lymfocytárnej leukémie (CLL). Bolo pozorované, že PPAR α bol exprimovaný rakovinotvornými bunkami, ktoré spôsobujú závažnejšie ochorenia a takisto došlo ku zníženiu expresie PPAR α , ktoré bolo spojené s imunologickou smrťou, z toho vyplýva, že antagonistu PPAR α MK886 môže mať terapeutické účinky na CLL. V dôsledku tohoto zistenia, boli CLL bunky od piatich rôznych pacientov kultivované v rôznych koncentráciách MK886. Životaschopnosť buniek bola meraná o 2 dni neskôr pomocou prietokovej cytometrie. Bolo zistené, že inhibítor MK886 je toxický pre CLL v rozsahu 10 μ M, v tomto rozsahu sa uvádza inhibícia PPAR α (Kehrer *et al.*, 2001).



Obr.3. Štruktúra inhibítora MK886 (Vernon *et al.*, 1999)

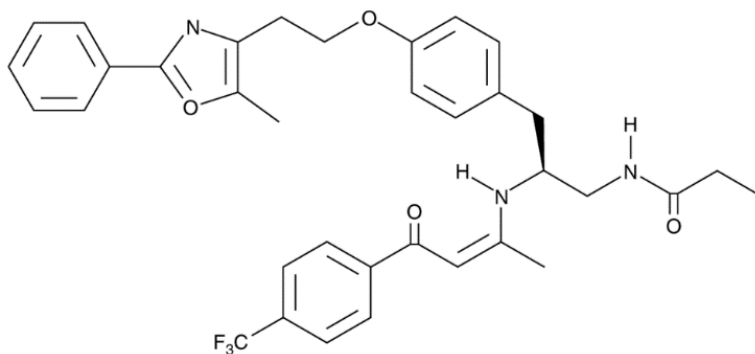
2.5.2 Inhibítor GW6471

2.5.2.1 Použitie GW6471 pre HNPGL

Paragangliómy hlavy a krku (HNPGL) sú zriedkavé nádory, ktoré môžu spôsobiť významnú chorobnosť, pretože majú tendenciu sa infiltrovať do lebky. V súčasnosti je chirurgia jedinou terapeutickou možnosťou, ale radikálne odstránenie môže byť obtiažne až nemožné. Preto je potrebné identifikovať účinné molekuly na vyliečenie HNPGL, tomu však bráni nedostatok bunkových modelov pre tento zriedkavý nádor. Špecifický agonista PPAR α WY14643 nemal žiadny vplyv na životaschopnosť HNPGL buniek, zatiaľ čo špecifický antagonist PPAR α GW6471 znížil životaschopnosť a rast buniek HNPGL indukciou zastavenia bunkového cyklu a apoptózy závislej od kaspázy. Po použití GW6471 došlo k výraznému poklesu expresie proteínu CDK4, cyklínu D3 a cyklínu B1, spolu so zvýšenou expresiou p21 v bunkách HNPGL. Okrem toho GW6471 drasticky zhoršil klonogénnu aktivitu buniek HNPGL s menším účinkom na migráciu buniek. Predovšetkým účinky GW6471 na bunky HNPGL boli spojené s inhibíciou signálnej dráhy PI3K/GSK3 β / β -katenínu. Záver je, že antagonist PPAR α GW6471 znižuje životaschopnosť buniek HNPGL, interferuje s bunkovým cyklom a indukuje apoptózu (Rosalba *et al.*, 2017).

2.5.2.2 Pôsobenie GW6471

Prvou alternatívou je, že inhibítor GW6471 prerušuje interakcie medzi PPAR α a koaktivačnými motívmi odvodených od SRC-1 (steroidný koaktivačný receptor) alebo CBP (CREB – viazaný proteín). Druhou alternatívou je, že podporuje naviazanie ko-represorových motívov zo SMRT (umlčovacieho mediátora pre receptory retinoidných a tyroidných hormónov) alebo N-CoR22 (jadrový ko-receptor) (Zhou *et al.*, 1998). Hodnota IC₅₀ pre PPAR α v bunkových testoch ukazuje silu GW6471 premiestniť koaktivátory a naopak nabrat' represory. Aktivita pre naviazanie SMRT alebo N-CoR motívov k doméne viažúcej ligand PPAR α (LBD) bola päťnásobne zvýšená vďaka inhibítoru GW6471. Tieto výsledky ukazujú, že GW6471 indukuje PPAR α LBD konformáciu, ktorá účinne reaguje s ko-represormi (Nagy *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999; Perissi *et al.*, 1999). Bolo preukázané, že antagonistické vlastnosti GW6471 významne bránia diferenciacii kardiomyocytov v myších embryonálnych bunkách a odstraňujú účinky palmitoyletanolamidu (PEA) v neurosteroidogéneze. Inhibítor takisto antagonizuje protizápalový účinok simvastatínu pri poranení miechy a takisto protidoštičkové účinky statínov a fibrátov súvisiacich s PPAR α pomocou proteínkinázy Ca (Sagar *et al.*, 2008; Romano *et al.*, 2013).



Obr.4. Štruktúra inhibítora GW6471 (prevzaté z <https://www.caymanchem.com/product/11697>)

2.6 CYP epoxygenázy a solubilní epoxidhydroláza

Cytochrómy P450 patria do skupiny hemoproteínov (spolu s hemoglobínom, myoglobínom atď.). V roku 1958 boli poprvykrát objavené M. Klingenbergom a vyskytujú sa takmer vo všetkých organizmoch jako sú baktérie, rastliny a živočíchy. Primárne sú najviac známe jako metabolizátory xenobiotík (liečivá, drogy, rôzne chemikálie), konkrétne sa účastnia I. fázy biotransformácie xenobiotík (Guengerich, 2006).

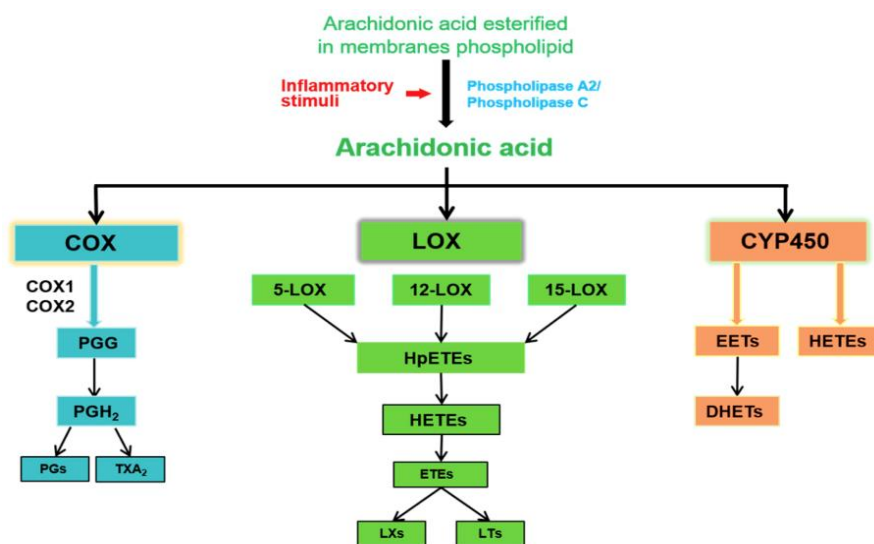
Všetky CYP majú nekovalentne viazané hematómy typu b (protoporphyrín IX), kde piatym ligandom je tiolátový anión cysteínového zvyšku, ktorý spája hemové železo s proteínom. Pomocou tohto typu väzby je skupina hem schopná meniť elektrónovú hustotu rezonancie porfyrínového kruhu, čím sa poskytne elektronické centrum pre aktivácia molekulárneho kyslíka (Anzenbacher *et al.*, 2001; Omura, 1999).

Symbol CYP napísaný kurzívom sa odporúča používať na označenie génu pre všetky druhy s výnimkou génov myši *Drosophili*, v tom prípade sa používajú malé písmena (Cyp). Ak sú sekvencie viac ako 40 % identické, tak sú v rovnakej rodine a sú označené arabskou číslicou (napr. CYP3). Ak sekvencie zdieľajú viac ako 55 % rovnakej identity, potom tvoria konkrétnu podrodinu, ktorá je označená písmenom (napr. CYP3A). Konečné číslo označuje jednotlivý typ CYP (napr. CYP3A1) (Nelson *et al.*, 1996).

V ľudskom genóme sa nachádza 57 funkčných génov CYP rozdelených do 18 rodín a 44 podrodín (Nelson, 2004). Väčšina z nich má špecifické endogénne funkcie, vrátane biosyntézy steroidov, cholesterolu, vitamínu D3, žlčových kyselín a atď. (Zanger *et al.*, 2013).

2.6.1 Metabolizmus kyseliny arachidonovej

Kyselina arachidonová patrí kyseliny, ktoré si žiadna bunka cicavcov nevie nasyntetizovať *de novo*. Táto kyselina patrí medzi polyneenasýtené kyseliny. Arachidonová kyselina je najčastejšie dodávaná do organizmu z rastlinnej potravy vo forme kyseliny linolovej. Metabolizmus kyseliny arachidonovej môže byť realizovaný tromi cestami: pomocou cyklooxygenáz (COX), lipoxygenáz (LOX) a cytochrómu P450 (CYPs). Kyselina arachidonová je metabolizovaná na prostacyklín pomocou cyklooxygenáz. Druhá cesta zahŕňa premenu na leukotrien C4 pomocou lipoxygenázy (LOX). Tretia cesta metabolizmu kyseliny arachidonovej je pomocou cytochrómu P450, tie môžu tvoriť buď 19- a 20- hydroxyeikosatrienovú kyselinu (19-HETE, 20-HETE) alebo epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs). EETs sú tvorené pomocou CYP epoxygenáz, hlavne CYP2C a CYP2J2 zatiaľčo HETEs sú produktom CYP4A a CYP4F (Čížková *et al.*, 2014; 2016; Tripathi *et al.*, 2018).



Obr.5. metabolizmus kyseliny arachidonovej (prevzaté z : www.mdpi.com/1422-0067/20/15/3683)

2.6.2 Výskyt a využitie CYP epoxygenáz

Aj keď sú prevažne ľudské CYP epoxygenázy exprimované v pečeni, v malom množstve sú exprimované v extrahepatickom tkanive čo je výsledkom medzibunkovej variability expresie CYP epoxygenáz u daného jedinca. Existuje mnoho podrodín, ktoré boli klasifikované ako CYP

epoxygenázy, ako napríklad CYP1A,CYP2B,CYP2C,CYP2E a CYP2J. Tieto podrodiny a mnohé ďalšie potenciálne, prispievajú k premene kyseliny abscisovej (AA) na EET. Ľudské epoxygenázy sú prevažne členmi CYP2C a CYP2J podrodiny. Najmä izoformy CYP2C8,CYP2C9,CYP2C19 a CYP2J2 boli identifikované ako hlavné izoformy CYP podieľajúce sa na biotransformácii AA na EET u ľudí.

2.6.3 Charakteristika CYP epoxygenázy

Cytochróm P450 (CYP) je kolektívny názov pre veľkú rodinu vnútrobunkových enzýmov, ktoré sa viažu na hem, ktoré sa podľa všetkého rozdelili z jedného pôvodného proteínu na mnoho foriem v priebehu ich biologického vývoja. Tieto enzýmy sa našli vo všetkých formách života (vo všetkých eukaryotických organizmoch a niektorých prokaryotách). CYP boli objavené začiatkom 60-tych rokov ako neznáma redukovaná forma pigmentu viažúceho oxid uhoľnatý v pečeni potkanov s maximálnou absorbanciou približne 450 nm, z toho vyplynul aj názov P450. Tento pigment bol nakoniec charakterizovaný ako hemový proteín v roku 1962 a jeho funkcia bola určená o rok neskôr (Estabrook *et al.*, 1963). Účinky P450 sú známe v metabolizme xenobiotik a to v prvej fáze metabolizmu, kde sú katalyzované tieto cytochrómy. Väčšinou tieto reakcie vedú k detoxikácii. Iný prípad je však, keď tieto reakcie vedú k metabolickej aktivácii liečiv na ich aktívnu formu. Inhibíciou CYPs či už reverzibilnou alebo ireverzibilnou cestou, dochádza k nežiadúcim interakciám medzi liečivami navzájom alebo liečivami a potravou (Barbier *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2008). CYP epoxygenázy hrajú dôležitú rolu v metabolizme liečiv. Sú druhou najdôležitejšou skupinou v metabolizme liečiv po CYP3A4/5 a metabolizujú približne 30 % klinicky dôležitých liekov. Jednou z ich dôležitých úloh je také funkcia endogénna. Táto úloha zahŕňa premenu kyseliny arachidonovej na štyri regioizoméry epoxyeikosatrienových kyselín (EETs), konkrétne sa jedná o 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET (Spector *et al.*, 2004). EETs pôsobia v mnohých biologických procesoch. Ich dôležitá úloha je napríklad v biologických procesoch ako je mitogéza, bunková signalizácia, regulácia cievného tonusu a iónových kanálov a majú protizápalové účinky. Značný vplyv majú takisto na rast nádorových buniek. Skúmaniu účasti CYP2J2 a EETs v mnohých procesoch podporujúcich vznik nádoru sa venovalo mnoho štúdií a rada experimentov dokonca preukázala, že tieto enzýmy sú pozitívne regulátory proliferácie nádorových buniek, angiogenézy a inhibujú apoptózu (Chen *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2014; Fleming, 2007; Jiang *et al.*, 2005; Spector, 2009).

Regioizoméry majú podobné metabolické a funkčné vlastnosti, preto sa EET považujú za samostatnú skupinu zlúčenín. No existujú kvantitatívne a kvalitatívne rozdiely medzi jednotlivými regioizomermi. Napríklad 14,15-EET je najlepší substrát pre sEH a 11,12-EET je jediný regioizomér, ktorý inhibuje bazolaterálne K⁺ kanály v renálnom kortikálnom zbernom kanále (Spector, 2009). Všetky regioizoméry sú produkované každou CYP epoxygenázou avšak jeden

alebo dva izoméry obvykle prevládajú. EET sú dôležitými modulátormi kardiovaskulárnych funkcií a tieto účinky vyvolávajú primárne pôsobením v obličkách. Spôsobujú vazodilatáciu, majú protizápalové účinky a ovplyvňujú apoptózu. sEH metabolizuje EETs tvorené CYP epoxygenázami na dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs), ktoré však majú nižšiu aktivitu než EETs. Určitá časť EETs je inkorporovaná do membránových fosfolipidov alebo vstupuje do ďalších metabolických dráh ako napríklad β -oxidácia, oxidácia cyklooxygenázami, lipoxygenázami a CYP ω -oxidačné enzýmy a konjugácia s glutatiómom (Spector *et al.*, 2004).

2.6.3.1 CYP2C8

Cytochróm CYP2C8 je hlavným enzýmom zodpovedným za metabolizmus protirakovinového liečiva paklitaxel (Taxol). Takisto je dominantným P450 zodpovedným za metabolizmus kyseliny arachidónovej na biologicky aktívne kyseliny epoxyeikosatrienové (EETs) v ľudskej pečeni a obličkách. EETs hrajú dôležitú rolu vo fyziológii ako napríklad, ovplyvňujú glykogenézu hepatocytov, sekréciu peptidických hormónov v pankrease, Na^+ transport a absorpciu vody v obličkách (Dai *et al.*, 2001). CYP2C8 tiež metabolizuje aj iné lieky ako napríklad roziglitazon, ktorý sa používa u dospelých pacientov s diabetes mellitus (Baldwin *et al.*, 1999). Navyše, Yun a kolektív uviedli, že CYP2C8 môže byť jeden z hlavných izoform, ktoré metabolizujú prekarinogén benzo(α)pyrén u ľudí, čo naznačuje, že CYP2C8 môže hrať rolu v karcinogéze ľudí. CYP2C8 bol navrhnutý ako endotelium odvodený hyperpolarizačný faktor (EDHF) syntetizovaný v oblasti koronárnych tepien (Fisslthaler, 1999). EDHF bol navrhnutý ako metabolit kyseliny arachidónovej, ktorá sprostredkúva dilatáciu koronárnych tepien a iných ciev na rôzne podnety (Yun *et al.*, 1992).

2.6.3.2 CYP2C9

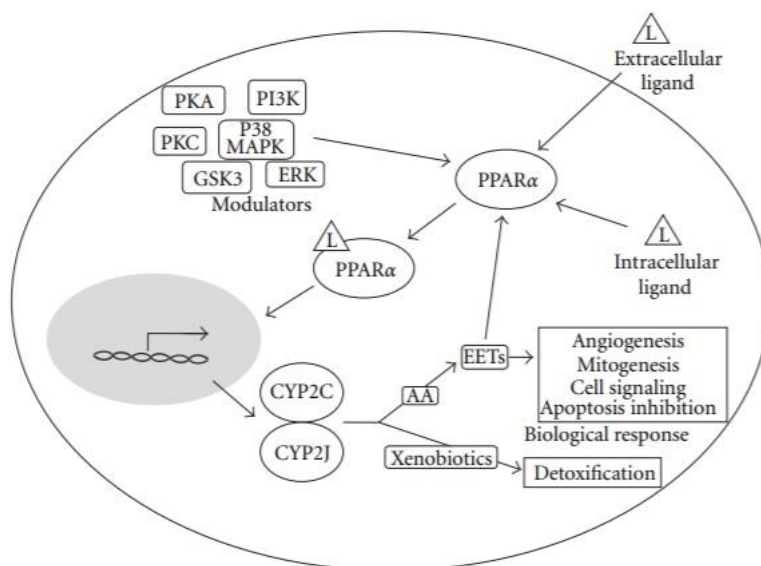
V ľudskej pečeni má hlavné zastúpenie zo skupiny CYP2C izoforma CYP2C9. Táto izoforma je jednou zo štyroch známych členov subrodiny CYP2C, vrátane izoformami CYP2C8, CYP2C18 a CYP2C19, ktoré zdieľajú viac ako 82 % aminokyselinovej identity. CYP2C9 sú zastúpené v rôznych terapeutických kategóriách ako napríklad, asi 16% je ich zastúpených v liekoch, ktoré sa súčasne používajú. Medzi tieto lieky patrí napríklad tolbutamid, ktorý patrí medzi antidiabetiká, antikoagulačný warfarín, veľké množstvo nesteroidných protizápalových liekov, ako napríklad ibuprofen, piroxikam a diuretický torsemid (Blaisdella *et al.*, 2004).

2.6.3.3 CYP2C18, CYP2C19

CYP2C18 mRNA bola nájdená v pečeni aj keď pri priemerných hladinách 7 – 8 krát nižších ako hladiny mRNA kódujúcich CYP2C8 a CYP2C9. Bola charakterizovaná cDNA kódujúca ľudský CYP2C18. Ľudská CYP2C18 bola exprimovaná v kvasinkách, v bunkách COS - 1, v lymfoblastových bunkách a ľudských epiteliálnych bunkách pečene. Zdá sa, že CYP2C18 je z CYP2C obsadený hlavne v pľúcach a hodnotí sa podľa hladín mRNA. mRNA bola nájdená v mozgu, v maternici, mliečnej žľaze, obličkách a dvanástniku. Uvádza sa, že CYP2C18 môže metabolizovať (S)-mefenytóin, tolbutamid, warfarín, kyselinu tienilovú, bisfenol A prostredníctvom exprese v kvasinkách a kyselinu all-trans-retinóvu prostredníctvom exprese lymfoblastov (Zhu – Ge *et al.*, 2002). CYP2C19 sa podieľa na metabolizme niekoľkých psychotropných liekov vrátane selektívnych inhibítorov spätného vychytávania serotonínu, sertralínu a citalopramu alebo tricyklických antidepresív. To naznačuje, že CYP2C19 je schopný metabolizovať substráty, ktoré účinkujú na centrálny nervový systém (Persson *et al.*, 2014).

2.6.3.4 CYP2J2

Len jediný gén a to 2J2 obsahuje ľudská podrodina CYP2J2. Je lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu 1, konkrétne na 1p32.1. Expresia CYP2J2 je zvýšená v zhubných nádoroch pečeni, prs, pľúc, kolorektu a pažeráka (Čížková *et al.*, 2014). Jeho úloha je taktiež v metabolizme xenobiotík. Medzi jeho substráty patria inhibítory tyrozín kináz ako sú dasatinib, imatinib alebo nilotinib (Lee *et al.*, 2010).



Obr.6. Model efektu PPARα na CYP2C a CYP2J2 : aktivácia PPARα vedie ku CYP2C a CYP2J2 expresii. CYP2C2 a CYP2J2 konvertujú kyselinu arachidónovú na EETs, ktoré majú

cytoprotektívnu funkciu a môžu byť aj PPAR α ligandmi. Navyše, CYP2C2 a CYP2J2 metabolizujú xenobiotiká (prevzaté z Čížková *et al.*, 2012).

2.6.4 Charakteristika sEH

Solubilná epoxidhydroláza (sEH) je enzým metabolizujúci v prvej fáze xenobiotického metabolizmu, ktorý metabolizuje epoxidy na vicinálne dioly. Je to bifunkčný enzým s aktivitou N-terminálnej fosfatázy a C-terminálnou epoxid hydrolázou. Ľudská sEH je kódovaná génom EPHX2, ktorý je umiestnený na chromozóme 8. Dôležitou skupinou substrátových epoxidov sú kyseliny epoxieikosatriénové (EET) generované cytochrómami P450 z arachidonovej kyseliny (Harris & Hammock, 2013). EET majú mnoho funkcií v organizme, napríklad, zohrávajú rolu pri regulácii vnútrobunkových signálnych molekúl, majú proteínkinázovú aktivitu, hrajú rolu pri diferenciácii a mitogenéze (Jiang *et al.*, 2005). Medzi dominantné ľudské epoxidázy patria CYP2C8, 2C9 a 2J2, ktoré generujú epoxidy kyseliny arachidónovej (EET, epoxyeikosatriénové kyseliny). Predpokladá sa, že EET sú zapojené do mnohých biologických procesov vrátane vaskulárneho tonusu, regulácie iónových kanálov, mitogenézy a bunkovej signalizácie (Wu *et al.*, 1996; Zeldin *et al.*, 1997; Capdevila *et al.*, 2000).

2.7 PPAR vo vzťahu s CYP 450 epoxygenázami

Existujúce štúdie preukázali, že hladiny proteínov CYP2C8, CYP2J2 a sEH sú ovplyvnené ligandami PPAR α . PPAR α je známy ako senzor metabolizmu lipidov a nie je prekvapujúce, že kyselina arachidonová a metabolity produkované CYP epoxygenázami a sEH sú ligandami jadrového receptora. Na druhej strane, PPAR α môže regulovať expresiu enzýmov zodpovedných za tvorbu týchto metabolitov a to vedie k pozitívnej spätnej väzbe (Čížková 2018, Ng *et al.*, 2007, Wray *et al.*, 2009). V predošlých štúdiách bolo preukázané, že jadrová pozitivita PPAR α sa akumuluje v použitých bunkových líniách po ošetrení fenofibrátom, bezafibrátom a gemfibrozilom (Čížková *et al.*, 2016; Umemoto & Fujiki, 2012). Tento nepriamy dôkaz poukazuje na to, že regulácia fibrátov CYP epoxygenázami a sEH expresia môže byť závislá od PPAR α . Navyše, Makia a Goldstein identifikovali CYP2C8 ako cieľový gén PPAR α v primárnych ľudských hepatocytoch a taktiež identifikovali peroxizomový proliferátový element odpovede (PPRE), cieľ pre PPAR α v promotore génu CYP2C8 (Makia & Goldstein, 2016). Bolo preukázané, že PPAR α majú značné účinky na CYP2C v ľudských a myších bunkách, no však ich cesta pôsobenia môže byť odlišná. Pre PPAR α a PPAR γ je ligandom EDM392949 a pri jeho dlhodobom účinku dochádza k zvýšenej expresii CYP2C9 v myších hepatocytoch. Liečba týmto ligandom má

práve opačný efekt v ľudských hepatocytoch a to, že vedie k silnej indukcii CYP2C8 (Richert *et al.*, 2008).

Expresia CYP epoxygenáz môže byť vyvolaná látkami znečisťujúcim prostredie, ktoré slúžia ako ligandy PPAR α , napríklad ftaláty, tri- a dichlóroctové kyseliny, zlúčeniny trichlóretylénu a kyseliny pefluóralkylovej. Tieto enzýmy a EET metabolity pravdepodobne súvisia s výskytom a progresiou nádorov, pretože EET sú známe, že zvyšujú rast nádorov zvýšenou proliferáciou rakovinotvorných buniek, bránia apoptóze rakovinotvorných buniek a podporujú metastázy. V ľudských bunkách ale EETs pôsobia cytoprotektívne. Stimulujú bunkovú proliferáciu prostredníctvom signálnych dráh PI3K a MAPK ako aj transaktiváciu EGFR. Okrem toho zabraňujú apoptóze zvýšením hladín antiapoptických proteínov Bcl-2 a Bcl-xL zatiaľ čo dochádza k zníženiu proapoptického proteínu Bax. Hladina EETs je regulovaná rovnováhou medzi syntézou EETs prostredníctvom CYP epoxygenáz a EETs hydrolýzou, na ich menej aktívne metabolity sEH. Teda modulácia pomeru CYP2J2/sEH môže preto umožniť zvýšenie alebo zníženie hladiny EETs. V práci Čížková (2018) výsledky poukazujú na rôzne pomery CYP2J2/sEH po aplikácii rôznych koncentrácií fibrátov. Tento jav bol pozorovaný na troch bunkových líniiach. Podľa získaných výsledkov je možné tvrdiť, že nižšie koncentrácie fibrátov (ktoré podporujú proliferáciu) sú spojené s vysokými koncentraciami EETs v bunkách. Kým vyššie koncentrácie fibrátov vedú ku zvýšenej hydrolýze EETs na DHET pomocou sEH a teda k inhibícii proliferácie buniek (Čížková, 2018).

Štúdiá s myšími epoxygenázami a ich metabolitmi ukázali, že majú pro-angiogénne funkcie. CYP2C44 (katalytický homológ ľudských CYP2C8 a 2C9) je cieľový gén pre PPAR α . Reguláciu tejto myšej epoxygenázy znižuje WY-14643 (ligand PPAR α) pričom dochádza k redukcii syntézy EETs, čo vedie následne k zníženiu nádorovej masy, objemu a prekrveniu nádorového štepu. Následne boli získané rovnaké výsledky zo štúdia myších epoxygenáz s ľudským PPAR génom. Rozdiely v regulácii CYP epoxygenáz a sEH pomocou PPAR α agonistov by sa mohli pripísať variáciám v regulačných oblastiach responzívnych génov. Všeobecne, u myší PPAR α ligandy znižujú CYP2C mRNA a hladiny proteínov. Avšak štúdie s potkanmi poskytli odlišné výsledky. Opisujú, že u nich je možná znížená aj zvýšená regulácia expresie CYP2C. Je to možné kontrastnými účinkami rovnakých ligandov spôsobených rozdielmi v kmeňoch potkanov a podávaných dávkach. V prípade sEH štúdie na hlodavcoch preukázali zvýšenú hladinu mRNA po podaní ligandov PPAR α (Pozzi *et al.*, 2010; Pozzi *et al.*, 2007).

Ďalšie štúdiá ukázali, že EETs produkované pomocou CYP2C a 2J2 sú schopné aktivovať PPAR α v ľudskej bunkovej línii HepG2 (pečeňová nádorová bunková línia) (Ng *et al.*, 2007). V publikácii Wray *et al.* je potvrdené nájdenie aktivovaných PPAR α pomocou CYP2J2 produktov v bunkovej línii HEK293 (embryonálna bunková línia ľadvín) (Wray *et al.*, 2009). Z ich výsledkov vychádza, že aktivácie PPAR α sa účastnia 8,9 - EET, 11,12 - EET. Štúdium

Prueksaritanont et al. sa zaoberalo účinkom klofibrátu, fenofibrátu a gemfibrozilu čo sú ligandy PPAR α v ľudských hepatocytoch. Zistili, že tieto tri ligandy zvyšovali hladinu mRNA CYP2C8. Za zvyšovaním aktivity CYP2C8 stála klofibrová a fenofibrová kyselina, avšak liečba gemfibrozilom viedla ku zníženiu aktivity CYP2C8 (Prueksaritanont *et al.*, 2005).

3 Experimentálna časť

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Biologický materiál

V experimentálnej časti mojej diplomovej práce bola použitá bunková línia odvodená od karcinómu ľudského hrubého čreva HT-29 (American Type Culture Collection). Za pomocou STR profilu bola bunková línia autentizovaná na Ústave klinickej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Pre hodnotenie expresie viľínu boli vzorky získané z archívu Ústavu klinickej a molekulárnej patológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Pestovanie bunkovej kultúry prebiehalo v kultivačnom médiu DMEM, ktoré obsahovalo 10 % fetálneho bovinného séra, penicilín, streptomycín, 1 % pyruvát sodný a 1% glutamax. Kultivačné podmienky v inkubátore boli nastavené na 37 °C a 5 % CO₂ v atmosfére.

3.1.2 Použité prístroje

Centrifúga MR 22i, Jouan SA (Francúzsko)

Elisa reader Bio-Tek (USA)

FlowBox MSC-Advantage, Thermo Fisher Scientific (USA)

Hlbokomraziaci box ARCTIKO, Trigon plus (Česká republika)

Chladnička a mraznička, Gorenje (Slovinsko)

Inkubátor Heracell CO₂, Thermo Fisher Scientific (USA)

Inverzný mikroskop ECLIPSE TS 100, Nikon (Japonsko)

Laboratórna váha KERN 440-33, Kern & Sohn (Nemecko)

Laboratórna výveva

Pierce Colorimetric In-Cell ELISA Kit (Thermo Scientific; 62200)

Spektrofotometer PowerWave XS , Biotek (Kanada)

Svetelný mikroskop BX 40, Olympus (Japonsko)

Tkanivový histoprocesor HISTOS PRO-RAPID MICROWAVE, Milestone Medical (Taliansko)

Vodná kúpeľ Julabo TW 8, Julabo Labortechnik (Nemecko)

3.1.3 Pomôcky

Automatické pipety eppendorf Research plus, Eppendorf (Nemecko)

Bürkerova počítacia komôrka, MEOPTA (USA)
Injekčná ihla 100 STERICAN, Braun (Nemecko)
Krycia fólia Parafilm, PARAFILM (USA)
Kryoskúmavky CryoTube Vials, Thermo Fisher Scientific (USA)
Kultivačná fľaša s filtrovým uzáverom, NUNC (Nemecko)
Magnetic Immuno Staining Tray (MIST), CELL PATH (Veľká Británia)
Miska na tkanivové kultúry, TPP (Švajčiarsko)
Odmerné valce
Opakovacia pipeta Multipette Plus Pipette, Eppendorf (Nemecko)
Pipeta pippetus-akku, Hirschmann Laborgeräte (Nemecko)
Plastové mikroskúmavky, Eppendorf (Nemecko)
Serologická pipeta, TPP (Švajčiarsko)
Sklo podložní SuperFrost Plus, Thermo Fisher Scientific (USA)
Sterilné skúmavky 15ccm PS, GAMA (Česká Republika)
Sterilné špičky, Eppendorf (Nemecko)
Testovacia doska pre tkanivové kultúry-96 jamiek, TPP (Švajčiarsko)

3.1.4 Chemikálie

acetón (Sigma Aldrich, Nemecko)
butyrát sodný (Sigma Aldrich, Nemecko)
hemathoxylin (Fluka, Nemecko)
montovací médium (PERTEX, Nemecko)
villin (GeneTex, USA)
CYP2C8 (GeneTex, USA)
CYP2C9 (GeneTex, USA)
CYP2J2 (GeneTex, USA)
sEH (GeneTex, USA)
WST reagent (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche,)
Xylen (Penta, Česká republika)
Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Sigma Aldrich, Dánsko)
trypsin (ThermoFisher Scientific, USA)
butyrát sodný (Sigma Aldrich, Nemecko)

3.1.5 Použité súpravy

Detekčný systém Dako Real™-EnVision™, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Dako (Dánsko)
In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit, ThermoFisher Scientific (USA)

3.1.6 Zloženie roztokov

10 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich), obsahuje 10 % fetálneho boviného séra (Hyclone), 1 % penicilín/streptomycin, 1 % pyruvát sodný, 1 % glutamax

70 %, 80 %, 96 % ethanol

10 % dimethylsulfoxid (DMSO) : 100 µl DMSO, 900 µl sterilní dH₂O – 1x Tris Buffered Saline (TBS) : 2,5 ml 20x TBS ; 47,5 ml dH₂O

4 % formaldehyd: 36-40 % formaldehyd riediť do 1x TBS

1x permeabilizačný pufr : 0,079 ml Thermo Scientific™ Surfact-Amps™ X-100 Detergent ; 8 ml 1x TBS

Quenching roztok : 0,267 ml 30 % H₂O₂ ; 8 ml 1X TBS

diluent pre protilátky : 3 ml blokovacieho pufru ; 3 ml 1X oplachovacieho pufru (1 : 1)

zriedený HRP konjugát : 8,7 µl HRP konjugát ; 3,5 ml 1X oplachovací pufr

Citrátový pufr (pH = 6-6,2), príprava : 9 ml z roztoku 10 mM kyseliny citrónovej (príprava : 10,505 g kyseliny citrónovej/500 ml destilovanej vody) a 41 ml roztoku 10 mM citronanu sodného (príprava: 14,705 g citronanu sodného/500 ml destilovanej vody)

3.2 Použité experimentálne metódy a vyhodnocovacie postupy

3.2.1 Kultivácia bunkovej línie

Bunková línia HT-29 bola kultivovaná za štandardných podmienok tj. 37 °C, 5 % CO₂. Na kultiváciu bolo použité kultivačné médium DMEM obsahujúce 10 % fetálneho boviného séra (FB), penicilín (100 U/ml) streptomycín (100 mg/l), 1 % pyruvát sodný a 1 % glutamax. Bunky boli spasáňované dvakrát týždenne. Bunky boli kultivované 5mM butyrátom sodným pre dosadenie diferenciácie po dobu 72 hod. (Čížková *et al.*, 2020).

3.2.2 Oplyvnenie buniek inhibítorom

Inhibítor GW6471 bol aplikovaný na adherované bunky bunkovej línie HT-29 v dvoch koncentráciách (1 μ l a 10 μ l). Bol sledovaný účinok inhibítora na bunky diferencované aj nediferencované. Na jednu jamku bolo vysiatých 10 000 buniek v 96 jamkovej mikrotitračnej doske do 80 μ l média v doubletoch pre In Cell ELISu. Bol použitý zásobný roztok butyrátu sodného o koncentrácii 0,5 M v 10 % DMSO a zásobný roztok GW6471 v dvoch koncentráciách. Nediferencované bunky boli ovplyvnené inhibítorom GW6471 a boli adherované 72 hod pri 37 °C a 5 % CO₂. Diferencované bunky boli ovplyvňované butyrátom sodným, po 72 hodinách následne inhibítorom a použité na WST-1 test alebo uskladnené v mrazničke a použité na In-Cell ELISu.

3.2.3 WST-1 test

Tento test, inak nazývaný test proliferácie aktivity buniek, hodnotí životnosť buniek na základe funkčnosti ich mitochondriálnych dehydrogenáz. Pre stanovenie hodnôt IC₁₀ a IC₅₀ boli bunky ovplyvnené koncentraciami GW6471 v rozmedzí 0 – 30 μ M. Do každej jamky bol aplikovaný WST reagent po 10 μ l obsahujúci tetrazoliové soli, ktoré boli štiepené na formazán mitochondriálnymi dehydrogenázami a kvantifikácia merania sa uskutočnila spektrofotometricky. Potom, ako sa dosičky nechali inkubovať 30 – 60 minút v inkubátore (37 °C, 5 % CO₂) sa merala absorbancia pri vlnovej dĺžke 450 nm. Uskutočnili sa tri nezávislé merania jednotlivých ovplyvnení a každé sa uskutočnilo v tripletoch. Vypočítal sa aritmetický priemer z hodnôt absorbancie, od hodnôt kontroly a ovplyvnenia sa odčítala absorbancia slepej vzorky a následne sa spočítal pomer ovplyvnenia/kontroly. Kontrolné vzorky sa rovnajú 100 %. Hodnoty, ktoré presahujú 100 % značia zvýšenú alebo nezmenenú proliferáciu buniek. Hodnoty nepresahujúce 100 %, značia zástavu proliferácie alebo smrť buniek. Na záver výsledky inhibičnej koncentrácie boli hodnotené jednovýberovým t – testom, vzťahnutým na strednú hodnotu, ktorá predstavovala 100 % (kontrola). Výpočty pre t – test bli vypracované pomocou MS Excel 2010. Porovnanie expresie vilínu v zdravom a nádorovom tkanive vo vzorkách získaných od pacientov bolo vypracované pomocou Wilcoxonovho testu. Všetky testy s hladinou signifikancie P < 0,05.

3.2.4 In Cell ELISA

Pre sledovanie zmien expresie boli vybrané koncentrácie 1 μ M a 10 μ M GW6471. Princíp tejto metódy je kvantifikácia proteínov priamo v bunkách. Do 96-jamkovej mikrotitračnej dosky boli vysiate bunky z línie HT-29 v doubletoch a hodnotenie bolo prevedené v rôznych stupňoch

diferenciácie. Dosky boli rozdelené na dosky s bunkami diferencovanými a nediferencovanými. Po vysadení buniek do dosky, sa následny deň bunky ovplyvňovali inhibítorom GW6471 alebo butyrátom sódnym. U diferencovaných buniek bol použitý butyrát sódný, u nediferencovaných inhibítor. Následne prebehla 72 h inkubácia (37 °C, 5 % CO₂). Po inkubácii sa u diferencovaných buniek odstránil butyrát sódný a pridal sa inhibítor príslušnej koncentrácie a bunky sa znova inkubovali 72 h. Pri nediferencovaných bunkách bol použitý 4 % formaldehyd, ktorý slúžil na zafixovanie buniek. Fixácia trvala 15 min pri RT. Následne sa formaldehyd odstránil a bunky boli dvakrát opláchnuté 1xTBS (100 µl/jamka) a po jeho odstránení bol pridaný permeabilizačný pufr obsahujúci Triton X (100 µl/jamka), následne prebehla inkubácia trvajúca 15 min pri RT. Nasledoval oplach 1x TBS a po jeho odstránení bol pridaný Quenching solution (100 µl / jamka) obsahujúci 1 % H₂O₂ a ten sa nechal inkubovať 20 min pri RT. Po použití Quenching solution boli bunky opláchnuté 1xTBS a nasledovalo pridanie Blocking buffer (50 µl/jamka) a inkubácia 60 min pri RT. Nariedenie primárnych protilátok villínu, solubilnej epoxyhydrolázy, CYP2C8, CYP2C9 a CYP2J2 sa prevádzalo pomocou diluentu pre protilátky (roztok Blocking buffer a Washing buffer v pomere 1 : 1). Po odstránení Blocking bufferu sa primárne protilátky pridávali v objeme 38 µl/jamka a k negatívnym kontrolám bol pridaná len diluent bez protilátky v objeme 40 µl/jamka. Následne bola doštička zalepená parafilmom a bola inkubovaná cez noc pri 4 °C. Po inkubácii bola primárna protilátka odstránená a trikrát bol prevedený oplach pufrom (100 µl/jamka). Nasledovalo pridanie sekundárnej protilátky, ktorá bola značená chrenovou peroxidázou (100 µl/jamka) a inkubácia prebiehala 30 min pri RT. Po odstránení sekundárnej protilátky došlo ku 3x oplachu oplachovacím pufrom (200 µl/jamka) a do jamiek bol pridaný TMB substrát (50 µl /jamka) a inkubácia prebiehala v tme 15 min pri RT. Nasledovalo pridanie TMB stop solution (50 µl /jamka) a bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 450 nm. Doštička po meraní bola dvakrát opláchnutá deionizovanou vodou (200 µl/jamka). Do jamiek bol pridaný Janus Green Whole- Cell Stain (50 µl/jamka) a nechal sa inkubovať 5 min pri RT. Následne boli jamky premyté deionizovanou vodou dokým sa neodstránil zbytok farbiva. Do jamiek bol pridaný Elution buffer (50 µl/jamka), ktorý bol inkubovaný 10 min pri RT a následne bola zmeraná absorbancia pri 615 nm. Výpočet reaktívnej expresie vilínu, CYP epoxygenáz a solubilnej epoxyhydrolázy bol nasledovný. Z nameraných absorbancií pri vlnovej dĺžke 450 nm boli vypočítané aritmetické priemery doubletov pre negatívne kontroly a tieto hodnoty boli odčítané od príslušných absorbancií pri 450 nm jednotlivých jamiek ovplyvnených butyrátom sódnym a inhibítorom GW6471. Bola prevedená normalizácia absorbancie nameranej pri 450 nm na absorbanciu 615 nm pre každú jamku pomerom týchto dvoch hodnôt. Boli vypočítané aritmetické priemery z normalizovaných hodnôt pre jednotlivé doublety a určila sa zmena v expresii ako pomer medzi hodnotami absorbancie ovplyvnených buniek a absorbancie kontroly.

Tab.1. Použité primárne protilátky, ich druh a klonalita, použité riedenie

PROTILÁTKA (OZNAČENIE A VÝROBCA)	DRUH/KLONALITA	RIEDENIE
vilín (GTX110034, GeneTex)	zajac/poly	1 : 1500
CYP2C98 (GTX113666, GeneTex)	zajac/poly	1 : 1000
CYP2C9 (AP14731PU-N, Acris Antibodies)	zajac/poly	1 : 1500
CYP2J2 (NBP2-01178, NovusBiologicals)	myš/mono	1 : 1000
sEH (GTX84570, GeneTex)	myš/mono	1 : 50

3.2.5 Imunohistochemické farbenie

Táto metóda je založená na špecifickej väzbe antigénu a protilátky. Používa sa na identifikáciu antigénu villínu v tkanive adenokarcinómu hrubého čreva. Princíp spočíva v naviazaní sekundárnej protilátky na protilátku primárnu, na ktorej je už naviazaný enzým chrenová peroxidáza. Nasleduje pridanie substrátu s chromogénom a dochádza ku vzniku hnedej zrazeniny na miestach, kde sa naviazala primárna protilátka. Ofarbenie jadier hematoxylínom na modro sa používa pre lepšiu orientáciu. Pomocou dvoch kúpeľov xylénu sa tkanivá zbavili parafínu a následne rehydratovali zostupnou radou alkoholov (96 %, 80 %, 70 %) a vodou (každý krok trvá 5 min.). Následne bolo potrebné rozrušiť zosieťovanie methylenovými mostíkmi, ktoré vznikajú fixáciou tkaniva 10 % formolom. Natravovanie v citrátovom pufre (pH = 6) pri zahrievaní na teplotu 120 °C po dobu 15 min pri zvýšenom tlaku pomocou tkanivového histoprocessoru Histos sa použilo pre úspešné rozpoznanie antigénu protilátkou. Následne sa vzorky nechali schlaďiť a opláchni sa destilovanou vodou. Nasledovala inkubácia vzoriek po dobu 30 min v roztoku H₂O₂, aby sa zabránilo falošnej pozitívite výsledkov. Ďalším krokom bol oplach destilovanou vodou, dvakrát TRIS pufrom po dobu 5 min a 5 min v TRIS+Tween pufre. Po opláchnutí nasledovalo naniesenie Protein Block Serum Free (DAKO) na vzorku a nechal sa inkubovať vo vlhčej komore po dobu 30 min. Tento krok slúžil predídeniu nešpecifickému sfarbeniu pozadia. Skla sa oklepali do buničiny a bez oplachu sa aplikovala primárna protilátka sEH riedená 1 : 200 v Antibody diluent (DAKO) a inkubácia trvala 60 min. Po inkubácii nasledovali oplachy, dvakrát pufrom TRIS a jedenkrát TRIS+Tween pufrom každým po 5 min. Nasledovala inkubácia vzoriek s enzýmovo značeným polymérom (DualLink EnVision-HRP, DAKO) po dobu 60 min. Po inkubácii nasledovali oplachy, dvakrát 5 min Tris pufrom a raz 5 min Tris+Tween pufrom. Roztok substrátového pufru a chromogénu diaminobenzidín (DAB) sa aplikoval pre vizualizáciu vzorky po dobu 5 min. Nasledovalo premytie vzoriek pod tečúcou vodou a dofarbenie pomocou roztoku hematoxylínu.

Potom sa vzorky opäť premyli pod tečúcou vodou a nasledovalo odvodnenie a rozjasnenie pomocou alkoholovej rady, acetónu a dvoch kúpeľoch xylénu. Posledným krokom bolo montovanie, vďaka ktorému sa vzorka napevno a natrvalo uzavrela krycím sklom. Pre analýzu obrazu bol využitý program ImageJ s plugingom IHC Profiler. Pre analýzu boli z každej vzorky zhotovené fotografie 3 zorných polí pri zväčšení 200x. Namerané hodnoty jednotlivých zorných polí pre každú vzorku boli spriemerované a na základe toho im bola priradená jedna z nasledujúcich kategórii (viz Tab.2.)

Tab.2. Sprievodná tabuľka pre určenie intenzity imunohistochemického farbenia

nameraná hodnota	intenzita farbenia	číslo
181-235	negatívna	0
121-180	slabá	1
61-120	stredná	2
0-60	silná	3

Tab.3. Zoznam pacientov, od ktorých boli získané vzorky adenokarcinómu hrubého čreva

číslo biopsie	pohlavie	vek	diagnóza	lokalizácia	štádium T	štádium N	štádium M	grade
1	M	71	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G2
2	Ž	66	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G2
3	Ž	76	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T3	N0	M0	G2
4	M	66	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
5	M	51	adenokarcinom	sigmoideum	T2	N0	M0	G2
6	Ž	63	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T3	N1	M1	G2
7	M	72	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T2	N0	M0	G2
8	M	70	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T3	N0	M0	G2
9	M	80	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G2

10	Ž	74	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T2	N0	M0	G2
11	M	76	adenokarcinom	sigmoideum	T4a	N0	M0	G2
12	Ž	50	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G1
13	M	72	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1a	M0	G2
14	M	60	adenokarcinom	sigmoideum	T4	N2a	M1b	G1
15	Ž	50	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N2b	M1b	G3
16	M	77	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
17	M	69	adenokarcinom	ascendens	T3	N2b	M0	G2
18	M	52	adenokarcinom	sigmoideum	T2	N0		G2
19	M	64	adenokarcinom	sigmoideum	T2	Nx	Mx	G1
20	M	76	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1a	M1a	G1
21	M	34	adenokarcinom	pravé colon	T2	Nx	M0	G1
22	Ž	79	adenokarcinom	ascendens	T2	Nx	M0	G1
23	M	83	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T2	Nx	M0	G1
24	M	59	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N2a	M0	G2
25	M	63	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1	M0	G2
26	Ž	43	adenokarcinom	sestupný tračník, rectum	T3	N1b	M0	G2
27	Ž	71	adenokarcinom	sigmoideum	T2	N1b	Mx	G1
29	M	77	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1	Mx	G2
30	M	70	adenokarcinom	sigmoideum	T4a	N0	M1a	G2
31	Ž	75	adenokarcinom	sigmoideum	T3	Nx	Mx	G1
32	M	57	adenokarcinom	sigmoideum	T2	Nx	Mx	G2
33	M	81	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1b	Mx	G2
34	M	60	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G1
35	M	71	adenokarcinom	sigmoideum	T2	N0	M0	G2

36	M	54	adenokarcinom	sigmoideum	T2	N0	M0	G3
37	Ž	68	adenokarcinom	přechod IC	T2	N0	M0	G2
38	M	60	adenokarcinom středně dif	sigmoideum	T4a	N2a	M0	G2
39	Ž	39	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1a	M0	G3
40	M	47	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G2
41	M	63	adenokarcinom nízc dif	sestupný tračník, rektum	T3	N2b	M0	G3
42	M	86	adenokarcinom	sestupný tračník, rektum	T3	N1b	M0	G2
43	Ž	70	adenokarcinom	sestupný tračník, rektum	T3	N2a	M0	G3
44	Ž	73	adenokarcinom	sestupný tračník, rektum	T2	N0	M0	G2
45	Ž	84	adenokarcinom	sestupný tračník, rektum	T3	N0	M0	G1
46	M	76	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
47	M	55	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N2b	M0	G2
48	M	69	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3

3.2.6 Štatistické hodnotenie

Zmeny v relatívnej expresii markeru diferenciácie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C2, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy bunkovej línie HT-29 po ovplyvnení inhibítorom GW6471 v rôznych stupňoch diferenciácie voči kontrole boli hodnotené pomocou jednovýberového t-testu. V prvom rade boli vyhodnotené relatívne hodnoty z troch opakovaní, ktoré boli spriemerované a vnesené do stĺpcového grafu spolu so stanovenou smerodatnou odchylkou. Následne výsledky expresie markeru diferenciácie a enzýmov CYP2C8, CYP2C2, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy boli hodnotené jednovýberovým t-testom, vzťahnutým na strednú hodnotu, ktorá predstavovala 100 % (kontrola). Výpočty pre t-test boli vypracované pomocou MS Excel 2010. Porovnanie expresie vilínu v zdravom a nádorovom tkanive vo vzorkách získaných od pacientov bolo vypracované pomocou Wilcoxovho testu. Všetky testy s hladinou signifikancie $P < 0,05$.

3.3 Výsledky

3.3.1 WST-1 test

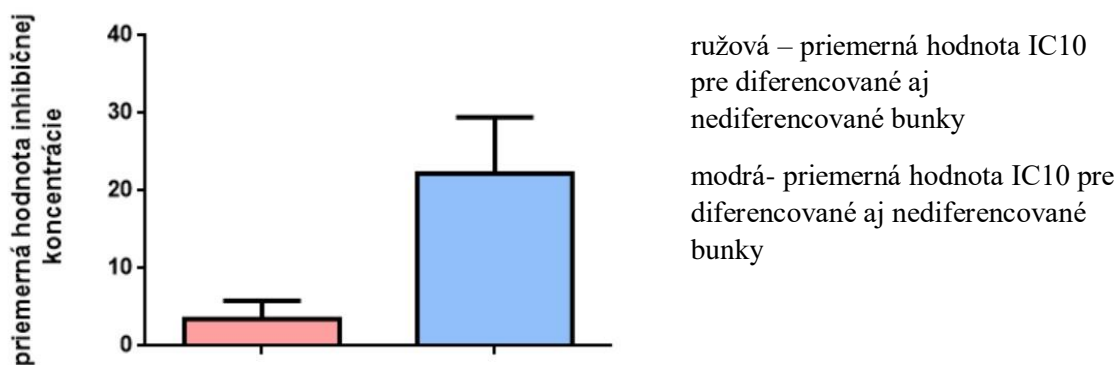
Prvou úlohou bolo stanoviť viabilitu buniek a určiť 10 % inhibičnú koncentráciu (IC10) a 50 % inhibičnú koncentráciu (IC50) pomocou WST-1 testu. Tento test hodnotí životnosť buniek na základe funkčnosti ich mitochondriálnych dehydrogenáz. Boli uskutočnené tri nezávislé merania jednotlivých ovplyvnení a každé sa uskutočnilo v tripletoch, následne bol vypočítaný aritmetický priemer z hodnôt absorbancie, od hodnôt kontroly a ovplyvnenia sa odčítala absorbancia slepej vzorky a následne bol spočítaný pomer ovplyvnenia/kontroly.

Tab.4. priemerné hodnoty inhibičných koncentrácií u diferencovaných a nediferencovaných buniek

	diferencované bunky	nediferencované bunky
IC10 [μM]	5,127 \pm 2,464	1,75 \pm 0,4513
IC50 [μM]	27,353 \pm 4,299	17,1 \pm 1,844

Z Tab.3. je zrejmé, že obidve inhibičné koncentrácie u diferencovaných buniek sú vyššie ako u nediferencovaných. Diferencované bunky potrebujú vyššiu inhibičnú koncentráciu k usmrteniu 10 % a 50 % buniek z bunečnej populácie. Tento rozdiel v koncentráciach je pre IC10 aj pre IC50 štatisticky nesignifikantný ($P = 0,3856$; $P = 0,1509$).

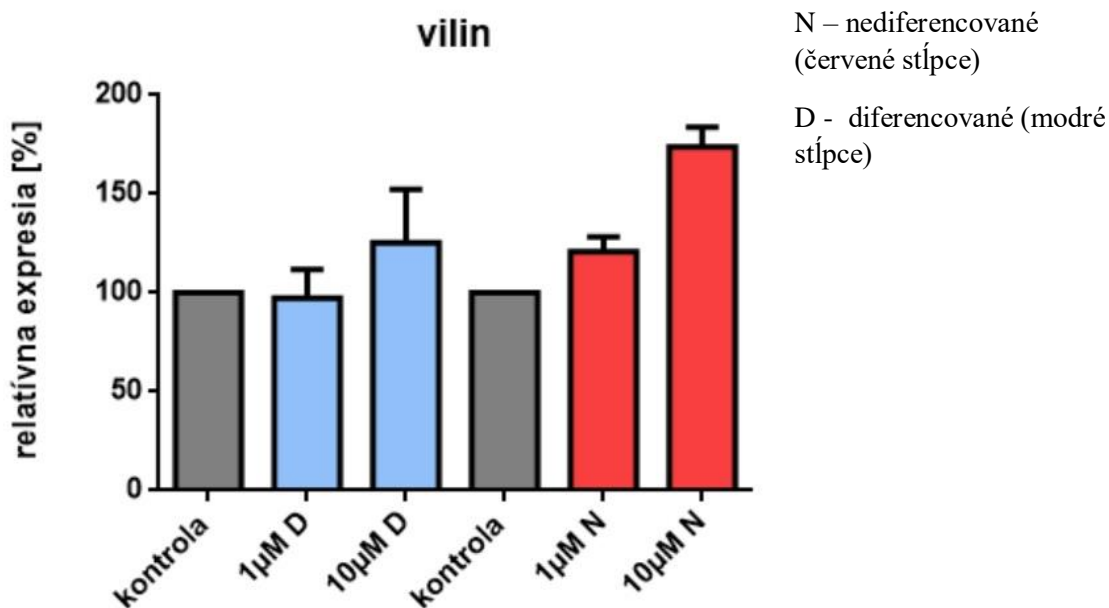
Graf.1. priemerné namerané hodnoty inhibičných koncentrácií u diferencovaných a nediferencovaných buniek



3.3.2 In-Cell-Elisa

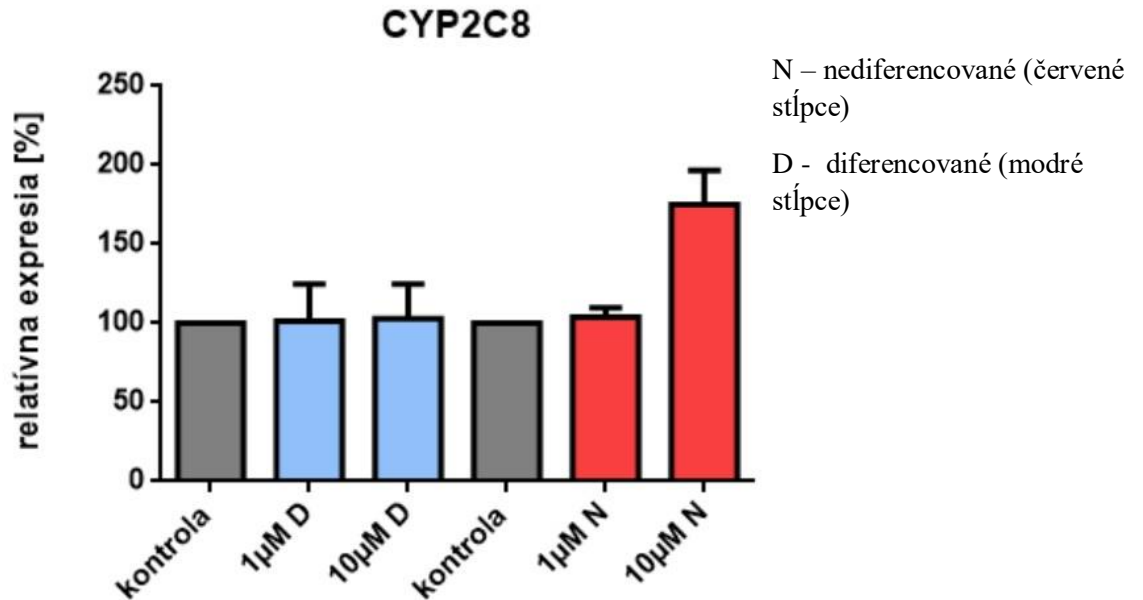
Pomocou metódy In-Cell-Elisa sa sledovala relatívna expresia markeru diferenciácie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C2, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy buniek HT-29 po ovplyvnení inhibítorom GW6471 v rôznych stupňoch diferenciácie.

Graf.2. relatívna expresia vilínu u nediferencovaných a diferencovaných buniek bunkovej línie HT-29 pri použití inhibítora GW6471 v dvoch koncentráciách (1 μ M, 10 μ M)



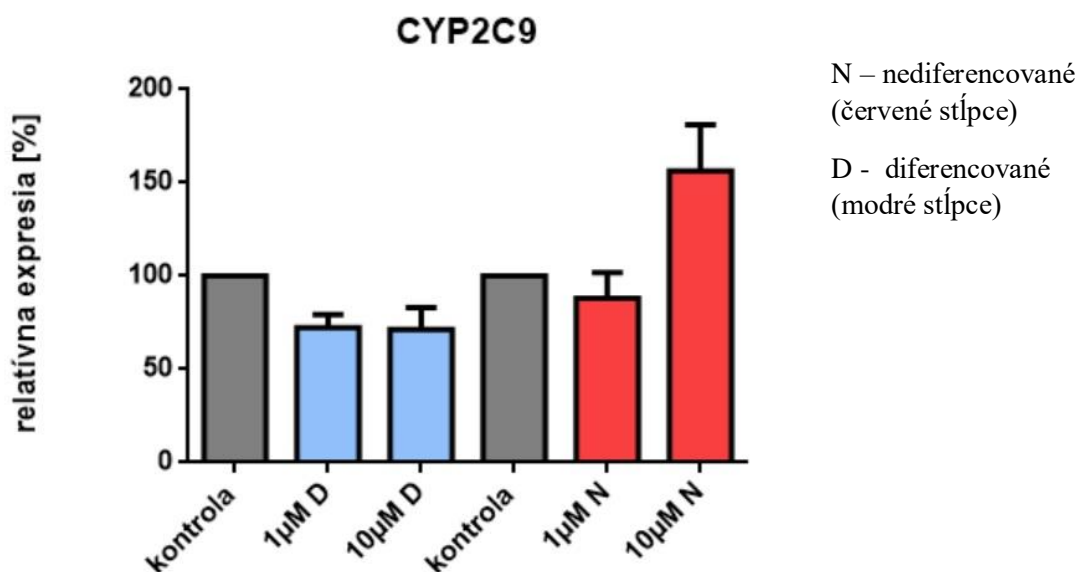
V grafe má kontrola hodnotu 100 %. Hodnoty, ktoré presahujú 100 % majú vyššiu relatívnu expresiu voči kontrole. Vyššia relatívna expresia vilínu je u nediferencovaných buniek v oboch koncentráciách a u diferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M. Naopak, hodnota relatívnej expresie vilínu diferencovaných buniek pri koncentrácii 1 μ M sa nelíši od kontroly to potvrdzuje aj nesignifikantný nárast expresie vilínu ($P = 0,7886$). 10 μ M je nesignifikantný voči kontrole ($P = 0,2501$). V druhom prípade, pri nediferencovaných bunkách, pri oboch použitých koncentráciách inhibítora je expresia vilínu signifikantná voči kontrole ($P = 0,0408$; $P = 0,0062$).

Graf.3. relatívna expresia CYP2C8 u nediferencovaných a diferencovaných buniek bunkovej línie HT-29 pri použití inhibítora GW6471 v dvoch koncentráciách (1 μ M, 10 μ M)



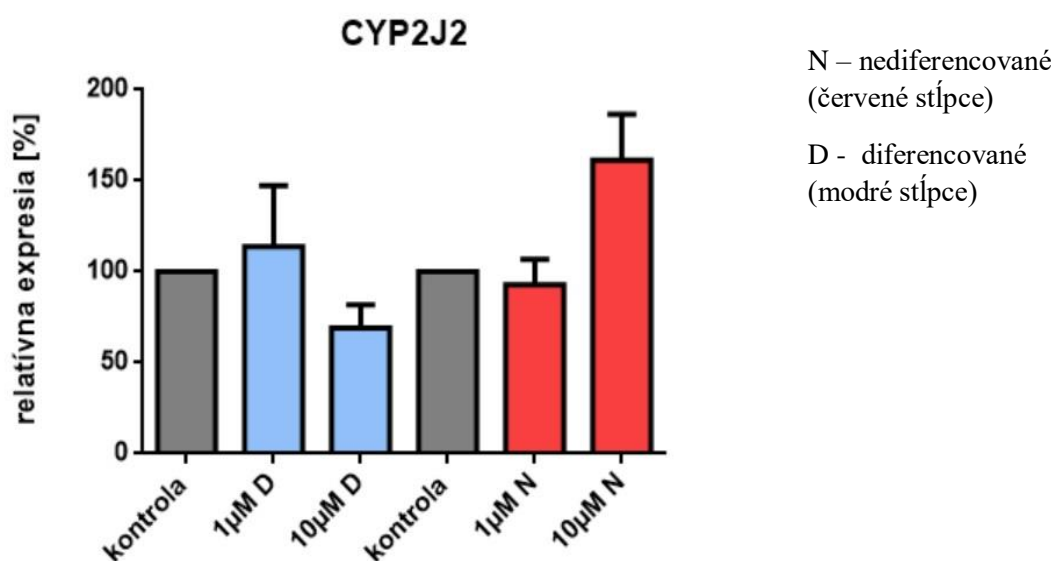
Kontrola má v grafe hodnotu 100 %. Z grafu vyplýva, že hodnoty, to sú relatívne expresie CYP2C8 u diferencovaných pri koncentrácii 1 μ M a 10 μ M a u nediferencovaných buniek pri koncentráciách použitého inhibítora 1 μ M sa nelíšia v porovnaní s kontrolou. Relatívna expresia u nediferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M použitého inhibítora je vyššia voči kontrole. V prípade použitého inhibítora pri koncentrácii 1 μ M pri diferencovaných bunkách ide o nesignifikantný rozdiel oproti kontrole ($P = 0,9333$). Pri koncentrácii 10 μ M ide o nesignifikantný rozdiel oproti kontrole ($P = 0,8437$). Výsledok relatívnej expresie CYP2C8 v prípade nediferencovaných buniek pri koncentrácii inhibítora 1 μ M je nesignifikantný voči kontrole ($P = 0,3857$) a pri 10 μ M je signifikantný voči kontrole ($P = 0,0264$).

Graf.4. relatívna expresia CYP2C9 u nediferencovaných a diferencovaných buniek bunkovej línie HT-29 pri použití inhibítora GW6471 v dvoch koncentráciách (1 μ M, 10 μ M)



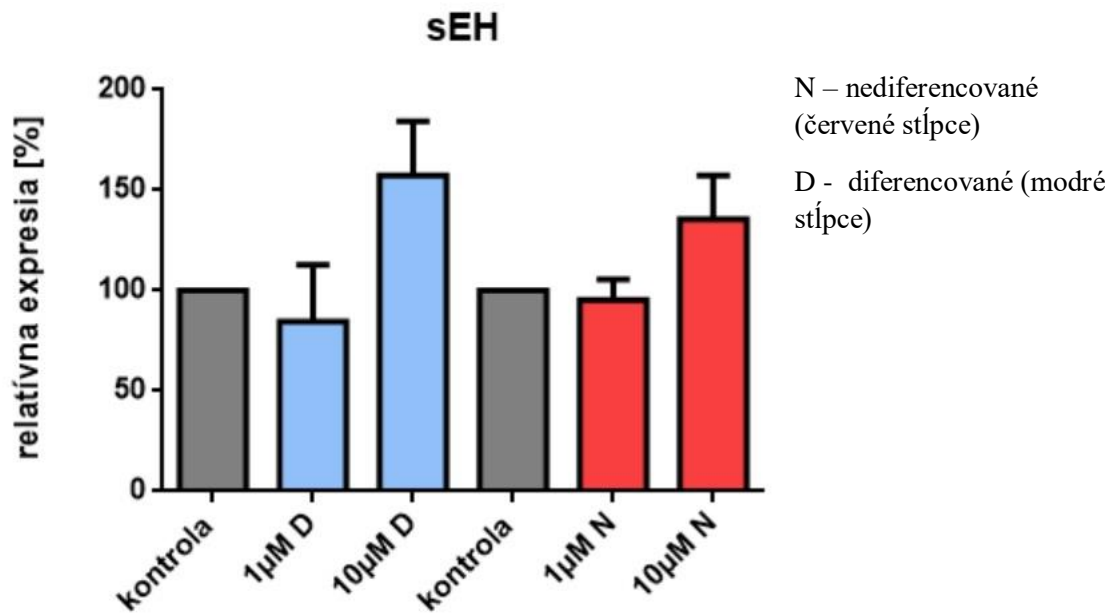
V tomto prípade, je vyššia relatívna expresia CYP2C9 voči kontrole len u nediferencovaných buniek pri koncentrácii použitého inhibítora 10 μ M. U nediferencovaných buniek pri koncentrácii použitého inhibítora 1 μ M a u diferencovaných buniek pri oboch koncentráciách použitého inhibítora je relatívna expresia CYP2C9 nižšia voči kontrole. Pri expresii CYP2C9 sa jedná o signifikantný rozdiel voči kontrole a to u diferencovaných buniek pri koncentrácii inhibítora 1 μ M ($P = 0,0215$) a pri koncentrácii 10 μ M ide o nesignifikantný rozdiel ($P = 0,0516$). U nediferencovaných buniek ide v oboch prípadoch koncentracii použitého inhibítora o nesignifikantný rozdiel voči kontrole ($P = 0,2764$; $P = 0,0593$).

Graf.5. relatívna expresia CYP2J2 u nediferencovaných a diferencovaných buniek bunkovej línie HT - 29 pri použití inhibítora GW6471 v dvoch koncentráciách (1 μ M, 10 μ M)



V grafe.4. má CYP2J2 vyššiu relatívnu expresiu voči kontrole v prípade nediferencovaných buniek pri použitej koncentrácii inhibítora 10 μ M a u diferencovaných buniek pri použitej koncentrácii inhibítora 1 μ M. V prípade nediferencovaných buniek pri koncentrácii použitého inhibítora 1 μ M má CYP2J2 nižšiu relatívnu expresiu voči kontrole a to isté platí aj u diferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M. V prípade diferencovaných aj nediferencovaných buniek pri oboch koncentráciách použitého inhibítora sa jedná o nesignifikantný rozdiel voči kontrole (viz Tab.4.).

Graf.6. relatívna expresia sEH u nediferencovaných a diferencovaných buniek bunkovej línie HT - 29 pri použití inhibítora GW6471 v dvoch koncentráciách (1 μ M, 10 μ M)



Z grafu je možné vidieť, že relatívna expresia sEH je vyššia voči kontrole v prípadoch nediferencovaných buniek pri koncentrácii použitého inhibítora 10 μ M a u diferencovaných buniek pri rovnakej koncentrácii. Naopak, relatívna expresia sEH je nepatrne nižšia voči kontrole u nediferencovaných buniek pri koncentrácii použitého inhibítora 1 μ M a u diferencovaných bunkách pri rovnakej koncentrácii. V prípade oboch prípadov koncentrácie inhibítora u diferencovaných a nediferencovaných bunkách sa jedná o nesignifikantný rozdiel expresie sEH voči kontrole (viz. Tab.4.).

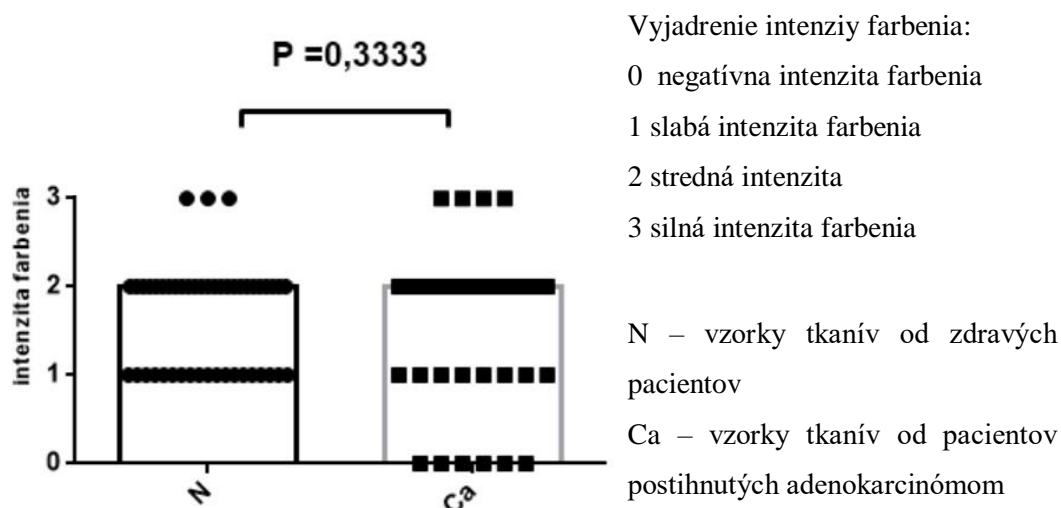
Tab.5. P hodnoty získané z jednovýberového t-testu, ktorým se hodnotila zmena expresie markeru diferenciácie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C2, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy s hladinou signifikancie $P < 0,05$

	1 μM nediferencované	10 μM nediferencované	1 μM diferencované	10 μM diferencované
vilín	0,0408	0,0062	0,7886	0,2501
CYP2C8	0,3857	0,0264	0,9333	0,8437
CYP2C9	0,2764	0,0593	0,0215	0,0516
CYP2J2	0,4738	0,0518	0,5475	0,0533
sEH	0,5161	0,1049	0,4442	0,0659

3.3.3 Imunohistochemické farbenie

Imunohistochemické farbenie je metóda, založená na špecifickej väzbe antigénu a protilátky. Táto metóda bola použitá pre overenie expresie vilínu vo vzorkách tkanív adenokarcinómu hrubého čreva.

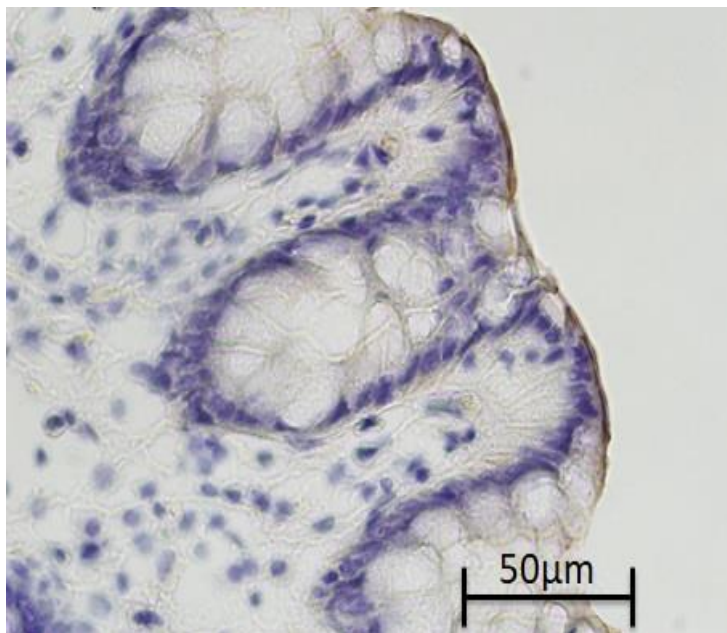
Graf.7. Expressia vilínu pomocou imunohistochemického farbenia.



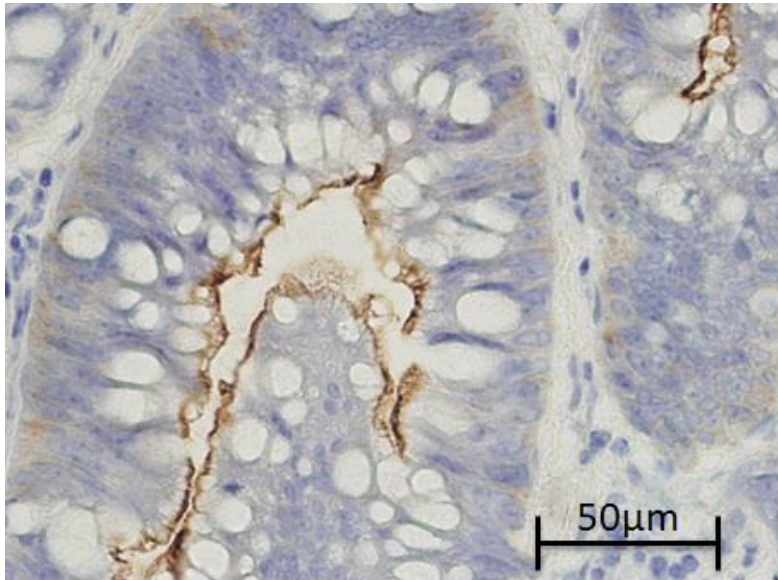
Z výsledného grafu je možné vidieť, že expressia vilínu pri vzorkách pacientov vykazuje pokles v tkanivách postihnutých adenokarcinómom v porovnaní so vzorkami tkanív od zdravých pacientov. Tento pokles je však nesignifikantný.

Tab.6. miera vilínu v nádorovom tkanive spočítana v danom počte vzoriek pacientov

miera vilínu v nádorovom tkanive	počet pacientov
nárast vilínu v nádorovom tkanive	12
rovnaké množstvo vilínu v nádorovom tkanive	81
pokles vilínu v nádorovom tkanive	25



Obr.7. Reprezentačná mikrofotografia expresie vilínu v zdravom tkanive (G2) (Z : 100x). Pacient č.9: muž, 80 rokov



*Obr.8. Reprezentačná mikrofotografia expresie vilínu v kolorektálnom karcinóme (G2) (Z : 100x).
Pacient č.9: muž, 80 rokov*

4 Diskusia

Ciele diplomovej práce boli stanovenie proliferlačnej aktivity buniek po ovplyvnení bunkovej línie HT-29 inhibítorom. Ďalším cieľom bolo sledovať zmeny expresie markeru diferenciacie, v mojom prípade vilínu a enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy. Posledná úloha bola zmerať mieru expresie vilínu vo vzorkách pacientov s kolorektálnym karcinómom. Prvou úlohou bolo stanovenie inhibičnej koncentrácie u buniek diferencovaných a nediferencovaných. Z Tab.3. je zrejmé, že obidve inhibičné koncentrácie (IC10, IC50) sú vyššie u diferencovaných buniek. Z toho vyplýva, že diferencované bunky potrebujú vyššiu inhibičnú koncentráciu k usmrteniu 10 % a 50 % buniek z buncenej populácie. IC50 pre diferencované bunky je väčšia ako pre nediferencované, čiže sú odolnejšie voči koncentráciám inhibítora.

Pomocou metódy In-Cell-Elisa boli stanovené expresie markeru diferenciacie (vilín) a enzýmov CYP2C8, CYP2C2, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy buniek HT-29, ktoré boli ovplyvnené použitým inhibítorom GW6471 v rôznych stupňoch diferenciacie. Jediným markerom diferenciacie, ktorý bol stanovovaný je vilín. Zo získaných výsledkov vyplýva, že dochádza k vyššej relatívnej expresii vilínu voči kontrole u nediferencovaných buniek v oboch koncentráciách použitého inhibítora GW6471 a u diferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M. V prípade diferencovaných buniek pri použitej koncentrácii 1 μ M sa nemení expresia vilínu voči kontrole. Vilín je aktívny regulačný proteín, ktorý je lokalizovaný vo všetkých črevných epitelových bunkách a v gastrointestinálnych exokrinných žľazách. Vilín je proteín zodpovedný za formáciu aktinových vlákien v mikroklkoch kartáčového lemu. Expresia vilínu sa pri diferenciacii črevných buniek zvyšuje. Znížená expresia vilínu môže pravdepodobne viesť k narušeniu štruktúry kartáčového lemu (Al-Maghrabi *et al.*, 2013). Zmena expresie diferenciačného markeru odpovedá proliferlačnej aktivite buniek a to tak, že pri vyššej proliferlačnej aktivite sú bunky menej diferencované a tým pádom je aj hladina vilínu nižšia ako u buniek, u ktorých dochádza ku nižšej proliferlačnej aktivite. Tomuto tvrdeniu odpovedá výsledok diferencovaných buniek, u ktorých dochádza ku vyššej relatívnej expresii vilínu oproti kontrole pri koncentrácii 10 μ M použitého inhibítora, čiže vyššej diferenciacii a nižšej proliferlačnej aktivite.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že expresia vilínu v patientských vzorkách vykazuje mierny nesignifikantný pokles v tkanivách postihnutých adenokarcinómom v porovnaní so vzorkami tkanív od zdravých pacientov. Iné štúdie však dokazujú opak a to, že vo vzorkách pacientov trpiacich kolaterálnym karcinómom je mierna expresia vilínu, zatiaľčo v normálnej sliznici väčšina patientských vzoriek vykazovali vysokú expresiu vilínu (Al-Maghrabi *et al.*, 2013). Tieto štúdie sú v súlade so zisteniami Werling a kolektív a Arango a kolektív (Werling *et al.*, 2003; Arango *et al.*, 2012). Pokles hladiny vilínu bol opísaný v patologických stavoch ako je Crohnova choroba a ulcerózna kolitída, čo je potvrdené zistením, že myši u ktorých bol

knockoutovaný vilín, majú vyššiu náchylnosť na poškodenie črevných buniek (Al-Maghrabi *et al.*, 2013).

Rola PPAR α v diferenciácii bola študovaná na iných typoch buniek než črevných. Aktivácia PPAR α podporuje nie len oxidáciu mastných kyselín ale aj diferenciáciu adipocytov. Diferenciácia adipocytov je spojená s obezitou a choroby indukovanými obezitou, ako napríklad rezistencia na inzulín. Navyše, farmakologická aktivácia PPAR α má za následok energetický metabolizmus v adipocytoch a aktivácia tohto receptora v tkanive adipocytov prispieva ku klinickým účinkom fibrátových liekov (Goto *et al.*, 2011). Aktivácia receptora PPAR α môže vyvolať aj diferenciáciu keratinocytov (Hanley *et al.*, 1998). PPAR α je prítomný v izolovaných ľudských monocytoch a jeho aktivácia a jeho expresia sa zvyšuje pri diferenciácii monocytov na makrofágy (Bernadette *et al.*, 2000). Vergori a kolektív preukázali, že mikročastice, v jeho prípade malé membránové nosiče produkované aktivovanými a apoptickými bunkami, nosiace PPAR α , zvyšujú diferenciáciu endoteliálnych progenitorových buniek a monocytárných progenitorov u myši, ktoré boli na strave s vysokým obsahom tukov (Vergori *et al.*, 2017). Ďalším typom buniek sa zaoberali Ding a kolektív. Tí študovali vplyv PPAR α na diferenciáciu kardiomyocytov a ich výsledky poukazujú na to, že PPAR α je zapojený do regulácie oxidu dusného a to ovplyvňuje diferenciáciu buniek srdca. Aktivácia PPAR α má prospešné účinky aj v zlepšení kardiovaskulárnych funkcií (Ding *et al.*, 2007). Vplyv PPAR α na diferenciáciu progenitorových buniek kostnej drene sa zaoberali v práci Vergori a kolektív. Ich štúdie poukazujú na to, že PPAR α negatívne moduluje diferenciáciu progenitorových buniek derivovaných z kostnej drene (Vergori *et al.*, 2014). Na základe získaných výsledkov, kedy vyššia koncentrácia inhibítora viedla k zvýšeniu expresie vilínu (viz. Graf.2.), je možné tvrdiť, že inhibícia receptora PPAR α vedie k vyššej diferenciácii črevných buniek.

Diferenciácia buniek môže byť ovplyvnená expresiou CYP epoxygenáz a sEH, ktorých expresia je ovplyvnená aktivátormi PPAR α (fibrátmi) (Čížková *et al.*, 2018). Navyac bolo preukázané, že zablokovanie aktivity sEH nedovoľuje kmeňovým bunkám sa diferencovať (Kim *et al.*, 2010). Použitie inhibítora GW6471 v dvoch rôznych koncentráciách (1 μ M a 10 μ M) v rôznych štádiách diferenciácie buniek, viedlo k rozdielným odpovediam v expresii CYP epoxygenáz. K vyššej relatívnej expresii CYP epoxygenáz voči kontrole dochádzalo u buniek nediferencovaných pri koncentrácii 10 μ M použitého inhibítora. U CYP2C8 došlo k vyššej relatívnej expresii voči kontrole dokonca u diferencovaných a nediferencovaných buniek v oboch koncentráciách použitého inhibítora. V prípade nižšej relatívnej expresii všetkých testovaných CYP epoxygenáz voči kontrole došlo u nediferencovaných buniek pri koncentrácii 1 μ M použitého inhibítora a u diferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M.

Solubilná epoxidhydroláza (sEH) konvertuje vysoko aktívnu kyselinu epoxyeikosatrienové (EETs) generovanú CYP450 z kyseliny arachidónovej na menej aktívne kyseliny dihydroxyeikosatrienové. EETs hrajú rolu pri regulácii intracelulárnych signálnych molekúl,

aktivity proteín kinázy a bunečnej diferenciacii a mitogenéze (Čížková *et al.*, 2016). Vyššia relatívna expresia sEH voči kontrole vyšla pri použití inhibítora pri koncentrácii 10 μ M u diferencovaných buniek a u nediferencovaných pri rovnakej koncentrácii použitého inhibítora. Naopak, nižšia relatívna expresia sEH voči kontrole vyšla u buniek diferencovaných a nediferencovaných pri použití koncentracie inhibítora 1 μ M.

Hladina EETs je regulovaná rovnováhou medzi syntézou EETs CYP epoxygenázami a hydrolýzou EETs na ich menej aktívne metabolity sEH. Zmenu pomeru týchto enzýmov doprevádza rozdielna odpoveď v proliferačnej aktivite buniek. EETs zvyšujú proliferáciu aj v nádorových bunkách a majú všeobecne cytoprotektívny charakter (Shen *et al.*, 2008). Cytoprotektívny charakter EETs v tkanivách potvrdil Wei a kolektív, ktorý preukázali spojitosť medzi agresívnosťou nádorových buniek pŕs a stupňom diferenciacie spojeným so sníženou expresiou sEH. Treba však brať na vedomie, že existujú rozdiely medzi zdravými črevnými bunkami a použitými nádorovými bunkami HT-29 (Shen *et al.*, 2008). Z výsledkov vyplýva, že zvyšujúca sa expresia sEH je u diferencovaných buniek pri koncentrácii 10 μ M použitého inhibítora oproti všetkým testovaným CYP epoxygenáz. Z toho sa dá usúdiť, že dochádza k rýchlejšej hydrolýze EETs, tým pádom, je ich koncentrácia nižšia. Tým, že klesá hladina EETs a je vyššia expresia vilínu u diferencovaných buniek (viz. Graf.2.) je možné usúdiť, že pokles EETs je nutný pre diferenciaciu buniek. Toto tvrdenie potvrdil aj Kim a kolektív v štúdií, kde zistili, že diferencované adipocyty majú viac DHETs a menej EETs než nediferencované bunky (Kim *et al.*, 2010). Pre overenie týchto tvrdení sa odporúča zmeranie hladiny metabolitov.

Tieto dosiahnuté výsledky zatiaľ nie sú obsiahnuté v akejkoľvek literatúre a tak sa nedajú porovnať. Pre plné pochopenie role PPARa v diferenciaci črevných buniek je potrebná rada ďalších štúdií.

5 Záver

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo stanoviť viabilitu buniek a určiť 10 % a 50 % inhibičnú koncentráciu, následne určiť mieru expresie markeru diferencácie, vilínu, enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxydhydrolázy. Podstatou bolo pozorovanie zmien aktivít vilínu, pozorovaných CYP epoxygenáz a solubilnej epoxydhydrolázy vplyvom inhibítora GW6471. Posledným cieľom bolo zmeranie miery vilínu v patientských vzorkách. Experimenty boli uskutočnené pomocou bunkovej línie odvodenej od karcinómu ľudského hrubého čreva, HT-29. Stanovenie viability buniek a určenie inhibičnej koncentrácie bolo uskutočnené pomocou WST-1 testu. Vplyv inhibítora a jeho účinok pôsobenia na expresiu vilínu, použitých CYP epoxygenáz a solubilnej epoxydhydrolázy bol testovaný pomocou In-Cell-Elisy. Miera vilínu v patientských vzorkách bola meraná pomocou ImageJ s pluginom IHC Profiler. Zo získaných výsledkov imunohistochemického farbenia patientských vzoriek sa mi žiaľ nepodaril preukázať štatisticky významný rozdiel medzi expresiou vilínu vo vzorkách pacientov trpiacich kolorektálnym karcinómom a vo vzorkách so zdravým tkanivom aj keď existujú štúdiá, ktoré to dokazujú.

Z výsledkov vyplýva, že inhibičné koncentrácie IC10 a IC50 sú vyššie u diferencovaných buniek. V prípade použitia inhibítora v dvoch rôznych koncentráciách (1 μM a 10 μM) v rôznych štádiách diferencácie buniek vyplýva, že inhibítor vplyva na bunkovú líniu. V prípade solubilnej epoxydhydrolázy vyšla vyššia relatívna expresia voči kontrole u diferencovaných a nediferencovaných bunkách pri koncentrácii inhibítora 10 μM a nižšia relatívna expresia voči kontrole vyšla u diferencovaných a nediferencovaných bunkách pri koncentrácii inhibítora 1 μM . V prípade CYP epoxygenáz viedlo použitie inhibítora GW6471 v dvoch rôznych koncentráciách (1 μM a 10 μM) v rôznych štádiách diferencácie buniek k rozdielným odpovediam v expresii. Ciele diplomovej práce boli splnené, dáta v tejto diplomovej práci predstavujú základ pre ďalšie práce v tejto oblasti, zamerané na štúdium expresie CYP epoxygenáz, vilínu a solubilnej epoxydhydrolázy a ich rolu v oblasti vzniku kolorektálneho karcinómu.

6 Literatúra

- Al-Maghrabi J., Gomaa W., Buhmeida A., Al-Quahtani M., Al-Ahwal M. (2013) Loss of Villin Immunoexpression in Colorectal Carcinoma Is Associated with Poor Differentiation and Survival. *ISRN Gastroenterology*, 1–7.
- Anderson K. M., Seed T., Jajeh A., Dudeja P., Meng T., Ou D., Bonomi P., Harris J. E. (1996) Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Prevention. *Anticancer Res*, 16, 2589–2599.
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci CMLS*, 58(5-6), 737–747.
- Arango, D., Al-Obaidi, S., Williams, D. S., Dopeso, H., Mazzolini, R., Corner, G., Byun D.S, Carr A.A., Murone C., Tögel L., Zeps N., Aaltonen A. L., Iacopetta B., Mariadason, J. M. (2012) Villin Expression Is Frequently Lost in Poorly Differentiated Colon Cancer. *The American Journal of Pathology*, 180(4), 1509–1521.
- Baldwin SJ, Clarke SE, Chenery RJ. (1999) Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *Br J Clin Pharmacol*, 48, 424–432.
- Barbier O, Fontaine C, Fruchart JC, Staels B. (2004) Genomic and non-genomic interactions of PPAR α with xenobiotic-metabolizing enzymes. *Trends Endocrinol Metab*, 15(7), 324–330.
- Barter PJ, Rye KA. (2008) Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39–46.
- Benedetti E., d'Angelo M., Ammazalorso A., Gravina G., Laezza C., Antonosante A., Panella G., Cinque B., Cristiano L., A. C. Dhez, C. Astarita, R. Galzio, M.G. Cifone, R. Ippoliti, R. Amoroso, E. Di Cesare, A. Giordano, A. Cimini, J. (2017) PPAR α Antagonist AA452 Triggers Metabolic Reprogramming and Increases Sensitivity to Radiation Therapy in Human Glioblastoma Primary Cells. *Cell. Physiol*, 232 (6), 1458–1466.
- Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 244-251
- Bernadette P. Neve, Jean-Charles Fruchart and Bart Staels (2000) Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) in Atherosclerosis. *Biochemical Pharmacology*, 1245–1250.
- Blaisdella Joyce, Jorge-Nebert Lucia F., Coultera Sherry, Ferguson Stephen S., Su-Jun Leea, Brian Chanasa, Tina Xic, Harvey Mohrenweiser, Burhan Ghanayema, Joyce A. Goldsteina (2004) Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics*, 14, 527–537.

- Bouwens M, Afman LA, Müller M. (2007) Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: Functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*, 1515–23.
- Brenner B, Hoshen MB, Purim O, David MB, Ashkenazi K, Marshak G, et al. (2011) MicroRNAs as a potential prognostic factor in gastric cancer. *World J. Gastroenterol*, 17(35), 3976–3985.
- Burns KA, Vanden Heuvel JP. (2007) Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1771(8), 952–960.
- Capdevila, JH, Falck, JR, Harris, RC (2000) Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*, 41, 163–181.
- Costa FF. (2010) Non-coding RNAs: Meet thy masters. *Bioessays*, 32(7), 599–608.
- Čihák R. (2002): Anatomie 2, 2nd ed. s83–119 Praha: Grada Publishing
- Čížková K., Aneta Rajdova A., Ehrmann J. (2015) Soluble Epoxide Hydrolase as a Potential Key Factor for Human Prenatal Development. *Cells Tissues Organs*. 201, 277–286.
- Čížková K., Konieczná A., Erdšová B., Ehrmann J. (2014) Time-dependent expression of cytochrome p450 epoxygenases during human prenatal development. *Organogenesis*, 10(1), 1–9.
- Čížková K. (2018) Expression of cytochrome P450 epoxygenases and soluble epoxide hydrolase is regulated by hypolipidemic drugs in dosedependent manner, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 355, 156–163.
- Čížková K., Steigerova J., Gursky J., Ehrmann J. (2016) Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning, . *Lipids in Health and Disease*, 15, 164.
- DeVita, Vincent T., Samuel Hellman a Steven A. Rosenberg (2001) Cancer, principles and practice of oncology. 6. vyd. Philadelphia: Lippincott. ISBN 0-7817–2229-2.
- Etgen GJ, Mantlo N. (2003) PPAR ligands for metabolic disorders. *Curr Top Med Chem*, (14), 1649–61.
- Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid c21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem Z*, 338, 741–755.

- Fleming I. (2007) Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 82, 60–67.
- Freedman LS, Clifford C, Messina M. (1990) Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: A review. *Cancer Res.* 50, 5710–5719.
- Fisslthaler B, P, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthetase in coronary arteries. *Nature*, 401, 493–497.
- Genini, D., Carbone, G. M. and Catapano, C. V. (2008) Multiple Interactions between Peroxisome Proliferators-Activated Receptors and the Ubiquitin-Proteasome System and Implications for Cancer Pathogenesis. *PPAR Res*, 1950–65.
- Goto T, Lee JY, Teraminami A, Kim YI, Hirai S, Uemura T, Inoue H, Takahashi N, Kawada T. (2011) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *J Lipid Res* 52(5):873–84.
- Guengerich FP. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*, 10, 101–1011.
- Hanley K, Jiang Y, He SS, Friedman M, Elias PM, Bikle DD, Williams ML, Feingold KR (1998) Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPARalpha. *J Invest Dermatol*, 110(4), 368–75.
- Harris, T.R., B.D. Hammock (2013) Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene*, 526, 61–74.
- Heneka MT, Landreth GE. (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta*, 1031-45
- Ijpenberg, A, et al. (2004) In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J*, 2083–2091.
- Inoue, J., Satoh, S., Kita, M., Nakahara, M., Hachimura, S., Miyata, M., Nishimaki-Mogami, T. and Sato, R. (2008)- PPARalpha gene expression is up-regulated by LXR and PXR activators in the small intestine *Biochem Biophys Res Commun*, 371, 675–8.
- Issemann, S. Green. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347, 645–650.
- Jhaveri M. D., Richardson D., Robinson I., Garle M. J., Patel A., Y. Sun, D. R. Sagar, A. J. Bennett, S. P. H. Alexander, D. A. Kendall, D. A. Barrett, V. Chapman (2008) Inhibition of

fatty acid amide hydrolase produces PPAR- α -mediated analgesia in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol*, 155(8), 1297–1306.

Jiaming Gao, Shuping Yuan, Jianhua Jin, Juanjuan Shi, Yongzhong Hou PPAR α regulate tumor progression, foe or friend? (2015) *European Journal of Pharmacology*, 765, 560–564.

Jiang J. G., Chen C. L., Card J. W., Yang S., Chen J. X., Fu X. N., Ning Y. G., Xiao X., Zeldin D. C., Wang D. W. (2005) Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Res*, 65(11), 4707–4715.

Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. (2009) microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int. J. Oncol*, 34(2), 537–542.

Katsiki N, Nikolic D, Montalto G, Banach M, Mikhailidis DP, Rizzo M. (2013) The role of fibrate treatment in dyslipidemia: an overview. *Curr Pharm Des.*, 3124–31.

Kehrer J. P., Biswal S. S., E. La, Thuillier P., Datta K., Fischer S. M., Vanden Heuvel J. P. (2001) Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK886. *Biochem J*, 899–906.

Kersten S., Seydoux J., Peters Jm., Gonzales F., Desvergne B., Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 103, 1489–98.

Kim, D. H., Vanella, L., Inoue, K., Burgess, A., Gotlinger, K., Manthati, V. L., Koduru, S. R., Zeldin, D. C., Falck, J. R., Schwartzman, M. L., & Abraham, N. G. (2010). Epoxyeicosatrienoic acid agonist regulates human mesenchymal stem cell-derived adipocytes through activation of HO-1-pAKT signaling and a decrease in PPAR γ . *Stem Cells and Development*, 19(12), 1863–1873.

Konrádová V., Uhlík J., Vajner L (2000) *Funkční histologie*, pp. 153–185.

Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. (2005) An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 51(2), 85-94.

Lee, Y., Yu, X., Gonzales, F., Mangelsdorf, D. J., Wang, M. Y., Richardson, C., Witters, L. A. and Unger, R. H. (2002) PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 53–11848.

- Liang C.-J., Tseng C.-P., Yang C.-M., Ma Y.-H., Br. J. (2011) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits ATP-induced COX-2 expression via peroxisome proliferator activator receptor- α in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.*, 815–825.
- Lüllmann-Rauch R. (2012) *Histologie*, pp. 319–338, Praha:Grada Publishing.
- Makia, N.L., Goldstein, J.A. (2016) CYP2C8 Is a Novel Target of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Human Liver. *Mol Pharmacol*, 89, 154–164.
- Mattick J.S., Makunin I.V. (2006) Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.*, 17–29.
- Nagy, L. et al. (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, 13, 3209–3216.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1–42.
- Nelson DR. (2004) Cytochrome P450 nomenclature. *Methods Mol Biol Clifton NJ*, 320, 1–10.
- Ng V. Y., Huang Y., Reddy L. M., Falck J. R., Lin E. T., Kroetz D. L. (2007) Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Drug Metabolism and Disposition*, 35(7), 1126–1134.
- Omura T. Forty (1999) Years of Cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun*, 266(3), 690–698.
- Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Raucy, J. L. and Johnson, E. F. (1998) Peroxisome proliferator activated receptor alpha expression in human liver *Mol Pharmacol* 53, 14–22.
- Pandey N. R., Renwick J., Misquith A., Sokoll K., Sparks D. L (2008) Linoleic Acid-Enriched Phospholipids Act through Peroxisome Proliferator-Activated Receptors α To Stimulate Hepatic Apolipoprotein A-I. *Secretion Biochemistry*, 1579–1587.
- Persson, S. C. Sim, S. Viriding, N. Onishchenko, G. Schulte, M. Ingelman-Sundberg (2014) Decreased hippocampal volume and increased anxiety in a transgenic mouse model expressing the human *CYP2C19* gene, *Molecular Psychiatry*, 19, 733–741.
- Peters J.M., Shah Y.M., Gonzales F.J. (2012) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, 12(3), 181–195.
- Perissi, V. et al. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction. *Genes Dev*. 13, 3198–3208.

- Pineda Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D. M., Fruchart, J. C. and Staels, B. (2002) Characterization of the human PPAR α promoter: identification of a functional nuclear receptor response element *Mol Endocrinol*, 16, 1013–28.
- Pozzi A., Ibanez M. R., Gatica A. E. et al. (2007) Peroxisomal proliferator-activated receptor- α -dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17685–17695.
- Pozzi A., Popescu V., Yang S. et al. (2010) The anti-tumorigenic properties of peroxisomal proliferator-activated receptor α are arachidonic acid epoxygenase-mediated. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12840–12850.
- Prueksaritanont T., Richards K. M., Qiu Y. et al. (2005) Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes. *Pharmaceutical Research* 22(1), 1–78.
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 182–89.
- Richert L., Tuschl G., Viollon - Abadie C. et al. (2008) Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-Otolylsulfanyl-2-(4-trifluormethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(4), 702–714.
- Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. (2008) Regulation of macrophage functions by PPAR- α , PPAR- γ , and LXRs in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 1050–9.
- Roberts-Thomson SJ, Snyderwine EG. (2000) Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in normal rat mammary gland and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary gland tumors from rats fed high and low fat diets. *Toxicol Lett*, 118(1-2), 79–86.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 695–723.
- Shen GF, Jiang JG, Fu XN, Wang DW. (2008) Promotive effects of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on the proliferation of tumor cells. *Ai Zheng*, 27, 390–5.
- Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. (2007) Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 72(5-6), 397–402.

- Spector A. A. (2009) Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of Lipid Research*, 50, 52–56.
- Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell line MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*, 34, 165–71.
- Sumanasekera, WK, et al. (2003) Heat shock protein-90 (hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor α and PPAR γ activity. *Biochemistry*, 10726–10735.
- Tauber Z., Kolečková M., Čížková K. (2019) Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)–cytochrome P450 epoxygenases-soluble epoxide hydrolase axis in ER+PR+HER2–breast cancer. *Med Mol Morphol.*, 1–18.
- Tripathi, N., Paliwal, S., Sharma, S. *et al.* (2018) Discovery of Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors as Potent Vasodilators. *Sci Rep* 8.
- Umemoto Tomoe and Fujiki Yukio (2012) Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes to Cells*, 17, 576–596.
- Vernon E. Steele,¹ Cathy A. Holmes, Ernest T. Hawk, Levy Kopelovich, Ronald A. Lubet, James A. Crowell, Caroline C. Sigman, and Gary J. Kelloff (1999) Lipoxygenase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. *Vol*, 8, 467–483.
- Vohl, M. C., Lepage, P., Gaudet, D., Brewer, C. G., Betard, C., Perron, P., Houde, G., Cellier, C., Faith, J. M., Despres, J. P., Morgan, K. and Hudson, T. J. (2000) Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162v mutation with hyperapobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*, 41, 945–52.
- Walgren, J. E., Kurtz, D. T. and McMillan, J. M. (2000) Expression of PPAR (alpha) in human hepatocytes and activation by trichloroacetate and dichloroacetate *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 108, 116–32.
- Wan, YJY, et al. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor α -deficient mice. *J. Biol. Chem*, 18–30.
- Wei X., Zhang D., Dou X., Niu N., Huang W., Bai J., Zhang G. (2014) Elevated 14,15-epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer*, 14(841), 1–9.

- Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM (2003) CDX2, a Highly Sensitive and Specific Marker of Adenocarcinomas of Intestinal Origin. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(3), 303–310.
- Wray J. A., Sugden M. C., Zeldin D. C. et al. (2009) The epoxygenases CYP2J2 activates the nuclear receptor PPAR α in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 4(10).
- Yun CH, Shimada T, Guengerich FP. (1992) Roles of human liver cytochrome P450C and 3A enzymes in the 3-hydroxylation of benzo(a)pyrene. *Cancer Res.*, 52, 1868–1874.
- Xu, HE, et al. (2002) Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature*, 813–817.
- Zanger UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 138(1), 103–141.
- Zeldin, DC, Foley, J, Boyle, JE, Moomaw, CR, Tomer, KB, Parker, C, Steenbergen, C. (1997) Predominant expression of an arachidonate epoxygenase in islets of Langerhans cells in human and rat pancreas. *Endocrinology*, 138, 1338–1346.
- Zhou, G. et al. (1998) Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Mol. Endocrinol.*, 12, 1594–1604.