



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav histologie a embryologie

**Regulácia expresie CYP epoxygenáz a solubilnej
epoxidhydrolázy pomocou fibrátov počas diferenciácie
črevných buniek *in vitro***

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor: **Bc. Zuzana Šmotková**
Študijný program: N1501 Experimentální biologie
Študijný odbor: Experimentální biologie
Forma štúdia: Prezenčné
Vedúci práce: Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
Termín odovzdania práce: 2020

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko	Bc. Zuzana Šmotková
Názov práce	Regulácia expresie CYP epoxygenáz a solubilnej epoxidhydrolázy pomocou fibrátov počas diferenciácie črevných buniek <i>in vitro</i>
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta UPOL
Vedúci práce	Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Diplomová práca sa zaoberá vplyvom fibrátov (fenofibrátu a WY-14643) na zmenu expresie enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxidhydrolázy pomocou In-Cell ELISy v črevných bunkách. Ako model boli využité bunkové línie HT-29 a Caco2 a to ako bunky nediferencované, tak diferencované <i>in vitro</i> . Zároveň bola sledovaná translokácia receptora PPAR α z cytoplazmy do jadra bunky po ovplyvnení fibrátmi a to prostredníctvom analýzy obrazu po imunocytochemickom farbení. Bola preukázaná regulácia expresie CYP epoxygenáz a solubilnej epoxidhydrolázy vplyvom fibrátov počas diferenciácie črevných buniek <i>in vitro</i> . U oboch bunkových línií boli pozorované zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u nediferencovaných a diferencovaných buniek. Bolo zistené, že k vyššiemu presunu PPAR α do jadra dochádzalo v závislosti na koncentrácii použitých fibrátov. Navyše bolo zistené, že vyššia jadrová pozitivita bola pozorovaná u diferencovaných buniek v porovnaní s nediferencovanými u línie HT-29, zatiaľ čo u línie Caco2 nie. Bolo zistené, že so zvyšujúcou sa koncentráciou použitého fibrátu dochádza k navýšeniu jadrovej positivity u oboch použitých bunkových línií. Získané výsledky by mohli byť podkladom ďalšieho nadväzujúceho výskumu, ktorý by mohol viesť k lepšiemu pochopeniu vzájomných vzťahov medzi PPAR α , CYP epoxygenázami a solubilnou epoxidhydrolázou a k pochopeniu ich úlohy v diferenciácii črevných buniek.
Kľúčové slová	PPAR α , fibráty, kyselina arachidonová, CYP epoxygenázy, sEH
Počet strán	90
Počet príloh	0

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Zuzana Šmotková
Title of thesis	Diploma
Type of thesis	Regulation of the expression of CYP epoxygenases and soluble epoxide hydrolase by fibrates during differentiation of intestinal cells <i>in vitro</i>
Department	Department of Histology and Embryology
Supervisor	Mgr. Kateřina Čížková, PhD.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The diploma thesis deals with the influence of fibrates (fenofibrate and WY-14643) on the change of expression of enzymes CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 and soluble epoxide hydrolase by In-Cell ELISA in intestinal cells. Both HT-29 and Caco2 cell lines, both undifferentiated and differentiated <i>in vitro</i>, were used as a model. At the same time, translocation of the PPARα receptor from cytoplasm into the nucleus of the cell after fibrate treatment was monitored by image analysis after immunocytochemical staining. Regulation of the expression of CYP epoxygenases and soluble epoxide hydrolase by fibrates during intestinal cell differentiation <i>in vitro</i> has been demonstrated. Changes in the expression of CYP epoxygenases and sEH in undifferentiated and differentiated cells were observed in both cell lines. It was found concentration-dependent transfer of PPARα to the nucleus after fibrates treatment. In addition, it was found that higher nuclear positivity was observed in differentiated cells as compared to undifferentiated in HT-29 cells but not in Caco2 cell line. The obtained results could underpin further follow-up research that could lead to a better understanding of PPARα-, CYP epoxygenases- soluble epoxide hydrolase axis in intestinal cell differentiation.</p>
Keywords	PPAR α , fibrates, arachidonic acid, CYP epoxygenases, sEH
Number of pages	90
Number of appendices	0
Language	Slovak (English)

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

V Olomouci dňa :

podpis :

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Kateřine Čížkové, PhD. za jej cenné rady, konzultácie, odborné vedenie, trpezlivosť a predovšetkým za jej ochotu a čas, ktorý mi venovala pri spracovaní teoretickej a experimentálnej časti mojej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Lucii Vozňákovéj a Mgr. Terézii Foltýnkovej za ich pomoc a čas, ktorý mi venovali v laboratóriu. Veľké poďakovanie patrí aj mojej rodine a kamarátom za psychickú podporu počas celého štúdia.

Zoznam použitých skratiek a symbolov

AA	kyselina arachidonová
AF-1	aktivačná funkcia nezávislá na ligande
AF-2	aktivačná funkcia 2
Agtx2	alanínglyoxylátaminotransferáza 2
APO A(1-5)	apolipoproteín A(1-5)
Caco2	bunková línia odvodená od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
COX	cyklooxygenázy
CYP P450	Cytochróm P450
DBD	doména viažúca DNA
DEHP	ester kyseliny ftalovej
dH ₂ O	destilovaná voda
DHA	dokosahexaénová kyselina
DHET	dihydroxyeikosatriénové kyseliny
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EETs	epoxyeikosatriénové kyseliny
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	eikosapentaénová kyselina
FAT	translokáza mastných kyselín
FATP	transportný proteín mastných kyselín
FBD	flexibilná pántová doména D
FBS	fetálne bovinné sérum
Gls	glutamináza
Got1	aspartátaminotransferáza
GPS2	supresor dráhy G-proteínu 2
Gpt	alanínaminotransferáza
GSTA	glutathion S-transferáza A
GSTs	glutathion S-transferázy
HAT	histonacetyltransferázová aktivita
HDAC	histondeacetyláza
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou
HETE	8(S)-hydroxyeicosatetraénová kyselina

HRP	chrenová peroxidáza
HT-29	bunková línia odvodená od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
L	leucín
LBD	doména viažúca ligand
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou
LOX	lipooxygenáza
LPL	lipoproteínová lipáza
MDR	mnohopočetná lieková rezistencia
MIST	Magnetic Immuno Staining Tray
NCoR	korepresor jadrového receptora
NRs	jadrové receptory
PBS	fosfátový pufor
Pck1	fosfoenolpyruvátkarboxykináza 1
Pcx	pyruvátkarboxyláza
Pdk4	pyruvátdehydrogenázakináza 4
PFDA	kyselina perfluorodekanová
PFOA	kyselina perfluorooktanová
PFOS	perfluoroktansulfonát
PGC-1	koaktivátor PPAR
PLA2	fosfolipáza A2
PPARs	receptory aktivované proliferátormi peroxizómov
PPRE	element peroxizómálnej proliferlačnej odpovede
PPs	peroxizómové proliferátory
RAR	receptory kyseliny retinovej
ROS	reaktívne druhy kyslíka
RXR	receptor 9- <i>cis</i> retinovej kyseliny
sEH	solubilná (rozpustná) epoxid hydroláza
SMRT	slencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SRC-1	koaktivátor steroidného receptora
TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor α
TR	receptory tyroidných hormónov
Tyr	aminokyselina Tyrozín
Ugt1a9	UDP-glukuronozyltransferáza 1A
UGTs	UDP-glukuronozyltransferázy

VEGF vaskulárny endotelový rastový faktor
VLDL lipoproteín s veľmi nízkou hustotou
WY-14643 kyselina pirixinová ([4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]octová kyselina)
X iná aminokyselina

Obsah

Zoznam použitých skratiek a symbolov	6
1 Úvod a ciele práce.....	11
2 Teoretická časť.....	13
2.1. Receptory aktivované peroxizómovým proliferátorom (PPARs)	13
2.1.1. Gény kódujúce PPARs a proteínová štruktúra PPARs	13
2.1.2. Expresia PPARs v organizme.....	15
2.1.3. Úloha PPARs v organizme.....	17
2.1.4 Ligandy PPAR α	17
2.1.5 Mechanizmus aktivácie transkripcie prostredníctvom PPARs	19
2.1.6 Cieľové gény PPAR α	21
2.2. Rola PPAR α v diferenciácii a karcinogéze	24
2.3. Metabolizmus kyseliny arachidonovej.....	27
2.3.1. Charakteristika kyseliny arachidonovej	27
2.3.2. Enzýmy metabolizujúce kyselinu arachidonovú.....	28
2.3.3. CYP epoxygenázy a ich súvislosť s karcinogézou	32
2.3.4. Lieková rezistencia u CYP epoxygenáz.....	34
2.4. Vzťah PPAR α , CYP epoxygenázam a solubilnej epoxidhydrolázy	35
2.5. Vybrané bunkové línie	37
2.5.1. Bunková línia Caco2	38
2.5.2. Bunková línia HT-29.....	38
3 Experimentálna časť	39
3.1 Materiál	39
3.1.1. Bunkové línie HT-29 a Caco-2	39
3.1.2. Protilátky použité pri metóde In-Cell ELISA a imunocytochemickom farbení PPAR α	39
3.1.3. Prístrojové vybavenie	40
3.1.4 Pomôcky.....	40
3.1.5. Chemikálie.....	41
3.1.6. Použité súpravy	42
3.1.7. Zloženie roztokov	42
3.2. Metódy práce.....	44
3.2.1 Kultivácia a pasážovanie bunkových línií HT-29 a Caco-2.....	44

3.2.2. Počítanie buniek	45
3.2.3. Príprava 96-jamkových dosiek na In-Cell ELISA	45
3.2.4. In - Cell ELISA	46
3.2.5. Imunocytochemické farbenie (ICC) proteínu PPAR α v bunkovej línii HT-29 a Caco2.....	48
3.2.6. Analýza translokácie receptora PPAR α po ovplyvnení fibrátmi	49
3.2.7. Štatistická analýza	49
3.3 Výsledky	50
3.3.1. Zmena expresie CYP epoxygenázy a sEH u bunkových línii HT-29 a Caco2 po ovplyvnení fibrátmi počas diferenciácie črevných buniek <i>in vitro</i>	50
3.3.2. Prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky.....	60
3.4 Diskusia	70
Referencie	77
Internetové zdroje	88
Zoznam obrázkov	89
Zoznam tabuliek a grafov	90

1 Úvod a ciele práce

Zhubné nádory sú celosvetovo po kardiovaskulárnych ochoreniach druhou najčastejšou príčinou úmrtí a ich incidencia neustále narastá. Prudký rozvoj molekulárno-biologických metód viedol v posledných rokoch k získaniu veľkého množstva poznatkov o transformácii normálnych buniek na nádorové, o príčinách nádorového rastu, spôsoboch metastázovania a o ďalších charakteristikách malígnych ochorení. Lepšie pochopenie týchto procesov umožnilo identifikovať nové ciele protinádorovej liečby a nové prognostické a prediktívne faktory. Vzhľadom na to, že nádorové ochorenia čreva sú v súčasnej dobe pomerne rozšírené v populácii, boli pri experimentálnej časti diplomovej práce použité bunkové línie odvodené od adenokarcinómu hrubého čreva.

Kyselina arachidonová je ω -6-polynenasýtená mastná kyselina, ktorá sa do tela dostáva prostredníctvom potravy, alebo dochádza k jej syntéze z iných esenciálnych mastných kyselín (kyseliny linolovej a kyselina α -linolénovej). V minulosti bol skúmaný podiel kyseliny arachidonovej a jej derivátov na zápalových procesoch. V súčasnosti je však výskum skôr orientovaný na ich súvislosť s rozvojom rakoviny. Kyselina arachidonová podlieha enzymatickej premene na biologicky aktívne molekuly lipidovej povahy - eikosanoidy. Kyselina arachidonová je metabolizovaná troma hlavnými cestami: cyklooxygenázami, lipooxygenázami a cytochrómom P450. Systém cytochrómu P450 je komplexná skupina enzýmov, ktorá pozostáva z dvoch hlavných častí: z ω -hydroxyláz a z epoxygenáz. Epoxygenázy sú enzýmy kódované prevažne génmi CYP2C a CYP2J, ktoré premieňajú kyselinu arachidonovú na epoxyeikosatriénové kyseliny (EETs). Následne dochádza k premene EETs na kyseliny dihydroxyeikosatriénové (DHETs) vplyvom solubilnej epoxidhydrolázy (sEH). Zatiaľ čo protektívne účinky CYP epoxygenáz na kardiovaskulárny systém boli predmetom rozsiahleho skúmania, úloha CYP epoxygenáz v nádorových procesoch je naďalej nedostatočne charakterizovaná avšak je známe, že ich prítomnosť v nádorovom tkanive prispieva k rozvoju mnohopočetnej liekovej rezistencie na protinádorové lieky.

Fibráty sú látky patriace do skupiny hypolipidemických liekov. Medzi klinicky používané fibráty sa zaraďuje klofibrát, fenofibrát, gemfibrozil, bezafibrát, ciprofibrát, nafenopin, zatiaľ čo medzi výhradne experimentálne používané patrí WY-14643. Fibráty sú agonistami receptorov aktivovaných peroxizómovými proliferátormi (PPARs), ktoré fungujú ako ligandom-aktivované transkripčné faktory regulujúce rôzne biologické procesy.

Experimentálna časť diplomovej práce bola zameraná na ovplyvnenie nediferencovaných a *in vitro* diferencovaných buniek bunkových línií HT-29 a Caco2 dvoma rôznymi koncentráciami fibrátov (fenofibrát a WY-14643) s cieľom sledovania zmeny expresie enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxidhydrolázy pomocou In-Cell ELISy . Zároveň bola sledovaná translokácia receptora PPAR α do jadra bunky po ovplyvnení fibrátmi a to prostredníctvom analýzy obrazu po imunocytochemickom farbení.

Teoretická časť diplomovej práce je rozdelená na 5 kapitol. Prvá kapitola je venovaná receptorom aktivovaných peroxizómovými proliferátormi (PPARs). Pričom je kladený dôraz hlavne na gény kódujúce PPARs, proteínovú štruktúru PPARs, expresiu PPARs a ich úlohu v organizme. Následne je popísaný mechanizmus aktivácie transkripcie prostredníctvom PPARs a cieľové gény PPAR α . Druhá kapitola stručne popisuje problematiku významu PPAR α v diferenciácii a karcinogéze. Tretia kapitola je zameraná na metabolizmus kyseliny arachidonovej, pričom je zdôraznený význam enzýmov metabolizujúcich kyselinu arachidonovú. Následne sú popísané cytochróm P450 epoxygenázy a ich súvislosť s karcinogézou a záver kapitoly je venovaný liekovej rezistencii spojenej s CYP epoxygenázami. Štvrtá kapitola rozoberá vzťah PPAR α , CYP epoxygenáz a solubilnej epoxidhydrolázy. Piata kapitola stručne popisuje dve bunkové línie (HT-29 a Caco2) následne použité v experimentálnej časti diplomovej práce.

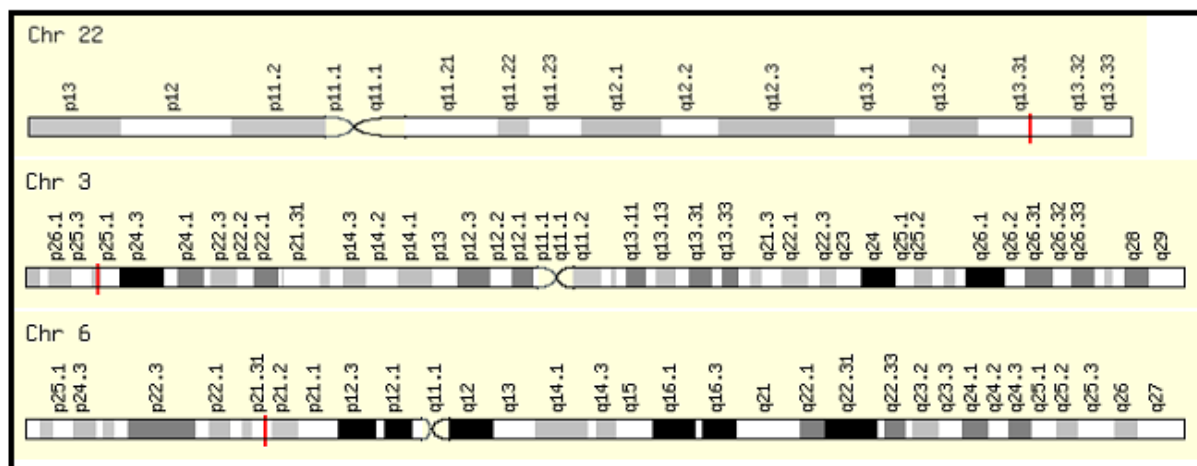
2 Teoretická časť

2.1. Receptory aktivované peroxizómovým proliferátorom (PPARs)

Receptory aktivované peroxizómovým proliferátorom fungujú ako ligandom-aktivované transkripčné faktory regulujúce rôzne biologické procesy (Soška, 2006). Názov receptorov aktivovaných proliferátormi peroxizómov (PPAR) vznikol na začiatku ich výskumu (Isselman & Green, 1990), kedy použitie peroxizómových proliferátorov na hlodavce dramaticky ovplyvnilo proliferáciu peroxizómov v tkanivových kultúrach myších hepatocytov. Peroxizómy sú subcelulárne organely, ktoré je možné nájsť ako v rastlinách tak aj u živočíchov. Obsahujú enzýmy dôležité pri respirácii a enzýmy podieľajúce sa na metabolizme lipidov. Predpokladá sa, že účinok peroxizómových proliferátorov je sprostredkovaný práve receptormi PPAR (Isselman & Green, 1990). Sú známe tri izoformy PPARs: PPAR α (NR1C1), PPAR γ (NR1C2) a PPAR β/δ (NR1C3), pričom každá z nich je kódovaná rozdielnymi génmi. Všetky tri izoformy PPAR fungujú ako transkripčné faktory, riadia a regulujú expresiu veľkého množstva génov podieľajúcich sa na regulácii metabolizmu glukózy a lipidov, homeostázy, adipogenézy, inzulínovej senzitivity, imunitnej odpovedi, bunkovom raste a diferenciácii (Monsalve et al., 2013).

2.1.1. Gény kódujúce PPARs a proteínová štruktúra PPARs

Tri izoformy PPARs kódované rozdielnymi génmi a nachádzajúce sa na iných chromozómoch ukazujú svoju vzájomnú odlišnosť aj v ich distribúcii v tkanivách a fyziologickej funkcii (Robinson et al., 2014). Ľudský gén PPAR α (NR1C1), ktorý má veľkosť 93,2 kb, sa nachádza na chromozóme 22 v pozícii 22q13.31, kóduje proteín o 468 aminokyselinách a je zložený zo 14 exónov. Ľudský gén PPAR γ je lokalizovaný na chromozóme 3 v pozícii 3p25.2, má veľkosť 85,6 kb a skladá sa z 11 exónov. Keďže gén PPAR γ má oddelené promotory a exóny na 5' konci dochádza k vzniku troch mRNA a to PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3. Proteíny vzniknuté z mRNA PPAR γ 1 a mRNA PPAR γ 3 sú identické zatiaľ čo produkt PPAR γ 2 obsahuje navyše NH₂-terminálnu oblasť zloženú z 30 aminokyselín (Janani & Kumari, 2015). Gén pre PPAR β/δ sa nachádza na chromozóme 6 v pozícii 6p21.31, má veľkosť 183,6 kb a je zložený z 13 exónov (Obrázok 1) (Desvergne & Wahli, 1999).



Obrázok 1 Znárodnenie pozície génov PPAR na chromozómoch. Gén PPAR α (červená farba) na chromozóme 22, gén PPAR γ na chromozóme 3 a gén PPAR β/δ na chromozóme 6. Prevzaté a upravené z The human gene database (Gene Cards).

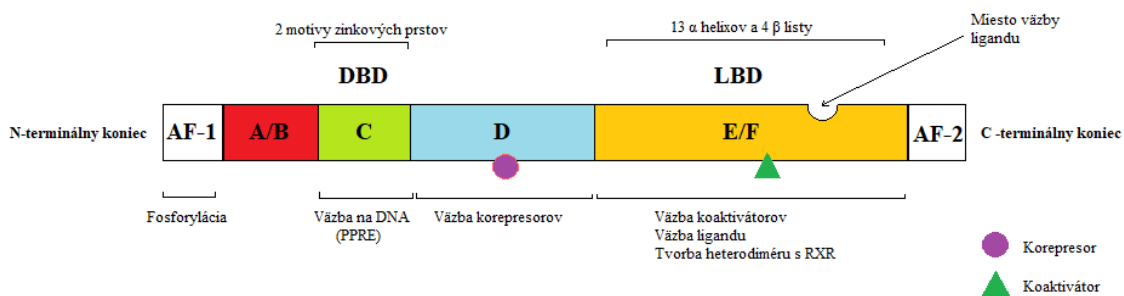
V proteínovej štruktúre PPARs je možné rozoznať štyri funkčné domény nazývané A/B; C; D a E/F znázornené na Obrázku 2. Doména A/B na N-terminálnom konci obsahuje aktivačnú funkciu 1 nezávislú na ligande (AF-1), ktorá zodpovedá za fosforyláciu PPAR. Doména A/B má zároveň nízku úroveň základnej transkripčnej aktivity (Desvergne & Wahli, 1999).

Za A/B doménou nasleduje doména viažúca DNA (DBD, DNA binding domain alebo C doména), ktorá sprostredkuje pripojenie PPAR na element peroxizálnej proliferácie (PPRE, peroxisome proliferation response element) v oblasti promotora cieľových génov. Element peroxizálnej proliferácie je definovaný ako priama repetícia dvoch hlavných rekogničných motívov AGGTCA s medzerou jedného nukleotidu tiež nazývaného DR1 (Kota et al., 2005). Doména DBD je jednou z najviac konzervovaných spomedzi všetkých jadrových receptorov. Je tvorená dvomi motívmi zinkových prstov zložených do globulárnej štruktúry, ktorá následne umožňuje rozpoznať cieľovú DNA zloženú zo 6 nukleotidov (Desvergne & Wahli, 1999). Vo väčšine prípadov sa jadrové hormónové receptory viažu ako diméry na dve kópie hlavných rekogničných motívov, ktoré tvoria funkčný prvok hormonálnej odozvy. Rozostup týchto dvoch motívov a ich relatívna orientácia (priame repetície, palindromatické repetície alebo obrátená konfigurácia palindromatických repetícií) určujú, ktoré receptory sa viažu na daný element hormonálnej odozvy (Glass, 1994). Členovia podskupiny receptorov tyroidných hormónov (TR) a receptorov kyseliny retinovej (RAR) - TR/RAR, do ktorej patria aj

PPARs, rozpoznávajú prednostne hlavný hexanukleotidový motív AGGTCA a vyznačujú sa tiež schopnosťou tvoriť heterodimér s receptorom 9-cis-retinoovej kyseliny RXR (NR2B) (Desvergne & Wahli, 1999).

Vedľa DBS sa nachádza flexibilná pántová doména D (alebo co-FBD), ktorá spája DBD s doménou E/F (Desvergne & Wahli, 1999). V oblasti domény D dochádza k naviazaniu korepresorov (Dowell et al., 1999). Vázobné miesto korepresora sa zároveň čiastočne prekrýva s väzobným miestom koaktivátora (Desvergne & Wahli, 1999).

Doména E/F alebo doména viažúca ligand (LBD, ligand-binding domain) sa nachádza na C-terminálnom konci receptora. Pozostáva z 13 α helixov a 4 β listov, ktoré spolu vytvárajú miesto, kde sa naviaže ligand (Berger & Moller, 2002). Miesto väzby ligandu je v porovnaní s ostatnými jadrovými receptormi väčšie (1,400 Å), čo umožňuje PPARs interagovať so širokou škálou štruktúrne odlišných prírodných a syntetických ligandov (Desvergne & Wahli, 1999; Xu et al., 2001; Berger & Moller, 2002). Súčasťou E/F domény je aktivačná funkcia 2 (AF-2), ktorá je závislá na ligande (Monsalve et al., 2013). Aktivačná funkcia 2 je potlačená, až kým nedôjde k väzbe ligandu. Po naviazaní ligandu prechádza doména AF-2 konformačným posunom, ktorý umožňuje tvorbu vodíkových väzieb medzi Tyr-314 a Tyr-464 (Xu et al., 2001). Prítomnosť konformačnej zmeny v proteíne umožňuje interakciu receptora (PPAR α) s LXXLL motívom (L - leucín, X - iná aminokyselina) prítomným u koaktivátorových proteínov (Xu et al., 2001).



Obrázok 2 Schématické znázornenie funkčných domén receptora PPAR α . Prevzaté a upravené z Kota et al., 2005; Pyper et al., 2010; Monsalve et al., 2013)

2.1.2. Expresia PPARs v organizme

Všetky tri izoformy PPARs sú kódované rozdielnymi génmi z zároveň dochádza aj k ich odlišnej distribúcii v tkanivách. Vyššie hladiny expresie PPAR α je možné nájsť v tkanive s aktívnym katabolizmom mastných kyselín ako napríklad pečeň, srdce, obličky, hnedé tukové tkanivo, kostrový sval, tenké črevo a hrubé črevo (Bookout et al., 2006;

Isselman & Green, 1990). Zatiaľ čo PPAR α reguluje veľa cieľových génov, expresia génu samotného PPAR α je pod kontrolou ostatných transkripčných faktorov (Pineda Torra et al., 2002). U hlodavcov je PPAR α regulovaný rôznymi fyziologickými podmienkami ako napríklad stres, hormóny (zahŕňa rastový hormón, glukokortikoidy, inzulín, a leptín (Lee et al., 2002; Inoue et al., 2008). Expresia PPAR α je spojovaná s procesom starnutia a je indukovaná počas diferenciácie hnedých tukových buniek - adipocytov (Pyper et al., 2010).

PPAR β/δ je exprimovaný v rôznych tkanivách a bunkách, relatívne vyššia expresia je prítomná v mozgu, adipocytoch a koži (Kota et al., 2005)

PPAR γ je najčastejšie exprimovaný v adipóznom tkanive, imunitných /zápalových bunkách (napríklad monocyty a makrofágy), sliznici hrubého a slepého čreva a v placente. Izoforma PPAR γ 1 je exprimovaná skoro vo všetkých bunkách, zatiaľ čo expresia PPAR γ 2 je limitovaná predovšetkým na adipózne tkanivo. Napriek tomu je izoforma PPAR γ 2 považovaná za úspešnejší transkripčný aktivátor (Janani & Kumari, 2015). Expresia PPAR γ je nižšia v kostrových svaloch a pečeni (Monsalve et al., 2013).

PPARs hrajú dôležitú úlohu pri vývoji zárodočných buniek a embryí. Každá z troch izoformiem PPAR je exprimovaná v somatických a zárodočných bunkách semenníkov a vaječníkov (Rees et al., 2008). Existuje len málo informácií o expresii PPARs v prenatalnom vývoji u ľudí. Huin et al. zisťoval odlišujúcu sa expresiu izoformiem PPARs v gastrointestinálnom trakte u ľudských plodov od 7 do 22 týždňa. Bola zdokumentovaná prítomnosť všetkých troch izoformiem PPARs už u 7 týždňového zárodka pričom s výnimkou žalúdka bola PPAR γ prevládajúcou izoformou v tráviacom trakte (Huin et al., 2000). Vysoká expresia PPAR γ bola tiež zdokumentovaná v ľudskej placente, kde sa podieľa na diferenciácii a funkcii trofoblastu (Fournier et al., 2007). Abbott et al. skúmala expresiu PPAR α , PPAR β a PPAR γ v ľudských fetálnych tkanivách. S pribúdajúcim fetálnym vekom sa expresia mRNA PPAR α a PPAR β zvýšila v pečeni, PPAR β sa znížila v srdci a čreve a PPAR γ sa znížila v nadobličkách (Abbott et al., 2010). Čížková et al. skúmala expresiu PPAR α v ľudských embryonálnych/fetálnych črevách, pečeni a obličkách od 5. do 20. týždňa ľudského prenatalného vývoja. Expresiu PPAR α bolo možné zistiť už v počiatočných fázach prenatalného vývoja; už v 7. týždni vnútromaternicového vývoja v črevách, v 5. týždni vnútromaternicového vývoja v pečeni a 6. týždni vnútromaternicového vývoja v obličkách (Čížková et al., 2015). Experimenty na hlodavcoch tiež ukázali, že PPAR α sa podieľa na neskoršom vývoji kože (Michalik & Wahli, 2007). PPAR β/δ sa podieľa na vývoji kože, vlasových folikulov (Michalik & Wahli, 2007), svalov (Rees et al., 2008) a nervového systému (Hall et al., 2008). Podobne aj

PPARy má vplyv na vývoj nervového systému a svalov (Michalik & Wahli, 2007; Rees et al., 2008).

2.1.3. Úloha PPARs v organizme

PPAR α sa podieľa na regulácii génov zahrnutých v oxidácii mastných kyselín, ktoré sa vyskytujú v mitochondriách, peroxizómoch a mikrozómoch v pečeni. PPAR α je kľúčový faktor v riadení adaptácie metabolizmu na vzrastajúce množstvo mastných kyselín a teda zabezpečuje homeostázu lipidov. Zvýšením β -oxidácie mastných kyselín a poskytnutím energie bunke PPAR α tiež odstraňuje mastné kyseliny s dlhým reťazcom, čím bráni akumulácii a toxicite lipidov v bunkách. U transgénnych myší s knockoutom génu pre PPAR α bola prítomnosť receptora zásadná pre reguláciu metabolickej adaptácie na hladovanie. Neprítomnosť génu pre PPAR α sa prejavila znemožnením využitia mastných kyselín ako energetického substrátu pri hladovaní čo malo za následok zásadné metabolické dôsledky na organizmus. PPAR α zároveň zabezpečuje reguláciu expisie génov zodpovedných za transport proteínov a enzýmov, ktoré sú zahrnuté v zápalových procesoch (Monsalve et al., 2013).

PPAR β/δ zohráva dôležitú úlohu pri vývoji jedinca vzhľadom k tomu, že pri experimentálnom knockoute receptora dochádza k vysokej fetálnej úmrtnosti (Barak et al., 2002). PPAR β/δ za zároveň podieľa na diferenciácii kože a svalov. V prípade svalov dochádza k podpore využitia tukov a zníženiu tukových depozitov. V koži PPAR β/δ riadi procesy apoptózy, proliferácie a diferenciácie. Rola PPAR β/δ bola najviac ozrejmená v prípade PPAR β/δ homozygotných myší, u ktorých v porovnaní s heterozygotmi a normálnymi myšami nedochádzalo k hojeniu rán (Haluzík & Svačina, 2005). Zúčastňuje sa tiež prostacyklínmi indukovanej apoptózy buniek a výrazne vplýva na rozvoj mozgu, napríklad pri diferenciácii oligodendrocytov.

PPARy je nevyhnutný pre diferenciáciu a fungovanie hnedých a bielych adipocytov a zároveň podporuje hromadenie lipidov v adipocytoch (Haluzík & Svačina, 2005). Izoformy PPARy1 a PPARy2 sú nevyhnutné pre vývoj tukového tkaniva a kontrolu citlivosti na inzulín (Janani & Kumari, 2015).

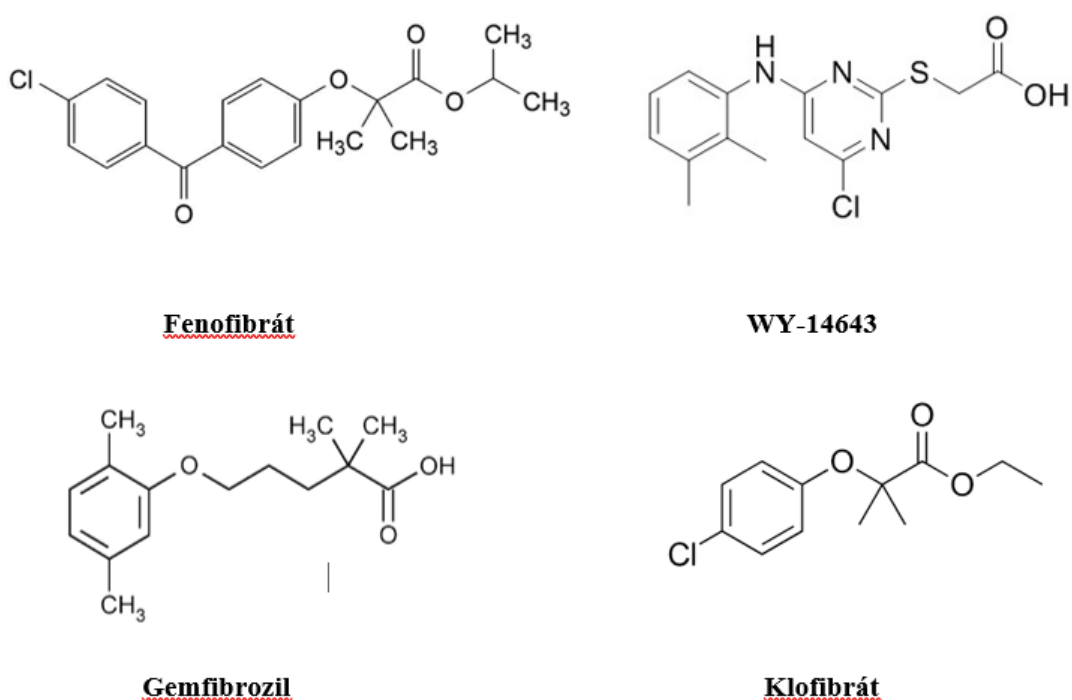
2.1.4 Ligandy PPAR α

Ligandy PPAR α je možné rozdeliť do dvoch hlavných kategórií: na syntetické exogénne ligandy a prirodzené endogénne ligandy.

PPARs zodpovedajú za rozdielne úlohy v organizme hlavne prostredníctvom väzby endogénnych ligandov, ktoré sa tvoria v metabolických procesoch (pri spracovaní mastných kyselín) a preto sú zároveň nazývané aj ako lipidové senzory (Grygiel-Górniak, 2014). Charakteristickou vlastnosťou PPAR miesta na väzbu ligandov je jeho veľkosť, ktorá je 3 - 4 krát väčšia ako u ostatných jadrových receptorov. Preto majú PPARs schopnosť naviazať na seba širokú škálu prirodzených (endogénnych) ale aj syntetických (exogénnych) ligandov. Medzi endogénne ligandy PPAR α sa radia nasýtené a nenasýtené mastné kyseliny (Berget & Moller, 2002), ktoré majú vo svojom reťazci jednu dvojitú väzbu (mononenasýtené) a viac dvojitých väzieb (polynenasýtené). Z nasýtených ide napríklad o kyselinu palmitovú. Z mononenasýtených ide napríklad o kyselinu olejovú a z polynenasýtených ide napríklad o kyselinu linolénovú, kyselinu arachidonovú (Haluzík & Svačina, 2005) ďalej kyselinu eikosapentaénovú (EPA) a kyselinu dokosaheptaénovú (DHA), ktoré patria medzi esenciálne mastné kyseliny (Grygiel-Górniak, 2014). Esenciálne mastné kyseliny sú agonisti PPAR a podieľajú sa na transkripcii génov zahrnutých v homeostáze lipidov a glukózy. Omega-3-mastné kyseliny obsahujú tri kľúčové elementy, ktoré umožňujú optimálnu väzbu na receptor: polárna hlavička (karboxylová kyselina u DHA a eikosapentaénová kyselina (EPA), spojovací región (dlhá časť uhlíkového reťazca) a hydrofóbny chvost. Keďže sa omega-3 mastné kyseliny radia k polynenasýteným, tak ľahko podliehajú oxidácii a stimulujú PPARs. K endogénnym ligandom PPAR patria tiež eikosanoidy ako napríklad leukotrién B₄, ktorý stimuluje PPAR α , alebo jeden z metabolitov lipooxygenázy (LOX) 8(S)-hydroxyeicosatetraénová kyselina (HETE), ktorá aktivuje PPAR α už v submikromolárnej koncentrácii (Berger & Moller, 2002; Haluzík & Svačina, 2005).

Syntetické ligandy zahŕňajú hypolipidemické lieky ako napríklad klofibrát, fenofibrát, gemfibrozil, bezafibrát, ciprofibrát, nafenopin a WY-14643. Zatiaľ čo, klofibrát a fenofibrát sú relatívne selektívne ligandy pre PPAR α (majú 10x vyššiu afinitu k PPAR α než k PPAR γ), bezafibrát v rovnakej miere aktivuje všetky tri izoformy PPAR (Haluzík & Svačina, 2005). Fibrát WY-14643, analóg klofibrátu na báze 2- arylthiooctovej kyseliny, je tiež relatívne selektívny pre PPAR α avšak má 10x nižšiu afinitu k PPAR γ . Fibrát WY-14643 je súčasne často využívaný v experimentálnych štúdiách, v klinickej praxi sa však nepoužíva (Haluzík & Svačina, 2005). Liečba fibrátmi, široko používanou triedou látok modifikujúcich lipidy, vedie k podstatnému zníženiu tukov (lipidov) konkrétne cholesterolu a triglyceridov (triacylglycerolov) v krvi. Fibráty sú agonistami receptorov PPARs. Aktiváciou PPARs dochádza k urýchleniu štiepenia tukov a tým sa znižuje hladina

cholesterolu a triglyceridov v plazme (Staels et al., 1998). Medzi exogénne ligandy PPAR α ďalej patrí skupina antikonvulzív ako napríklad kyselina valproová (používaná pri liečbe epilepsie) a fenobarbital. Medzi polutanty z prostredia patria napríklad ftaláty a perfluorooktanová kyselina (PFOA), ester kyseliny ftalovej (DEHP), perfluorodekanová kyselina (PFDA), perfluorooktansulfonát (PFOS). Medzi exogénne ligandy PPAR α je ešte možné zaradiť kyselinu arachidonovú, Indometacín (nesteroidné protizápalové liečivo), dehydroepiandrosterón (steroidní hormon produkovaný vo veľkej miere nadobličkami), Telmisartan (metabolicky neutrálne antihypertenzívum) a mnohé ďalšie (Vanden Heuvel & Peters, 2010). Štruktúry vybraných syntetických ligandov PPAR α sú uvedené v Obrázku 3.

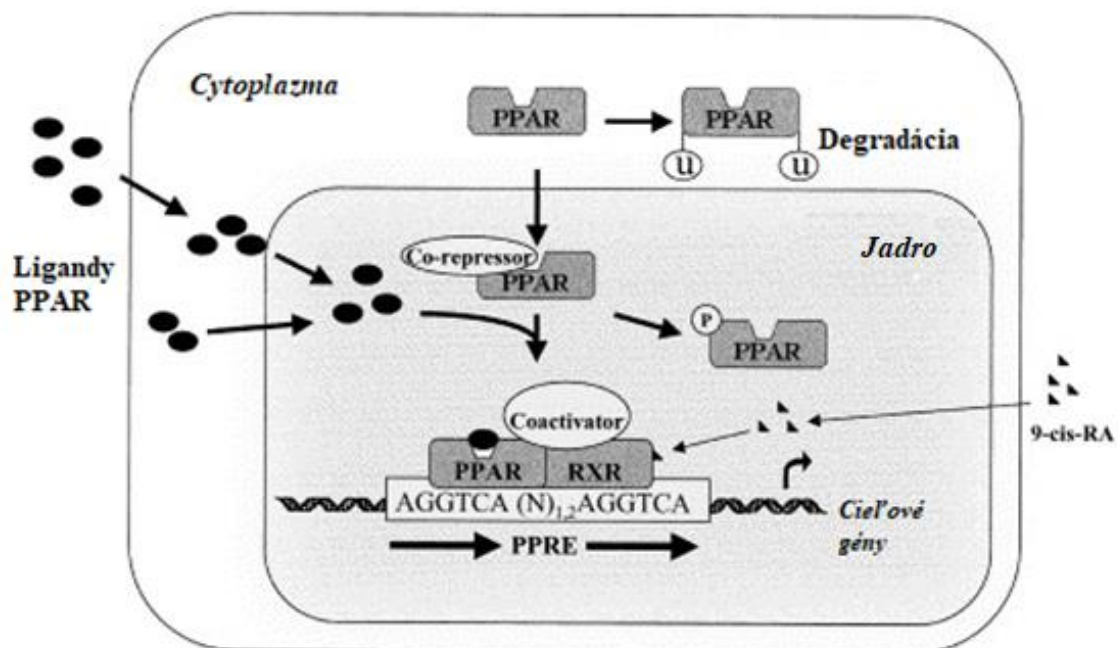


Obrázok 3 Štruktúry syntetických ligandov PPAR α - fenofibrát, WY-14643, gemfibrozil a kľofibrát.

2.1.5 Mechanizmus aktivácie transkripcie prostredníctvom PPARs

Všetky tri izoformy PPARs (PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ) zdieľajú rovnaký molekulárny mechanizmus účinku prostredníctvom tvorby heterodiméru s receptorom RXR (Rakhshandehroo et al., 2010). Receptor RXR je významným členom super rodiny jadrových receptorov (NRs, nuclear receptors), ktorý funguje prostredníctvom homodimerizácie so sebou samým alebo s ďalšími jadrovými receptormi. Zároveň zastáva funkciu transkripčného faktora, ktorý sa podieľa na vývoji, bunkovej diferenciácii, metabolizme a bunkovej smrti (Dawson & Xia, 2012). Proces transkripcie začína

naviazaním endogénneho alebo exogénneho ligandu na receptor PPAR. Dochádza k fosforylácii PPAR v cytoplazme a k uvoľneniu korepresorových proteínov (Dowell et al., 1999; Pyper et al., 2010) ako napríklad korepresorov jadrových receptorov (NCoR, nuclear receptor corepressors), históndeacetylázy (HDAC), supresoru dráhy G-proteínu 2 (GPS2, G - protein pathway suppressor 2) a SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) (Dowell et al., 1999; Pyper et al., 2010), ktoré zastávajú úlohu v inhibícii expresie cieľových génov. Následne dochádza k translokácii komplexu receptor-ligand do jadra bunky, kde dochádza k tvorbe heterodiméru s retinoidným X receptorom (RXR) (Desvergne & Wahli, 1999). K aktivácii retinoidného X receptoru dochádza pomocou endogénneho agonistu – kyseliny 9-cis-retinovej (Berger & Moller, 2002). Heterodimér PPAR/RXR sa naviaže do oblasti elementu peroxizálnej proliferáčnej odpovede PPRE, ktorý sa nachádza v promotorovej oblasti cieľových génov (Dowell et al., 1999; Pyper et al., 2010). Element PPRE pozostáva z dvoch kópií konsenzuálnej hexamérnej sekvencie AGG(A/T)CA s medzerou jedného nukleotidu DR-1 (Kota et al., 2005). Na heterodimér PPAR/RXR sa viaže RNA polymeráza II. a koaktivátory ako napríklad koaktivátor PPAR (PGC-1), histonacetyltransferáza p300 a koaktivátor steroidného receptoru (SRC-1) (Dowell et al., 1999). Koaktivátory disponujú histonacetyltransferázovou (HAT) aktivitou, ktorá je schopná remodelovať štruktúru chromatinu a zvýšiť tak transkripciu cieľových génov. (Berger & Moller, 2002). Zároveň obsahujú motív LXXLL (L - leucín, X - iná aminokyselina) a viažu sa do hydrofóbnej štrbiny na povrchu nukleárných receptorov. Tvorba aktivačného komplexu PPAR vedie k modifikácii histónov prostredníctvom acetylácie a dochádza k zmene expresie génov zahrnutých v metabolizme mastných kyselín, homeostázy tukov a diferenciacii adipocytov (Pyper et al., 2010). Heterodimér PPAR/RXR je schopný prijať komplex korepresorových proteínov a inhibovať tak transkripciu cieľového génu (DiRenzo et al., 1997). Schématické znázornenie účinku PPAR je zobrazené na Obrázku 4.



Obrázok 4 Schématické znázornenie účinku PPAR. Po naviazaní exogénneho (lieky) alebo endogénneho ligandu (mastné kyseliny, prostaglandíny atd.) dochádza k uvoľneniu korepresorov, napojeniu koaktivátorov a k tvorbe heretodiméru s RXR. Komplex PPAR/RXR sa viaže na PPRE. Aktivita PPAR je zároveň kontrolovaná degradáciou proteínu a fosforyláciou. PPRE - element peroxizálnej proliferačnej odpovede, RA- kyselina 9-cisretinová, RXR- retinoidný X receptor, u - ubiquitin. (upravené podľa Kota et al., 2005)

2.1.6 Cieľové gény PPAR α

PPAR α riadi biologické procesy zmenou expisie veľkého počtu cieľových génov. Štúdie naznačujú, že existujú stovky cieľových génov PPAR α (Kersten, 2014). Vplyv PPAR α na reguláciu génov je závislý na tom, či je PPAR α aktivovaný farmakologicky, fyziologicky alebo nutrične. Syntetické ligandy PPAR α – fibráty sa viažu v porovnaní s mastnými kyselinami na receptor lepšie. Zároveň pravdepodobne spôsobujú aj miernu konformačnú zmenu v proteíne PPAR α , čo spolu vedie k zmenenej a všeobecne silnejšej indukcii cieľových génov fibrátmi (Sanderson et al., 2008). Ukázalo sa, že fibráty ovplyvňujú expresiu génov prostredníctvom interakcie s receptorom PPAR α a prostredníctvom aktivácie PPAR α (Schoonjans et al., 1996). PPAR α stimuluje katabolizmus mastných kyselín na viacerých úrovniach. PPAR α ovplyvňuje transport mastných kyselín a cholesterolu v plazme tým, že zasahuje do metabolizmu lipoproteínov. PPAR α zvyšuje transkripciu apolipoproteínov A1 a A2 a preto zasahuje do reverzného transportu cholesterolu sprostredkovaného lipoproteínmi s vysokou hustotou (HDL, high

density lipoproteins) (Vu-Dac et al., 1994; Vu-Dac et al., 1995). Apolipoproteín A1 je hlavným apolipoproteínom HDL a zohráva dôležitú úlohu v reverznom transporte cholesterolu z periférnych buniek. Medzi gény zahrnuté v metabolizme lipidov a metabolizme lipoproteínov u ľudí a regulované receptorom PPAR α patria okrem APOA1 (apolipoproteín A1) a APOA2 (apolipoproteín A2) aj APOA5 (apolipoproteín A5). Aktivácia PPAR α ďalej stimuluje expresiu lipoproteínovej lipázy (LPL) (Schoonjans et al., 1996), ktorý sa podieľa na hydrolýze triglyceridov prítomných v lipoproteínoch s veľmi nízkou hustotou (VLDL, very low density lipoproteins) a stimuluje príjem lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL, low density lipoproteins). PPAR α inhibuje expresiu apolipoproteínu C3 v pečeni čo má dôsledok na zvýšenie aktivity LPL (Neve et al., 2000). V srdci PPAR α reguluje gény zodpovedné za príjem mastných kyselín a ich oxidáciu čoho sa dosiahne prostredníctvom zníženia oxidácie mastných kyselín a inhibície LPL (Carroll & Severson, 2001). Agonisti PPAR α zároveň stimulujú bunkový príjem mastných kyselín prostredníctvom zvýšenia expresie transportného proteínu mastných kyselín (FATP, Fatty-Acid Transport Protein) a translokázy mastných kyselín (FAT, Fatty-acid translocase) (Motojima et al., 1998).

I keď je PPAR α prevažne spájaný s metabolizmom mastných kyselín, štúdie na myšiach ukázali, že PPAR α sa podieľa aj na metabolizme glukózy v pečeni (Rakhshandehroo et al., 2010). Medzi gény zahrnuté v glukoneogenéze, ktoré boli identifikované ako cieľové gény PPAR α , patria fosfoenolpyruvátcarboxykináza 1 (Pck1, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1), pyruvátcarboxyláza (Pcx, Pyruvate carboxylase) a laktát dehydrogenáza. PPAR α zohráva úlohu v metabolickej konverzii glycerolu v pečeni prostredníctvom priamej upregulácie expresie génov ako napríklad Gpd1, Gpd2, Gyk, Aqp3, a Aqp9 (Patsouris et al., 2004). Okrem regulácie produkcie glukózy môže PPAR α tiež meniť využitie glukózy v mnohých tkanivách indukciou izoformy 4 pyruvátdehydrogenázykinázy 4 (Pdk4) (Wu et al., 2001).

Nedávne výskumy potvrdzujú rolu PPAR α v regulácii metabolizmu aminokyselín a močoviny (Kersten et al., 2001). Štúdie na myšiach ukázali že PPAR α riadi metabolizmus aminokyselín prostredníctvom potlačenia expresie génov zahrnutých v procese transaminácie (aspartátaminotransferáza (Got1), alanínaminotransferáza (Gpt), alanínglyoxylátaminotransferáza (Agtx2)) a deaminácie (glutamináza (Gls)), rovnako ako aj génov, ktoré sú súčasťou močovínového cyklu (Cps1, Otc, Ass1 a Asl) (Kersten et al., 2001).

Okrem regulácie početných metabolických ciest, PPAR α sa tiež podieľa na riadení zápalových procesov a to downreguláciou génovej expresie prostredníctvom mechanizmu, ktorý sa všeobecne nazýva ako transrepresia (Rakhshandehroo et al., 2010). Medzi špecifické gény downregulované pomocou PPAR α zúčastňujúce sa akútnej fázy zápalovej odpovede patria napríklad fibrinogén, sérová amyloidná P-zložka, lipokalín 2, metalotioneíny a sérový amyloid A2, u ktorých sa ukázalo, že sú potlačené vplyvom agonistu PPAR α WY-14643 u myši (wild type) (Stienstra et al., 2007). Podobný vplyv má liečba fenofibrátom na ľudí, kedy dochádza k zníženiu niekoľkých proteínov akútnej fázy v plazme zahŕňajúc C-reaktívny proteín, fibrinogén α , fibrinogén β , a interleukín 6 (Gervois et al., 2001).

Detoxikácia endogénnych a exogénnych molekúl z organizmu sa všeobecne delí na tri fázy biotransformácie. Reakcie prvej fázy zahŕňajú zavedenie polárnej skupiny do molekuly xenobiotika a následnú katalýzu prostredníctvom členov superrodiny cytochrómu P450 (Rushmore & Kong, 2002). Enzýmy II. fázy sú zodpovedné za kovalentné spojenie absorbovaných látok alebo produktov z fázy I. s látkami ako napríklad glutatión, kyselina glukuronová alebo aminokyseliny. Druhá fáza je sprostredkovaná pomocou enzýmov sulfotransferáz, UDP-glukuronozyltransferáz (UGTs), glutatión S-transferáz (GSTs) a N-acetyl transferáz (Rushmore & Kong, 2002). Tretia fáza pozostáva z eliminácie konjugovaných molekúl z buniek a z ich exkrécie do žlče alebo moču prostredníctvom špecifických transportérov, ktoré prevažne patria do superrodiny ATP-viažúcich kaziet (Bock, 2003). Štúdie ukazujú, že peroxizómové proliferátory modulujú Cyp4a triedu monooxygenáz (zahrnutú v metabolizme biologicky dôležitých zložiek ako napríklad mastné kyseliny) u myši, zatiaľ čo u ľudí regulujú ďalšie CYP gény v hepatocytoch ako napríklad podrodiny CYP1A, CYP2A, CYP2C, a CYP2E (Rakhshandehroo et al., 2009). Gény ako napríklad Cyp2a5, Cyp2c11, Cyp2c12, a Cyp2c29, zahrnuté v prvej fáze biotransformácie sú downregulované prostredníctvom PPAR α u myši (Barclay et al., 1999). Pokiaľ ide o druhú fázu biotransformácie, bolo preukázané, že PPAR α downreguluje glutatión S-transferázu A (GSTA), čo pravdepodobne vedie k zníženiu exkrécie glutatiónových konjugátov žlčou (Voskoboinik et al., 1996). Expresia UDP-glukuronozyltransferázy 1A (Ugt1a9), ktorá sa spolu s ďalšími UGT enzýmami podieľa na glukoronidácii bilirubínu, kyseliny arachidonovej a metabolitov kyseliny linoleovej je priamo stimulovaná PPAR α (Barbier et al., 2003). Celkovo je zrejmé, že PPAR α je hlavným regulátorom biotransformačných enzýmov a

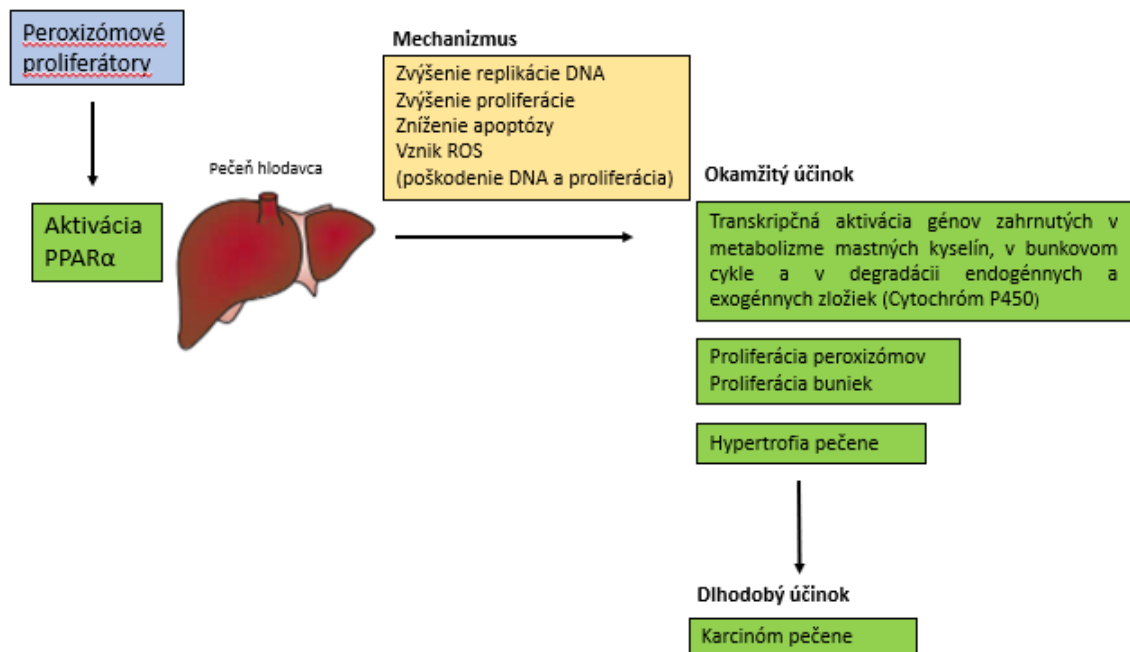
riadi expresiu mnohých cytochrómov P450 a konjugujúcich enzýmov (Rakhshandehroo et al., 2010).

2.2. Rola PPAR α v diferenciácii a karcinogéze

Každý z izotypov PPAR je v istej miere asociovaný s procesom karcinogenézy (Michalik et al., 2004). PPARs sprostredkovávajú účinky mastných kyselín a ich derivátov na transkripčnej úrovni. Prostredníctvom týchto ciest môžu PPARs regulovať proliferáciu, diferenciáciu a prežitie buniek, a tak kontrolovať karcinogézu v rôznych tkanivách. Rastúce dôkazy naznačujú, že každý z troch izotypov zohráva úlohu vo vývoji nádorov v rôznych tkanivách, či už pôsobí škodlivo alebo prospešne (Michalik et al., 2004).

Peroxisómové proliferátory (PPs) sú chemicky nepríbuzné molekuly, ktoré zahŕňajú prirodzene sa vyskytujúce steroidy a lipidy, ako aj xenobiotiká, ako sú fibráty, ftaláty, pesticídy a rozpúšťadlá. Lock et al. vo svojej štúdií opisuje, že dlhodobá aktivácia PPAR α prostredníctvom peroxisómových proliferátorov spúšťa rozvoj rakoviny pečene u hlodavcov. Čo zahŕňa hypertrofiu a hyperpláziu pečene, proliferáciu peroxisómov, aktiváciu transkripcie a zvýšenú aktivitu enzýmov, ktoré sú zahrnuté v metabolizme mastných kyselín (Obrázok 5). V prípade myši, u ktorých došlo k cieľnému narušeniu génu pre PPAR α , bolo zistené, že pri podaní fibrátov (klofibrát a WY-14643) nenastal rozvoj karcinómu pečene a teda bolo potvrdené, že práve PPAR α sa podieľa na sprostredkovaní rozvoja karcinómov pečene u myši (Lee et al, 1995). V náväznosti na to, PPs indukujú replikáciu DNA a proliferáciu v hepatocytoch (Isenberg et al., 1997) spôsobom závislým na PPAR α (Peters et al., 1997). Účasť PPAR α na represii apoptózy prostredníctvom PPs je indikovaná použitím dominantného negatívneho proteínu PPAR α , ktorý tento účinok eliminuje pri transfekcii do primárnych hepatocytov potkanov (Roberts et al., 1998). Dôkazy naznačujú, že produkcia reaktívnych druhov kyslíka (ROS, reactive oxygen species) ako vedľajších produktov β -oxidačných reakcií, ktoré by mohli poškodiť DNA a podporovať proliferáciu hepatocytov, sa tiež podieľa na hepatálnej karcinogéze sprostredkovanej agonistami PPAR α (Yeldandi et al., 2000; Rusyn et al., 2000). Ďalšie štúdie ukazujú, že je potrebná aktivácia PPAR α a tá je aj príčinou nepriaznivých účinkov PPs na pečeň hlodavcov (Corton et al., 2000). Základné mechanizmy pravdepodobne zahŕňajú poruchu bunkového cyklu a produkciu reaktívnych druhov kyslíka v hepatocytoch (Boitier et al., 2003). V súčasnosti sú ľudia takmer neustále vystavených PPs - buď prostredníctvom liečby fibrátmi (hypolipidemikami), alebo kontaktom so všade

prítomnými pesticídmi. Avšak živočíšne druhy, odlišné od potkanov a myší, nevykazujú taký rozsah odpovede na PPs ako je to napríklad u hlodavcov (Corton et al., 2000). Epidemiologické štúdie nepreukázali významnú proliferáciu peroxizómov v pečeni pacientov, ktorí boli liečení hypolipidemikami (Corton et al., 2000; Boitier et al., 2003) a štúdie využívajúce bunkové kultúry naznačujú, že ľudské bunky vykazujú zníženú transkripčnú odpoveď na aktiváciu PPAR α v porovnaní s potkanmi (Scotto et al., 1995). Skoršie štúdie uvádzajú, že ľudské hepatocyty exprimujú iba 1–10% množstva PPAR α , ktoré bolo kvantifikované v hepatocytoch hlodavcov (Palmer et al., 1998). Avšak novšie štúdie (Rakhshandehroo et al., 2010) rozdiel medzi množstvom PPAR α v ľudských a myších hepatocytoch nepreukázali.



Obrázok 5 Dôsledky a mechanizmus aktivácie PPAR α prostredníctvom peroxizómových proliferátorov v pečeni hlodavca. Upravené podľa Michalik et al., 2004.

V štúdiách bolo zistené, že v nádorových bunkách dochádza k expresii PPAR α (Collett et al., 2000; Suchanek et al., 2002) a zároveň, že ligandy PPAR α sú schopné potlačiť rast niektorých rakovinových bunkových línií vrátane hrubého čreva, prsníkov, sliznice maternice (endometria) a kože *in vitro* (Maggiore et al., 2004; Saidi et al., 2006; Panigrahy et al., 2008). Ligandy PPAR α tiež potláčajú metastatický potenciál buniek melanómu *in vitro* a *in vivo* (Grabacka et al., 2004; Grabacka et al., 2006). Ligandy PPAR α ďalej znižujú vývoj nádoru pri karcinogéze hrubého čreva u myší (Tanaka et al., 2001).

Najnovšie, bolo zistené, že agonista PPAR α WY-14643 potláča tumorogézu spôsobom závislým od PPAR α (Pozzi et al., 2007). V náväznosti na predchádzajúce štúdie je zrejmé, že ligandy PPAR α by mohli hrať dôležitú úlohu ako protirakovinové činidlá (Panigrahy et al., 2008). Expresia PPAR α je prítomná nie len u nádorových buniek ale zároveň u endotelových buniek a zápalových imunitných buniek (Berger & Moller, 2002). Ligandy PPAR α môžu inhibovať proliferáciu a migráciu endotelových buniek a indukovať ich apoptózu *in vitro* (Goetze et al., 2002; Varet et al., 2003). Zároveň, ligand PPAR α – fenofibrát (používaný k liečbe hyperlipidémií pri minimálnych vedľajších účinkoch (Panigrahy et al., 2008)) redukuje angiogézu a zápal u prasačieho modelu (Kasai et al., 2006) a znižuje hladinu vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGF, Vascular endothelial growth factor) u pacientov s hyperlipidémiou a aterosklerózou (Blann et al., 2001), ktorý slúži ako kľúčový mediátor pri procese vzniku a formovaní nových krvných ciev.

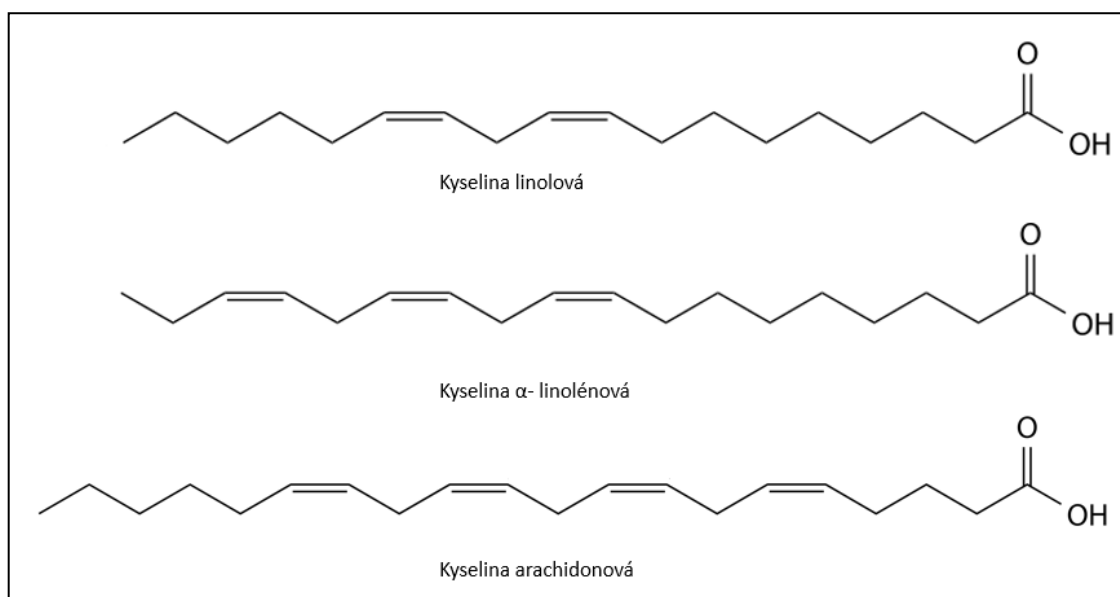
Na druhej strane, Suchanek et al. zistil, že u bunkových línií rakoviny prsníka (MCF7 a MDA-MB-231) dochádza k expresii PPAR α a navyše, že PPAR α je na úrovni mRNA dynamicky regulovaný, a že aktivácia receptora vyvoláva proliferáciu buniek bunkových línií rakoviny prsníka vplyvom pôsobenia ligandov PPAR α . PPAR α sa tiež exprimuje v mliečnych žľazách potkanov a myší (Roberts-Thomson et al., 2000). Zatiaľ čo mRNA a proteín PPAR α sa exprimujú v epitelových bunkách mliečnej žľazy normálnych potkanov, v karcinómoch mliečnych žliaz sa pozoruje významné zvýšenie expresie mRNA PPAR α , čo zvyšuje pravdepodobnosť, že PPAR α má úlohu v karcinogéze prsných žliaz (Roberts-Thomson et al., 2000). Pri výskume efektu fibrátov na proliferáciu u bunkovej línie MCF7 (bunková línia odvodená od karcinómu prsníka) bolo zistené, že získané výsledky sú závislé na koncentrácii fibrátov. Pri nízkych koncentráciách fibrátov bol pozorovaný nárast bunkovej proliferácie, zatiaľ čo u vyšších koncentrácií fibrátov došlo k zníženiu proliferačnej aktivity buniek (Tauber et al., 2019). Totožné výsledky boli dosiahnuté pri štúdiu zameranej na efekty rozdielnych koncentrácií fibrátov na proliferáciu bunkových línií HEK293, HepG2 a HT-29, kedy bolo zistené, že vplyvom nízkych koncentrácií fibrátov dochádza k zvýšeniu proliferácie buniek, zatiaľ čo vplyvom vyšších koncentrácií fibrátov dochádza k potlačeniu ich proliferácie (Čížková et al., 2016).

Doposiaľ bolo popísané veľké množstvo účinkov PPAR α na nádorové bunky (Lock et al., 1989; Suchanek et al., 2002; Grabacka et al., 2004). Z tohto dôvodu ostáva presná úloha PPAR α a jeho ligandov v rakovinových procesoch nejasná.

2.3. Metabolizmus kyseliny arachidonovej

2.3.1. Charakteristika kyseliny arachidonovej

Kyselina arachidonová (5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina; AA- arachidonic acid) je ω -6-polynenasýtená masťná kyselina, ktorá je tvorená 20 uhlíkmi a 4 dvojitémi väzbami. Do tela sa dostáva prostredníctvom potravy, alebo dochádza k jej syntéze z iných esenciálnych masťných kyselín (kyseliny linolovej a kyselina α -linolénovej). Chemická štruktúra AA, kyseliny linolovej a kyselina α -linolénovej je znázornená v Obrázku 6.



Obrázok 6 Štruktúra kyseliny linolovej, kyselina α -linolénovej a kyseliny arachidonovej.

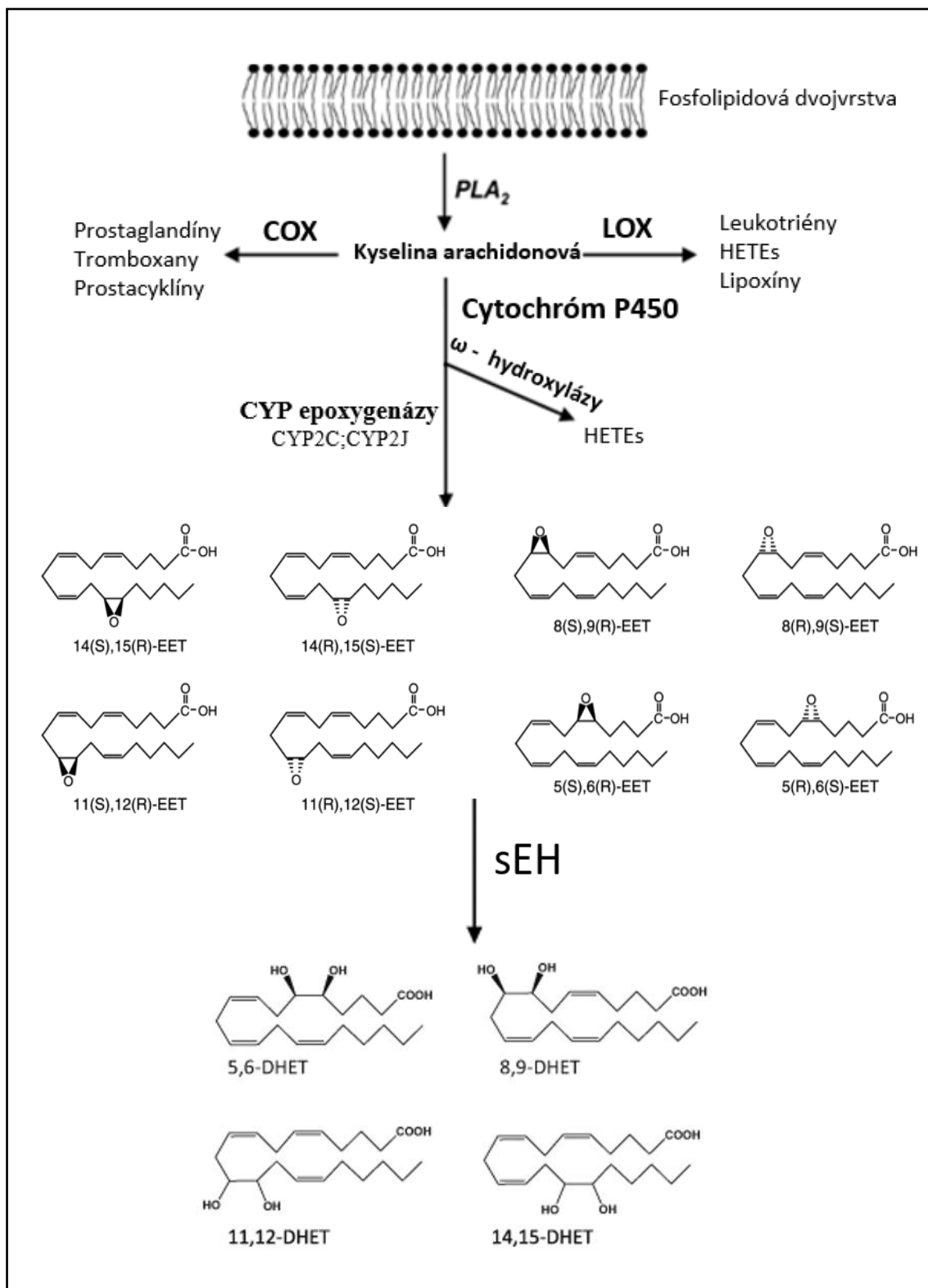
Kyselina arachidonová sa získava z potravín živočíšneho pôvodu (exogénny zdroj) ako napríklad hydina, vnútornosti, ryby, morské plody a vajcia (Abedi & Sahari, 2014). Kyselina linolová sa naopak vyskytuje v olejoch rastlinného pôvodu ako napríklad olej zo sóje, kukurice, slnečnice poprípade aj v oleji z vlašských orechov (Zock et al., 2016). Pri normálnych podmienkach je prevažná časť kyseliny arachidonovej viazaná vo fosfolipidovej membráne buniek, pričom koncentrácia voľnej AA je nízka. Intracelulárne hladiny AA sú kontrolované prostredníctvom série reakcií, kedy dochádza k uvoľneniu AA z fosfolipidovej membrány prostredníctvom cytozolovej formy fosfolipázy A2 (Hughes-Fulford et al., 2005). Expresia a aktivácia fosfolipázy A2 (PLA2) môže byť dôsledkom odpovede organizmu na rôzne bunkové aktivačné signály, ako napríklad väzba tumor nekrotizujúceho faktora α (TNF- α) na jeho receptor P75 a P55 čo indukuje uvoľňovanie kyseliny arachidonovej z fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu (Jayadev et al., 1994).

Voľná AA sa zároveň môže difundovať do iných buniek, znovu sa zapracovať do fosfolipidov, alebo metabolizovať v organizme (Hanna & Hafez, 2018). Po uvoľnení kyseliny arachidonovej z fosfolipidovej membrány dochádza k jej premene na biologicky aktívne molekuly lipidovej povahy - eikosanoidy. Štyri *cis* dvojité väzby nachádzajúce sa v molekule AA sprostredkujú jej tendenciu reagovať s molekulárnym kyslíkom pôsobením troch typov oxygenáz : cyklooxygenázy (COX), lipooxygenáza (LOX) a cytochrómu P450 čo vedie k tvorbe rôznych typov eikosanoidov (Tallima & Ridi, 2018).

2.3.2. Enzýmy metabolizujúce kyselinu arachidonovú

Produkty metabolizmu kyseliny arachidonovej (eikosanoidy), vrátane prostaglandínov a leukotriénov, sa vytvárajú rôznymi enzymatickými systémami iniciovanými cyklooxygenázou a lipoxygenázou.

Existuje však ďalšia významná enzymatická cesta, pre ktorú je substrátom kyselina arachidonová: systém cytochrómu P450 (CYP P450). Systém CYP P450 je komplexná skupina enzýmov, ktorá pozostáva z viac ako 102 zjavne funkčných génov u myši a len z 57 génov u ľudí (Wang et al., 2004). Enzýmy cytochrómu P450 sa prevažne nachádzajú v pečeni ale zároveň sa nachádzajú aj v ostatných tkanivách tela. Systém CYP P450 pozostáva z dvoch hlavných častí: z ω -hydroxyláz, ktoré premieňajú AA na hydroxyeikosateraénové kyseliny (HETE) a z epoxygenáz, ktoré konvertujú AA na epoxyeikosatriénové kyseliny (EETs)(Panigrahy et al., 2013). ω -hydroxylázy sú kódované génmi CYP4A a CYP4F a premieňajú AA na 12-HETE, 19-HETE a 20-HETE. Kyselina 20-hydroxyekosateraénová je hlavnou izoformou tejto dráhy a vykazuje vazokonstrikčnú aktivitu (Hardwick et al., 1987). Epoxygenázy sú kódované prevažne génmi CYP2C a CYP2J a premieňajú AA na EETs, ktoré naopak preukázali vazodilatačné vlastnosti (Zeldin, 2001). EETs sa potom následne metabolizujú hlavne rozpustnou epoxidhydrolázou (sEH) na kyseliny dihydroxyeikosatriénové (DHET) (Obrázok 7), ktoré sa tradične považujú za menej aktívne ako EET (Panigrahy et al., 2010).



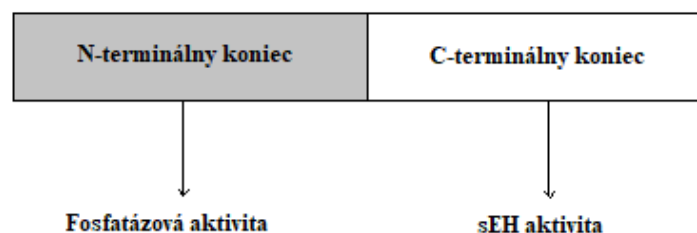
Obrázok 7 Premena kyseliny arachidonovej na epoxyeikosatriénové kyseliny (EETs) a následne na dihydroeikosatriénové kyseliny (DHET). Kyselina arachidonová je uvoľnená z fosfolipidovej dvojvrstvy prostredníctvom fosfolipázy A2 (PLA2). CYP epoxygenázy metabolizujú kyselinu arachidonovú na EETs. EETs sú následne metabolizované solubilnou epoxidhydrolázou (sEH) na DHETs.

K premene kyseliny arachidonovej na EETs dochádza vplyvom CYP epoxygenáz (hlavne podrodín CYP2C a CYP2J). Vznikajú štyri regioizoméry EETs: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET (Spector et al., 2004). Každý z regioizomérov môže byť vytvorený ako enantiomér R, S, alebo S, R, pretože epoxidová skupina sa môže viazať na každú z dvojitých väzieb v dvoch samostatných konfiguráciách, čo vedie k celkom k vzniku ôsmich EETs. CYP epoxygenáza vkladá atóm kyslíka na uhlík pripojený k jednej z dvojitých väzieb kyseliny arachidonovej a dvojitá väzba sa redukuje za tvorby epoxidu (Spector et al., 2009). Každá CYP epoxygenáza produkuje niekoľko regioizomérov EETs, pričom obvykle prevažuje jedna forma. Izoforma enzýmu CYP2C8 tvorí 14,15- a 11,12-EETs v pomere 1,3 : 1,0 (Zeldin et al., 2001). CYP2C9 produkuje regioizoméry 14,15-, 11,12-, a 8,9-EETs v pomere 2,3 : 1,0 : 0,5, zatiaľ čo izoforma CYP2J2 tvorí 5,6-, 8,9-, 11,12-, a 14,15-EETs s rovnakou účinnosťou (Wu et al., 1996).

Okrem CYP2C a CYP2J môžu EET v rôznych tkanivách a u rôznych druhov produkovať aj ďalšie CYP epoxygenázy. Táto aktivita bola preukázaná u CYP1A2 a CYP2B6 (Roman, 2002). Nedávna štúdia pripúšťa možnosť, že CYP2C8 je hlavná epoxygenáza exprimovaná v ľudskej pečeni (Zeldin et al., 1996). Vyšlo najavo, že CYP2J2 pôsobí ako jeden z hlavných enzýmov zahrnutých v tvorbe EETs v extrahepatálnych tkanivách u ľudí (Wu et al., 1996; Zeldin et al., 1997). Jeho expresia bola potvrdená v myocytoch, proximálnom tubule, zberných kanálikoch v obličkách, v pankrease, v pľúcach v tenkom čreve a v hrubom čreve (Wu et al., 1996; Roman, 2002). CYP2J2 slúži zároveň ako primárny enzým katalyzujúci tvorbu EETs v srdci, pričom EET znižujú srdcovú kontraktilitu inhibíciou otvárania sodíkových kanálov (Lee et al., 1999) a kalciových kanálov L-typu (Chen et al., 1999). EETs sú biologicky viac aktívne molekuly v porovnaní s DHETs a v organizme sa podieľajú na mnohých funkciách. Shen et al. skúmal podporný účinok EET na proliferáciu nádorových buniek. Štyri nádorové bunkové línie Tca-8113, A549, Ncl-H446 a HepG2 boli ovplyvnené rozdielnymi koncentraciami EETs (8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET). Bolo zistené, že u všetkých troch bunkových línií došlo k zvýšeniu úrovne proliferácie nádoru v porovnaní s kontrolnou skupinou. Ako silnejšie stimulatory proliferácie pôsobili 11,12-EET a 14,15-EET v porovnaní s 8,9-EET. Bol zároveň objasnený mechanizmus zodpovedný za proliferáciu, kedy došlo k zvýšeniu fosforylácie ERK1/2 a PI3K (Shen et al., 2008). Štúdie naznačujú, že EET zohrávajú rozhodujúcu úlohu pri endoteliálnej proliferácii, migrácii a angiogenéze. Zistilo sa, že exogénne pridanie EET a nadmerná expresia CYP epoxygenáz inhibuje apoptózu endotelových buniek a indukuje proliferáciu endotelových buniek a angiogénu

prostredníctvom mechanizmu zahrňajúceho ako aktiváciu dráh ERK a PI3K / Akt, tak aj transaktiváciu EGFR (Yan et al., 2008). Okrem zvýšenia proliferácie buniek EET regulujú zároveň procesy potenciálne relevantné pre vývoj, ako je napríklad uvoľňovanie intracelulárnych signálnych molekúl, aktivita proteinkináz a diferenciácia buniek. Ďalej sa zúčastňujú angiogenézy, majú protizápalové účinky a navyše ovplyvňujú regeneráciu tkanív a apoptózu (Spector et al., 2004; Shen et al., 2008). Wei et al. vo svojej štúdií zistil, že zvýšené hladiny EET (konkrétne regioizoméru 14,15-EET) v nádorových tkanivách rakoviny prs boli asociované s upreguláciou CYP epoxygenáz (CYP2C8, CYP2C9, CYP2J) a downreguláciou sEH čo bolo asociované s vyššou agresivitou nádoru u pacientov (Wei et al., 2014).

Epoxidhydrolázy (EC 3.3.2.3) sú skupinou enzýmov, ktoré premieňajú epoxidovú skupinu chemických zlúčenín na príslušné dioly za pomoci prídavku vody. Rozpustná (solubilná) epoxidhydroláza (sEH) je primárny enzým zodpovedný za konverziu EETs na zodpovedajúce DHETs. Aj napriek tomu, že sEH je prevažne lokalizovaná v cytozole buniek, enzymatická aktivita sEH a proteín sú tiež prítomné v peroxizómoch (Eriksson et al., 1991). U ľudí je sEH kódovaná génom EPHX2, ktorý sa nachádza na chromozóme 8 v pozícii 8p21.12. Mutácie génu EPHX2 sú asociované s familiárnou hypercholesterolémiou (Oni-Orisan et al., 2018). sEH je vo vyššej miere exprimovaná v pečeni, v menšej miere je exprimovaná v leukocytoch, červených krvinkách, bunkách hladkého svalstva, adipocytoch a v proximálnom tubule. V ľudskom mozgu je enzým široko distribuovaný, väčšinou v tele neurónov, ako aj v astrocytoch a oligodendrocytoch. Cicavčia sEH je homodimér a každá podjednotka obsahuje karboxylové- a amino-terminálne domény (Obrázok 8). Aktívne miesto pre hydrolyzu epoxidu sa nachádza v karboxylovej terminálnej doméne. Nedávne zistenia dokázali, že amino-terminálna doména sEH má fosfatázovú aktivitu (Cronin et al., 2003). Konverzia EETs na zodpovedajúce DHETs pomocou sEH je regioselektívna, 14,15-EET je preferovaným substrátom v porovnaní s 11,12- a 8,9-EET (Spector et al., 2004; Spector & Norris, 2007).



Obrázok 8 Bifunkčné domény sEH

Nedávne štúdie s bunkovými líniami ukazujú, že EETs majú pozitívny vplyv na cievny systém, srdce, obličky a nervový systém. Pričom inhibícia sEH zvyšuje prevažnú časť funkčných efektov EETs (Fang et al., 2001). V súčasnej dobe je preto kladený dôraz na inhibíciu sEH, ktorá by mohla slúžiť ako terapeutická stratégia na zvýšenie prospešných účinkov EETs. V náväznosti na to bolo zistené, že inhibícia sEH nie len zvyšuje, ale zároveň aj predlžuje funkčné efekty EETs (Spector et al., 2009). V prípade, že je konverzia EETs na DHET inhibovaná tak dochádza ku akumulácii EETs v bunkách. V dôsledku čoho sa zvyšuje dostupnosť EETs na inkorporáciu do fosfolipidov a na interakcie s iónovými kanálmi, signálnymi dráhami a transkripčnými faktormi (Spector et al., 2009). Doposiaľ nebola zistená žiadna esenciálna funkcia DHETs (Roman, 2002) a všeobecne sa predpokladá, že inhibícia sEH nie je škodlivá. Avšak Lu et al. kladie dôraz na to, že 11,12-DHET aktivuje Ca^{2+} aktivované draslíkové kanály s vysokou vodivosťou v koronárnych artériách myocytov a spôsobuje koronárnu vazodilatáciu. Navyše 14,15-DHET stimuluje PPAR α sprostredkovanú transkripciu v bunkách COS-7 - génového expresného systému (Fang et al., 2006). Inhibítory sEH boli pôvodne vyvinuté ako antihypertenzíva, ale najnovšie údaje naznačujú, že tiež bránia srdcovej hypertrofii, znižujú proliferáciu hladkých svalov ciev, zlepšujú hemodynamiku obličiek a znižujú hypertenzívne poškodenie obličiek (Xu et al., 2006; Ng et al., 2006; Huang et al., 2007)

2.3.3. CYP epoxygenázy a ich súvislosť s karcinogénou

Zmeny úrovne expresie a distribúcie enzýmov zapojených do biosyntézy eikosanoidov môžu mať výrazný vplyv na homeostázu tkanív a môžu prispieť k patogeneze mnohých chorôb. To môže byť zvlášť dôležité pri karcinogéze, kde zmeny expresie a aktivity enzýmov (COX a LOX) sa podieľajú na rôznych druhoch rakoviny u ľudí a hlodavcov (Shappell et al., 2003). Zatiaľ čo protektívne účinky CYP epoxygenáz na kardiovaskulárny systém boli predmetom rozsiahleho skúmania, úloha CYP epoxygenáz v nádorových procesoch je naďalej nedostatočne charakterizovaná (Chen & Wang, 2013).

Niekoľko laboratórií nedávno ukázalo, že kyselina arachidonová a metabolity CYP epoxygenáz hrajú významnú úlohu v zápalových procesoch a rakovine (Panigrahy et al., 2011; Chen & Wang, 2013). Bola zistená súvislosť medzi CYP epoxygenázami a nádorovým fenotypom (Jiang et al., 2005; Jiang et al., 2007; Panigrahy et al., 2012). Následná práca so syntetickými inhibítormi CYP epoxygenáz ukázala, že CYP epoxygenázy, najmä CYP2J2, môžu byť sľubným terapeutickým cieľom liečby rakoviny

(Chen et al., 2011; Pozzi et al., 2010). Hromadiace sa údaje ukázali, že gény CYP epoxygenáz môžu byť nielen asociované s rizikom rakoviny, ale zároveň sú tiež dôležitými faktormi tumorogenézy (Rodriguez-Antona et al., 2010).

Expresia CYP epoxygenáz bola v súvislosti s rakovinou skúmaná vo veľkom počte štúdií. Guengerich & Turvy zistili, že expresia CYP2C bola zvýšená v metastatických pečňových tkanivách v porovnaní s normálnymi pečňovými tkanivami. Zistilo sa, že dochádza k selektívnej expresii CYP2C9 epoxygenázy v cievach ľudských nádorov obličiek (Pozzi et al., 2010). Nedávno bola kvantitatívnou RT-PCR a imunohistochemickým farbením stanovená tkanivová distribúcia a úloha CYP2C8, 2C9, 2J2 a sEH v karcinogéze prsníka (Wei et al., 2014). Výsledky ukázali, že zvýšené hladiny EETs v tkanivách rakoviny prsníka boli spojené s upreguláciou CYP2C8, 2C9 a 2J2 a downreguláciou sEH, boli tiež spojené s agresívnym správaním buniek u pacientov s rakovinou prsníka (Wei et al., 2014). Hoci je málo známe o úlohe signalizácie CYP2C epoxygenázami v progresii rakoviny, objavujúce sa dôkazy naznačujú, že CYP epoxygenázy a metabolity, ktoré produkujú, sú zapojené do biológie nádorov (Chen & Wang, 2015). Priame úlohy CYP2 epoxygenáz boli prvý krát podrobené výskumu v roku 2005 kedy Jiang et al. zistil veľmi silnú a selektívnu expresiu CYP2J2 v tkanivách karcinómu u 101 zo 130 pacientov (77%), ako aj v 8 bunkových líniiach ľudského karcinómu. Avšak nedetekovateľné hladiny boli zistené u normálnych tkanív a nenádorových bunkových línii pomocou metódy Western blot, RT - PCR a imunohistochemického farbenia (Jiang et al., 2005). Nedávno bolo zistené, že EET sa podieľajú na mnohých procesoch, ktoré sú relevantné v patogenéze rakoviny vrátane regulácie intracelulárnych signálnych dráh, génovej expresie, proliferácie nádorových buniek a metastáz prostredníctvom aktivácie MAPK a PI3K / Akt dráh ako aj fosforylácie receptora epidermálneho rastového faktoru (EGFR, Epidermal growth factor receptor) (Cheng et al., 2010). Okrem toho metaloproteíny aktivované prostredníctvom EETs v rakovinových bunkách môžu viesť k EET-indukovanej transaktivácii EGFR, ktorá následne uvoľňuje proangiogénny faktor HB-EGF v rakovinových bunkových líniiach (Cheng et al., 2010). Tieto výsledky silne naznačujú, že CYP epoxygenáza 2J2 hrá doteraz neznámu úlohu pri propagácii neoplastického bunkového fenotypu a pri patogenéze rôznych typov rakoviny u ľudí (Chen & Wang, 2015). Neskôr sa zistilo, že nadmerná expresia CYP epoxygenázy alebo pôsobenie EETs podporovali metastázy nádoru nezávisle od účinkov na rast nádoru (Jiang et al., 2007). Navyše Jiang et al. zistil, že cieleňá nadmerná expresia CYP2J2 alebo pôsobenie EETs na bunkové kultúry Tca-8113 *in vitro* značne

urýchlili proliferáciu buniek a zároveň ochránili bunky pred apoptózou indukovanou tumor nekrotickým faktorom α (TNF- α) v bunkových líniiach. Bolo zároveň ukázané, že CYP2J2 a EET sú pozitívne regulátory proliferácie rakovinových buniek a inhibujú apoptózu. CYP2J2 podporuje tvorbu nádoru v *in vivo* u myšieho modelu a jeho expresia je zvýšená v použitých bunkových líniiach ľudského karcinómu. Navyše u buniek, u ktorých došlo k obmedzeniu apoptózy indukovanej TNF- α došlo k tomu, že sa u nich zvýšila expresia NF- κ B a antiapoptických proteínov Bcl-2 a Bcl-X a teda, že došlo k narušeniu rovnováhy medzi proapoptickými a antiapoptickými proteínmi (Jiang et al., 2005; Jiang et al., 2007). Spomenuté pozorovania naznačujú, že CYP2J2 podporuje neoplastický fenotyp rakovinových buniek a teda by mohol predstavovať nový biomarker a potenciálny cieľ pri liečbe rakoviny u ľudí (Jiang et al., 2005).

2.3.4. Lieková rezistencia u CYP epoxygenáz

Aj napriek tomu, že sa chemoterapia stala na prelome 60. a 70. rokov rovnocennou liečbou v porovnaní s chirurgickým zásahom a rádioterapiou tak ostáva stále v popredí problém týkajúci sa odhadu účinnosti cytostatickej liečby v liečbe nádorov a súčasnej miery toxicity pre pacienta (Nosková et al., 2000; Gottesman et al., 2002). Medzi jednu z najzávažnejších komplikácií, ktorá je spojená s použitím protinádorovej liečby a najdôležitejšiu príčinu jej zlyhania patrí samotná schopnosť nádorových buniek odolať účinkom cytotoxických látok. Zhubné populácie nádorových buniek môžu vykazovať rezistenciu voči chemoterapii už pri prvej liečbe, vtedy ide o primárnu (prirodzenú) rezistenciu. Na druhej strane sekundárna (získaná) rezistencia vzniká až v priebehu samotnej cytostatickej liečby, kedy sa pôvodne citlivé bunky stanú rezistentnými a tým pádom sa účinnosť cytostatickej liečby znižuje (Nosková et al., 2000). Ďalším možným prípadom je tzv. skrížená rezistencia kedy pri strate citlivosti k jednému prípravku vzniká súčasne rezistencia na iné, ale väčšinou štruktúrou podobné cytostatikum. V prípade, že dochádza k skríženej rezistencii medzi protinádorovými liekmi, ktoré sa odlišujú ako štruktúrou, tak zároveň aj mechanizmom účinku, vtedy ide o mnohopočetnú liekovú rezistenciu (MDR, multidrug resistance) (Nosková et al., 2000; Baguley, 2010).

Existuje množstvo štúdií, ktoré podrobne opisujú expresiu rôznych izoformiem cytochrómu P450 (CYP) v nádorovom tkanive. Niektoré z nich boli spomenuté v predchádzajúcej podkapitole 2.3.3. CYP2C8 a CYP3A4, ktoré sú známe tým, že

metabolizujú protinádorové lieky, boli medzi tými, ktoré sa exprimujú v nádoroch a navyše bolo zistené, že zohrávajú úlohu pri predpovedaní cytotoxicity liekov (Dhaini et al., 2003). CYP epoxygenázy sú druhou najdôležitejšou skupinou enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii liekov. Metabolizujú približne 20-30% klinicky využívaných liekov, zatiaľ čo CYP3A4 sa podieľa na biotransformácii 70-80% liekov (Zanger & Schwab, 2013). Podrodiny CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D a CYP3A sú zodpovedné hlavne za metabolizmus protinádorových liekov. Príklady protinádorových liekov a izoenzýmov, ktoré ich metabolizujú sú uvedené v Tabuľke 1. Je dobre známe, že aktivita CYP epoxygenáz je ovplyvnená niekoľkými faktormi vrátane genetických polymorfizmov, zmeny fyziologických podmienok ako je vek a chorobné stavy, príjem určitých liekov, potravín, alebo iné faktory ako je napríklad fajčenie (Wilkinson, 2005). Navyše, niekedy sú zároveň pozorované veľké interindividuálne rozdiely v expresii CYP epoxygenáz v hepatocytoch. Zmeny aktivity CYP epoxygenáz v dôsledku týchto faktorov môžu spôsobiť zmeny vo farmakokinetike protinádorových liekov (Rochat, 2005).

Tabuľka 1 Protinádorové látky ako substráty cytochrómu P450. CYP epoxygenázy zahrnuté v experimentálnej časti tejto diplomovej práce sú zvýraznené tučným písmom. Upravené podľa Scripture et al., 2005.

Protirakovinové látky	Izoenzýmy cytochrómu P450 zahrnuté v metabolizme
Bexarotene	2C9 , 3A4
Cyclophosphamide	2B6, 2C9 , 3A4
Idarubicin	2D6, 2C9
Ifosfamide	2A6, 2B1, 2B6, 2C9 , 2C18, 2C19, 3A4, 3A5
Imatinib	1A2, 2C9 , 2C19, 2D6, 3A4
Paclitaxel	2C8 , 3A4, 3A5
Tamoxifen	1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C9 , 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5
Tretinoin	2C8 , 2C9 , 2E, 3A4

2.4. Vzťah PPAR α , CYP epoxygenáz a solubilnej epoxidhydrolázy

V bunkovom jadre existujú špecifické receptory PPARs, ktoré regulujú expresiu niektorých génov a ktoré môžu sprostredkovať celý rad účinkov endogénnych aktívnych látok (napríklad steroidných poprípade tyroidných hormónov), ako aj niektorých xenobiotík (Soška, 2006). PPARs zodpovedajú za rozdielne úlohy v organizme hlavne

prostredníctvom väzby endogénnych ligandov, ktoré sa tvoria v metabolických procesoch (pri spracovaní mastných kyselín) a preto sú zároveň nazývané aj ako lipidové senzory (Grygiel-Górniak, 2014). Izoforma PPAR α sa podieľa na regulácii expresie enzýmov zahrnutých v metabolizme xenobiotík (I a II. fáza biotransformácie). V posledných rokoch bolo realizovaných niekoľko štúdií či už na zvieracích modeloch, alebo na ľudských bunkových líniiach, ktoré objasnili vzťahy medzi PPAR α , CYP epoxygenázami a sEH. Je známe, že ligandy PPAR α regulujú expresiu CYP epoxygenáz ako u hlodavcov tak aj u človeka avšak rozdielnym spôsobom.

CYP epoxygenázy a ich metabolity (napríklad. kyseliny epoxyeikosatriénové (EETs)) sú proangiogénne a zníženie ich biosyntézy pomocou ligandov PPAR α znižuje angiogénu a rast nádoru. Bolo zistené, že u myši s knockoutom génu *Cyp2c44* dochádza k značnej redukcii objemu nádoru, hmoty a vaskularizácie, pričom je známe, že myšia *Cyp2c44* je katalytickým homológom ľudských enzýmov CYP2C8 a 2C9. Myšia *Cyp2c44* tvorí regioizoméry 11,12- a 14,15-EET ako hlavné produkty je exprimovaná v endotelových bunkách a podlieha transkripčnej kontrole PPAR α (Pozzi et al., 2005; Pozzi et al., 2007; Pozzi et al., 2010). Za účelom štúdia úlohy receptoru PPAR α a jeho cieľového génu epoxygenázy *Cyp2c* pri tumorogéneze bol myšiam podaný syntetický fibrát WY-14643, ktorý výrazne znížil rast nádorov a ich vaskularizáciu. Navyše bola zistená znížená syntéza EETs u myši prostredníctvom zníženia expresie *Cyp2c44*. Pozorovaný efekt je teda závislý na PPAR α , pričom k nemu dochádza aj u myši, ktoré mali ľudský gén pre PPAR α (Pozzi et al., 2007; Pozzi et al., 2010). Indukcia expresie sEH (v pečeni a obličkách) u hlodavcov bola zase pozorovaná po liečbe s klofibrátom (Pinot et al., 1995). Expresia sEH mRNA je vysoko citlivá na ošetrovanie fibrátmi a WY-14643 (Kimura et al., 1989; Tollet et al., 1994; Pinot et al., 1995). Expresia sEH je upregulovaná aktiváciou PPAR α u hlodavcov. Hladiny sEH mRNA v pečeni myši sa zvýšili 8-krát po podaní klofibrátu- hypolipidemického lieku, ktorý spôsobuje peroxizomálnu proliferáciu. K zvýšeniu hladín sEH mRNA dochádza tiež v obličkách a srdci vplyvom pôsobenia klofibrátu (Johansson et al., 1995).

Prueksaritanont et al. pri štúdiu na ľudských hepatocytoch zistil, že pôsobením klofibrátu, fenofibrátu dochádza k indukcii expresie CYP2C8. Gemfibrozil zase pôsobil ako induktor a zároveň inhibítor u CYP2C8 (Prueksaritanont et al., 2005). Gemfibrozil zase inhiboval aktivitu CYP2C9 pri použití klinicky relevantných koncentrácií (Wen et al., 2001).

Kyselina arachidonová sa vplyvom CYP epoxygenáz metabolizuje na EETs, následne dochádza vplyvom sEH k premene EETs na DHETs, ktoré sú vo všeobecnosti menej biologicky aktívne molekuly v porovnaní s EETs (Ng et al., 2007). Nedávna štúdia dokázala, že EETs navyše pôsobia ako ligandy s vysokou afinitou pre PPAR α (Coward et al., 2002). Ng et al. ďalej demonštroval, že 11,12-EET, 14,15-DHET, and 20-HETE pôsobia ako účinné aktivátory PPAR α . Čo podporuje výsledky ďalšieho výskumu, kedy bolo zistené, že expresia CYP2J2 *in vitro* vedie k aktivácii PPAR α reakcií s osobitnou preferenciou pre PPAR α navyše, že produkty CYP2J2 8,9-EET a 11-12-EET tiež aktivujú PPAR α (Wray et al., 2009). V štúdiu pri ktorej boli využité potkanie hepatocyty (Ng et al., 2007) bolo zistené, že expresia CYP2C epoxygenáz, ktoré sú zodpovedné za tvorbu EETs, bola downregulovaná po aplikácii vyššej koncentrácie fibrátov. Eikosanoidy sa viažu na PPAR α , aktivujú ho a to vedie k modulácii expresie cieľových génov PPAR α . Navyše eikosanoidy indukujú expresiu sEH a CYP2C11 čo naznačuje, že môžu regulovať svoje vlastné hladiny (Ng et al., 2007). Vzhľadom na to, že eikosanoidy majú mnohopočetné kardiovaskulárne účinky, môže farmakologická modulácia ich tvorby poprípade degradácie priniesť terapeutické výhody (Wray et al., 2009).

2.5. Vybrané bunkové línie

Pri štúdiu diferencovaného statusu buniek je dôležité aby došlo k správne výberu bunkovej línie a to tak, aby boli zachované podobné podmienky ako sa nachádzajú v žijúcom organizme (Čížková et al., 2020). Kauffman et al. zistil, že po izolácii ľudských epiteliálnych buniek čreva si zachovávajú *in vivo* anatomické a biochemické charakteristiky avšak je zjavné, že dochádza obmedzeniu ich viability a navyše je podstatne ťažšie ich aj kultivovať. V návaznosti na predošlé zistenia, došlo k zvýšeniu používania imortalizovaných ľudských bunkových línií odvodených od adenokarcinómu hrubého čreva. Navyše 3D *in vitro* modely, nazývané organoidy, majú tiež schopnosť dlhodobého rastu a preto môžu byť tiež využívané. *In vitro* organoidné kultúry sú získané z kmeňových alebo progenitorových buniek. Vráťane schopnosti dlhodobého rastu majú taktiež schopnosť bunkovej diverzity a priestorovej organizácie špecifickej pre orgán, ktorý reprezentujú (Dedhia et al., 2016).

Bunkové línie, odvodené od kolorektálneho adenokarcinómu, Caco2 a HT-29 predstavujú cenný nástroj pri štúdiu bunkovej diferenciácie, zároveň je ich možné použiť aj pri výskume, ktorý sa týka stravy, farmakológie, toxikológie, alebo pri výskume

rakoviny. Vplyvom bežných podmienok kultivácie bunkových línií nedochádza k diferenciacii buniek, avšak vplyvom zmenených podmienok bunkové línie vykazujú znaky diferenciácie, ktoré sú prítomné u zrelých črevných buniek ako napríklad mucinóznych črevných buniek alebo enterocytov (Simon-Assmann et al., 2007; Čížková et al., 2020).

2.5.1. Bunková línia Caco2

Bunková línia Caco2 bola odvodená z relatívne dobre diferencovaného adenokarcinómu hrubého čreva. Caco2 spontánne podlieha typickej diferenciacii, ktorá je prítomná u enterocytov (Hara et al., 1993). V skorých štádiách rastu kultúry sú bunky nediferencované, no po dosiahnutí konfluencie tvoria polarizované monovrstvy buniek, ktoré sú medzi sebou spojené tesnými spojmi a prezentujú tak dobre vyvinuté apikálne mikrovili (Simon - Assmann et al., 2007). Aj napriek tomu, že je bunková línia Caco2 odvodená od dospelého ľudského hrubého čreva kde nie sú prítomné mikrovilárne hydrolázy, bunky Caco2 exprimujú disacharidázy a peptidázy, ktoré sú typické pre normálne bunky klkov tenkého čreva (Simon- Assmann et al., 2007). Zároveň sú zodpovedné za transport iónov a vody smerom k bazolaterálnej membráne (Pinto et al., 1983). Diferenciáciu u buniek Caco2 je možné indukovať pomocou induktorov diferenciácie, napríklad butyrátom sodným (Rickard et al., 1999). Fenotyp buniek diferencovaných post-konfluentným rastom a indukovaným butyrátom sodným sa ale líši (Mariadason et al., 2000; Čížková et al., 2020).

2.5.2. Bunková línia HT-29

Ľudská bunková línia adenokarcinómu HT-29 sa považuje za pluripotentnú črevnú bunkovú líniu, ktorá zároveň obsahuje bunky produkujúce mucín. Ukázalo sa, že bunky HT-29 majú veľmi vysokú mieru spotreby glukózy. V prítomnosti glukózy a v prítomnosti séra (klasické štandardné podmienky) sú bunky HT-29 nediferencované. Rastú ako viacvrstvové nepolarizované, nediferencované bunky a neexprimujú markery funkčných epitelových buniek. Avšak bunky HT-29 sú schopné exprimovať rôzne diferenciačné charakteristiky pod vplyvom zmien kultivačného média alebo induktorov diferenciácie ako je napríklad butyrát sodný (Rickard et al., 1999; Simon- Assmann et al., 2007).

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál

3.1.1. Bunkové línie HT-29 a Caco-2

Experimentálna časť diplomovej práce zahŕňa použitie dvoch bunkových línií HT-29 a Caco-2. Bunkové línie pochádzajú z American Type Culture Collection a boli odvodené od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu. Bunkové línie boli autentizované pomocou STR profilu na Ústave klinickej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

3.1.2. Protilátky použité pri metóde In-Cell ELISA a imunocytochemickom farbení PPAR α

K detekcii proteínu CYP2C8 a CYP2C9 bola použitá neznačená primárna králičia polyklonálna protilátka, ktorá bola riedená do Antibody diluentu. Ďalšími stanovovanými proteínmi boli CYP2J2 a EPHX2 (sEH), pri ktorých boli použité primárne myšie monoklonálne protilátky, riedenie bolo opäť prevedené za použitia Antibody diluentu. K vizualizácii receptora PPAR α pri imunocytochemickom farbení bola použitá primárna protilátka PPAR α riedená do DAKO antibody diluentu. Popis jednotlivých primárnych protilátok je znázornený v Tabuľke 2.

Tabuľka 2 Použité primárne protilátky, ich označenie, výrobca, pôvod, klonalita a riedenie. Mono- monoklonálna protilátka, Poly- polyklonálna protilátka.

Protilátka (označenie; výrobca)	Pôvod/klonalita	Riedenie protilátky v pomere
CYP2C8 (GTX 113666; GeneTex)	Králik/Poly	1:1000
CYP2C9 (AP14731PU-N; Acris Antibodies)	Králik/Poly	1:1500
CYP2J2 (NBP2-01178 (2A9); NovusBiologicals)	Myš/Mono	1:1000
EPHX2 (sEH) (GTX 84570 (1A6); GeneTex)	Myš/Mono	1:50
PPARα (GTX 28934; Gene Tex)	Králik/Poly	1:100

3.1.3. Prístrojové vybavenie

Centrifúga mini spin, Eppendorf (Nemecko)
Centrifúga MR 22i, Jouan SA (Francúzsko)
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
Spektrofotometer PowerWave XS , Biotek (Kanada)
Svetelný mikroskop BX 40, Olympus (Japonsko)
Tkanivový histoprocesor HISTOS PRO-RAPID MICROWAVE, Milestone Medical (Taliansko)
Viacrýchlostná centrifúga IEC CL 31R, Thermo Fisher Scientific (USA)
Vodná kúpeľ Julabo TW 8, Julabo Labortechnik (Nemecko)

3.1.4 Pomôcky

Automatické pipety eppendorf Research plus, Eppendorf (Nemecko)
Bürkerova počítacia komôrka, MEOPTA (USA)
Injekčná ihla100 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 pipetus-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)

3.1.5. Chemikálie

1-methylethyl ester (fenofibrát), Cayman Chemical Company (USA)

Butyrát sodný (98%), Sigma Aldrich (Nemecko)

Citronan sodný, PENTA (Česká republika)

Dezinfekcia Softasept N, Braun (Nemecko)

Dimetylsulfoxid (DMSO), WAK-Chemie Medical GmbH (Nemecko)

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), Sigma Aldrich (Nemecko)

Etanol, PENTA (Česká republika)

Fetálne bovinné sérum FetalClone II Hyclone, Biosera (USA)

GlutaMAX, gibco (USA)

Hematoxylín, Fluka (Nemecko)

Hydrogénfosforečnan draselný, PENTA (Česká republika)

Hydrogénfosforečnan sodný, PENTA (Česká republika)

Hydroxid amónny, PENTA (Česká republika)

Chlorid draselný, PENTA (Česká republika)

Chlorid sodný, PENTA (Česká republika)

Jodičnan sodný, Fluka (Nemecko)

Kyselina citronová, PENTA (Česká republika)

Kyselina chlorovodíková, PENTA (Česká republika)

Kyselina pirixinová (WY-14643), Sigma Aldrich (Nemecko)

Kyselina vínna, PENTA (Česká republika)

Paraformaldehyd, ICN Biomedicals (USA)

PEN-STREP(penicilín/streptomycín), Lonza (Nemecko)

Peroxid vodíka, PENTA (Česká republika)

Pertex,, HistoLab (Švédsko)

Síran hlinito-draselný, PENTA (Česká republika)

Sterilná deionizovaná voda ddH₂O

Sterilná destilovaná voda dH₂O

Trypsín, PAA (Rakousko)

TWEEN 20, Sigma Aldrich (Nemecko)

Xylén, PENTA (Česká republika)

3.1.6. Použité súpravy

Detekčný systém Dako RealTM - EnVisionTM, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, Dako (Dánsko)

In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit, ThermoFisher Scientific (USA)

3.1.7. Zloženie roztokov

Roztoky použité pri imunocytochemickom farbení PPAR α

Citrátový pufo (pH 6,0 - 6,2)

Bolo zmiešaných 41 ml roztoku citrátu sodného (29,41 g citronanu sodného v 1 l dH₂O) a 9 ml roztoku kyseliny citrónovej (21,01 g kyseliny citrónovej v 1 l dH₂O). Následne bol objem vzniknutého roztoku doplnený do 0,5 l destilovanou vodou (dH₂O).

0,5M TRIS pufo (pH 7,6) (premyvací pufo)

Bolo zmiešaných 61 g TRIS-(hydroxymetyl)aminometátu s 1 l dH₂O. pH roztoku bolo upravené pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Pripravený roztok slúžil ako zásobný (10x), z neho bol ďalej pripravený 1x TRIS pufo (0,05M) zmiešaním 0,5M TRIS zásobného pufru a 900 ml fyziologického roztoku.

TRIS+TWEEN 20 pufo

Bolo zmiešaných 0,5 l 1x TRIS pufru s 250 μ l TWEEN 20.

Čpavková voda

Bolo zmiešaných 100 ml destilovanej vody a 6 kvapiek hydroxidu amónneho.

Kamencový hematoxylín

Bolo zmiešaných 0,4 g hematoxylínu; 400ml destilovanej vody; 20 g síranu hlinito-draselného; 0,08 g jodičnanu sodného a 0,4 g kyseliny vínnej.

Roztoky použité pri In-Cell ELISE

1x TBS pufo

Pufo bol pripravený pomocou 2,5 ml 20 x TBS pufru a následného doplnenia na objem 50 ml destilovanou vodou.

1x Oplachovací pufo (Washing Buffer)

Bolo zmiešaných 7,5 ml 20 x TBS pufru; 141 ml destilovanej vody a 1,5 ml Surf-Amps 20 Detergentu (súčasť In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit)..

Permeabilizačný pufo

Pufo bol pripravený zmiešaním 99 µl Surfact-Amps X-100 Detergentu a 10 ml 1x TBS pufru (101x riedenie).

Quenching solution

Roztok bol pripravený zmiešaním 333,3 µl peroxidu vodíku (30%) a 9,7 ml TBS pufru.

ATB diluent na protilátky

Diluent na protilátky bol pripravený zmiešaním blokovacího pufru (Blocking Buffer) a oplachovacího pufru (Washing Buffer) v pomere 1:1. Na prípravu 20 ml ATB diluentu na protilátky bolo zmiešaných 10 ml oplachovacího pufru (Washing Buffer) a 10 ml blokovacího pufru (Blocking Buffer).

Nariadený konjugát chrenovej peroxidázy (HRP)

Do 12 ml oplachovacího pufru (Washing Buffer) bolo pridaných 30 µl HRP konjugátu.

Roztoky použité pri príprave 96-jamkových testovacích dosiek k následnej In-Cell ELISE

10% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (pre bunkovú líniu HT-29)

Kultivačné médium pre bunkovú líniu HT-29 obsahovalo 10 % (v/v) fetálneho bovinného séra (Hyclone, SV30160.03), glutaMAX a PEN-STREP. Na prípravu 1 l 10% DMEM bolo zmiešaných 880 ml DMEM média; 100 ml fetálneho bovinného séra (Hyclone, SV30160.03); 10 ml PEN-STREP (penicilín (5000 U Penicilin/ml) /streptomycín (5000 U Streptomycin/ml)) a 10 ml glutaMAXu.

15% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (pre bunkovú líniu Caco-2)

Kultivačné médium pre bunkovú líniu Caco-2 obsahovalo 15 % (v/v) fetálneho bovinného séra (Hyclone, SV30160.03), glutaMAX a PEN-STREP. Na prípravu 1 l 15% DMEM bolo zmiešaných 830 ml DMEM média, 150 ml fetálneho bovinného séra (Hyclone, SV30160.03); 10 ml PEN-STREP (penicilín (5000 U Penicilin/ml) /streptomycín (5000 U Streptomycin/ml)) a 10 ml glutaMAXu.

Fosfátový pufr (10x PBS)

Zásobný roztok fosfátového pufru bol pripravený rozpustením 80g NaCl; 2g KCl; 32,1 g Na_2HPO_4 a 2 g KHPO_4 . Objem roztoku bol doplnený na 1 l s použitím destilovanej vody.

3.2. Metódy práce

3.2.1 Kultivácia a pasážovanie bunkových línií HT-29 a Caco-2

Bunkové línie HT-29 a Caco-2 boli kultivované v 10% alebo 15% DMEM médiu, ktoré obsahovalo 10% (v/v) (HT-29) alebo 15% (v/v) (Caco-2) fetálneho bovinného séra (FBS glutaMAX a PEN-STREP. Bunkové línie boli inkubované v inkubátore pri teplote 37 °C a pri 5% CO_2 a boli pasážované dvakrát do týždňa.

Bunkové línie HT-29 a Caco-2 sú adherentné bunkové línie, na ktoré bol použitý nasledujúci postup pasážovania buniek. Zo stredne veľkej kultivačnej fľaše s bunkovou líniou HT-29 alebo Caco-2 bolo odsaté kultivačné médium. Pomocou predhriateho sterilného fosfátového (PBS) pufru (na teplotu 37 °C) boli bunky opláchnuté jedenkrát za účelom odstránenia zvyškov média obsahujúceho inhibítory trypsínu. Do stredne veľkej kultivačnej fľaše bol následne napipetovaný 1 ml trypsínu, fľaša bola umiestnená na dobu 5 minút do inkubátoru pri 37 °C na zaistenie optimálnych podmienok trypsínu. Po uvoľnení buniek vplyvom trypsínu k nim bolo pridaných 9 ml kompletného kultivačného média 10% DMEM (Caco-2 15 %). Následne boli bunky jemne rozsuspendované opakovaným nasávaním média s bunkami do serologickej pipety. V kultivačnej fľaši bol ponechaný 1 ml bunkovej suspenzie a k nemu bolo pridaných ešte 12 ml čerstvého kultivačného média. Inkubácia kultivačných fliaš prebiehala pri 37°C v inkubátore. Bunkové línie boli pasážované v laminárnych boxoch kde prúdenie sterilného vzduchu zaisťovalo prostredie bez mikroorganizmov.

3.2.2. Počítanie buniek

Z kultivačnej fľaše bolo odsaté médium. Bol pridaný 1 ml trypsínu a bunky boli kultivované v inkubátore pri teplote 37 °C. K bunkám, ktoré sa uvoľnili bolo pridané čerstvé kultivačné médium. Celý obsah kultivačnej fľaše bol následne prevedený do sterilnej skúmavky. Potom boli bunky centrifugované pri 1200 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol vyliaty do odpadovej fľaše a k peletu bol pridaný 1 ml čerstvého média. Na okraj krycieho sklíčka Bürkerovej komôrky bolo napipetovaných 10 µl suspenzie buniek. Následne bol stanovený počet buniek v 1 ml bunkovej suspenzie.

3.2.3. Príprava 96-jamkových dosiek na In-Cell ELISA

Bunkové línie HT-29 a Caco-2 boli pasážované podľa postupu z podkapitoly 3.2.1 Kultivácia a pasážovanie bunkových línií HT-29 a Caco-2. Následne boli bunky spočítané za pomoci Bürkerovej komôrky. Na základe celkového počtu buniek bolo vypočítané, koľko pôvodnej bunkovej suspenzie bude pridaných do média, ktoré bude použité. V prípade bunkovej línie HT-29 boli bunky vysadené v hustote 10 000 buniek/jamku a v prípade bunkovej línie Caco-2 boli vysadené v hustote 6 500 buniek/jamku. V prípade bunkovej línie Caco-2, ktorá mala byť nechaná k post-konfluentnému rastu, boli bunky vysadené v hustote 11 000 buniek/jamku. Vo všetkých prípadoch boli bunky vysadené v objeme 80 µl média na jamku.

Bunky boli inkubované cez noc v inkubátore pri 37 °C a pri 5% CO₂ a v prípade prípravy diferencovaných bunkových línií boli bunky ošetrované butyrátom sodným (HT-29) poprípade u nich prebiehala spontánna diferenciácia (Caco2). Bol pripravený 0,5M roztok butyrátu sodného. Bunky boli kultivované s butyrátom sodným v 5mM koncentrácii. Bunky boli inkubované 72 hodín pri 37 °C a pri 5% CO₂. V prípade post- konfluentného rastu boli bunky Caco-2 inkubované 14 dní po dosiahnutí konfluencie (rastové médium bolo počas tejto doby vymieňané dvakrát do týždňa).

Podľa navrhutej schémy boli bunky následne ošetrované rôznymi koncentráciami fenofibrátu a kyseliny pirixinovej (WY-14643). Použité koncentrácie boli stanovené pomocou WST-1 testu v predošlých experimentoch. Predchádzajúce štúdie totiž preukázali, že nižšia koncentrácia fibrátov viedla k zvýšeniu proliferačnej aktivity nediferencovaných buniek, zatiaľ čo vyššia koncentrácia fibrátov znižovala proliferačnú aktivitu u nediferencovaných buniek (Čížková et al. , 2016; Tauber et al., 2019; Suchanek et al., 2002). Pomocou odsávacej ihly bol odsatý celý obsah každej jamky. Následne bolo

do každej jamky napipetovaných 80 µl kultivačného média. Ďalej bol pripravený 0,1% roztok DMSO (kontrola), 25µM roztok fenofibrátu, 150µM roztok fenofibrátu (pre Caco2 200 µM roztok fenofibrátu), 25µM roztok Wy-14643 a 200µM roztok Wy-14643. Prehľad koncentrácií jednotlivých aktívnych látok sa nachádza v Tabuľke 3. Do každej jamky bolo podľa schémy prenesených 20 µl aktívnej látky. Následne prebehla inkubácia buniek s aktívnou látkou po dobu 72 hodín.

Tabuľka 3 Prehľad použitých koncentrácií fenofibrátu a WY-14643 u bunkových línií HT-29 a Caco2. Použité koncentrácie boli získané pomocou WST-1 testu v predošlých experimentoch, zároveň bola stanovená príslušná proliferačná aktivita u nediferencovaných buniek (Čížkova et al. , 2016). P- proliferačná koncentrácia fibrátov, I-inhibičná koncentrácia fibrátov.

Bunková línia	Aktívna látka	Použitá koncentrácia [µM] P-proliferačná, I-inhibičná	Proliferačná aktivita nediferencovaných buniek [% kontroly] ± SD
HT-29	Fenofibrát	25 (P)	136,5 ± 21,9
		150 (I)	90,0 ± 4,1
	WY-14643	25 (P)	116,4 ± 11,5
		200 (I)	82,8 ± 7,8
Caco2	Fenofibrát	25 (P)	119,3 ± 27,1
		200 (I)	80,7 ± 10,2
	WY-14643	25 (P)	128,0 ± 16,7
		200 (I)	91,7 ± 4,7

Dosky boli následne zafixované. Bol odsatý obsah jamiek za pomoci odsávacej ihly. Do každej jamky bolo následne prenesených 100 µl 4% roztoku paraformaldehydu v TBS. Paraformaldehyd bol nechaný pôsobiť po dobu 10 minút. Následne bol paraformaldehyd odstránený a dosky boli dvakrát opláchnuté 1x TBS pufrom. Dosky boli zamrazené alebo ponechané priamo k In- Cell ELISE.

3.2.4. In - Cell ELISA

In - Cell ELISA je metóda používaná na kvantifikáciu cieľového proteínu, alebo prípadne post-translačných modifikácií cieľového proteínu priamo v kultivovaných bunkách bez nutnosti lýzy buniek. Metóda umožňuje merať cieľové analyty *in situ* v adherentných aj v suspenzných bunkách.

Z 96-jamkovej dosky, pripravenej v predchádzajúcej kapitole 3.2.3. bol odstránený 1x TBS pufor. Následne bolo do každej jamky pridaných 100 µl permeabilizačného pufru za účelom odmytia lipidov z plazmatickej membrány buniek a doska bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút. Po odstránení permeabilizačného pufru boli jamky

opláchnuté 1x TBS pufrom. TBS pufof bol odstránený a do každej jamky bolo pridaných 100 μ l Quenching solution. Po odstránení Quenching solution boli jamky opláchnuté 1x TBS pufrom. TBS pufof bol odstránený a bolo pridaných 100 μ l blokovacieho pufru (Blocking Buffer). Doska bola inkubovaná po dobu 60 minút pri laboratórnej teplote. V medzičase boli nariedené jednotlivé protilátky CYP2C8, CYP2J2, CYP2C9 a EPHX2 (sEH) do ATB diluentu podľa Tabuľky 2. Blokovací pufof bol odstránený a boli pridané príslušné nariedené protilátky, k negatívnym kontrolám bol pridaný iba ATB diluent bez protilátky. 96-jamková doska bola zalepená a inkubovaná cez noc pri teplote 4 °C v chladničke.

Bola odstránená primárna protilátka a následne bol trikrát urobený oplach oplachovacím pufrom (100 μ l/jamka). Oplachovací pufof bol odstránený a do každej jamky bolo pridaných 50 μ l Diluted HRP konjugátu. Následne bola doska inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Nariedený HRP konjugát bol odstránený a bol trikrát urobený oplach oplachovacím pufrom (200 μ l / jamka). Oplachovací pufof bol odstránený, do každej jamky bolo pridaných 50 μ l TMB substrátu a doska bola inkubovaná 15 minút pri laboratórnej teplote v tme. Následne bol pridaný TMB Stop Solution (50 μ l / jamka) a bola odmeraná absorbanca pri 450 nm (signál protilátky) na spektrofotometri PowerWave XS. Roztoky z dosky boli odstránené a bol urobený dvakrát oplach destilovanou vodou (200 μ l / jamka). Destilovaná voda bola odstránená a bolo pridaných 50 μ l Janus Green Whole-Cell Stain do každej jamky. Doska bola inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote a následne bol opäť urobený oplach destilovanou vodou (tri až päťkrát) za účelom odstránenia zvyškov farbiva. Destilovaná voda bola odstránená a bol pridaný Elution Buffer (50 μ l / jamka). Doska bola inkubovaná 10 minút pri laboratórnej teplote a bola odmeraná absorbanca pri 615 nm (nafarbenie celých buniek) pomocou spektrofotometra.

Pri vyhodnocovaní výsledkov bol najskôr urobený priemer hodnôt absorbiancie pri 450 nm pre negatívne kontroly a následne bola táto hodnota odčítaná od všetkých absorbiancií pri 450 nm pre jednotlivé jamky. Ďalej boli znormalizované absorbiancie pri 450 nm a pri 615 nm (pre každú jamku $A=A_{450}/A_{615}$). Normalizované hodnoty pre jednotlivé aktívne látky (doublety) boli spriemerované. Následne bol určený fold change ako podiel absorbiancie aktívnej látky a absorbiancie kontroly.

3.2.5. Imunocytochemické farbenie (ICC) proteínu PPAR α v bunkovej línii HT-29 a Caco2

Sklá, ktoré boli pripravené ako náter z bunkovej suspenzie s bunkovou líniou Caco-2 alebo HT-29 boli najskôr nechané po nanosení bunkovej suspenzie zaschnúť na vzduchu a boli fixované ľadovo vychladeným metanol : acetónom (1 : 1) po dobu 15 minút. Bunky pre ICC boli ovplyvnené rovnako ako v prípade In-Cell ELISy. Sklá boli po vyschnutí, pred samotným farbením, uchovávané v mrazničke pri -20 °C. Následne boli opláchnuté destilovanou vodou (rehydratácia) po dobu 5 minút, ďalej boli umiestnené do tkanivového histoprosoru HISTOS PRO-RAPID MICROWAVE na 15 minút k revitalizácii antigénu pôsobením tepla (120 °C), zvýšeného tlaku a za použitia citrátového pufru (pH 6). Vzorky boli nechané na vychladnutie a opláchnuté destilovanou vodou. Bola u nich zablokovaná endogénna peroxidáza pomocou 1% roztoku peroxidu vodíka aby sa predišlo falošnej pozitivite (15 minút). Vzorky boli opláchnuté destilovanou vodou a dvakrát po dobu 5 minút prepláchnuté 0,05M TRIS pufrom. Ďalej boli po dobu 5 minút opláchnuté TRIS+TWEEN 20 pufrom. Ďalej bol na vzorky nanosený Protein Block Serum Free, vzorky boli inkubované v komore Magnetic Immuno Staining Tray (MIST) po dobu 10 minút za účelom predídania nešpecifického zafarbenia pozadia.

Následne boli sklá nechané odtrieť od Protein Block Serum Free na bunkovej vate a inkubované s primárnou protilátkou riedenou pomocou DAKO antibody diluentu v pomere 1:100 (1000 μ l DAKO antibody diluentu + 10 μ l primárnej protilátky PPAR α) po dobu 60 minút. Ďalej boli opláchnuté dvakrát 0,05M TRIS pufrom po dobu 5 minút a potom opláchnuté raz TRIS+TWEEN 20 pufrom po dobu 5 minút s cieľom odstrániť zvyšky primárnej protilátky.

Následne boli inkubované so sekundárnou enzymaticky značenou protilátkou Dako En Vision + Dual Link System- HRP po dobu 30 minút. Ďalej boli opláchnuté dvakrát 0,05M TRIS pufrom po dobu 5 minút a potom opláchnuté raz TRIS+TWEEN 20 pufrom po dobu 5 minút s cieľom odstrániť zvyšky sekundárnej protilátky. Pri procese vizualizácie bol na vzorky aplikovaný roztok substrátového pufru s chromogénom (1 ml Dako Substrate Buffer + 1 kvapka (20 μ l) Dako DAB⁺ Chromogen) po dobu 5 minút. Sklá boli následne opláchnuté pomocou tečúcej vody po dobu 5 minút a destilovanej vody. Následne prebehlo dofarbenie jadier buniek hematoxylínom (2 - 4 minúty). Sklá boli potom opláchnované tečúcou vodou po dobu 10 minút a ďalej čpavkovou vodou. Potom boli sklá opláchnované 3 minúty tečúcou vodou a následne destilovanou vodou.

Ďalej boli sklá odvodnené a prejasnené pomocou alkohol-xylénovej rady oplachov. Najprv boli sklá umiestené do kyvety s 96% alkoholom na dobu 5 minút. Použitý alkohol bol vyliaty a nahradený acetónom na dobu 3 minút, acetón-xylénom (v pomere 1:1) na dobu 5 minút a čistým xylénom na dobu 5 minút. Potom bolo použité montovacie médium PERTEX k trvalému prilepeniu krycieho skla. Použité protilátky pre metódu imunocytochemického farbenia sú uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4 Použité protilátky pre metódu imunocytochemického farbenia. Typ protilátky, názov protilátky, prípadné riedenie a doba inkubácie s jednotlivou protilátkou.

Typ	Názov	Riedenie	Doba inkubácie
Primárna	PPAR α	1:100	1 hodina
Sekundárna	Dako En Vision + Dual Link System- HRP	-	30 minút

3.2.6. Analýza translokácie receptora PPAR α po ovplyvnení fibrátmi

Bola overená translokácia receptora PPAR α po ovplyvnení fibrátmi prostredníctvom analýzy obrazu po imunocytochemickom farbení. Vychádzalo sa z toho, že neaktívny receptor sa nachádza v cytoplazme, po naviazaní ligandu sa však presúva do jadra a spúšťa expresiu. Pri analýze bol využitý program ImageJ s rozšírením IHC Profiler pluginu. Jednotlivé snímky boli zhotovené za pomoci svetelného mikroskopu BX 40 (Olympus) s kamerou DP71 (Olympus) zo skiel, ktoré boli pripravené ako náter z bunkovej suspenzie a následne zafarbené pomocou imunocytochemického farbenia. Najskôr bol vyhodnotený celkový počet buniek na snímke, následne boli určené tie bunky s jadrovou pozitivitou. Bolo vypočítané percento pozitívnych buniek, následne boli medzi sebou spriemerované jednotlivé snímky z rovnakej série.

3.2.7. Štatistická analýza

Relatívna expresia proteínov bola vyjadrená ako fold change* 100 [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie bol použitý 1-výberový t-test. Ak bola $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líšila od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ bolo označené ako *, $p < 0,01$ bolo označené ako **, $p < 0,001$ bolo označené ako *** a $p < 0,0001$ bolo

označené ako ****. Štatistické vyhodnotenie výsledkov bolo urobené za pomoci programu Graph Pad Prism 8.

Analýza jadrovej pozitivity bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a bola vyjadrená ako jadrová pozitivita [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie bol použitý viacparametrový test ANOVA nasledovaný Dunnnovou metódou mnohonásobného porovnávaní. Ďalej na porovnanie diferencovaných a nediferencovaných buniek bol použitý neparametrický test Mann Whitney. Ak bola $p < 0,05$ tak sa jadrová pozitivita PPAR α signifikantne líšila od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ bolo označené ako *, $p < 0,01$ bolo označené ako **, $p < 0,001$ bolo označené ako *** a $p < 0,0001$ bolo označené ako ****. Štatistické vyhodnotenie výsledkov bolo urobené za pomoci programu Graph Pad Prism 8.

3.3 Výsledky

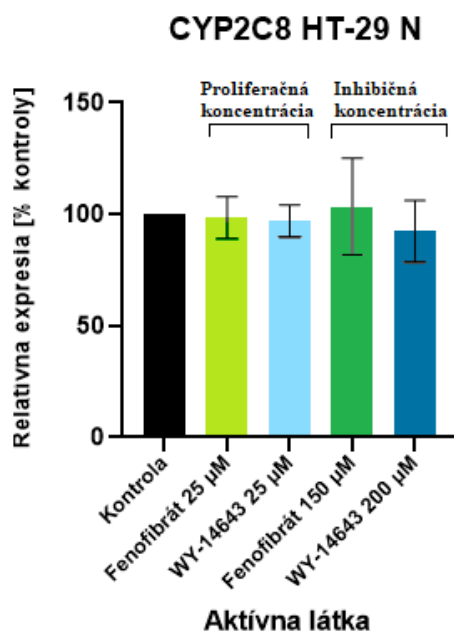
3.3.1. Zmena expresie CYP epoxygenázy a sEH u bunkových línií HT-29 a Caco2 po ovplyvnení fibrátmi počas diferenciácie črevných buniek *in vitro*

Výsledky získané pri spracovaní tejto diplomovej práce nadväzujú na výsledky získané v predošlých štúdiách (Čížková et al., 2015; Čížková et al., 2016; Čížková, 2018; Čížková et al., 2020).

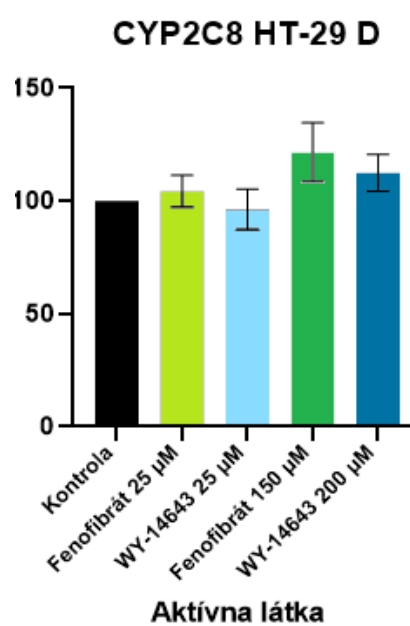
V prípade bunkovej línie HT-29 boli zisťované zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u nediferencovaných a diferencovaných buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643 ako ligandov PPAR α . Nižšia koncentrácia ligandov mala proliferačný účinok na nediferencované bunky zatiaľ čo vyššia koncentrácia pôsobila inhibične (Čížková et al., 2016). Čížková et al. pri svojom výskume stanovila, že hladina CYP epoxygenáz a sEH sa líši aj medzi diferencovanými a nediferencovanými bunkami. Pričom u diferencovaných buniek HT-29 bol stanovený 1,8-násobný nárast expresie CYP2C9 a sEH; 1,3-násobný nárast v expresii CYP2C8 a 13,2-násobný nárast v expresii CYP2J2 v porovnaní s nediferencovanými bunkami (Čížková et al., 2020).

Zmeny v expresii CYP2C8 u nediferencovaných buniek neboli výrazné. U nediferencovaných buniek sa expresia výrazne nelíšila od buniek kontroly, zatiaľ čo u diferencovaných buniek bol pozorovaný mierny, ale však nesignifikantný nárast expresie. Zmeny expresie CYP2C8 sú znázornené v Grafe 1A a 1B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 5.

A

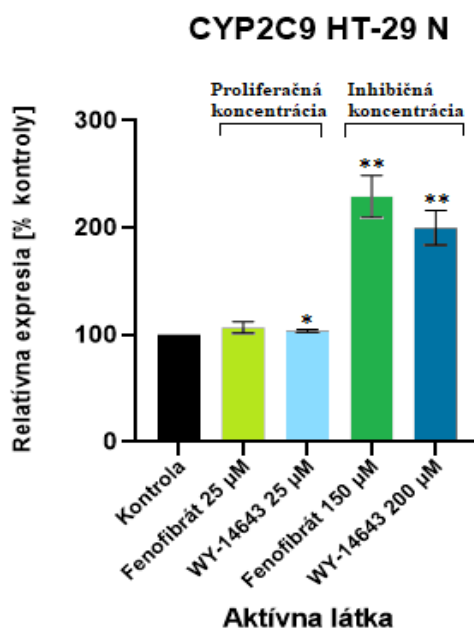
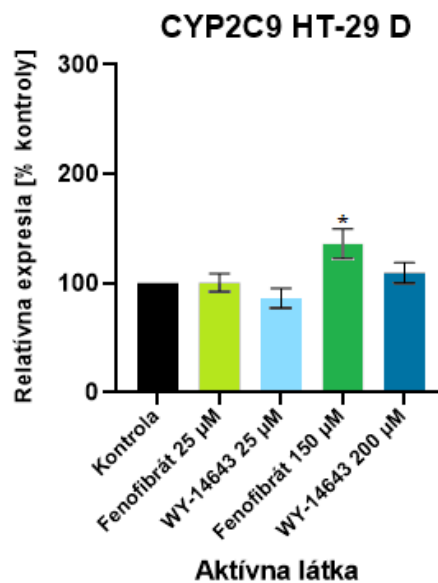


B



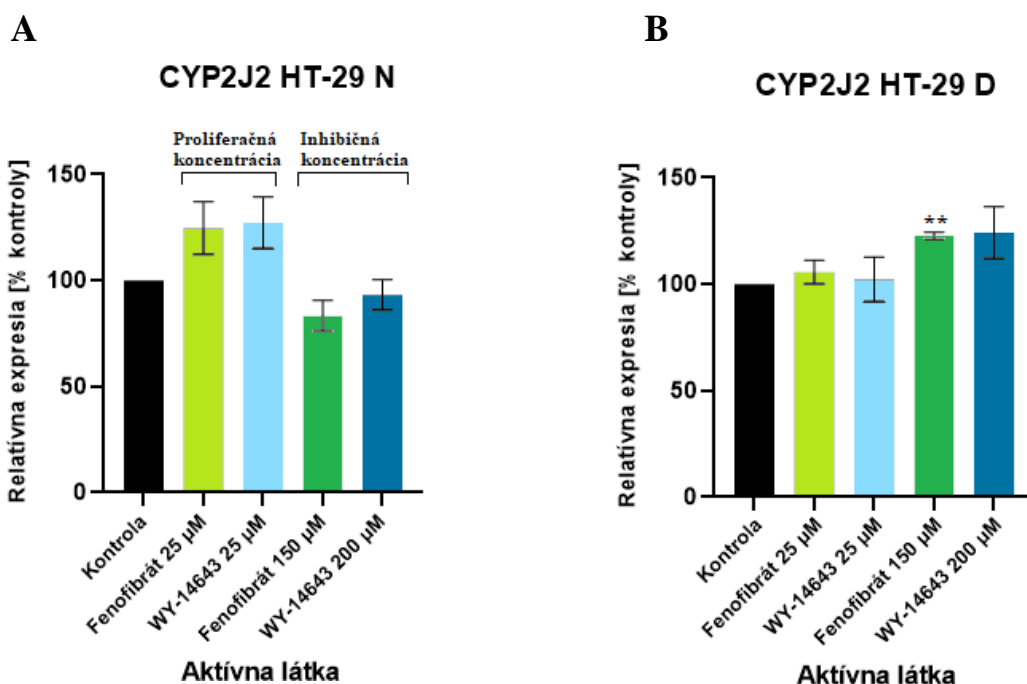
Graf 1A a 1B Relatívna expresia CYP2C8 u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Expresia CYP2C9 vykazovala rovnaký trend u nediferencovaných aj diferencovaných buniek. Ako u nediferencovaných tak aj diferencovaných buniek sa expresia CYP2C9 po ovplyvnení nižšou (proliferačnou) koncentráciou ligandov nemenila. K signifikantnej zmene došlo iba u nižšej (proliferačnej) koncentrácie WY-14643 u nediferencovaných buniek. Zároveň však došlo k signifikantnému nárastu expresie CYP2C9 u vyššej (inhibičnej) koncentrácie oboch ligandov u nediferencovaných buniek. K signifikantnému zvýšeniu expresie CYP2C9 u diferencovaných buniek došlo iba u vyššej koncentrácie fenofibrátu a teda vykazujú rovnaký trend zmeny expresie ako nediferencované bunky avšak zmena v expresii je menšia. Zmeny expresie CYP2C9 sú znázornené v Grafe 2A a 2B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 5.

A**B**

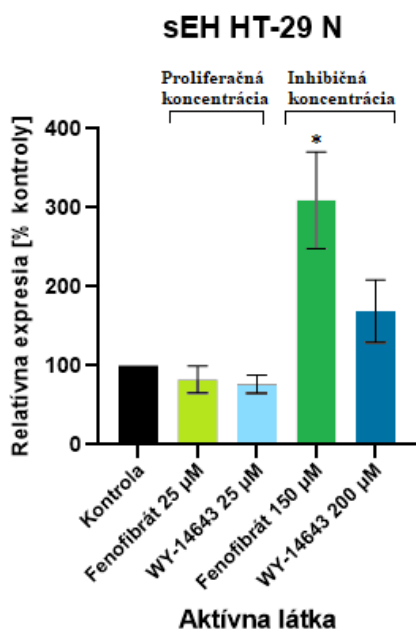
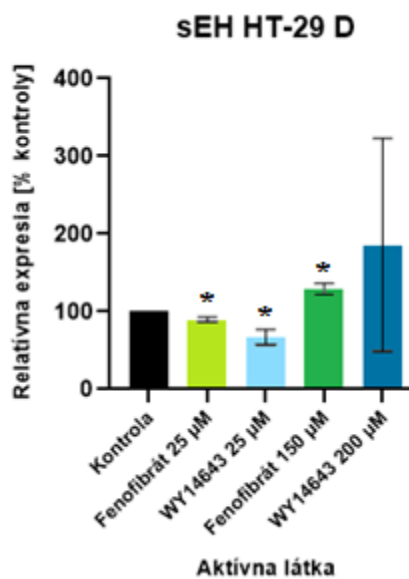
Graf 2A a 2B Relatívna expresia CYP2C9 u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

V prípade expresie CYP2J2 bola odpoveď buniek na podanie fibrátov odlišná. Zatiaľ čo u nediferencovaných buniek viedla nižšia (proliferačná) koncentrácia fibrátov k nárastu expresie, vyššia (inhibičná) koncentrácia fibrátov expresiu CYP2J2 znižovala aj napriek tomu, že získané výsledky boli nesignifikantné. V prípade diferencovaných buniek viedla naopak vyššia koncentrácia použitých fibrátov k nárastu expresie CYP2J2 v porovnaní s bunkami nediferencovanými. Zistilo sa, že u vyššej koncentrácie fenofibrátu došlo k signifikantnému nárastu expresie CYP2J2. Zmeny expresie CYP2J2 sú znázornené v Grafe 3A a 3B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 5.



Graf 3A a 3B Relatívna expresia CYP2J2 u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Expresia sEH vykazovala rovnaký trend u nediferencovaných aj diferencovaných buniek. Všeobecne došlo u nižšej (proliferáčnej) koncentrácii k zníženiu expresie sEH zatiaľ čo vyššia (inhibičná) koncentrácia fibrátov expresiu zvyšovala. Expresia sEH, u nediferencovaných buniek, bola signifikantne vyššia u vyššej (inhibičnej) koncentrácii WY-14643. U diferencovaných buniek došlo tiež k signifikantným zmenám v expresii. Signifikantné zníženie expresie bolo prítomné u nižšej koncentrácii oboch ligandov, zatiaľ čo signifikantné zvýšenie expresie sEH bolo prítomné u vyššej koncentrácii fenofibrátu. Zmeny expresie sEH sú znázornené v Grafe 4A a 4B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 5.

A**B**

Graf 4A a 4B Relatívna expresia sEH u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

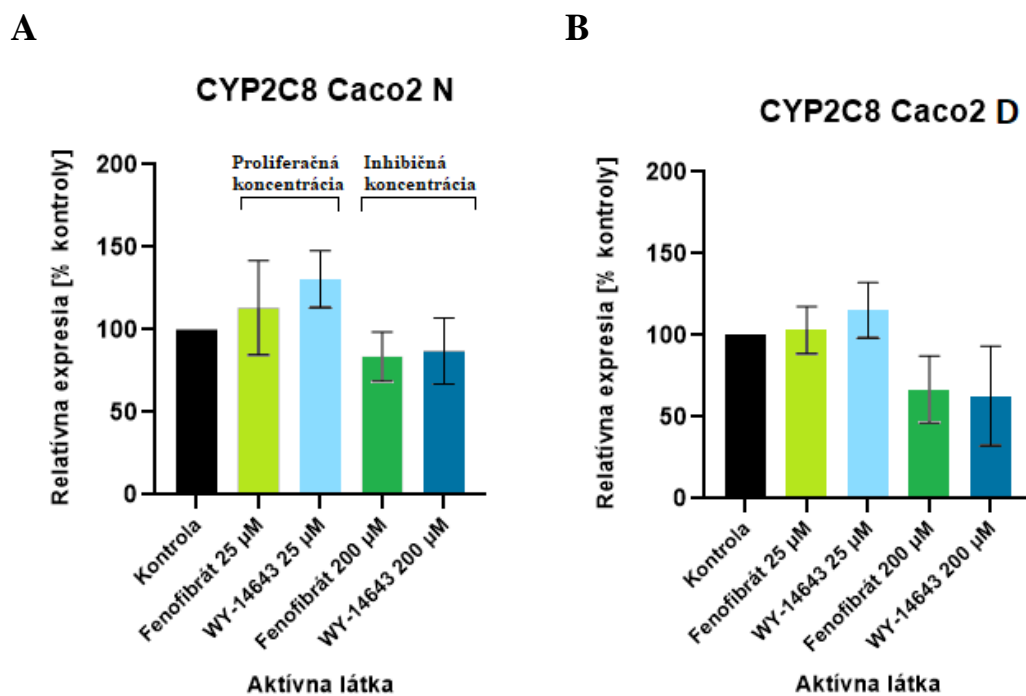
Tabuľka 5 Štatistické vyhodnotenie signifikancie zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u bunkovej línie HT-29 . Signifikantné výsledky (P-hodnota) sú uvedené tučným písmom.

Bunková línia HT-29	Proteín	Aktívna látka	Koncentrácia [μ M]	P-hodnota
Nediferencované bunky	CYP2C8	Fenofibrát	25	0,8031
		WY-14643	25	0,5445
		Fenofibrát	150	0,8110
		WY-14643	200	0,4439
	CYP2C9	Fenofibrát	25	0,1420
		WY-14643	25	0,0405
		Fenofibrát	150	0,0076
		WY-14643	200	0,0085
	CYP2J2	Fenofibrát	25	0,0736
		WY-14643	25	0,0615
		Fenofibrát	150	0,0576
		WY-14643	200	0,2428
	sEH	Fenofibrát	25	0,2185
		WY-14643	25	0,0722
		Fenofibrát	150	0,0274
		WY-14643	200	0,0941
Diferencované bunky	CYP2C8	Fenofibrát	25	0,3988
		WY-14643	25	0,5518
		Fenofibrát	150	0,1032
		WY-14643	200	0,1171
	CYP2C9	Fenofibrát	25	0,9125
		WY-14643	25	0,1221
		Fenofibrát	150	0,0423
		WY-14643	200	0,2138
	CYP2J2	Fenofibrát	25	0,2154
		WY-14643	25	0,7519
		Fenofibrát	150	0,0018
		WY-14643	200	0,0751
	sEH	Fenofibrát	25	0,0318
		WY-14643	25	0,0286
		Fenofibrát	150	0,0199
		WY-14643	200	0,3913

V prípade bunkovej línie Caco2 boli zisťované zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u nediferencovaných a diferencovaných buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643 ako ligandov PPAR α . Čížková et al. pri svojom výskume stanovila, že hladina CYP epoxygenáz a sEH sa líši aj medzi diferencovanými a nediferencovanými bunkami. U spontánne diferencovaných buniek Caco2 bol stanovený 1,3-násobný pokles expresie CYP2C8; 1,8-násobný pokles expresie CYP2C9; 2,9-násobný

nárast expresie CYP2J2 a 1,5-násobný nárast expresie sEH v porovnaní s nediferencovanými bunkami (Čížková et al., 2020).

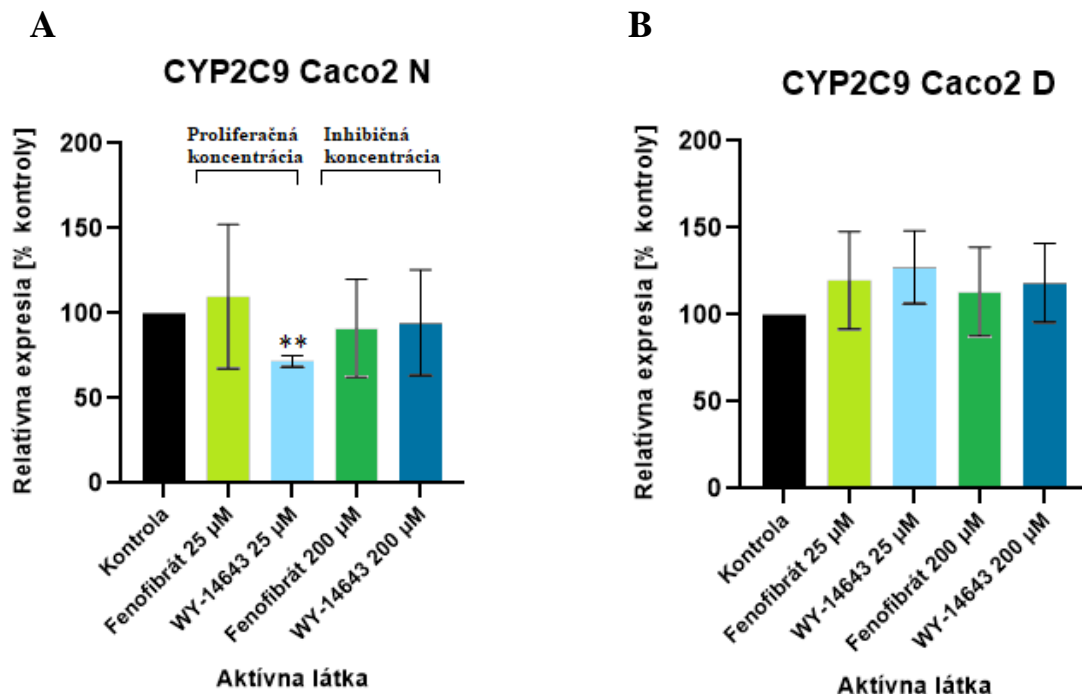
Expresia CYP2C8 vykazovala rovnaký trend u nediferencovaných aj diferencovaných buniek. Všeobecne došlo u nižšej (proliferáčnej) koncentrácii k zvýšeniu expresie CYP2C8 zatiaľ čo vyššia (inhibičná) koncentrácia fibrátov expresiu znižovala. Zmeny expresie však v oboch prípadoch neboli signifikantné. Zmeny expresie CYP2C8 sú znázornené v Grafe 5A a 5B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 6.



Graf 5A a 5B Relatívna expresia CYP2C8 u bunkovej línie Caco2 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

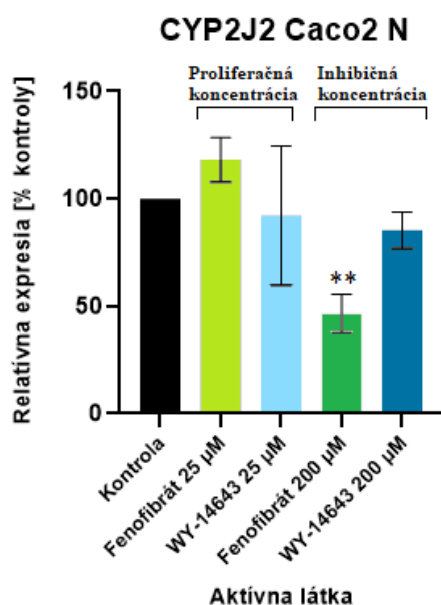
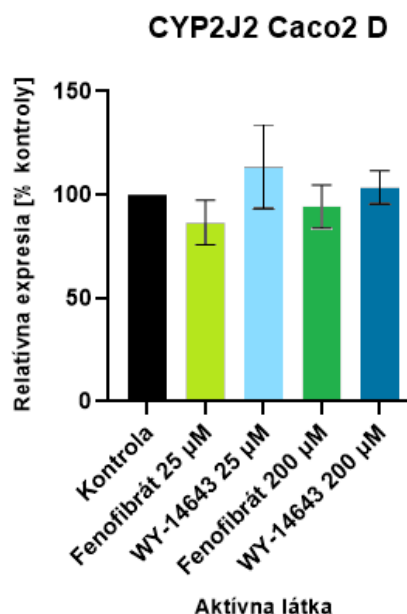
V prípade expresie CYP2C9 bola odpoveď buniek na podanie fibrátov odlišná. Zatiaľ čo u nediferencovaných buniek viedla nižšia (proliferáčná) koncentrácia fibrátov k nárastu expresie, vyššia (inhibičná) koncentrácia fibrátov expresiu CYP2C9 znižovala. Výnimku predstavovalo signifikantné zníženie expresie CYP2C9 u nediferencovaných

buniek u nižšej (proliferačnej) koncentrácii WY-14643. U diferencovaných buniek bol pozorovaný mierny, avšak nesignifikantný nárast expresie. Zmeny expresie CYP2C9 sú znázornené v Grafe 6A a 6B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 6.



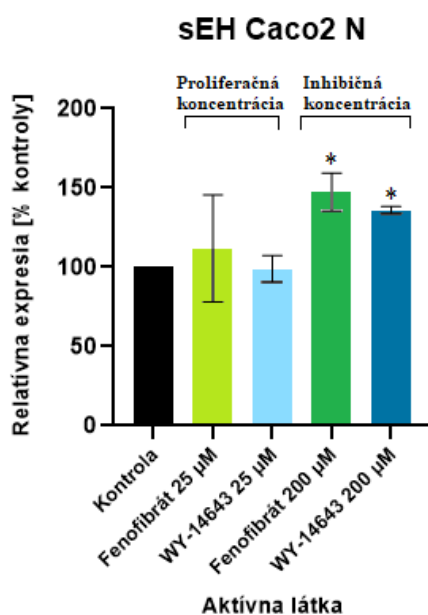
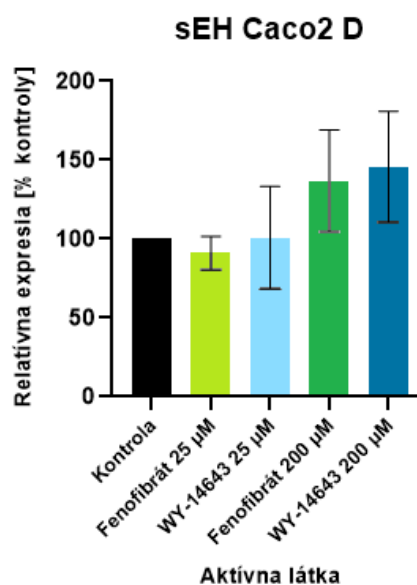
Graf 6A a 6B Relatívna expresia CYP2C9 u bunkovej línie Caco2 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Expresia CYP2J2, u nediferencovaných buniek, bola signifikantne nižšia u vyššej (inhibičnej) koncentrácii fenofibrátu, k zvýšeniu expresie došlo tiež u vyššej (proliferačnej) koncentrácii fibrátov, zmeny však neboli signifikantné. U diferencovaných buniek signifikantná zmena expresie CYP2J2 nebola zistená. Zmeny expresie CYP2J2 sú znázornené v Grafe 7A a 7B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 6.

A**B**

Graf 7A a 7B Relatívna expresia CYP2J2 u bunkovej línie Caco2 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Výsledky ukazujú, že v prípade nediferencovaných buniek došlo k signifikantnému zvýšeniu expresie sEH u vyššej (inhibičnej) koncentrácie oboch ligandov. U diferencovaných buniek signifikantná zmena expresie sEH nebola zistená, avšak vykazovali rovnaký trend zmeny expresie ako nediferencované bunky, teda zvýšenie expresie sEH u vyššej koncentrácie ligandov. Zmeny expresie sEH sú znázornené v Grafe 8A a 8B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 6.

A**B**

Graf 8A a 8B Relatívna expresia sEH u bunkovej línie Caco2 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Relatívna kvantifikácia proteínov bola uskutočnená prostredníctvom In-Cell ELISy s následnou spektrofotometrickou analýzou. Relatívna expresia proteínov je vyjadrená ako fold change* 100 ± SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý 1-výberový t-test. Ak je $p < 0,05$ tak sa relatívna expresia proteínov signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N - nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Tabuľka 6 Štatistické vyhodnotenie signifikancie zmeny expresie CYP epoxygénáz a sEH u bunkovej línie Caco2. Signifikantné výsledky (P-hodnota) sú uvedené tučným písmom.

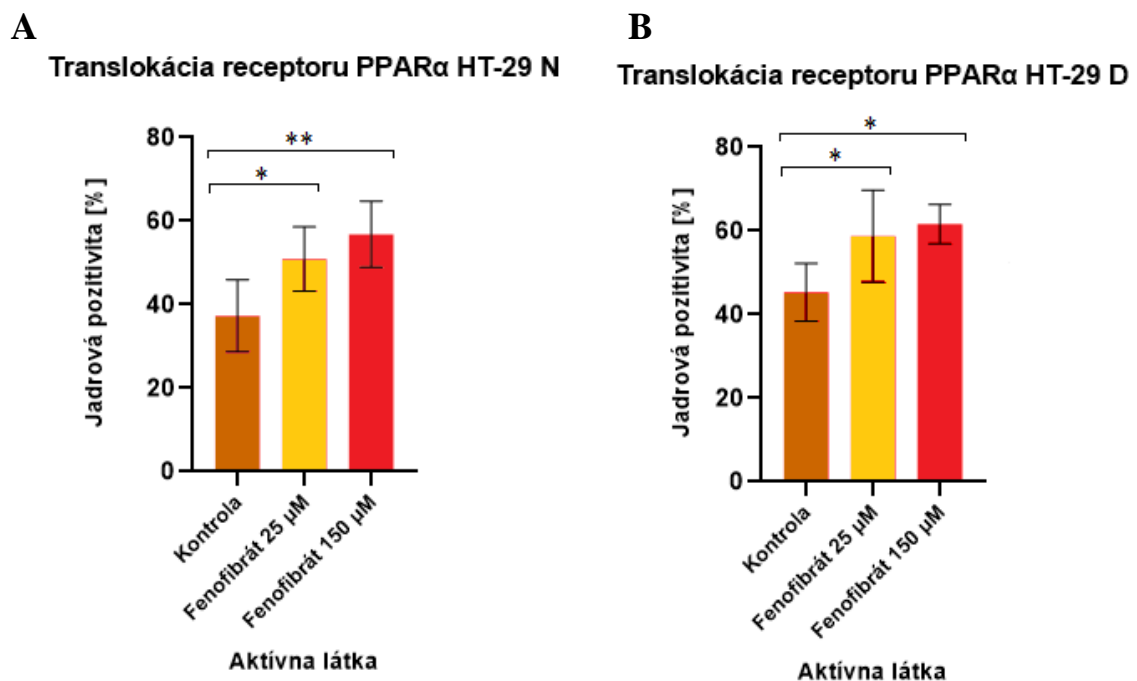
Bunková línia Caco2	Proteín	Aktívna látka	Koncentrácia [μM]	P-hodnota
Nediferencované bunky	CYP2C8	Fenofibrát	25	0,7307
		WY-14643	25	0,2600
		Fenofibrát	200	0,1079
		WY-14643	200	0,1703
	CYP2C9	Fenofibrát	25	0,7261
		WY-14643	25	0,0045
		Fenofibrát	200	0,6496
		WY-14643	200	0,7870
	CYP2J2	Fenofibrát	25	0,0933
		WY-14643	25	0,7163
		Fenofibrát	200	0,0093
		WY-14643	200	0,0972
	sEH	Fenofibrát	25	0,6053
		WY-14643	25	0,8887
		Fenofibrát	200	0,0211
		WY-14643	200	0,0275
Diferencované bunky	CYP2C8	Fenofibrát	25	0,7307
		WY-14643	25	0,2600
		Fenofibrát	200	0,1079
		WY-14643	200	0,1703
	CYP2C9	Fenofibrát	25	0,3418
		WY-14643	25	0,1529
		Fenofibrát	200	0,4590
		WY-14643	200	0,2931
	CYP2J2	Fenofibrát	25	0,1620
		WY-14643	25	0,3654
		Fenofibrát	200	0,4426
		WY-14643	200	0,5333
	sEH	Fenofibrát	25	0,2792
		WY-14643	25	0,9704
		Fenofibrát	200	0,1866
		WY-14643	200	0,1527

3.3.2. Prítomnosť receptora PPARα v jadre bunky

V prípade bunkovej línie HT-29 boli zisťované zmeny v translokácii receptora PPARα do jadra (jadrová pozitivita) u nediferencovaných a diferencovaných buniek pri použití dvoch odlišných koncentrácií fenofibrátu a WY-14643 ako ligandov PPARα.

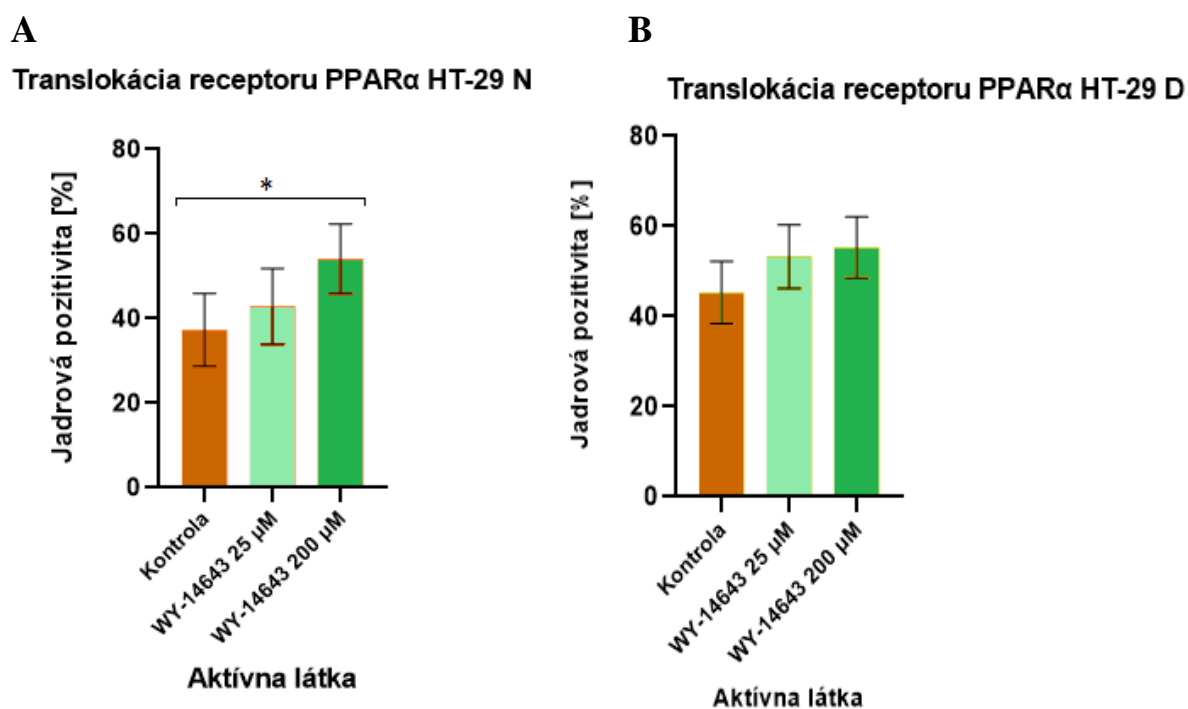
U nediferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami fenofibrátu boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a nižšou koncentraciou fenofibrátu. Zároveň boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej

pozitívite medzi kontrolou a vyššou koncentráciou fenofibrátu. V oboch prípadoch došlo k zvýšeniu jadrovej pozitivity voči kontrole. U diferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami fenofibrátu boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitívite medzi kontrolou a nižšou koncentráciou fenofibrátu. Zároveň boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitívite medzi kontrolou a vyššou koncentráciou fenofibrátu. V oboch prípadoch došlo k zvýšeniu jadrovej pozitivity voči kontrole. Kontrola v prípade nediferencovaných buniek predstavovala hodnotu jadrovej pozitivity 37,36 %, zatiaľ čo u diferencovaných buniek to bolo 45,33 %. A teda u bunkovej línie HT-29 vykazovali diferencované bunky vyššiu jadrovú pozitívitu PPAR α ako u nediferencovaných buniek pričom rozdiel nebol signifikantný. Zmeny jadrovej pozitivity sú znázornené v Grafe 9A a 9B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 7.



Graf 9A a 9B Translokácia receptoru PPAR α do jadra u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek vplyvom dvoch koncentrácií fenofibrátu. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Analýza jadrovej pozitivity bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a je vyjadrená ako jadrová pozitívitá [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý viacparametrový test ANOVA nasledovaný Dunnnovou metódou mnohonásobného porovnávania. Ak je $p < 0,05$ tak sa jadrová pozitívitá PPAR α signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N – nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

U nediferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami WY-14643 boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a vyššou koncentraciou WY-14643. Výsledky ukazujú, že došlo k zvýšeniu jadrovej positivity voči kontrole. U diferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami WY-14643 neboli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a nižšou alebo vyššou koncentraciou WY-14643. Zmeny jadrovej positivity sú znázornené v Grafe 10A a 10B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 7.



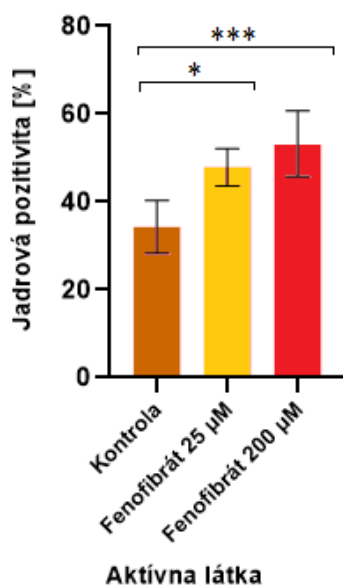
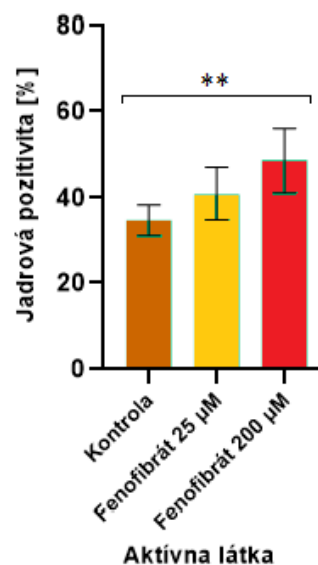
Graf 10A a 10B Translokácia receptora PPAR α do jadra u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek vplyvom dvoch koncentrácií WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Analýza jadrovej positivity bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a je vyjadrená ako jadrová pozitivita [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý viacparametrový test ANOVA nasledovaný Dunnovou metódou mnohonásobného porovnávania. Ak je $p < 0,05$ tak sa jadrová pozitivita PPAR α signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N – nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

Tabuľka 7 Štatistické vyhodnotenie rozdielov v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a aktívnou látkou a zároveň medzi dvoma aktívnymi látkami navzájom u bunkovej línie HT-29 . Signifikantné výsledky (P-hodnota) sú uvedené tučným písmom

Bunková línia HT-29	Aktívna látka	P-hodnota
Nediferencované bunky	Fenofibrát 25 µM vs. Kontrola	0,0272
	Fenofibrát 150 µM vs. Kontrola	0,0022
	Fenofibrát 25 µM vs. Fenofibrát 150 µM	0,4356
	WY-14643 25 µM vs. Kontrola	0,5507
	WY-14643 200 µM vs. Kontrola	0,0170
	WY-14643 25 µM vs. WY-14643 200 µM	0,1352
Diferencované bunky	Fenofibrát 25 µM vs. Kontrola	0,0383
	Fenofibrát 150 µM vs. Kontrola	0,0126
	Fenofibrát 25 µM vs. Fenofibrát 150 µM	0,8165
	WY-14643 25 µM vs. Kontrola	0,2025
	WY-14643 200 µM vs. Kontrola	0,0797
	WY-14643 25 µM vs. WY-14643 200 µM	0,8815

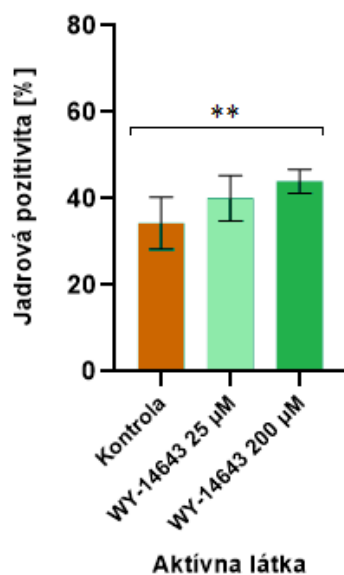
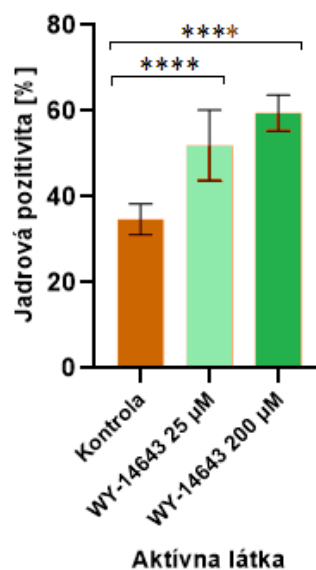
Na rozdiel od bunkovej línie HT-29 bola jadrová pozitivita u línie Caco2 rovnaká u nediferencovaných aj diferencovaných buniek. Vplyvom fibrátov však došlo k nárastu jadrovej pozitivity PPAR α , tak ako to bolo aj v prípade bunkovej línie HT-29.

U nediferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami fenofibrátu boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a nižšou koncentraciou fenofibrátu. Zároveň boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a vyššou koncentraciou fenofibrátu. V oboch prípadoch došlo k zvýšeniu jadrovej pozitivity voči kontrole. U diferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami fenofibrátu boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a vyššou koncentraciou fenofibrátu. Výsledky ukazujú, že došlo k zvýšeniu jadrovej pozitivity voči kontrole. Kontrola v prípade nediferencovaných buniek predstavovala hodnotu jadrovej pozitivity 34,29 %, zatiaľ čo u diferencovaných buniek to bolo 34,70 %. Zmeny jadrovej pozitivity sú znázornené v Grafe 11A a 11B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 8.

A**Translokácia receptoru PPAR α Caco2 N****B****Translokácia receptoru PPAR α Caco2 D**

Graf 11A a 11B Translokácia receptoru PPAR α do jadra u bunkovej línie Caco2 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek vplyvom dvoch koncentrácií fenofibrátu. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Analýza jadrovej pozitivity bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a je vyjadrená ako jadrová pozitivita [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý viacparametrový test ANOVA nasledovaný Dunnnovou metódou mnohonásobného porovnávania. Ak je $p < 0,05$ tak sa jadrová pozitivita PPAR α signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N – nediferencované bunky, D-diferencované bunky.

U nediferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami WY-14643 boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a vyššou koncentraciou WY-14643. Výsledky ukazujú, že došlo k zvýšeniu jadrovej pozitivity voči kontrole. U diferencovaných buniek ovplyvnených dvoma koncentraciami WY-14643 boli nájdené signifikantné rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a nižšou koncentraciou WY-14643 a zároveň rozdiely v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a vyššou koncentraciou WY-14643. Zmeny jadrovej pozitivity sú znázornené v Grafe 12A a 12B. P-hodnoty signifikancie sú znázornené v Tabuľke 8.

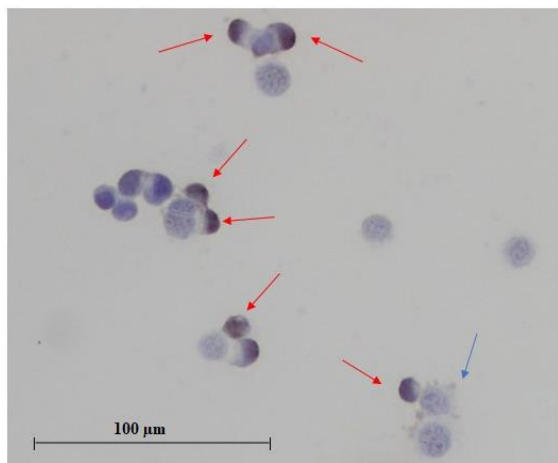
A**Translokácia receptora PPAR α Caco2 N****B****Translokácia receptora PPAR α Caco2 D**

Graf 12A a 12B Translokácia receptora PPAR α do jadra u bunkovej línie HT-29 u nediferencovaných (A) a diferencovaných (B) buniek vplyvom dvoch koncentrácií WY-14643. Na bunky kontroly bolo aplikované 0,1% DMSO. Analýza jadrovej pozitivity bola uskutočnená pomocou programu ImageJ a je vyjadrená ako jadrová pozitivita [%] \pm SD. Pre štatistické vyhodnotenie je použitý viacparametrový test ANOVA nasledovaný Dunnnovou metódou mnohonásobného porovnávania. Ak je $p < 0,05$ tak sa jadrová pozitivita PPAR α signifikantne líši od buniek kontroly pričom $p < 0,05$ je označené ako *, $p < 0,01$ je označené ako **, $p < 0,001$ je označené ako *** a $p < 0,0001$ je označené ako ****. N – nediferencované bunky, D- diferencované bunky.

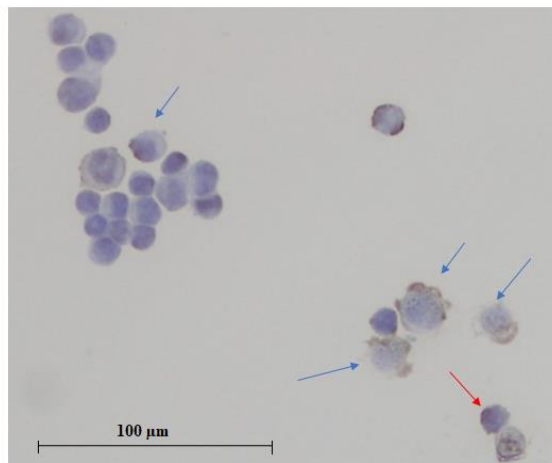
Tabuľka 8 Štatistické vyhodnotenie rozdielov v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a aktívnou látkou a zároveň medzi dvoma aktívnymi látkami navzájom u bunkovej línie Caco2 . Signifikantné výsledky (P-hodnota) sú uvedené tučným písmom.

Bunková línia Caco2	Aktívna látka	P-hodnota
Nediferencované bunky	Fenofibrát 25 μ M vs. Kontrola	0,0107
	Fenofibrát 200 μ M vs. Kontrola	0,0003
	Fenofibrát 25 μ M vs. Fenofibrát 200 μ M	0,3482
	WY-14643 25 μ M vs. Kontrola	0,1549
	WY-14643 200 μ M vs. Kontrola	0,0097
	WY-14643 25 μ M vs. WY-14643 200 μ M	0,3987
Diferencované bunky	Fenofibrát 25 μ M vs. Kontrola	0,1433
	Fenofibrát 200 μ M vs. Kontrola	0,0013
	Fenofibrát 25 μ M vs. Fenofibrát 200 μ M	0,0680
	WY-14643 25 μ M vs. Kontrola	<0,0001
	WY-14643 200 μ M vs. Kontrola	<0,0001
	WY-14643 25 μ M vs. WY-14643 200 μ M	0,0637

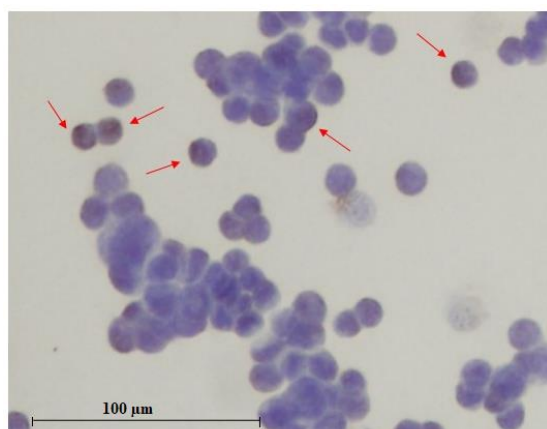
Vyhodnotenie prítomnosti receptoru PPAR α v jadre buniek bolo zaistené pomocou využitia programu ImageJ. Na vybraných fotografiách (Obrázok 9- Obrázok 23) je možné pozorovať prítomnosť receptora v jadre bunky (tmavo modro-hnedá farba, červená šípka na obrázku), poprípade je možné vidieť prítomnosť receptora v cytoplazme bunky (hnedá farba, modrá šípka na obrázku) u dvoch bunkových línií (HT-29 a Caco2).



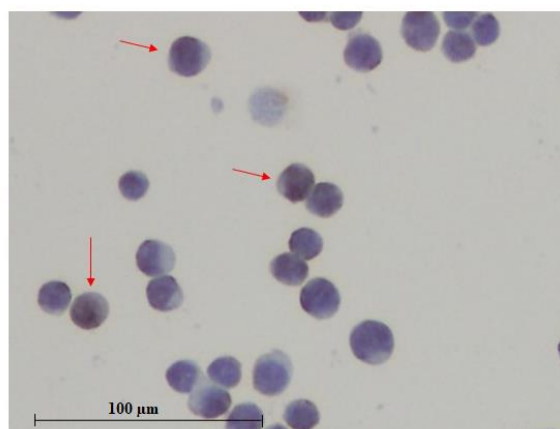
Obrázok 9 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom 150 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



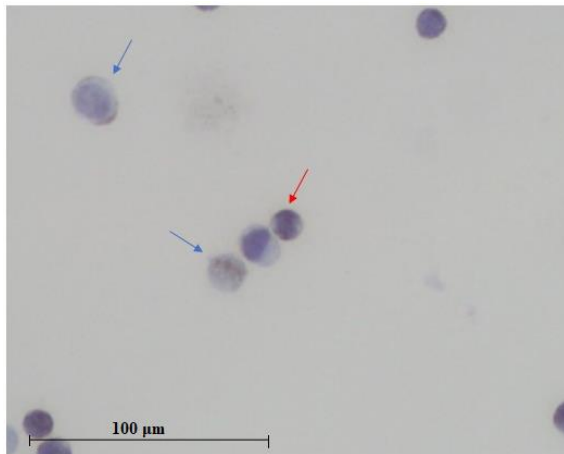
Obrázok 10 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (nediferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO-kontrola). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou, pozitivita cytoplazmy (prítomnosť receptora PPAR α v cytoplazme bunky) je označená modrou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



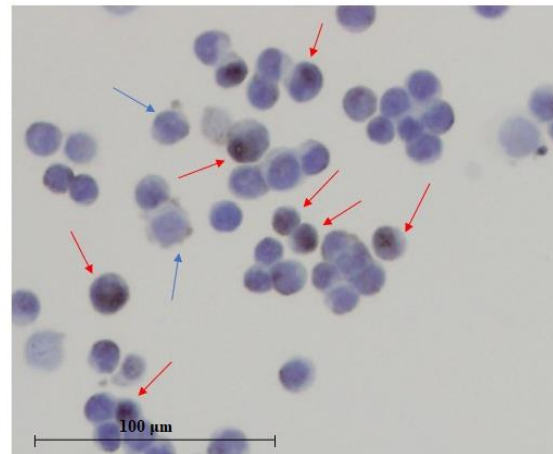
Obrázok 11 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



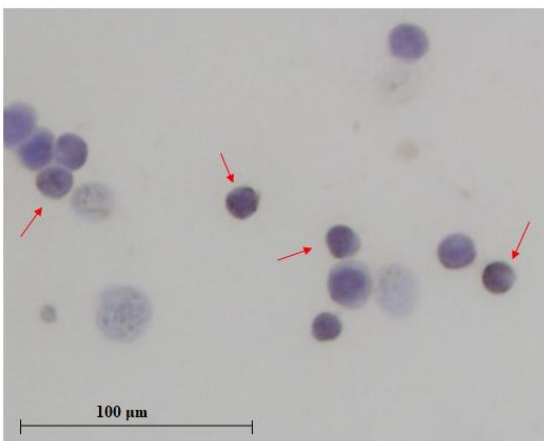
Obrázok 12 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO - kontrola). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



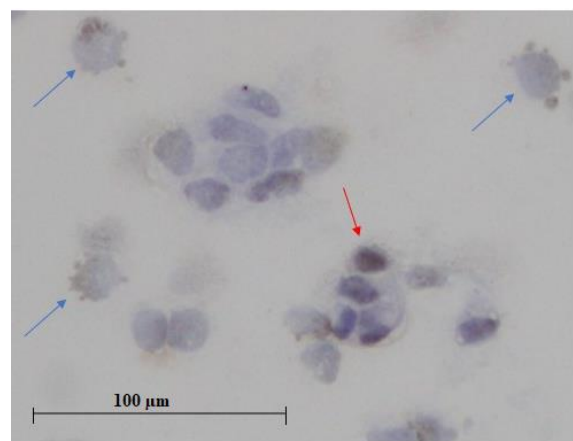
Obrázok 13 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou, pozitivita cytoplazmy (prítomnosť receptoru PPAR α v cytoplazme bunky) je označená modrou šípkou.



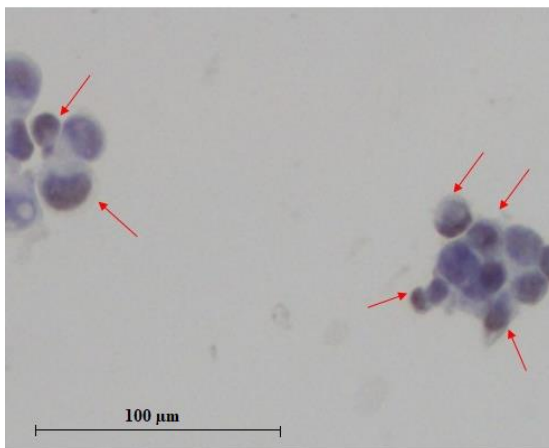
Obrázok 14 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou, pozitivita cytoplazmy (prítomnosť receptoru PPAR α v cytoplazme



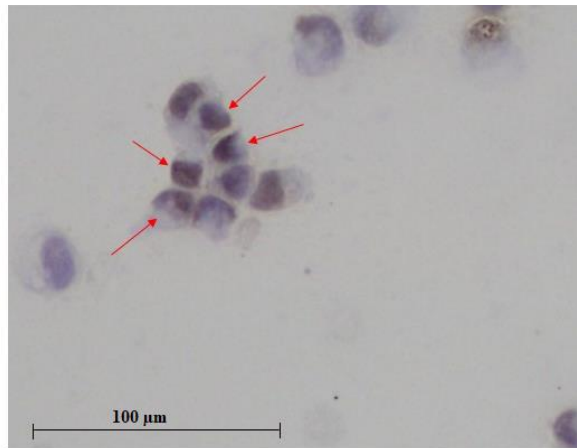
Obrázok 15 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



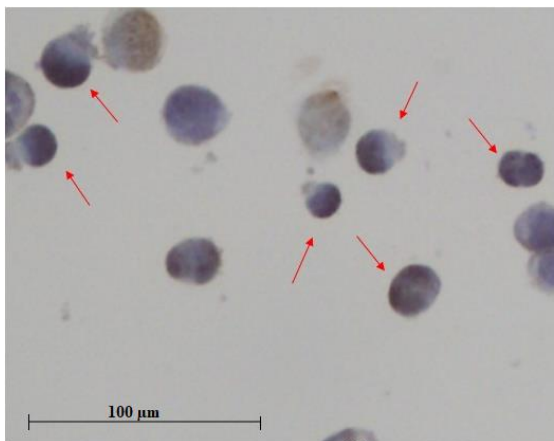
Obrázok 16 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou, pozitivita cytoplazmy (prítomnosť receptoru PPAR α v cytoplazme bunky) je označená modrou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



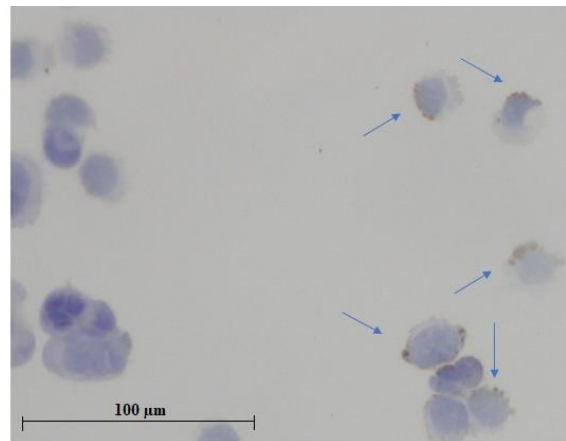
Obrázok 17 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou. Použité zväčšenie 200x.



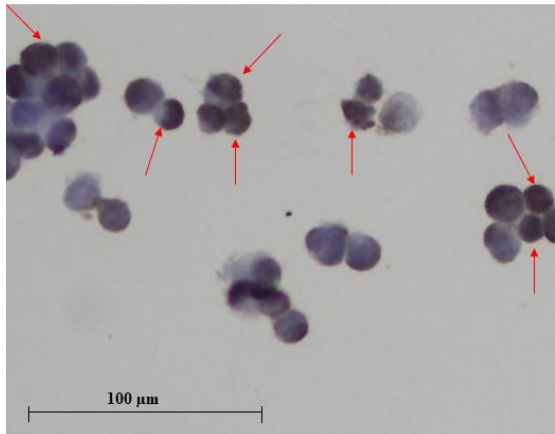
Obrázok 18 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



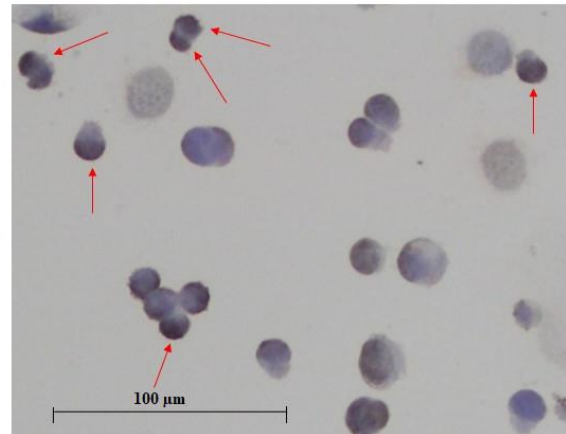
Obrázok 19 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO-kontrola). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptora PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



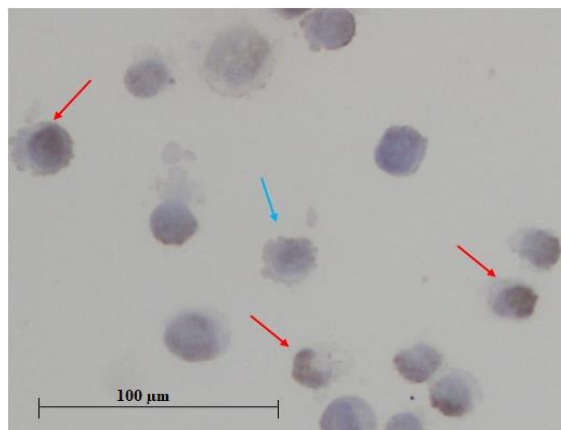
Obrázok 20 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M). Bunky s pozitivitou cytoplazmy (prítomnosť receptora PPAR α v cytoplazme bunky) sú označené modrou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



Obrázok 21 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 200 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



Obrázok 22 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou. Použité zväčšenie 200x.



Obrázok 23 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M). Bunky s jadrovou pozitivitou (prítomnosť receptoru PPAR α v jadre bunky) sú označené červenou šípkou, pozitivita cytoplazmy (prítomnosť receptoru PPAR α v cytoplazme bunky) je označená modrou šípkou. Použité zväčšenie 200x.

3.4 Diskusia

Cieľom diplomovej práce bolo sledovanie zmeny expresie enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxidhydrolázy u nediferencovaných a *in vitro* diferencovaných buniek bunkových línií HT-29 a Caco2 vplyvom dvoch rôznych koncentracií fibrátov (fenofibrát a WY-14643) pomocou In-Cell ELISy. Zároveň bola sledovaná translokácia receptora PPAR α do jadra bunky po ovplyvnení fibrátmi a to prostredníctvom analýzy obrazu po imunocytochemickom farbení.

V prvej časti diplomovej práce bola sledovaná zmena expresie CYP epoxygenáz (CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2) a solubilnej epoxidhydrolázy (sEH) u bunkových línií Caco2 a HT-29 (diferencovaných a nediferencovaných) pri použití dvoch koncentracií fibrátov (fenofibrát a WY-14643). CYP epoxygenázy metabolizujú kyselinu arachidonovú na štyri regioizoméry epoxyeikosatriénových kyselín (EETs). EETs sa následne metabolizujú hlavne solubilnou epoxidhydrolázou (sEH) na kyseliny dihydroxyeikosatriénové (DHET), ktoré sa tradične považujú za menej aktívne ako EETs (Panigrahy et al., 2010). Predošlé experimenty dokázali, že nižšia koncentrácia ligandov PPAR α mala proliferačný účinok na nediferencované bunky, zatiaľ čo vyššia koncentrácia pôsobila inhibične (Čížková et al., 2016). Jedným z možných vysvetlení rozdielnej odpovede je zmena pomeru CYP epoxygenáz a sEH, vďaka rozdielnej hladine EETs, ktoré majú cytoprotektívny účinok. Hladiny EETs sú regulované prostredníctvom rovnováhy medzi syntézou EET (vplyvom CYP epoxygenáz) a hydrolýzou EETs (vplyvom sEH). A teda moduláciou pomeru medzi CYP epoxygenázami a sEH môže nastať zvýšenie, alebo zníženie hladín EETs v návaznosti na to, sú nižšie koncentrácie fibrátov asociované s vyššou koncentraciou EETs v bunkách, zatiaľ čo vyššie koncentrácie fibrátov zvyšujú hydrolýzu EETs na DHET (Čížková, 2018). Bolo to však popísané iba v nediferencovaných bunkách HT-29 a táto diplomová práca výskum rozširuje aj na bunkovú líniu Caco2 a zároveň diferencovaný status buniek. Pričom hladina expresie sledovaných proteínov sa všeobecne líši ako medzi oboma bunkovými líniami, tak aj medzi diferencovanými a nediferencovanými bunkami (Čížková et al., 2020).

V prípade expresie CYP2C8 a CYP2C9 sa odpoveď buniek na aplikáciu fibrátov líšila medzi HT-29 a Caco2, zatiaľ čo v prípade CYP2J2 boli zmeny v expresii u oboch bunkových línií veľmi podobné. U bunkovej línie HT-29 nedošlo k výrazným zmenám expresie CYP2C8 ako u nediferencovaných, tak diferencovaných buniek. Expresia CYP2C8 u bunkovej línie Caco2 vykazovala rovnaký trend u nediferencovaných aj

diferencovaných buniek. Všeobecne došlo u proliferačnej (nižšej) koncentrácii k zvýšeniu expresie CYP2C8, zatiaľ čo inhibičná (vyššia) koncentrácia fibrátov expresiu znižovala. Zmeny expresie však v oboch prípadoch neboli signifikantné. Predošlé štúdie pozorovali nárast hladín mRNA CYP2C8 po pôsobení WY-14643, bezafibrátu, klofibrátu, fenofibrátu, gemfibrozilu a EMD 392949 (Richert et al., 2003; Prueksaritanont et al., 2005; Rakhshanderoo et al., 2009; Makia & Goldstein, 2016). Čížková et al. vo svojej práci naopak pozorovala downreguláciu expresie CYP2C8 po ovplyvnení fibrátmi. Expresia CYP2C9 u HT-29 vykazovala rovnaký trend u nediferencovaných aj diferencovaných buniek, a to nárast expresie CYP2C9 po ovplyvnení vyššou koncentráciou fibrátov. Tieto zmeny boli viac zjavné u nediferencovaných buniek. U nediferencovaných buniek Caco2 bol zistený mierny pokles expresie CYP2C9, zatiaľ čo u diferencovaných buniek došlo k miernemu nárastu expresie aj napriek tomu, že zmeny boli väčšinou nesignifikantné. V prípade CYP2C9, Rakhshanderoo et al. popísala nárast expresie tohto enzýmu po použití nízkej koncentrácii (10 μ M) fibrátu WY-14643. Rozdielna odpoveď buniek mohla byť spôsobená použitím rôznych koncentrácií použitých fibrátov. Ako bolo spomenuté vyššie, rôzne koncentrácie fibrátov viedli k rôznej proliferačnej odpovedi buniek a tá bola sprevádzaná práve zmenami v expresii CYP epoxygenáz a sEH, ktorá je závislá na koncentrácii (Čížková et al. 2018). Ďalšou príčinou rozdielnej odpovede buniek by mohla byť rôzna citlivosť použitej metódy, alebo to, že zmena expresie bola nesignifikantná (pokles čo môže byť v rámci odchýlky). Rozdielna zmena expresie CYP2C8 a CYP2C9 v nediferencovaných bunkách a diferencovaných bunkách oboch línii mohla byť tiež spôsobená rozdielmi medzi samotnými bunkovými líniami navzájom. Aj napriek tomu, že sú obe bunkové línie odvodené od ľudského kolorektálneho adenokarcinómu, hladina expresie CYP2C8 a CYP2C9 sa v nediferencovaných bunkách líši: zatiaľ čo v prípade línie HT-29 bola vyššia hladina CYP2C9, v prípade bunkovej línie Caco2 bola vyššia hladina CYP2C8. Počas diferenciacie sa zmeny expresie enzýmov CYP2C8 a CYP2C9 v bunkových líniiach tiež líšia. Počas diferenciacie u buniek HT-29 expresia oboch enzýmov mierne rástla, zatiaľ čo u spontánne diferencovaných buniek Caco2 hladina oboch proteínov klesala. Z pohľadu CYP epoxygenáz a sEH sa diferencované bunky HT-29 podobali svojou expresiou dospelému hrubému črevu a spontánne diferencované bunky Caco2 odpovedali svojou expresiou fetálnemu črevu (Čížková et al., 2020).

U oboch bunkových línii v nediferencovanom stave bol pozorovaný rovnaký trend, kedy došlo k poklesu expresie CYP2J2 u inhibičnej (vyššej) koncentrácii fibrátov. Nižšia koncentrácia fibrátov viedla k miernemu nárastu expresie CYP2J2. Získané výsledky

odpovedajú štúdiu, kedy bolo zistené, že fibráty ovplyvňujú expresiu CYP2J2 v závislosti na ich koncentrácii. Hladiny CYP2J2 sa zvýšili u všetkých testovaných bunkových línií (HEK293, HepG2 a HT-29) po použití nižších koncentrácií fibrátov, zatiaľ čo vyššie koncentrácie fibrátov viedli k návratu na pôvodnú hladinu expresie, alebo dokonca k jej poklesu (Čížková, 2018). V prípade diferencovaných buniek došlo k nárastu expresie CYP2J2 u buniek HT-29, zatiaľ čo u bunkovej línie Caco2 sa expresia výrazne nemenila. Zatiaľ čo expresia CYP2C8 a CYP2C9 sa medzi nediferencovanými a diferencovanými bunkami správala opačne u línie HT-29 a Caco2, expresia CYP2J2 sa v oboch prípadoch zvyšovala, avšak u línie Caco2 bol nárast expresie oveľa vyšší (Čížková et al., 2020).

Výsledky ukazujú, že fibráty ovplyvňujú expresiu sEH v závislosti na ich koncentrácii, ale nie na diferenciačnom stave buniek. V prípade proliferačnej (nižšej) koncentrácie sa expresia sEH nemenila, alebo dokonca znižovala. Na rozdiel od toho inhibičná (vyššia) koncentrácia fibrátov viedla u oboch bunkových línií k nárastu expresie sEH ako u buniek nediferencovaných, tak diferencovaných. Bolo dokázané, že nárast expresie sEH doprevádza diferenciáciu oboch bunkových línií (Čížková et al. 2020).

Získané výsledky naznačujú, že regulácia expresie CYP epoxygenáz a sEH fibrátmi je závislá na jadrovom receptore PPAR α . Receptory aktivované peroxizómovým proliferátorom (PPAR) fungujú ako ligandom-aktivované transkripčné faktory regulujúce rôzne biologické procesy. Receptor PPAR α sa podieľa na regulácii lipidového a energetického metabolizmu (Monsalve et al., 2013), zápalových procesov a metabolizme xenobiótik (Soška, 2006; Pyper et al., 2010). K aktivácii PPAR α dochádza vplyvom rôznych endogénnych a exogénnych zložiek.

Aby PPARs fungovali ako transkripčné faktory, musí dôjsť k translokácii PPARs do jadra, kde sa spájajú s transkripčným aparátom. Tauber et al. v jeho práci demonštroval ako cytoplazmatickú tak jadrovú prítomnosť receptora PPAR α v bunkovej líni MCF7 za použitia imunocytochemickej metódy. Ďalej zistil, že celková hladina expresie PPAR α sa nelíšila od kontroly po aplikácii nízkej koncentrácie fibrátu WY-14643. Preukázal zároveň štatisticky významný presun PPAR α do jadra naznačujúci jeho aktiváciu. Čížková et al. tiež detekovala presun PPAR α do jadra po stimulácii buniek (HEK293, HepG2 a HT-29) nízkymi koncentráciami fibrátov. Umemoto & Fujiki dokázali, že PPAR α (aj PPAR γ) sa dynamicky presúvajú medzi jadrom a cytoplazmou, hoci sa prevažne vyskytujú v jadre. Zároveň zistili, že transport receptora PPAR α je urýchlenný väzbou príslušného ligandu. Výsledky dosiahnuté v tejto práci ukazujú, že k vyššiemu presunu receptora do jadra dochádzalo v závislosti na koncentrácii použitých fibrátov. Navyše bolo zistené, že vyššia

jadrová pozitivita bola pozorovaná u diferencovaných buniek v porovnaní s nediferencovanými u línie HT-29, zatiaľ čo u línie Caco2 sa nelíšila. Bolo zistené, že so zvyšujúcou sa koncentráciou použitého fibrátu dochádza k navýšeniu jadrovej positivity u oboch použitých bunkových línií (HT-29 a Caco2). Získané výsledky teda odpovedajú vyššie spomenutým výsledkom (Tauber et al., 2019; Čížková et al., 2016, Umamoto & Fujiki, 2012).

Na základe toho je možné usudzovať, že regulácia expresie CYP epoxygenáz a sEH je závislá na PPAR α . Regulácia expresie týchto proteínov by mohla byť jedným z mechanizmov akými sa PPAR α podieľa na regulácii proliferácie a diferenciácie buniek. Rozdielna zmena expresie CYP epoxygenáz a sEH po ovplyvnení rôznymi koncentraciami fibrátov viedla pravdepodobne k rozdielnej koncentrácii metabolitov kyseliny arachidonovej tvorenými týmito enzýmami. Predchádzajúce práce popisovali, že nižšie koncentrácie fibrátov boli asociované s vyššou proliferačnou aktivitou buniek a pravdepodobne na základe pomeru CYP epoxygenáz a sEH aj s vyššou koncentraciou EETs v bunkách, zatiaľ čo vyššie koncentrácie fibrátov znižovali proliferáciu buniek a zároveň zvyšovali ich hydrolýzu solubilnou epoxidhydrolázou (Suchanek et al., 2002; Čížková, 2018; Tauber et al. 2019). Wei et al. zároveň zistil, že vyššia expresia sEH inhibovala proliferáciu tak ako aj migráciu buniek rakoviny prsníka. Zvýšenie expresie sEH po ovplyvnení vyššou koncentraciou fibrátov viedlo pravdepodobne k vyššej hydrolýze EETs a tým k zvýšeniu koncentrácie DHETs. Zvýšenie expresie sEH a tým aj DHETs je dôležité pri diferenciácii adipocytov z mezenchymálnych kmeňových buniek (Kim et al. 2010) a tiež doprevádza diferenciáciu buniek HT-29 a Caco2 *in vitro* (Čížková et al. 2020). V diplomovej práci bolo dokázané zvýšenie expresie sEH u oboch testovaných nádorových črevných bunkových línií po aplikácii vyšších dávok fibrátov, čo by mohlo naznačovať rolu týchto látok v diferenciácii buniek. Na overenie tohto predpokladu by bolo vhodné sledovať expresiu niektorého z diferenciačných markerov ako napríklad villínu, alebo alkalickéj fosfatázy.

Fibráty sú agonistami receptorov PPAR α a majú široké využitie v klinickej praxi ako hypolipidemiká. Navyše, je potrebné upriamiť pozornosť na vplyv polutantov z prostredia ako napríklad ftalátov, herbicídov, kyseliny perfluorooktanovej (PFOA), esteru kyseliny ftalovej (DEHP), kyseliny perfluorodekanovej (PFDA), perfluorooktansulfonátu (PFOS) ako u ľudí, tak aj u hlodavcov, alebo vtákov (Berger & Moller, 2002; Haluzík & Svačina, 2005; Takacs & Abbott, 2007; Cwinn et al, 2008; Abbott et al., 2010; Čížková, 2018). Spomenuté environmentálne faktory aktivujúce PPAR α a spúšťajúce transkripciu

rôznych génov by mohli hrať dôležitú úlohu v rozvoji nádorových ochorení a ich progresii (Lock et al., 1989; Suchanek et al., 2002; Grabacka et al., 2004; Leclerc et al., 2010). Preto by objasnenie role PPAR α malo byť predmetom ďalšieho výskumu.

3.5 Záver

Predložená diplomová práca bola zameraná na ovplyvnenie nediferencovaných a *in vitro* diferencovaných buniek bunkových línií HT-29 a Caco2 dvoma rôznymi koncentraciami fibrátov (fenofibrát a WY-14643) s cieľom sledovať zmenu expresie enzýmov CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 a solubilnej epoxidhydrolázy pomocou In-Cell ELISy. Zároveň bola sledovaná translokácia receptora PPAR α do jadra bunky po ovplyvnení fibrátmi a to prostredníctvom analýzy obrazu po imunocytochemickom farbení.

Na základe série experimentov vykonaných v experimentálnej časti práce bola preukázaná úloha fibrátov v regulácii expresie CYP epoxygenáz a solubilnej epoxidhydrolázy ako u nediferencovaných tak u *in vitro* diferencovaných buniek HT-29 a Caco2.

Na rozdiel od sEH sa regulácia expresie CYP2C8, CYP2C9, CYP2J2 ako v rámci bunkových línií HT-29 a Caco2, tak v rôznych diferenciačných stavoch líšila. Rôzne výsledky hladín expresie medzi líniami mohli byť spôsobené tým, že diferencované bunky HT-29 sa podobali svojou expresiou dospelému hrubému črevu a spontánne diferencované bunky Caco2 odpovedali svojou expresiou fetálnemu črevu aj napriek tomu, že obe línie sú odvodené od ľudského adenokarcinómu hrubého čreva.

V prípade expresie sEH bolo spoločným rysom oboch bunkových línií v oboch diferenciačných stavoch zvýšenie jej expresie po ovplyvnení vyššou (inhibičnou) koncentraciou fibrátov. Nižšia (proliferatívna) koncentrácia fibrátov viedla k zníženiu expresie alebo sa v porovnaní s kontrolou nemenila.

Ďalej bola zistená na koncentrácii závislá vyššia jadrová pozitivita buniek po ovplyvnení fibrátmi. To by mohlo naznačovať, že regulácia expresie CYP epoxygenáz a sEH pomocou fibrátov by mohla byť závislá na PPAR α .

Vzhľadom na to, že nádorové ochorenia čreva sú v súčasnej dobe pomerne rozšírené v populácii, boli pri experimentálnej časti diplomovej práce použité bunkové línie odvodené od adenokarcinómu hrubého čreva. Kyselina arachidonová je dôležitou zložkou potravy. Zároveň slúži ako substrát CYP epoxygenáz. Kyselina arachidonová ďalej patrí k agonistom receptora PPAR α rovnako ako jej metabolity EETs a DHETs. Na expresiu CYP epoxygenáz a sEH vplýva rada rôznych faktorov: lieky- fibráty, ktoré majú hypolipidemický účinok, alebo môže byť expresia ovplyvnená aj polutantmi z prostredia. Preto je porozumenie vzájomných vzťahov PPAR α , CYP epoxygenáz a solubilnej

epoxidhydrolázy v popredí vedeckého a medicínskeho záujmu. Výsledky tejto diplomovej práce by mohli slúžiť ako podklad pre ďalší výskum.

Referencie

1. Abbott B. D., Wood C. R., Watkins A. M., Das K. P., Lau C. S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha, Beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues. *PPAR research*, 2010, 690907.
2. Abedi E., Sahari M. A. (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*, 2(5), 443-463.
3. Baguley B. C. (2010) Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Molecular biotechnology*, 46(3), 308-316.
4. Barak Y., Liao D., He W., Ong E.S., Nelson M.C., Olefsky J.M., Boland R., Evans R.M. (2002) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (1), 303-308.
5. Barbier O., Villeneuve L., Bocher V., Fontaine C., Torra I. P., Duhem C., Kosykh V., Fruchart J. CH., Guillemette CH., Staels, B. (2003) The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor α and γ target gene. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13975-13983.
6. Barclay T. B., Peters J. M., Sewer M. B., Ferrari L., Gonzalez F. J., Morgan E. T. (1999) Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor- α dependent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(3), 1250-1257.
7. Berger J. & Moller D. E. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53(1), 409-435.
8. Blann A. D., Li J. L., Li C., Kumar S. (2001) Increased serum VEGF in 13 children with Wilms' tumour falls after surgery but rising levels predict poor prognosis. *Cancer letters*, 173(2), 183-186.
9. Bock K. W. (2003) Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochemical Pharmacology*, 66(5), 691-696.
10. Boitier E., Gautier J. C., Roberts, R. (2003) Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comparative hepatology*, 2(1), 3.
11. Bookout A. L., Jeong Y., Downes M., Ruth T. Y., Evans R. M., Mangelsdorf D. J. (2006) Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*, 126(4), 789-799.
12. Carroll R. & Severson D. L. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor- α ligands inhibit cardiac lipoprotein lipase activity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(2), H888-H894.
13. Collett G. P., Betts A. M., Johnson M. I., Pulimood A. B., Cook S., Neal D. E., Robson, C. N. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor α is an androgen-responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6(8), 3241-3248.

14. Corton J. C., Lapinskas P. J., Gonzalez F. J. (2000) Central role of PPAR α in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(2), 139-151.
15. Cowart L. A., Wei S., Hsu M. H., Johnson E. F., Krishna M. U., Falck J. R., Capdevila J. H. (2002) The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35105-35112.
16. Cronin A., Mowbray S., Dürk H., Homburg S., Fleming I., Fisslthaler B., Oesch F., Arand M. (2003) The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(4), 1552-1557. Čížková K. (2018) Expression of cytochrome P450 epoxygenases and soluble epoxide hydrolase is regulated by hypolipidemic drugs in dose-dependent manner. *Toxicology and applied pharmacology*, 355, 156-163.
17. Cwinn M. A., Jones S. P., Kennedy S. W. (2008) Exposure to perfluorooctane sulfonate or fenofibrate causes PPAR- α dependent transcriptional responses in chicken embryo hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(2), 165-171.
18. Čížková K. (2018) Expression of cytochrome P450 epoxygenases and soluble epoxide hydrolase is regulated by hypolipidemic drugs in dose-dependent manner. *Toxicology and applied pharmacology*, 355, 156-163.
19. Čížková K., Birke P., Malohlava J., Tauber Z., Huskova Z., Ehrman J. (2020) HT-29 and Caco2 cell lines are suitable models for studying a role of arachidonic acid-metabolizing enzymes in intestinal cell differentiation. *Cells Tissues Organs*, 208(1-2), 37-47.
20. Čížková K., Konieczna A., Erdosova B., Lichnovska R., Ehrmann J. (2012) Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochromes P450: new way to overcome multidrug resistance? *BioMed Research International*, 2012, 1-10.
21. Čížková K., Rajdova A., Ehrmann J. (2015) Spatio-Temporal Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α During Human Prenatal Development. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 116(4), 361-366.
22. 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(1), 164.
23. Dawson M. I. & Xia Z. (2012) The retinoid X receptors and their ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821 (1), 21-56.
24. Dedhia P. H., Bertaux-Skeirik N., Zavros Y., Spence J. R. (2016) Organoid models of human gastrointestinal development and disease. *Gastroenterology*, 150(5), 1098-1112.
25. Desvergne B. & Wahli W. (1999) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews*, 20, 649-688.
26. Dhaini H. R., Thomas D. G., Giordano T. J., Johnson T. D., Biermann J. S., Leu K., Hollenberg P.F., Baker L. H. (2003) Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *Journal of clinical oncology*, 21(13), 2481-2485.
27. DiRenzo, J., Söderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M. H., Ricote, M., Ingrey S., Hörlein A., Rosenfeld M.G. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors

- differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Molecular and cellular biology*, 17(4), 2166-2176.
28. Dowell P., Ishmael J. E., Avram D., Peterson V. J., Nevriy, D. J., Leid M. (1999) Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor α interacting protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15901-15907.
 29. Eriksson M. A., Zetterqvist M. A., Lundgren B., Andersson K., Beije B., DePierre (1991) Studies on the intracellular distributions of soluble epoxide hydrolase and of catalase by digitonin-permeabilization of hepatocytes isolated from control and clofibrate-treated mice. *European journal of biochemistry*, 198(2), 471-476.
 30. Fang X., Hu S., Xu B., Snyder G. D., Harmon S., Yao J, Liu Y., Sangras B., Falck J. R., Weintraub N.L., Arthur A., Spector, A. A. (2006) 14, 15-Dihydroxyeicosatrienoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(1), H55-H63.
 31. Fang X., Kaduce T. L., Weintraub N. L., Harmon S., Teesch L. M., Morisseau C., Thompson D.A., Hammock B.D., Spector, A. A. (2001) Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14867-14874.
 32. Fournier T., Tsatsaris V., Handschuh K., Evain-Brion D. (2007) PPARs and the placenta. *Placenta*, 28(2-3), 65-76.
 33. Gervois P., Vu-Dac N., Kleemann R. (2001) Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33471–33477.
 34. Glass C. K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Reviews*, 15(3), 391-407.
 35. Goetze S., Eilers F., Bungenstock A., Kintscher U., Stawowy P., Blaschke F., Graf K., Law R.E., Fleck E., Gräfe M. (2002) PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(5), 1431-1437.
 36. Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48-58.
 37. Grabacka M., Placha W., Plonka P. M., Pajak S., Urbanska K., Laidler P., Slominski A. (2004) Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. *Archives of Dermatological Research*, 296(2), 54-58.
 38. Grabacka M., Plonka P. M., Urbanska K., Reiss K. (2006) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activation Decreases Metastatic Potential of Melanoma Cells *In vitro* via Down-Regulation of Akt. *Clinical Cancer Research*, 12(10), 3028-3036.
 39. Grygiel-Górniak B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. *Nutrition journal*, 13(1), 17.
 40. Guengerich F. P. & Turvy C. G. (1991) Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using

- immunochemical analysis of surgical liver samples. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(3), 1189-1194.
41. Hall M. G., Quignodon L., Desvergne B. (2008) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in the Brain: Facts and Hypothesis. *PPAR research*, 2008, 1-8.
 42. Haluzík M. & Svačina Š.(2005) Metabolický syndrom a nukleární receptory: PPAR. pp. 1-136. Grada Publishing a.s., Praha, Česká republika.
 43. Hanna V. S. & Hafez E. A. A. (2018) Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*, 11, 23-32.
 44. Hara A., Hibi T., Yoshioka M., Toda K., Watanabe N., Hayashi A., Iwao Y., Saito H., Watanabe T., Tsuchiya M. (1993) Changes of proliferative activity and phenotypes in spontaneous differentiation of a colon cancer cell line. *Japanese journal of cancer research*, 84(6), 625-632.
 45. Hardwick J. P., Song B. J., Huberman E., Gonzalez F. J. (1987) Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochrome P-450LA omega). Identification of a new cytochrome P-450 gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 801–810.
 46. Huang H., Morisseau C., Wang J., Yang T., Falck J. R., Hammock B. D., Wang M. H. (2007) Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(1), F342-F349.
 47. Hughes-Fulford M., Tjandrawinata R. R., Li C. F., Sayyah S. (2005) Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A₂ in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 26(9), 1520-1526.
 48. Huin, C., Corriveau, L., Bianchi, A., Keller, J. M., Collet, P., Krémarik-Bouillaud, P., Domenjoud L., Bécuwe P., Schohn H., Ménard D., Dauça, M. (2000) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(5), 603-611.
 49. Cheema S. K. & Agellon L. B. (2000) The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor α . *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12530-12536.
 50. Chen C. & Wang D. W. (2013) CYP epoxygenase derived EETs: From cardiovascular protection to human cancer therapy. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(12), 1454-1469.
 51. Chen C. & Wang D. W. (2015) Cytochrome P450-CYP2 family-epoxygenase role in inflammation and cancer. *Advances in Pharmacology*, 74, 193-221.
 52. Chen G., Wang P., Zhao G., Xu G., Gruzdev A., Zeldin D. C., Wang, D. W. (2011) Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 attenuates nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 96(1-4), 63-71.
 53. Chen J., Capdevila J. H., Zeldin D. C., Rosenberg R. L. (1999) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Molecular pharmacology*, 55(2), 288-295.
 54. Cheng L. M., Jiang J. G., Sun Z. Y., Chen C., Dackor R. T., Zeldin D. C., Wang D. W. (2010) The epoxyeicosatrienoic acid-stimulated phosphorylation of EGF-R involves the activation of

- metalloproteinases and the release of HB-EGF in cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica*, 31(2), 211-218.
55. Inoue, J., Satoh, S. I., Kita, M., Nakahara, M., Hachimura, S., Miyata, M., Nishimaki-Mogami T, Sato R (2008) PPAR α gene expression is up-regulated by LXR and PXR activators in the small intestine. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 675-678.
 56. Isenberg J. S., Kolaja K. L., Ayoubi S. A., Watkins J. B., Klaunig J. E. (1997) Inhibition of WY-14,643 induced hepatic lesion growth in mice by rotenone. *Carcinogenesis*, 18(8), 1511–1519.
 57. Issemann I. & Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645–650.
 58. Janani C., Ranjitha Kumari BD (2015) PPAR gamma gene – A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9(1), 46-50.
 59. Jayadev S., Linardic C. M., Hannun Y. A. (1994) Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 269(8), 5757-5763.
 60. 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 research*, 65(11), 4707-4715.
 61. Jiang J. G., Ning Y. G., Chen C., Ma D., Liu Z. J., Yang S., Card J. W. et al. (2007) Cytochrome p450 epoxygenase promotes human cancer metastasis. *Cancer research*, 67(14), 6665-6674.
 62. Johansson C., Stark A., Sandberg M., Ek B., Rask L., Meijer J. (1995) Tissue specific basal expression of soluble murine epoxide hydrolase and effects of clofibrate on the mRNA levels in extrahepatic tissues and liver. *Archives of toxicology*, 70(1), 61-63.
 63. Kasai T., Miyauchi K., Yokoyama T., Aihara K., Daida H. (2006) Efficacy of peroxisome proliferative activated receptor (PPAR)- α ligands, fenofibrate, on intimal hyperplasia and constrictive remodeling after coronary angioplasty in porcine models. *Atherosclerosis*, 188(2), 274-280.
 64. Kauffman A. L., Gyurdieva A. V., Mabus J. R., Ferguson C., Yan, Z., Hornby P. J. (2013) Alternative functional *in vitro* models of human intestinal epithelia. *Frontiers in pharmacology*, 4, 79.
 65. Kersten S. (2014) Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Molecular metabolism*, 3(4), 354-371.
 66. Kersten S., Mandard S., Escher P., Gonzalez F.J., Tarufi S., Desvergne B., Wahli W. (2001) The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB Journal*, 15(11), 1971–1978.
 67. 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.

68. Kimura S., Hardwick J. P., Kozak C. A., Gonzalez F. J. (1989) The rat clofibrate-inducible CYP4A subfamily II. cDNA sequence of IVA3, mapping of the Cyp4a locus to mouse chromosome 4, and coordinate and tissue-specific regulation of the CYP4A genes. *Dna*, 8(7), 517-525.
69. Kota B. P., Huang T. H., Roufogalis B. D. (2005) An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 51(2),85-94.
70. Leclerc J., Tournel G., Ngangue E. C. N., Pottier N., Lafitte J. J., Jaillard S., Mensier E., Lhermitte M., Broly F., Lo-Guidice, J. M. (2010) Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers. *Biochimie*, 92(3), 292-306.
71. Lee H. C., Lu T., Weintraub N. L., VanRollins M., Spector A. A., Shibata E. F. (1999) Effects of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 519(1), 153-168.
72. Lee S. S., Pineau T., Drago J., Lee E. J., Owens J. W., Kroetz D. L., Fernandez-Salguero P.M., Westphal H., Gonzalez F.J. (1995) Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Molecular and cellular biology*, 15(6), 3012-3022.
73. Lee Y., Yu X., Gonzales F., Mangelsdorf D. J., Wang M. Y., Richardson C., Witters L.A., Unger R. H. (2002) PPAR α is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99(18), 11848-11853.
74. Lock, E. A., Mitchell A. M., Elcombe C. R. (1989) Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29(1), 145–163.
75. Lu T., Katakam P. V., VanRollins M., Weintraub N. L., Spector A. A., Lee, H. C. (2001) Dihydroxyeicosatrienoic acids are potent activators of Ca²⁺-activated K⁺ channels in isolated rat coronary arterial myocytes. *The Journal of physiology*, 534(3), 651-667.
76. Maggiora M., Bologna M., Cerù M. P., Possati L., Angelucci A., Cimini A., Miglietta A., Bozzo F., Margiotta Ch., Muzio G., Canuto R.A. (2004) An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 112(6), 909-919.
77. Makia N. L. & Goldstein J. A. (2016) CYP2C8 is a novel target of peroxisome proliferator-activated receptor α in human liver. *Molecular pharmacology*, 89(1), 154-164.
78. Mariadason J. M., Rickard K. L., Barkla D. H., Augenlicht L. H., Gibson P. R. (2000) Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. *Journal of cellular physiology*, 183(3), 347-354.
79. Michalik L. & Wahli W. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 991-998.
80. Michalik L., Desvergne B., Wahli W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 61-70.

81. Monsalve FA, Pyarasani R.D., Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm*, 2013, 1-18.
82. Motojima K., Passilly P., Peters J.M., Gonzalez F.J., Latruffe N. (1998) Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor and activators in a tissue- and inducer-specific manner. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16710-16714.
83. Neve B. P., Fruchart J. C., Staels B. (2000). Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochemical pharmacology*, 60(8), 1245-1250.
84. 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.
85. Ng V. Y., Morisseau C., Falck J. R., Hammock B. D., Kroetz D. L. (2006) Inhibition of Smooth Muscle Proliferation by Urea-Based Alkanoic Acids via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α -Dependent Repression of Cyclin D1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(11), 2462-2468.
86. Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwiertka, K. (2000) Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. Typická MDR. *Klinická onkologie*, 13(2), 4-9.
87. Oni-Orisan A., Cresci S., Jones P. G., Theken K. N., Spertus J. A., Lee C. R. (2018) Association between the EPHX2 p. Lys55Arg polymorphism and prognosis following an acute coronary syndrome. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 138, 15-22.
88. Palmer C. N., Hsu M. H., Griffin K. J., Raucy J. L., Johnson E. F. (1998) Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Molecular pharmacology*, 53(1), 14-22.
89. Panigrahy D., Edin M. L., Lee C. R., Huang S., Bielenberg D. R., Butterfield C. E., Benny O. et al. (2012) Epoxyeicosanoids stimulate multiorgan metastasis and tumor dormancy escape in mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 178-191.
90. Panigrahy D., Greene E. R., Pozzi A., Wang D. W., Zeldin D. C. (2011) EET signaling in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3-4), 525-540.
91. Panigrahy D., Kaipainen A., Greene E. R., Huang S. (2010) Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(4), 723-735.
92. Panigrahy D., Kaipainen A., Huang S., Butterfield C. E., Barnés C. M., Fannon M., Laforme A.M., Chaponis D.M., Folkman J., Kieran M.W. (2008) PPAR α agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 985-990.
93. Panigrahy D., Kalish B. T., Huang S., Bielenberg D. R., Le H. D., Yang J., Butterfield C. E. et al. (2013) Epoxyeicosanoids promote organ and tissue regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13528-13533.
94. Patsouris D., Mandard S., Voshol P. J., Escher P., Tan N.S., Havekes L.M., Koenig W., März W., Tafuri S., Wahli W., Müller M., Kersten S. (2004) PPAR α governs glycerol metabolism,. *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), 94-103.

95. Peters J. M., Cattley R. C., Gonzalez F. J. (1997) Role of PPAR α in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18(11), 2029–2033.
96. Pineda Torra I., Jamshidi Y., Flavell D. M., Fruchart J. C., Staels B. (2002) Characterization of the human PPAR α promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Molecular endocrinology*, 16(5), 1013-1028.
97. Pinot F., Grant D. F., Spearow J. L., Parker A. G., Hammock B. D. (1995) Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice. *Biochemical pharmacology*, 50(4), 501-508.
98. Pinto M., Robine-Léon S., Appay M.D., Kedingler M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, 323–330.
99. Pozzi A., Ibanez M. R., Gatica A. E., Yang S., Wei S., Mei S., Falck J.R., Capdevila J. H. (2007) Peroxisomal proliferator-activated receptor- α -dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17685-17695.
100. Pozzi A., Macias-Perez I., Abair T., Wei S., Su Y., Zent, R., Falck J.R., Capdevila J. H. (2005) Characterization of 5, 6-and 8, 9-epoxyeicosatrienoic acids (5, 6-and 8, 9-EET) as potent *in vivo* angiogenic lipids. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27138-27146.
101. Pozzi A., Popescu V., Yang S., Mei S., Shi M., Puolitaival S. M., Caprioli R.M., Capdevila, J. H. (2010) The anti-tumorigenic properties of peroxisomal proliferator-activated receptor α are arachidonic acid epoxygenase-mediated. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12840-12850.
102. Prueksaritanont T., Richards K. M., Qiu Y., Strong-Basalyga K., Miller A., Li C., Eisenhandler R., Carlini E. J. (2005) Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes. *Pharmaceutical research*, 22(1), 71-78.
103. Pyper S. R., Viswakarma N., Yu S., Reddy J. K. (2010) PPAR α : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling*, 8(1), nrs-08002.
104. Rakhshandehroo M., Hooiveld G., Müller M., Kersten S. (2009) Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR α between mouse and human. *PloS one*, 4(8), e6796.
105. Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research*, 2010, 1-20.
106. Rees W. D., McNeil C. J., Maloney C. A. (2008) The roles of PPARs in the fetal origins of metabolic health and disease. *PPAR research*, 2008, 1-8.
107. Rickard K. L., Gibson P. R., Young G. P., Phillips W. A. (1999) Activation of protein kinase C augments butyrate-induced differentiation and turnover in human colonic epithelial cells *in vitro*. *Carcinogenesis*, 20(6), 977-984.
108. Richert L., Lamboley C., Viollon-Abadie C., Grass P., Hartmann N., Laurent S., Heyd B., Manton G., Chibout S.D., Staedtler, F. (2003) Effects of clofibric acid on mRNA expression profiles in primary cultures of rat, mouse and human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(2), 130-146.

109. Roberts R. A., James N. H., Woodyatt N. J., Macdonald N., Tugwood J. D. (1998) Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α). *Carcinogenesis*, 19(1), 43–48.
110. Roberts-Thomson S. J., Snyderwine E. G. (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. *Toxicology letters*, 118(1-2), 79-86.
111. Robinson G, Most D, Ferguson LB, Mayfield J, Harris RA, Blednov YA (2014) Neuroimmune pathways in alcohol consumption: evidence from behavioral and genetic studies in rodents and humans. *Int Rev Neurobiol*, 118,13–39.
112. Rodriguez-Antona C., Gomez A., Karlgren M., Sim S. C., Ingelman-Sundberg M. (2010) Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Human genetics*, 127(1), 1-17.
113. Rochat B. (2005) Role of cytochrome P450 activity in the fate of anticancer agents and in drug resistance. *Clinical pharmacokinetics*, 44(4), 349-366.
114. Roman R. J. (2002) P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological reviews*, 82(1), 131-185.
115. Rushmore T. H. & Kong N. T. (2002) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*, 3(5), 481–490.
116. Rusyn I., Rose M. L., Bojes H. K., Thurman R. G. (2000) Novel role of oxidants in the molecular mechanism of action of peroxisome proliferators. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2(3), 607-621.
117. Saidi S. A., Holland C. M., Charnock-Jones D. S., Smith S. K. (2006) *In vitro* and *in vivo* effects of the PPAR α agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Molecular cancer*, 5(1), 13.
118. Sanderson L. M., de Groot P. J., Hooiveld G. J., Koppen A., Kalkhoven E., Müller M., Kersten S. (2008) Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics. *PLoS one*, 3(2), e1681.
119. Scotto C., Keller J. M., Schohn H., Dauca M. (1995) Comparative effects of clofibrate on peroxisomal enzymes of human (Hep EBNA2) and rat (FaO) hepatoma cell lines. *European journal of cell biology*, 66(4), 375-381.
120. Scripture C. D., Sparreboom A., Figg W. D. (2005) Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *The lancet oncology*, 6(10), 780-789.
121. Shappell S. B., Olson S. J., Hannah S. E., Manning S., Roberts R. L., Masumori N., Shook M. F. et al. (2003) Elevated expression of 12/15-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in a transgenic mouse model of prostate carcinoma. *Cancer research*, 63(9), 2256-2267.
122. Shen G. F., Jiang J. G., Fu X. N., Wang D. W. (2008) Promotive effects of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on proliferation of tumor cells. *Ai Zheng*, 27, 390-5.
123. Schoonjans K., Peinado-Onsurbe J., Lefebvre A. M., Heyman R. A., Briggs M., Deeb S., Staels B., Auwerx J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*, 15(19), 5336–5348.

124. Simon-Assmann P., Turck N., Sidhoum-Jenny M., Gradwohl G., Kedinger M. (2007) *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell biology and toxicology*, 23(4), 241-256.
125. Soška V. (2006), Jadrové receptory PPAR α , *Súčasná klinická prax*, 3, 25-27.
126. Spector A. A. & Norris A. W. (2007) Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(3), C996-C1012.
127. Spector A. A. (2009) Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S52-S56.
128. Spector A. A., Fang X., Snyder G. D., Weintraub N. L. (2004) Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in lipid research*, 43(1), 55-90.
129. Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebreton M., Torra I. P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J. CH., Najib J., Maclouf J., Tedgui A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature*, 393 (6687), 790-793.
130. Stienstra R., Mandard S., Patsouris D., Maass C., Kersten S., Muller M. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor α protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology*, 148(6), 2753-2763.
131. Suchanek K. M., May F. J., Robinson J. A., Lee W. J., Holman N. A., Monteith G. R., Roberts-Thomson S. J. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 34(4), 165-171.
132. Takacs M. L. & Abbott B. D. (2007) Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (α , β/δ , γ) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicological Sciences*, 95(1), 108-117.
133. Tallima H. & Ridi R. (2018) Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits—a review. *Journal of advanced research*, 11, 33-41.
134. Tanaka T., Kohno H., Yoshitani S. I., Takashima S., Okumura A., Murakami A., Hosokawa M. (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer research*, 61(6), 2424-2428.
135. 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. *Medical Molecular Morphology*, 1-8.
136. Tollet P., Strömstedt M., Frøyland L., Berge R. K., Gustafsson J. A. (1994) Pretranslational regulation of cytochrome P450A1 by free fatty acids in primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of lipid research*, 35(2), 248-254.
137. Umemoto T., & Fujiki Y. (2012) Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes to Cells*, 17(7), 576-596.
138. Vanden Heuvel J.P. & Peters J.M. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptors. In *Comprehensive Toxicology*, Vol. 2 *Cellular and Molecular Toxicology* (McQueen C.A., Bond J, Ramos K, et al., ed.), pp. 145–167, Elsevier, New York, USA.

139. Varet J., Vincent L., Mirshahi P., Pille J. V., Legrand E., Opolon P., Mishal Z., Soria J., Li H., Soria C. (2003) Fenofibrate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(4), 810-819.
140. Voskoboinik I., Drew R., Ahokas, J. T. (1996) Differential effect of peroxisome proliferators on rat glutathione S-transferase isoenzymes. *Toxicology letters*, 87(2-3), 147-155.
141. Vu-Dac N., Schoonjans K., Kosykh V., Dallongeville J., Fruchart J. C., Staels B., Auwerx J. (1995) Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *The Journal of clinical investigation*, 96(2), 741-750.
142. Vu-Dac N., Schoonjans K., Laine B., Fruchart J. C., Auwerx J., Staels B. (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein AI promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 31012-31018.
143. Wang H., Zhao Y., Bradbury J. A., Graves J. P., Foley, J., Blaisdell J.A., Goldstein J.A., Zeldin D.C. (2004) Cloning, expression, and characterization of three new mouse cytochrome p450 enzymes and partial characterization of their fatty acid oxidation activities. *Molecular Pharmacology*, 65, 1148-1158.
144. 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(1), 841.
145. Wen X., Wang J. S., Backman J. T., Kivistö K. T., Neuvonen P. J. (2001) Gemfibrozil is a potent inhibitor of human cytochrome P450 2C9. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), 1359-1361.
146. Wilkinson G. R. (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response. *New England Journal of Medicine*, 352(21), 2211-2221.
147. Wray J. A., Sugden M. C., Zeldin D. C., Greenwood G. K., Samsuddin S., Miller-Degraff L., Bishop-Bailey D. et al. (2009) The epoxygenases CYP2J2 activates the nuclear receptor PPAR α *in vitro* and *in vivo*. *PloS one*, 4(10).
148. Wu P., Peters J. M., Harris R. A. (2001) Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochemical and biophysical research communications*, 287(2), 391-396.
149. Wu S., Moomaw C. R., Tomer K. B., Falck J. R., Zeldin D. C. (1996) Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3460-3468.
150. Xu D., Li N., He Y., Timofeyev V., Lu L., Tsai H. J., Kim I.H., Tuteja D., Mateo R.K.P., Singapuri A., Davis B.B., Low R., Hammock B.D., Chiamvimonvat N. (2006) Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18733-18738.
151. Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Plunket K. D., Moore L. B., Collins J. L, Moore J. T. (2001) Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13919-13924.

152. Yan G., Chen S., You B., Sun J. (2008) Activation of sphingosine kinase-1 mediates induction of endothelial cell proliferation and angiogenesis by epoxyeicosatrienoic acids. *Cardiovascular research*, 78(2), 308-314.
153. Yeldandi A. V., Rao M. S., Reddy J. K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(2), 159-177.
154. Zanger U. M. & Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103-141.
155. Zeldin D. C. (2001) Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36059–36062.
156. Zeldin D. C., Foley J., Goldsworthy S. M., Cook M. E., Boyle J. E., Ma J., Moomaw C.R., Tomer K.B., Steenbergen Ch., Wu S. (1997) CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Molecular pharmacology*, 51(6), 931-943.
157. Zeldin D. C., Foley J., Ma J., Boyle J. E., Pascual J. M., Moomaw C. R., Tomer K.B., Steenbergen C., Wu S. (1996) CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Molecular pharmacology*, 50(5), 1111-1117.
158. Zock P. L., Blom W. A., Nettleton J. A., Hornstra G. (2016) Progressing insights into the role of dietary fats in the prevention of cardiovascular disease. *Current cardiology reports*, 18(11), 111.

Internetové zdroje

The human gene database (Gene Cards) <https://www.genecards.org/>

Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Znázornenie pozície génov PPAR na chromozómoch	14
Obrázok 2 Schématické znázornenie funkčných domén receptoru PPAR α	15
Obrázok 3 Štruktúry syntetických ligandov PPAR α	19
Obrázok 4 Schématické znázornenie účinku PPAR.....	21
Obrázok 5 Dôsledky a mechanizmus aktivácie PPAR α prostredníctvom peroxizómových proliferátorov v pečeni hlodavca.....	25
Obrázok 6 Štruktúra kyseliny linolovej, kyselina α -linolénovej a kyseliny arachidonovej.....	27
Obrázok 7 Premena kyseliny arachidonovej na epoxyeikosatriénové kyseliny (EETs) a následne na dihydroxyeikosatriénové kyseliny (DHET)	29
Obrázok 8 Bifunkčné domény sEH.....	31
Obrázok 10 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (nediferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO-kontrola)	66
Obrázok 9 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom 150 μ M).....	66
Obrázok 12 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO - kontrola).	66
Obrázok 11 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M)..	66
Obrázok 16 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M).	67
Obrázok 15 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M).	67
Obrázok 13 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M)	67
Obrázok 14 Expresia PPAR α u bunkovej línie HT-29 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M).	67
Obrázok 20 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M)..	68
Obrázok 19 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené 0,1% DMSO-kontrola).	68
Obrázok 18 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M).	68
Obrázok 17 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (diferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 25 μ M).	68
Obrázok 22 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 25 μ M).	69
Obrázok 21 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené fenofibrátom - 200 μ M).	69
Obrázok 23 Expresia PPAR α u bunkovej línie Caco2 (nediferencované bunky ovplyvnené WY-14643 - 200 μ M)..	69

Zoznam tabuliek a grafov

Tabuľka 1 Protinádorové látky ako substráty cytochrómu P450.	35
Tabuľka 2 Použité primárne protilátky, ich označenie, výrobca, pôvod, klonalita a riedenie.	39
Tabuľka 3 Prehľad použitých koncentrácií fenofibrátu a WY-14643 u bunkových línií HT-29 a Caco2.....	46
Tabuľka 4 Použité protilátky pre metódu imunocytochemického farbenia.	49
Tabuľka 5 Štatistické vyhodnotenie signifikancie zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u bunkovej línie HT-29	55
Tabuľka 6 Štatistické vyhodnotenie signifikancie zmeny expresie CYP epoxygenáz a sEH u bunkovej línie Caco2..	60
Tabuľka 7 Štatistické vyhodnotenie rozdielov v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a aktívnou látkou a zároveň medzi dvoma aktívnymi látkami navzájom u bunkovej línie HT-29	63
Tabuľka 8 Štatistické vyhodnotenie rozdielov v jadrovej pozitivite medzi kontrolou a aktívnou látkou a zároveň medzi dvoma aktívnymi látkami navzájom u bunkovej línie Caco2	65