

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Jiří Hanyk

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role inhibitoru PPAR-alfa
v diferenciaci buněčné linie Caco-2**

Diplomová práce

Bc. Jiří Hanyk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021 19/20

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jiří HANYK
Osobní číslo: R190058
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Role inhibitoru PPAR-alfa v diferenciaci buněčné linie Caco-2
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Stanovení proliferační aktivity nediferencovaných a diferencovaných buněk Caco-2 po ovlivnění GW6471 (inhibitorem jaderného receptoru PPAR-alfa) při koncentraci $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ a $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.
2. Stanovení změny exprese villin, PPAR-alfa, CYP2J2 a solubilní epoxidhydroláza (sEH) v nediferencovaných a diferencovaných buňkách Caco-2 po ovlivnění GW6471 při koncentraci $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ a $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ pomocí metody In-Cell ELISA.
3. Stanovení exprese PPAR-alfa ve vzorcích tkání kolorektálního nádoru a zdravé tkáně pacientů metodou imunohistochemie pomocí programu ImageJ.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Cizkova 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.
- Cizkova 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.
- Barker N. (2014): Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (1):19-33.
- Kim DH., Vanella L., Inoue K., Burgess A., Gotlinger K., Manthali VL., Koduru SR., Zeldin DC., Falck JR., Schwartzman ML., Abraham NG (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): 1863-73.
- Ammazzalorso A., De Lellis L., Florio R., Bruno I., De Filippis B., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Perconti S., Verginelli F., Cama A., Amoroso R. (2017): Cytotoxic effect of a family of peroxisome proliferator-activated receptor antagonists in colorectal and pancreatic cancer cell lines. *Chemical Biology and Drug Design* 90 (5): 1029-1035.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
Ústav histologie a embryologie

Datum zadání diplomové práce: 16. prosince 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANATOMIE, FYZIOLOGIE A GENETIKY
Štepláčkova 27, 783 71 Olomouc - Holič
tel. +420 585 634 901

Bibliografické údaje

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. Jiří Hanyk |
| Název práce: | Role inhibitoru PPAR α v diferenciaci buněčné linie Caco-2 |
| Typ práce: | diplomová |
| Pracoviště: | katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci |
| Vedoucí práce: | Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2021 |
| Abstrakt: | |

Diplomová práce v teoretické části shrnuje informace o patogenezi a molekulárně genetické podstatě kolorektálního karcinomu. V souvislosti s nádorovými onemocněními je popsána problematika receptorů aktivovaných proliferátory peroxizómů (PPARs), konkrétně izoforma PPAR α . Práce je zaměřena na funkci receptoru při buněčných procesech proliferace a diferenciaci v různých nádorových tkáních, a v neposlední řadě popisuje vliv PPAR α na tumorigenezi v souvislosti s jeho inhibitorem GW6471.

Experimentální část dokládá výsledky testování inhibitoru GW6471 na diferenciaci buněčné nádorové linie Caco-2, která je odvozená od kolorektálního adenokarcinomu. Inhibitor PPAR α byl aplikován na nediferencované a diferencované buňky ve dvou různých koncentracích – 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Účinek ligandu na proliferaci byl měřen prostřednictvím proliferacího testu, který byl porovnán s mírou změny exprese zvolených proteinů – villin (diferenční marker), PPAR α , CYP2J2 a solubilní epoxid hydroláza. Imunohistochemické barvení v kombinaci se softwarovým programem ImageJ s pluginem IHC Profiler bylo použito ke kvantifikaci rozdílů proteinové hladiny PPAR α ve vzorkách normální a nádorové tkáně pacientů.

| | |
|----------------|---|
| Klíčová slova: | PPAR α ; kolorektální karcinom; Caco-2; GW6471; diferenciaci |
| Počet stran: | 59 |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | český |

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Jiří Hanyk
Title: The role of PPAR-alpha inhibitor in differentiation of Caco-2 cell line
Type of thesis: master
Department: department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor: Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.
The year of presentation: 2021
Abstract:

This diploma thesis summarizes information about the pathogenesis and molecular genetic basis of colorectal carcinoma. In association with cancer illnesses, we describe the problem of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), specifically with a focus on the isoform of PPAR α and its function in cellular processes such as proliferation and differentiation in various tumour tissues and its effect on tumorigenesis in association with PPAR α antagonist, GW6471.

The experimental part exemplifies the results of testing of PPAR α inhibitor GW6471 treatment on the differentiation of the tumour cell line Caco-2, which is derived from colorectal adenocarcinoma. The PPAR α inhibitor was administered to undifferentiated and differentiated cells at two different concentrations – 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. The effect of the ligand used on cell proliferation was measured by the WST-1 proliferation assay, which was compared with the relative change of expression of selected proteins of interests – villin (marker of differentiation), PPAR α , CYP2J2 and soluble epoxide hydrolase. Immunohistochemical staining in combination with ImageJ analysis with a novel IHC (ImunoHistoChemistry) profiler plugin was used to quantify differences in PPAR α expression in samples of normal and tumour tissue.

Keywords: PPAR α ; colorectal cancer; Caco-2; GW6471; differentiation
Number of pages: 59
Number of appendices: 0
Language: czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Kateřiny Čížkové, Ph.D. a za použití literárních zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

Bc. Jiří Hanyk

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí diplomové práce Mgr. Kateřině Čížkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady, které mě dovedly k sepsání této práce. Zároveň bych rád poděkoval Ústavu histologie a embryologie LF UP za poskytnutí přátelského prostředí po dobu mé laboratorní činnosti. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK | VII |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | IX |
| SEZNAM TABULEK..... | X |
| 1 ÚVOD | 1 |
| 2 CÍLE PRÁCE..... | 2 |
| 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 3.1 Kolorektální karcinom | 3 |
| 3.1.1 Patogeneze kolorektálního karcinomu..... | 3 |
| 3.1.2 Molekulární a genetická podstata kolorektálního karcinomu..... | 5 |
| 3.1.2.1 Chromozomální nestabilita (CIN)..... | 5 |
| 3.1.2.2 Mikrosatelitní nestabilita (MSI)..... | 7 |
| 3.1.2.3 Metylace CpG ostrůvků (CIMP)..... | 7 |
| 3.1.3 Grading a Staging | 7 |
| 3.2 Receptory aktivované proliferátory peroxizómů alfa (PPAR α)..... | 9 |
| 3.2.1 Molekulární mechanismus transkripční regulace | 9 |
| 3.2.1.1 Korepresory a koaktivátory | 10 |
| 3.2.2 Antagonisté PPAR α a jejich biologické účinky..... | 12 |
| 3.2.3 Potenciál pro prevenci a léčbu rakoviny | 16 |
| 3.2.4 PPAR α a iniciace karcinogeneze | 21 |
| 3.2.5 Role PPAR α v diferenciaci | 22 |
| 4 MATERIÁL A METODY | 25 |
| 4.1 Biologický materiál..... | 25 |
| 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky..... | 25 |
| 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení | 26 |
| 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy | 27 |
| 4.4.1 Kultivace buněčné linie Caco-2 a aplikace inhibitoru GW6471 | 27 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.4.1.1 | Nediferencované buňky | 27 |
| 4.4.1.2 | Diferencované buňky | 28 |
| 4.4.2 | Test proliferace (WST-1 test) | 28 |
| 4.4.3 | In-Cell Elisa (ICE) | 29 |
| 4.4.4 | Imunochemické barvení..... | 31 |
| 4.4.4.1 | Imunohistochemické barvení | 31 |
| 4.4.4.2 | Imunocytochemické barvení | 32 |
| 4.4.5 | Imunohistochemická kvantitativní analýza | 33 |
| 4.4.6 | Statistické hodnocení | 34 |
| 5 | VÝSLEDKY | 35 |
| 5.1 | Hodnocení proliferace a změny exprese sledovaných proteinů v nediferencovaných a diferencovaných buňkách Caco-2..... | 35 |
| 5.2 | Imunochemická analýza..... | 37 |
| 6 | DISKUZE | 40 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 43 |
| 8 | LITERATURA | 44 |
| 9 | PŘÍLOHA | 58 |

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------------|--|
| AF-2 | doména s aktivační funkcí závislou na ligandu; ligand-dependent Activation Function |
| Akt (PKB) | protein kináza B; thymomas of Akr mice |
| AMPK | AMP-aktivovaná protein kináza; 5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase |
| <i>APC</i> gen | Adenomatous Polyposis Coli |
| BAD | Bcl-2 Associated Death promotor |
| CBP | CREB Binding Protein |
| CDK4 | cyklin-dependentní kináza 4; Cyclin-Dependent Kinase 4 |
| CRC | kolorektální karcinom; ColoRectal Cancer |
| CREB | cAMP-Responsive Element Binding protein |
| CIMP | CpG Island Methylator Phenotype |
| CIN | chromozomální nestabilita; Chromosomal INstability |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidin; 3,3'-DiAminoBenzidine |
| DBD | DNA-vazebná doména; DNA-Binding Domain |
| <i>DDC</i> gen | Deleted in Colorectal Carcinoma |
| DHETs | dihydroxyeikosatrienové kyseliny; DiHydroxyEicosaTrienoic acids |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | dimetylsulfoxid; DiMethyl SulfOxide |
| EETs | epoxyeikosatrienové kyseliny; EpoxyEicosaTrienoic acids |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| FAP | familiární adenomatózní polypóza; Familial Adenomatous Polyposis |
| FOXO | Forkhead boX O |
| GDP/GTP | guanosindifosfát / guanosintrifosfát; Guanosine-5'-DiPhosphate / Guanosine-5'-TriPhosphate |
| GSK3 β | glykogensyntáza kináza 3 β ; Glycogen Synthase Kinase-3 beta |
| HAT | histon acetyltransferáza; Histone AcetylTransferase |
| HDAC | histon deacetyláza; Histone DeACetylase |
| HNPCC | dědičná nepolypózní kolorektální rakovina; Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer |
| HNPGL | paragangliomy hlavy a krku; Head and Neck ParaGangLiomas |
| HRP | křenová peroxidáza; Horse-Radish Perosidase |

| | |
|-----------------|--|
| ICE | In-Cell ELISA |
| LBD | ligand-vazebná doména; Ligand-Binding Domain |
| LOH | ztráta heterozygotnosti; Loss Of Heterozygosity |
| MMR | system oprav chybného párování bází; MisMatch Repair |
| MSI | mikrosatelitní nestabilita; MicroSatellite Instability |
| mTOR | mammalian Target Of Rapamycin kinase |
| PBP | PPAR γ Binding Protein |
| PRIC | PPAR α -Interacting Cofactor |
| NCoR | Nuclear Corepressor Receptor |
| NF- κ B | jaderný faktor kappa B; Nuclear Factor kappa B |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza; PhosphoInositide-3-Kinase |
| PPARs | receptory aktivované proliferátory peroxizómů; Peroxisome Proliferator Activated Receptors |
| RXR | receptor kyseliny 9-cis-retinové; Retinoid X Receptor |
| sEH | solubilní epoxid hydroláza; soluble Epoxide Hydrolase |
| SMRT | Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors |
| SRC-1 | Steroid Rceptor Coactivator-1 |
| SWI/SNF | SWItch/Sucrose Non-Fermenting |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin; 3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine |
| TNF | faktor nádorové nekrózy; Tumor Necrosis Factor |
| <i>TP53</i> gen | Tumor protein P53 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Vývoj kolorektálního karcinomu. | 4 |
| Obrázek 2: Genetické změny spojené s kolorektální tumorigenezí. | 6 |
| Obrázek 3: Protinádorové aktivity antagonisty PPAR α GW6471. | 14 |
| Obrázek 4: Chemické struktury reprezentativních antagonistů PPAR α . | 15 |
| Obrázek 5: Potenciál PPAR α pro prevenci a léčbu rakoviny. | 18 |
| Obrázek 6: Aktivita PPAR α a AMPK v rakovinných buňkách vystavených energetickému stresu. | 20 |
| Obrázek 7: Schéma ovlivnění nediferencovaných buněk inhibitorem GW6471. | 28 |
| Obrázek 8: Schéma ovlivnění diferencovaných buněk inhibitorem GW6471. | 28 |
| Obrázek 9: Graf proliferační aktivity společně s grafem exprese zvolených proteinů v nediferencované buněčné linii Caco-2. | 36 |
| Obrázek 10: Graf proliferační aktivity společně s grafem exprese zvolených proteinů v diferencované buněčné linii Caco-2. | 36 |
| Obrázek 11: Individuální hodnoty histoskóre jednotlivých patientských vzorků. | 37 |
| Obrázek 12: Reprezentativní mikrofotografie exprese PPAR α v normální tkáni tlustého střeva a při různém stupni gradingu kolorektálního karcinomu společně s hodnotami histoskóre pro jednotlivé patientské vzorky. | 38 |
| Obrázek 13: Reprezentativní mikrofotografie exprese PPAR α v buněčné linii Caco-2 po ovlivnění inhibitorem GW6471. | 39 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: TNM klasifikace. | 8 |
| Tabulka 2: Poměr ředění pro primární protilátky použité při ICE. | 30 |
| Tabulka 3: Charakteristika vzorků tkáně tlustého střeva a kolorektálního karcinomu pro imunohistochemické barvení. | 58 |

1 ÚVOD

Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (PPARs) jsou kromě energetické homeostáze zapojeny do buněčných procesů jako jsou proliferace, diferenciace nebo zánět, které se mohou potencionálně podílet na iniciaci karcinogeneze. Úloha PPAR α v nádorech je stále kontroverzním tématem a jeho přesná role není dosud objasněna, jelikož účinky receptoru na proliferaci a diferenciaci v nádorových buňkách vykazují pleiotropní charakter u různých modelů rakovin. Vliv PPAR α na diferenciaci byl popsán u řady buněčných linií jako jsou například osteocyty, keratinocyty, adipocyty nebo buňky kostní dřeně. Na druhé straně, vztah PPAR α na proliferaci byl prokázán například u potkaních hepatocytů a buněk mléčné žlázy. Zdali se PPAR α podílí na procesu diferenciace u střevních enterocytů není zatím známo.

PPAR α byl identifikován již na počátku 90. let 20. století. Za tuto dobu byla publikována řada studií, které zmiňují přirozené nebo syntetické agonisty receptoru a popisují jejich rozličné funkce v metabolických drahách. Naproti tomu existuje jen málo vědeckých článků, které se zabývají potencionální protinádorovou aktivitou antagonistů PPAR α , kteří jsou schopni potlačit aktivaci receptoru, a narušit tím tak metabolismus a životaschopnost rakovinných buněk. Cílení a modulace aktivity PPAR α tak činí tento receptor atraktivním nástroje k léčbě a prevenci rakoviny.

2 CÍLE PRÁCE

1. Stanovit proliferační aktivitu nediferencovaných a diferencovaných buněk nádorové linie Caco-2 po ovlivnění GW6471 (inhibitor jaderného receptoru PPAR α) v koncentraci 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

2. Metodou In-Cell ELISA stanovit změnu exprese villinu, PPAR α , CYP2J2 a solubilní epoxid hydrolázy (sEH) v nediferencovaných a diferencovaných buňkách nádorové linie Caco-2 po ovlivnění GW6471 v koncentraci 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3. Stanovit expresi PPAR α ve vzorkách tkání kolorektálního nádoru a zdravých tkáních tlustého střeva metodou imunohistochemie v kombinaci s programem ImageJ.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Kolorektální karcinom

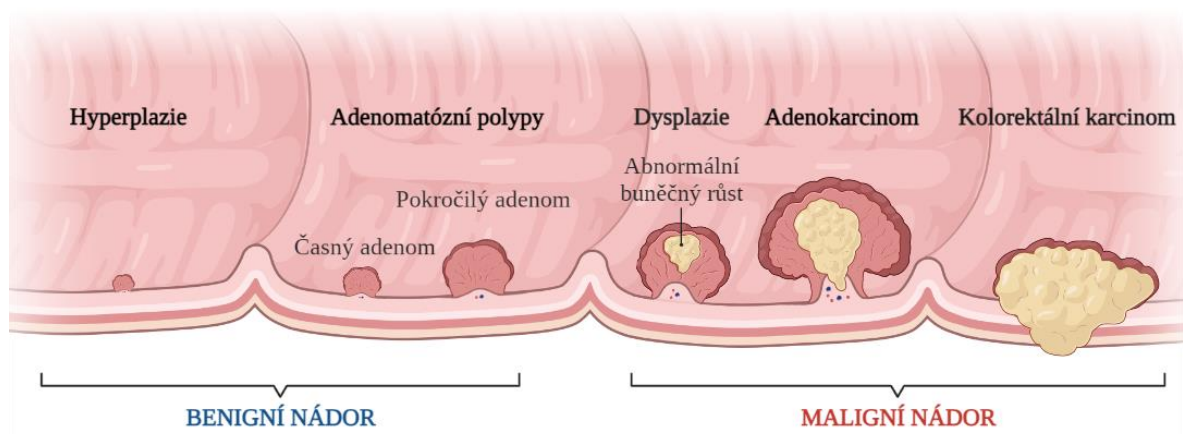
Kolorektální karcinom (colorectal cancer; CRC) je nádorové onemocnění tlustého střeva, které v roce 2020 patřilo mezi třetí nejčastější maligní onemocnění na světě – 1. rakovina prsu a 2. rakovina plic. V rámci ČR se jednalo o druhé nejčastější nádorové onemocnění u žen a rovněž u mužů – 1. rakovina prsu u žen a prostaty u mužů (GLOBOCAN, 2020). Lze to tak přičíst jako důsledek celosvětově rostoucí průměrné délce života, špatným stravovacím návykům (strava bohatá na živočišné tuky a chudá na vlákninu) a nárůstu rizikových faktorů, mezi které se řadí například kouření cigaret, konzumace alkoholu, nízká fyzická aktivita a mnoho dalších (Kuipers *et al.*, 2015).

Většina CRC se vyvíjí sporadicky (88–94 %), na pozadí dědičných syndromů rakoviny, tzv. hereditární forma (5–10 %) nebo je asociovaná s idiopatickými střevními záněty (1–2 %). Sporadický CRC vzniká v důsledku postupné akumulace mutací (Fearon *et Vogelstein*, 1990), kdy nejvýznamnějším endogenním rizikovým faktorem je věk – nárůst incidence CRC pozorujeme od 50. roku života (Král *et al.*, 2016). Hereditární formy vznikají na základě zděděné mutace (Bogaert *et Prenen*, 2014). Mezi nejčastější dvě autozomálně dominantní dědičné onemocnění řadíme familiární adenomatózní polypózu (FAP), způsobenou zárodečnou mutací v genu *APC* (viz kapitola 3.1.2.1) a Lynchův syndrom, dříve nazývaný jako hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), kdy vrozená mutace postihuje tzv. mutátorové geny, které se podílejí na opravách chybně spárovaných bází (Chew *et al.*, 2015). Mezi zánětlivá onemocnění střev, která mohou dát základ vzniku CRC, řadíme ulcerózní kolitidu a Crohnovu chorobu. Riziko vzniku CRC signifikantně roste s délkou trvání nemoci, jejím rozsahem a aktivitou zánětu (Weitz *et al.*, 2005; Zavoral *et al.*, 2013).

3.1.1 Patogeneze kolorektálního karcinomu

Vnitřní výstelka trávicího traktu je tvořena rychle proliferujícími střevními buňkami umístěnými na bázi krypty, které slouží k udržení homeostáze sliznice. Rychlá obnova střevních buněk v kombinaci s nepříznivým prostředím, zahrnující toxiny a karcinogeny přítomné v natrávených potravinách, činí zažívací trakt ideálním místem pro vznik a vývoj rakoviny (Thomas *et Sobin*, 1995).

Převážná většina CRC vzniká uvnitř benigních prekancerózních polypů. Jedná se o výrůstky nebo agregace abnormálních buněk, lokalizované ve střevní sliznici a prominující do lumen střeva. Podle histologické skladby dělíme adenomy na tubulární, tubulovilózní a vilózní. V tomto pořadí se rovněž zvyšuje riziko maligního zvratu. Dalším důležitým parametrem, dle kterého lze usuzovat riziko malignity, je velikost polypu. Léze do velikosti 10 mm označujeme jako časné adenomy, zatímco adenomy nad touto hranicí za tzv. pokročilé adenomy s vyšším maligním potenciálem (Zavoral *et al.*, 2013). Nadměrná proliferace buněk v polypu způsobuje akumulaci genetických mutací a epigenetických změn, které se odráží na cytologické a histologické dysplazii a progresi v adenokarcinom (**Obrázek 1**). Ten může v průběhu času získat schopnost napadnout stěnu střev, případně se rozšířit do místních lymfatických uzlin a metastazovat do vzdálených míst (Lochhead *et al.*, 2014; Simon, 2016). Ačkoli histologie konvenčních tubulárních adenomů je poměrně homogenní, na molekulární a genetické úrovni se jedná vcelku o heterogenní skupinu. To by mohlo vysvětlovat, proč pouze cca 10 % polypů přechází do stadia kolorektálního karcinomu (Jones *et al.*, 2008; Engeland *et al.*, 2011).



Obrázek 1: Vývoj kolorektálního karcinomu.

(upraveno z „Benign and Malignant Colon Cancer“, BioRender.com (2020)).

Adenomatózní polypy nejsou jediné léze schopné progredovat v rakovinu. Některé rakoviny tlustého střeva a konečníku se vyvíjejí ze skupiny polypů nazývaných serátní nebo také pilovité adenomy, podle jejich pilovitého vzhledu. Tyto serátní adenomy tvoří zhruba 5–10 % všech polypů. Serátní polypy vznikají molekulárními a histologickými procesy, které jsou odlišné od tubulárních adenomů, a lze je rozdělit do třech základních kategorií: hyperplastický polyp (HP, HPP), sesilní serátní adenom/polyp (SSA/P) a tradiční serátní adenom (TSA) (Jass, 2004; Goldstein, 2006; Rex *et al.*, 2012; Bettington *et al.*, 2013; Obuch *et al.*, 2015).

3.1.2 Molekulární a genetická podstata kolorektálního karcinomu

CRC vzniká vícestupňovým karcinogenním procesem, který zahrnuje postupnou akumulaci genetických mutací a epigenetických změn, jenž vedou k přeměně normální sliznice tlustého střeva v nádorovou tkáň. Součástí tohoto transformačního procesu, trvajícího zhruba 10–15 let, je tzv. genomová nestabilita, která řídí klíčové molekulárně-patogenní kroky vedoucí k iniciaci tumorigeneze (Grady *et Carethers*, 2008). Nejčastější genetické změny, podílející se na genomové nestabilitě, zahrnují chromozomální nestabilitu, mikrosatelitní nestabilitu a metylaci CpG ostrůvků.

3.1.2.1 Chromozomální nestabilita (CIN)

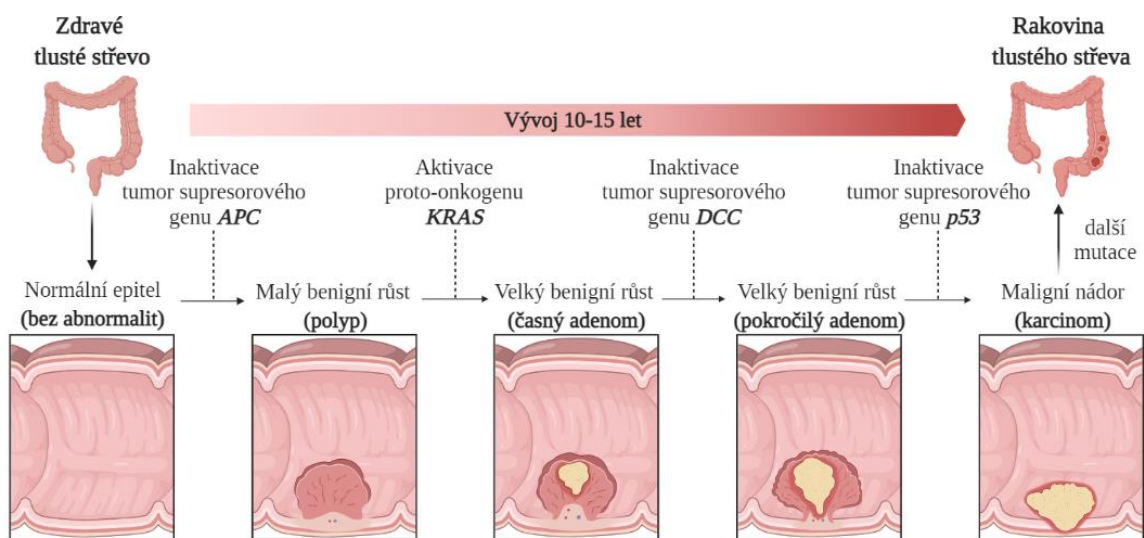
Jedná se o nejběžnější typ genomové nestability (65–70 %), způsobené četnými strukturními a numerickými změnami chromozómů (Lengauer *et al.*, 1997). Důsledkem CIN je chybný počet chromozómu (aneuploidie), chromozomální amplifikace (zmnožení úseku DNA) či ztráta heterozygotnosti – LOH (ztráta jedné alely daného lokusu). Následkem většinou bývá aktivace proto-onkogenů (*KRAS*, ...) nebo inaktivace tumor supresorových genů (*APC*, *DCC*, *TP53*, ...), což vede ke vzniku tumorigeneze (Markowitz *et Bertagnolli*, 2009; Pino *et Chung*, 2010; Al-Sohaily *et al.*, 2012).

Typicky první mutace bývá uvnitř tumor supresorového genu *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), který se podílí na proliferaci, diferenciaci, migraci, apoptóze a řízení buněčného cyklu (Kwong *et Dove*, 2009). Mutace se vyskytuje u časných stádiích nádoru a zpravidla se jedná o bodovou mutaci nebo LOH. Obecně je k manifestaci mutace tumor supresorových genů důležité, aby dle Knudsonovy hypotézy byly mutovány obě alely genu. Mutace postihující pouze jednu alelu obvykle k progresi v rakovinu nestačí (Berger *et al.*, 2011).

Z hlediska posloupnosti je velmi často mutace v genu *APC* následována mutací v proto-onkogenu *KRAS*. Produktem tohoto genu je membránový protein s GTPázovou aktivitou, který hraje roli v buněčné signalizaci ovlivňující buněčný růst, přežití, diferenciaci, proliferaci a řadu dalších buněčných dějů (Lamy *et al.*, 2011). Mutovaný protein si zachovává aktivní formu, znemožňující hydrolýzu GTP zpátky na GDP, což má za následek stimulační efekt na proliferaci a růst buněk (Armaghany *et al.*, 2012).

Gen *DCC* (Deleted in Colorectal Carcinoma) se řadí mezi tumor supresorové geny a je zodpovědný zejména za expresi transmembránového receptoru (Mehlen *et al.*, 2004). Přírozenou funkcí *DCC* je potlačení růstu buňky v případě absence endogenního ligandu netrin-1, který je produkován v kryptách kolorektální sliznice (Mazelin *et al.*, 2004; Castets *et al.*, 2011; Armaghany *et al.*, 2012). V nepřítomnosti ligandu má receptor schopnost indukovat buněčnou smrt. V případě mutace *DCC* nedochází k expresi transmembránového receptoru, následkem toho nemůže dojít k navození apoptózy a buňka nadále proliferuje. Mutace v tomto genu se zpravidla objevuje až v pokročilých formách CRC, nikoliv na počátku patogeneze (Kráľ *et al.*, 2016).

Podobně bývá v pozdější fázi vývoje CRC přítomna i mutace v genu *TP53*, která obvykle vede k přechodu adenomu na adenokarcinom (Kráľ *et al.*, 2016). Postupný sled událostí vedoucí ke vzniku maligního nádoru je zobrazen na **Obrázku 2**. Protein *TP53* funguje jako transkripční faktor s tumor supresorovou aktivitou, který je schopný aktivovat řadu genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu (koordinace oprav poškozené DNA), apoptóze a buněčném metabolismu. V případě, že nastane poškození DNA, které nelze opravit, dochází k iniciaci apoptózy. Gen *TP53* bývá zároveň nejčastěji postiženým genem v mutagenezi mnoha nádorových onemocnění (Vogelstein *et al.*, 2000; Armaghany *et al.*, 2012; Naccarati *et al.*, 2012).



Obrázek 2: Genetické změny spojené s kolorektální tumorigenezí.

(upraveno z „The Multi-Hit Model of Colorectal Cancer“, BioRender.com (2020)).

3.1.2.2 Mikrosatelitní nestabilita (MSI)

Mikrosatelitní nestabilita je způsobená defektními geny, které jsou zodpovědné za opravu chybného párování bází (Mismatch Repair; MMR), například v místě mikrosatelitu. Mikrosatelity jsou krátké sekvence opakujících se nukleotidů, jenž se vyskytují v celém genomu. Tyto úseky DNA jsou náchylné k chybám, ke kterým přirozeně dochází během replikace DNA, kdy nejsou rozpoznány proof-reading aktivitou DNA polymerázy. Mutace v tomto reparačním systému mohou být jak vrozené (germinální), tak i získané. Právě vrozená mutace je klíčová při vzniku onemocnění HNPCC (Markowitz *et Bertagnolli*, 2009; Al-Sohaily *et al.*, 2012).

3.1.2.3 Metylace CpG ostrůvků (CIMP)

Principem je aberantní hypermethylace promotorových oblastí genů, tzv. CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). Jedná se o epigenetický regulační mechanismus, kdy metylace CpG ostrůvku sice nevede ke změně DNA sekvence, ale ovlivňuje promotorovou oblast daného genu, a tím jeho expresi. Zpravidla tak dochází k epigenetickému umlčení genů (Farkas *et al.*, 2014), jenž zahrnuje kovalentní připojení metylové skupiny k poloze 5' cytosinu v opakujících se CG nukleotidech, které jsou často přítomny právě v promotorech genů (Al-Sohaily *et al.*, 2012; Armaghany *et al.*, 2012). S touto epigenetickou změnou DNA se můžeme běžně setkat například u serátních lézí (Kang, 2011).

3.1.3 Grading a Staging

Stanovení histologického typu, gradingu a stagingu CRC je základním předpokladem pro volbu optimálního léčebného postupu. Jednotná klasifikace je zcela zásadní pro posouzení rozsahu nádorového onemocnění, k predikci přežití, výběru vhodné terapie a k hodnocení efektu léčby (Zavoral *et al.*, 2013).

Histologický grading nádoru (G1– G4) určuje mikroskopický stupeň diferenciací nádorových buněk, resp. glandulární komponenty tumoru. Označení G1 udává dobře diferencovaný nádor a G4 nediferencovaný. V případě, že nelze určit stupeň diferenciací, užívá se označení Gx. Zároveň před zahájením adekvátní terapie CRC je nezbytné pacienta kompletně vyšetřit pomocí zobrazovacích metod, stanovit staging (**Tabulka 1**) a klinické stádium CRC dle TNM (z angl. Tumor, Nodes, Metastases) klasifikace (Sobin

et al., 2009). Základním nástrojem stagingu je provedení CT břicha, malé pánve a hrudníku (Zavoral *et al.*, 2013).

Tabulka 1: **TNM klasifikace.**

| | | |
|----------|-----|--|
| | Tx | nádor nemůže být vyloučen |
| | T0 | žádný primární nádor |
| | Tis | Ca <i>in situ</i> , invaze do <i>lamina propria mucosae</i> – nově HG mukózní neoplazie |
| T | T1 | invaze do submukózy |
| | T2 | invaze do <i>muskuláris propria</i> |
| | T3 | invaze přes <i>muskuláris propria</i> |
| | T4a | nádor prorůstá na viscerální peritoneum |
| | T4b | nádor prorůstá do okolních orgánů |
| | Nx | postižení uzlin nemůže být vyloučeno |
| | N0 | bez postižení regionálních lymfatických uzlin |
| | N1 | postižení 1–3 uzliny |
| | N1a | 1 uzlina |
| N | N1b | 2–3 uzliny |
| | N1c | satelity v subseróze, bez postižení regionálních lymfatických uzlin |
| | N2 | postižení 4 a více regionálních lymfatických uzlin |
| | N2a | 4–6 uzlin |
| | N2b | 7 a více uzlin |
| | Mx | vzdálené metastázy nemohou být vyloučeny |
| | M0 | bez vzdálených metastáz |
| M | M1 | vzdálené metastáze |
| | M1a | metastáze omezená na jeden orgán (játra, plíce, vaječníky, neregionální lymfatická uzlina) |
| | M2b | metastáza ve více než jednom orgánu nebo postižení peritonea |

3.2 Receptory aktivované proliferátory peroxizómů alfa (PPAR α)

Receptory aktivované proliferátory peroxizómů (Peroxisome Proliferator Activated Receptors; PPARs) jsou ligandem aktivované transkripční faktory patřící do rodiny jaderných receptorů. Dosud byly u obratlovců identifikovány tři izotypy PPARs (PPAR α , PPAR β/δ a PPAR γ), který sdílejí vysoký stupeň homologie, ale liší se v tkáňové distribuci a specifitě ligandu (Desvergne *et* Wahli, 1999; Berger *et* Moller, 2002). PPAR α byl prvním identifikovaným PPARs (Issemann *et* Green, 1990) a jeho exprese probíhá převážně ve vysoce energeticky náročných tkáních (játra, ledviny, tenké střevo, srdce nebo kosterní svaly), jenž vyžadují jako zdroj energie oxidaci mastných kyselin (Escher *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2017). PPAR α je aktivován řadou endogenních ligandů, odvozených z metabolismu mastných kyselin, a dalšími sloučeninami, které se přirozeně vyskytují ve stravě, což odpovídá skutečnosti, že PPAR α reguluje expresi mnoha genů podílejících se na metabolismu glukózy a lipidů (Schupp *et* Lazar, 2010).

PPARs řídí různé buněčné procesy, jako je proliferace, diference nebo apoptóza, a jejich účast je mimo jiné klíčová ve vývoji gastrointestinálního traktu. Deregulace PPARs způsobuje řadu patofyziologických stavů, včetně chronického zánětu nebo rakoviny (Fucci *et al.*, 2012). Přesná role PPARs v nádorech je však stále kontroverzní, a doposud není zcela známo, zda tyto receptory fungují jako tumor supresory nebo onkogeny – pleiotropní charakter v malignitě. Prostřednictvím těchto receptorů je regulováno velké množství signálních a metabolických drah, jejichž vzájemná provázanost a komplexita činí buňky náchylnými ke změně v nádor. Zapojení PPARs v tak širokém spektru drah poskytuje určité vysvětlení pro rozličné funkce v různých typech nádorů. Vzhledem k tomu, že cílení PPARs může zlepšit klinické důsledky metabolických poruch, o nichž je známo, že jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny (cukrovka, obezita, dyslipidemie, ...), činí modulace aktivit PPARs atraktivním přístupem k léčbě a prevenci rakoviny (Peters *et al.*, 2012).

3.2.1 Molekulární mechanismus transkripční regulace

Ze strukturálního hlediska mají PPARs společnou obecnou receptorovou organizaci s výjimkou odlišné DNA vazebné domény (DNA Binding Domain; DBD) a domény vázající ligand (Ligand Binding Domain; LBD) (Renaud *et* Moras, 2000). Při vazbě endogenního nebo syntetického ligandu do místa LBD, dochází k aktivaci PPARs,

což vyvolá konformační změnu, která způsobí uvolnění korepresorů s aktivitou histon deacetyláz (HDAC). Následně dochází k dimerizaci, tvorbě heterodimeru s receptorem kyseliny 9-cis-retinové (PPAR:RXR), a DNA vazebná doména, tvořená dvěma zinkovými prsty, rozpozná konsenzuální sekvenci DNA v promotorové oblasti cílových genů, tzv. PPAR response elements (PPRE). Preiniciační komplex a koaktivátory s aktivitou histon acetyltransferáz (HAT) vedou k remodelaci chromatinu, dochází k nasednutí RNA polymerázy II a zahájení transkripce daného genu (Desvergne *et Wahli*, 1999; Berger *et Moller*, 2002; Peters *et al.*, 2012; Dubois *et al.*, 2017).

Přestože PPAR α je řazen mezi jaderné transkripční faktory s konstitutivní subcelulární lokalizací v buněčném jádře, bylo prokázáno, že se dynamicky pohybuje mezi jádrem a cytoplazmou, a jeho jaderná lokalizace je podpořena vazbou ligandu (Umamoto *et Fujiki*, 2012). Kyvadlová translokace mezi těmito dvěma kompartmenty není ojedinělá a vyskytuje se rovněž i u jiných jaderných receptorů, jako je progesteronový receptor nebo receptor pro vitamín D (Kumar *et al.*, 2006). Translokace transkripčních faktorů do jádra je jednou ze základních podmínek, které umožňují jejich transkripčně-regulační funkci. Naproti tomu jiné jaderné receptory, jako je estrogenový receptor nebo receptor kyseliny retinové, jsou lokalizovány výhradně v buněčném jádře, a to i za nepřítomnosti ligandu (Hager *et al.*, 2000).

Rozmanitost funkcí, do kterých jsou PPARs zapojeny, se odráží v rozmanitosti ligandů, které se mohou vázat do LBD (Krey *et al.*, 1997). Proteinová struktura LBD obsahuje 12 α -helixů a 4 β -listy, které se skládají a vytvářejí velkou hydrofobní dutinu pro navázání ligandu (Nolte *et al.*, 1998). Klíčovou roli v aktivačním procesu hraje substruktura LBD, helix 12 (H12), lokalizovaná v doméně AF-2 na C-terminálním konci. Studie (Hashimoto *et Miyachi*, 2005) ukázala, že skládání H12 je zodpovědné za globální účinek ligandů. Správné skládání helixu totiž zajišťuje aktivaci receptoru, zatímco nesprávné zabraňuje biologickým účinkům receptoru, což vede k antagonistickému chování. Kromě vazby ligandu zajišťuje LBD rovněž hlavní povrch pro dimerizaci a interakci s regulačními proteiny, nazývané kofaktory – korepresory a koaktivátory (Feige *et al.*, 2006).

3.2.1.1 Korepresory a koaktivátory

Proteiny, označované jako korepresory nebo koaktivátory mohou potlačovat, resp. zvyšovat transkripční aktivitu jaderných receptorů specifickou změnou

chromatinové struktury. Mezi jaderné korepresory, interagující s PPAR α , řadíme např. NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) a SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors). Jejich represivní účinek je v zásadě zprostředkován aktivitou histon deacetyláz (HDAC), kdy dochází ke kondenzaci chromatinu v rámci hypoacetylace histonů. Tyto korepresory se podílejí na potlačení aktivity receptoru, v nepřítomnosti ligandu nebo po vazbě antagonisty, do doby, než vazba agonisty vyvolá výměnu za koaktivátorový komplex s účelem indukce transkripce (McKenna *et O'Malley*, 2002; Hebbbar *et Archer*, 2003).

Působení korepresorů v reakci na vazbu antagonisty slibuje zajímavé terapeutické aplikace z pohledu farmakologické inhibice PPARs. Specifičnost působení korepresorů dává možnost indukovat transkripční umlčování receptoru prostřednictvím vazby antagonisty (Feige *et al.*, 2006). Z tohoto hlediska je zajímavá krystalová struktura ligand vazebné domény PPAR α s navázaným antagonistou GW6471 a korepresorem SMRT, která naznačuje, že antagonisté podporují konformaci receptoru, která brání správnému umístění substruktury H12 do aktivní pozice a následně vazbě koaktivátorů (Xu *et al.*, 2002). Tato studie rovněž ukazuje, že motiv korepresoru SMRT brání receptoru v převzetí aktivní konformace, a navíc je vazba korepresoru posílena přítomností antagonisty, který blokuje šroubovici AF-2 v zaujatí aktivní polohy.

Karboxylová skupina agonisty GW409544, vázaného na PPAR α , vytváří vodíkovou vazbu v místě Y464 (Y = tyrozin) C-terminální šroubovice AF-2, jejichž interakce stabilizuje receptor v aktivní konformaci (Xu *et al.*, 2001). Na základě tohoto pozorování, byl navržen antagonist PPAR α , nazývaný GW6471, jehož původní funkční karboxylová skupina byla nahrazena etylamidovou skupinou. Modifikovaná amidová skupina inhibitoru GW6471 způsobuje konfiguraci, která již není schopná vytvářet vodíkovou vazbu v místě Y464 domény AF-2. Antagonista GW6471 tímto narušuje interakci mezi PPAR α a motivy koaktivátorů odvozených od SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) nebo CBP (CREB-binding protein), a zároveň podporuje vazbu korepresorů SMRT nebo NCoR. Vazebná afinita těchto korepresorů k LBD byla navíc zvýšena pomocí inhibitoru GW6471. Tyto výsledky ukazují, že antagonist GW6471 indukuje konformaci LBD, která účinně interaguje s korepresory (Xu *et al.*, 2002).

Proteiny, které naopak zvyšují transkripční aktivitu a řadíme je mezi koaktivátory, můžeme rozdělit do dvou skupin podle mechanismu modifikace chromatinu. První

skupina zahrnuje komplexy, které mění umístění nebo konformaci nukleozómů a remodelují chromatin v závislosti na ATP. Do této skupiny patří například komplex SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting), který je konzervovaných u všech eukaryotních organismů (Martens *et Winston*, 2003). Byli popsáni tři členové rodiny SWI/SNF interagující s PPAR α v komplexu PRIC (PPAR α -interacting cofactor), jenž obsahuje konzervativní motiv LXXLL (L = leucin; X = jakákoliv aminokyselina), který je nezbytný pro vazbu s jadernými receptory. Komplex PRIC zahrnuje celou řadu koaktivátorů nebo proteinů vázající koaktivátory – CBP, SRC-1, PBP a mnoho dalších (Surapureddi *et al.*, 2002). Komplexy SWI/SNF rovněž hrají klíčovou roli v diferenciaci adipocytů ve spolupráci s PPAR γ (Salma *et al.*, 2004).

Druhá skupina koaktivátorových proteinů remodelující chromatin zahrnuje faktory, které kovalentně modifikují histonové konce prostřednictvím acetylace, methylace, fosforylace nebo ubikvitinace (Feige *et al.*, 2006). Kofaktory vybavené aktivitou histon acetyltransferáz jsou například CBP (CREB binding protein) a protein p300. Aktivace transkripce zprostředkovaná vazbou CBP/p300 je dána zvýšenou acetylací histonů. Protein p300 byl izolován jako kofaktor, jenž se pomocí motivu LXXLL váže na receptor v místě LBD, a zvyšuje tím tak transkripční aktivitu PPAR α a PPAR γ .

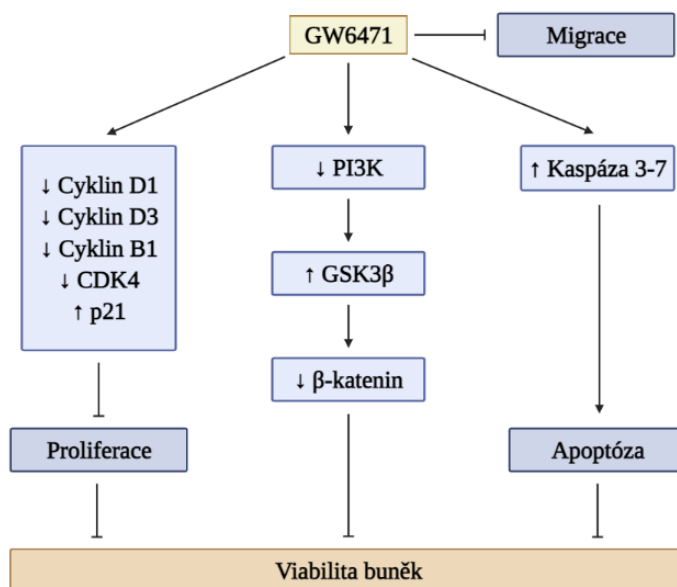
3.2.2 Antagonisté PPAR α a jejich biologické účinky

Na rozdíl od agonistů PPAR α – nasycené a nenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty (Krey *et al.*, 1997) – bylo doposud popsáno pouze několik málo selektivních antagonistů. Ti se však ukazují jako užitečná strategie pro lepší pochopení metabolických drah regulovaných právě prostřednictvím PPAR α . Antagonisté PPAR α jsou schopni potlačit aktivaci receptoru, a narušit tím tak metabolismus a životaschopnost rakovinných buněk. Aktivace PPAR α totiž hraje rozhodující roli v biologii nádorů, takže jeho inhibice pomocí antagonistů může být prospěšná v potlačení nádorů, které nadměrně exprimují tento receptor. Represe PPAR α by mohla nalézt vhodné využití u různých patologických jevů, avšak v rámci klinických studií dosud nebyli žádní selektivní antagonisté PPAR α testováni (Ammazzalorso *et al.*, 2013; 2020; De Lellis *et al.*, 2018).

První antagonistá PPAR α , označován jako MK886, byl původně identifikován jako silný inhibitor biosyntézy leukotrienu a byl používán pro svou schopnost indukovat apoptózu v některých biologických systémech (Anderson *et al.*, 1996). Během studie

(Kehrer *et al.*, 2001), hodnotící mechanismus anti-apoptické aktivity, byla pozorována jeho nekompetitivní inhibiční aktivita vůči PPAR α , s minimálním inhibičním účinkem na izoformy PPAR β/δ a PPAR γ . Antagonista MK886 se uplatnil ve funkčních studiích, zaměřených na ověření zapojení PPAR α do různých signálních drah (Li *et al.*, 2006).

Druhým popsaným antagonistou PPAR α je již zmiňovaný GW6471. Jak bylo popsáno v předchozí kapitole (3.2.1.1 Korepresory a koaktivátory), vazba inhibitoru GW6471 do místa LBD způsobuje konformační změnou receptoru, která podporuje vazbu korepresorů, jenž způsobí inaktivaci PPAR α (Ammazzalorso *et al.*, 2013). Protinádorové účinky GW6471 (**Obrázek 3**) byly studovány *in vitro* na buněčném modelu RCC, odvozeného od karcinomu ledvinových buněk, kde byla prokázána schopnost inhibitoru zastavit buněčný cyklus ve fázi G0/G1 a indukovat apoptózu, což bylo asociováno s poklesem exprese proteinů cyklin D1, CDK4 a c-Myc. Zároveň GW6471 vykazuje synergické cytotoxické chování, pokud je použit v kombinaci s inhibitorem glykolýzy (Aboud *et al.*, 2013; 2015). Podobné výsledky byly pozorovány u paragangliomu hlavy a krku (Head and Neck ParaGangLiomas; HNPGL), kdy se jedná o vzácné neuroendokrinní nádory vykazující výraznou expresi PPAR α . Během experimentu agonista Wy-14 643 nevykazoval žádné účinky na životaschopnost buněk odvozených od HNPGL, zatímco antagonist GW6471 snižoval viabilitu a růst buněk interferencí s buněčným cyklem a indukoval apoptózu závislou na kaspázách. Rovněž docházelo k výraznému snížení exprese proteinů CDK4, cyklinu D3 a cyklinu B1, spolu se zvýšenou expresí univerzálního inhibitoru buněčného cyklu – protein p21. Kromě toho se ukázalo, že léčba inhibitorem GW6471 ovlivňuje migraci buněk HNPGL. Mechanismus, ovlivňující životaschopnost těchto buněk, zahrnuje represi PI3K/GSK3 β / β -kateninové dráhy. Hladina intracelulárního β -kateninu je regulována fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3K) prostřednictvím glykogensyntázy kinázy 3 β (GSK3 β), která fosforyluje β -katenin a podporuje jeho degradaci ubikvitin-proteazóm. Data ukázala, že docházelo ke snížení exprese PI3K a β -kateninu spolu se zvýšením exprese GSK3 β , což naznačuje inhibiční účinek GW6471 na životaschopnost buněk HNPGL, který je alespoň částečně způsoben inhibicí signální dráhy PI3K/GSK3 β / β -katenin (Florio *et al.*, 2017).

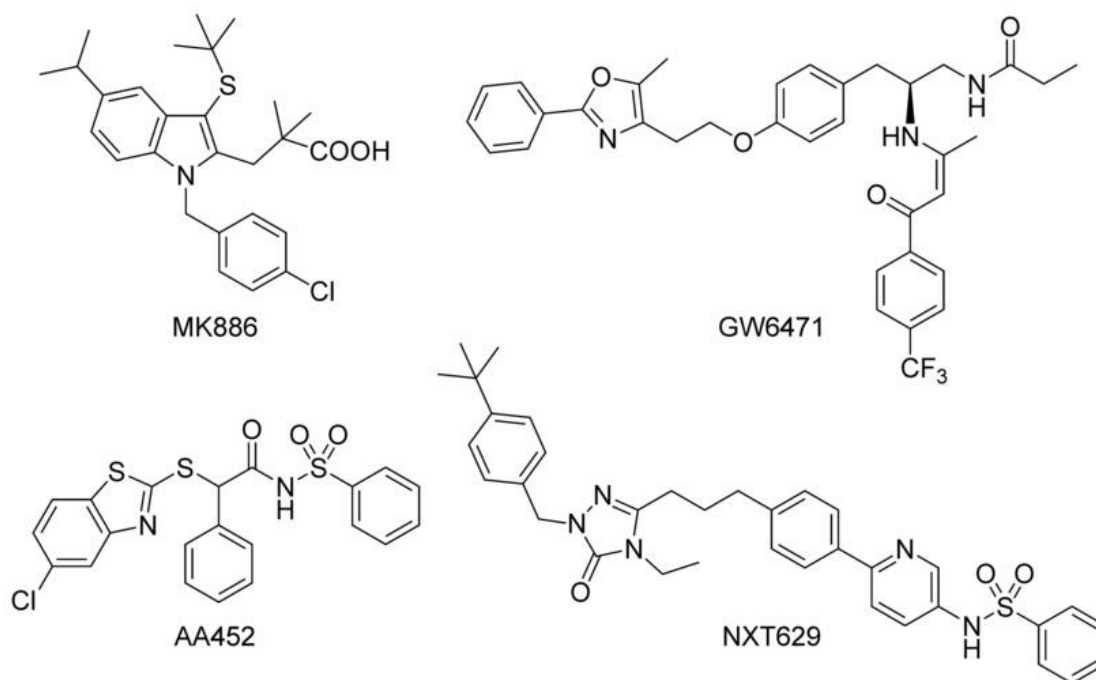


Obrázek 3: **Protinádorové aktivity antagonisty PPAR α GW6471.**

Legenda: snížená exprese proteinu (↓); zvýšená exprese proteinu (↑)
(upraveno podle De Lellis *et al.*, 2018; vytvořeno v BioRender.com)

Dalším syntetickým antagonistou PPAR α je tzv. AA452. Jedná se o *N*-acylsulfonamidový derivát, který se chová jako kompetitivní antagonist PPAR α . Byl testován na různých buněčných liniích *in vitro* a bylo prokázáno, že ovlivňuje viabilitu rakovinných buněk tlustého střeva a slinivky břišní (Ammazzalorso *et al.*, 2017). V nedávné studii (Benedetti *et al.*, 2017) byla tato sloučenina rovněž testována na primárních buňkách lidského glioblastomu, což vyvolalo silné účinky na životaschopnost, proliferaci a migraci buněk související s mevalonátovou dráhou. Kromě toho je inhibitor AA452 schopen zvýšit citlivost glioblastomu na radiční terapii, což otevírá nové možnosti pro testování této sloučeniny v preklinických studiích.

Poslední z řad selektivních kompetitivních antagonistů PPAR α je NXT629. Tento inhibitor byl testován v souvislosti s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), kdy bylo prokázáno, že buňky CLL nadměrně exprimují PPAR α ve srovnání s normálními B-buňkami. Antagonista NXT629, podobně jako antagonist MK886 (Spaner *et al.*, 2013), je schopný vyvolat apoptózu a snížit počet životaschopných CLL buněk *in vitro* a *in vivo* u myších modelů (Messmer *et al.*, 2015). Celkově výsledky této studie naznačují, že metabolismus mastných kyselin podporuje přežití a proliferaci primárních buněk CLL. Inhibice regulace genu PPAR α by se tak mohla stát novým terapeutickým přístupem v léčbě CLL.



Obrázek 4: **Chemické struktury reprezentativních antagonistů PPAR α .**

(převzato z De Lellis *et al.*, 2018)

Při hledání nových ligandů PPAR α byly identifikovány deriváty sulfonamidu, které mají antagonistické vlastnosti v mikromolárním rozmezí (Ammazzalorso *et al.*, 2011; 2012). Tyto molekuly rovněž vykazovaly antagonismus u PPAR γ , nikoliv však u PPAR β/δ (Ammazzalorso *et al.*, 2016). V souladu s těmito pozorováními byly sulfonamidové deriváty schopny potlačit aktivitu karnitin palmitoyl transferázy 1 (CPT1A), což je klíčový gen, řízený PPAR α a PPAR γ , zapojený v transportu mastných kyselin do mitochondrií.

V poslední době rovněž roste zájem o možnost interferovat s metabolickými drahami, aberantní glykolýzou a oxidací mastných kyselin, v rakovinných buňkách, které vykazují různé energetické potřeby k přežití a proliferaci (Laurenti *et al.*, 2011; Martinez-Outschoorn *et al.*, 2017). PPAR α se tak přirozeně staví do pozice, kdy by potenciálně mohl být schopný regulovat metabolické potřeby rakovinných buněk, které využívají mastné kyseliny pro generování ATP jako zdroje energie pro buňku (Ammazzalorso *et al.*, 2017). V předklinických studiích je inhibice PPAR α spojena se smrtí rakovinných buněk a zmenšením velikosti nádoru. Budoucí použití protinádorových látek, založených na antagonistech, by mohlo mít pozoruhodnou terapeutickou hodnotu při léčbě nádorů, které nadměrně exprimují odpovídající receptor (De Lellis *et al.*, 2018).

3.2.3 Potenciál pro prevenci a léčbu rakoviny

Metabolický syndrom, obezita, dyslipidémie, intolerance glukózy a chronický zánět jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny (Tsugane *et Inoue*, 2010; Wolin *et al.*, 2010). Dříve byly ligandy PPARs hojně asociovány s léčbou cukrovky, hyperlipidémie a kardiovaskulárních onemocnění, protože modulují expresi genů, které se podílejí na regulaci metabolismu glukózy a lipidů. V poslední době jsou však považovány za potenciální protirakovinné látky s relativně nízkou systémovou toxicitou (Grabacka *et Reiss*, 2008). Nasvědčuje tomu fakt, že PPARs se mimo jiné podílí na buněčných procesech jako je proliferace, diferenciaci nebo zánět, které mohou přispět k tumorigenezi. Existují proto dobré důvody předpokládat, že ligandy PPARs by se mohly stát potenciálními kandidáty při léčbě a prevenci rakoviny. Konkrétně izoforma PPAR α se stala cílem zájmu kvůli důkazům, které naznačují, že lidé jsou refrakterní vůči hepatokarcinogenním účinkům agonistů PPAR α (Peters *et al.*, 2012).

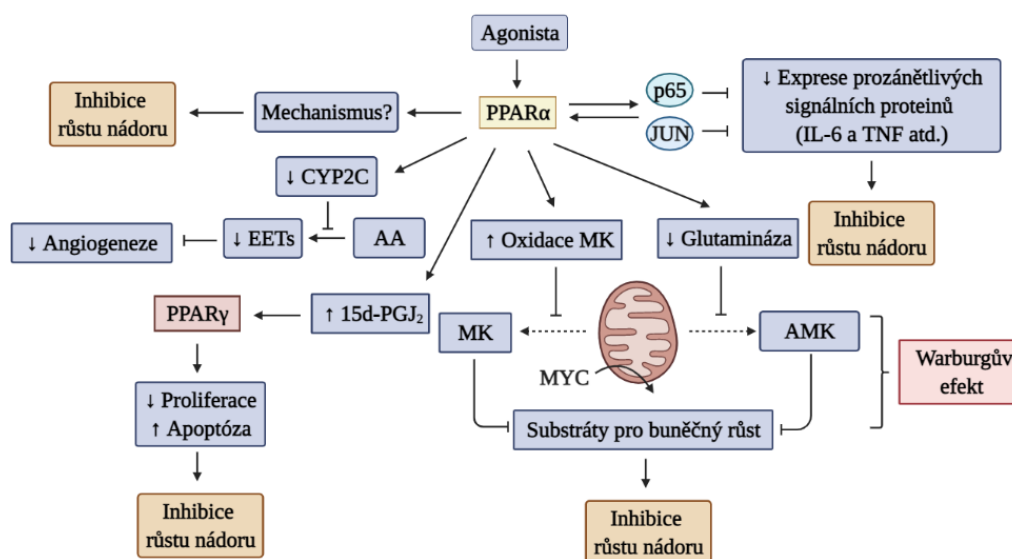
Aktivace PPAR α může inhibovat proliferaci rakovinných buněk prostřednictvím zatím neznámého mechanismu a může interferovat s prozánětlivou signalizací prostřednictvím trans-represe, která vede ke snížení exprese anti-apoptických proteinů a tumor-podporujících molekul. Například agonisté PPAR α mohou zvýšit syntézu 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandinu J₂ (15d-PGJ₂), který slouží zase jako agonista PPAR γ , což v konečném důsledku může způsobit inhibici buněčné proliferace a zvýšit apoptózu v nádorových buňkách (Peters *et al.*, 2012)

PPAR α rovněž hraje roli v regulaci enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik – cytochrom P450 (CYP). Konkrétně aktivace PPAR α může snížit expresi enzymů CYP2C a CYP2J, jenž katalyzují epoxidaci kyseliny arachidonové (AA) na čtyři regioizomery epoxyeikosatrienových kyselin (EETs). Tyto kyseliny se účastní biologických procesů a hrají roli při zánětu a angiogenezi. Některé studie ukázaly, že EETs podporují růst nádorů zvýšením buněčné proliferace a inhibicí apoptózy (Jiang *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2008). Nicméně EETs jsou následně hydrolyzovány pomocí solubilní epoxid hydrolázy (sEH) na méně biologicky aktivní dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) (Spector *et al.*, 2004). Snížení hladiny EETs tak může vést k inhibici proliferace endoteliálních buněk, což může mít za následek snížení angiogeneze (Pozzi *et al.*, 2007; Rakhshandehroo *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2012). Nedávná studie (Čížková, 2018) navíc ukázala, že fibráty, které fungují jako aktivátory PPAR α , regulují expresi

proteinů CYP2J2 a sEH v závislosti na jejich koncentraci. Změny poměru CYP2J2/sEH vysvětlují odlišnou proliferační odpověď u testovaných buněčných linií.

Agonisté PPAR α negativně ovlivňují Warburgův efekt interferencí s metabolickými dráhami – oxidace mastných kyselin a glutaminolýza. Warburgova hypotéza naznačuje výraznou závislost metabolismu nádorových buněk na glykolýze, i navzdory tomu, že je k dispozici dostatečné množství kyslíku pro účinnější oxidační fosforylaci (Warburg, 1956; Weinhouse *et al.*, 1956). Tendence nádorových buněk ke glykolýze je poháněna hlavně mitochondriální dysfunkcí nebo onkogenní aktivitou proteinů Akt, Ras nebo Myc (Degenhardt *et al.*, 2006; Shaw, 2006). Aktivace PPAR α by mohla cílit u nádorových buněk na zvýšení mitochondriální oxidace mastných kyselin, jenž by měla za následek snížení hladiny lipidů v důsledku zvýšeného katabolismu (Aoyama *et al.*, 1998). Společně s inhibicí MYC-indukovaného zvýšení glutaminolýzy (Kersten *et al.*, 2001), vedoucí ke snížení hladiny glutaminu, by tak docházelo ke spotřebě substrátů, které jsou vyžadovány pro růst a proliferaci rakovinných buněk (Koppenol *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2012)

Další dráhou závislou na PPAR α , která by mohla inhibovat tumorigenezi nebo růst nádoru, je založena na inhibici zánětlivé signalizace prostřednictvím represivních mechanismů. Ty jsou zprostředkovány interakcí s p65 podjednotky NF- κ B (jaderný faktor kappa B) nebo snížením aktivity proteinu c-JUN. Inhibice signálů závislých na NF- κ B, jako je TNF (faktor nádorové nekrózy) nebo IL-6 (interleukin 6), může účinně inhibovat růst více typů nádorů (Balkwill, 2006). Potencionální modulace všech zmíněných metabolických a signálních drah v souvislosti s PPAR α jsou souhrnně zaznamenány na **Obrázku 5**.



Obrázek 5: Potenciál PPAR α pro prevenci a léčbu rakoviny.

Legenda: kyselina arachidonová (AA); mastné kyseliny (MK); aminokyseliny (AMK)
(upraveno podle Peters *et al.*, 2012; vytvořeno v BioRender.com)

Mezi další potenciální protirakovinné účinky PPAR α patří potlačení zánětu a upregulace rozpojovacích proteinů (uncoupling proteins; UCP), což má za následek snížení produkce mitochondriálních reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species; ROS) a buněčnou proliferaci. PPAR α rovněž spolupracuje s AMP-aktivovanou protein kinázou (AMPK) na procesech jako je potlačování onkogenní aktivity proteinkinázy B (PKB), též označované jako Akt, inhibice buněčné proliferace nebo donucení rakovinných buněk závislých na glykolýze přejít do tzv. „metabolické katastrofy“ (Grabacka *et Reiss*, 2008).

Ve stavu vyčerpání energie, způsobené například omezenou dostupností glukózy, mohou normální buňky přepínat mezi energetickými metabolickými dráhami, aby podpořily své přežití. AMP-aktivovaná protein kináza (AMPK) hraje významnou roli v reakci na hladovění tím, že hlídá poměr AMP/ATP a vypíná anaboličké procesy náročné na spotřebu ATP, jako jsou syntéza proteinů a lipidů nebo replikace DNA. AMPK může indukovat několik záchranných drah, které zvyšují přežití buněk během deprivace glukózy (**Obrázek 6**). Jedna z těchto drah zahrnuje kontrolní bod závislý na p53, který blokuje buněčný cyklus, podporuje oxidaci mastných kyselin a podílí se na autofágii jako alternativním zdroji zisku energie pro buňku (Buzzai *et al.*, 2005). Je zajímavé, že rakovinné buňky s nedostatkem proteinu p53 jsou velmi citlivé na nedostatek glukózy,

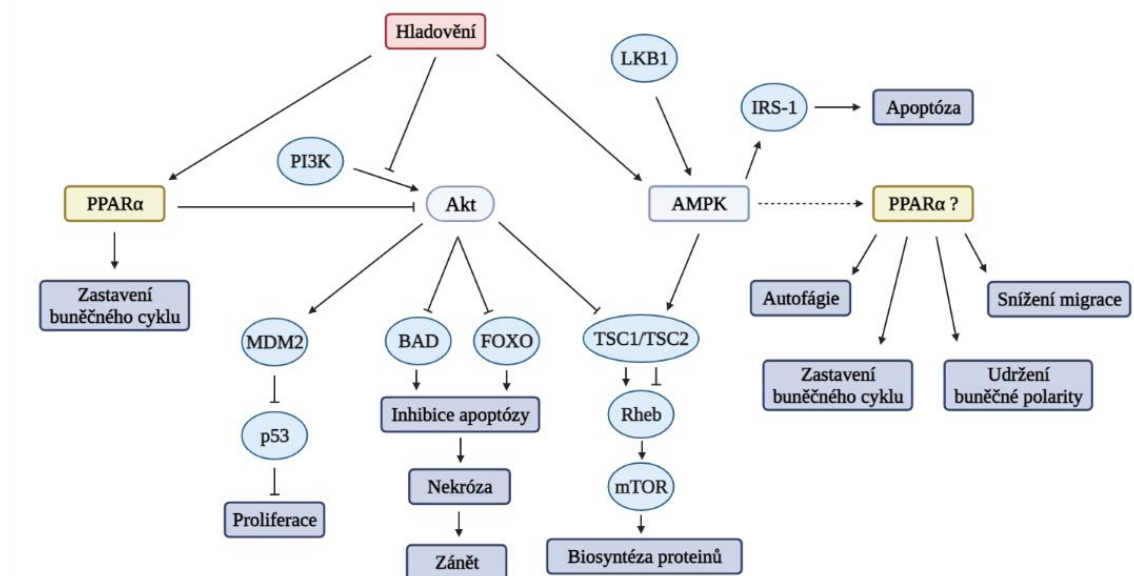
a vzhledem k tomu, že nejsou schopné autofágie, dochází u těchto buněk rovnou k apoptóze (Jones *et al.*, 2005). AMPK je silný inhibitor PI3K/Akt signalizace, zejména Akt-indukované glykolýzy a syntézy proteinů. Onkogenní Akt je zodpovědný za zvýšenou aktivitu mTOR (mammalian target of rapamycin kinase), savčích serin/threoninových kináz, které se přirozeně podílí na regulaci buněčného růstu, metabolismu a odpovědi na přítomnost živin (Elstrom *et al.*, 2004; Plas *et Thompson*, 2005). AMPK antagonizuje Akt/mTOR aktivaci pomocí aktivace tumor supresorového proteinu tuberinu (tuberous sclerosis complex 2; TSC2), který inaktivuje G-protein Rheb. V důsledku deaktivace proteinu Rheb nemůže být aktivován mTOR a tím pádem nedochází k biosyntéze proteinů *de novo* (Garami *et al.*, 2003).

Aktivace PPAR α inhibuje Akt fosforylaci a snižuje metastatický potenciál buněk myšího melanomu (Grabacka *et al.*, 2006). To může poskytnout zajímavou synergii mezi AMPK a PPAR α směrem k inhibici mTOR a aktivaci autofágie. Mechanismus, kterým ligandy PPAR α snižují Akt fosforylaci, je stále předmětem výzkumu. AMPK je regulován tumor supresorem LKB1 (liver kinase B1, rovněž známý jako serine/threonine kinase 11; STK11), který koordinuje různé buněčné procesy, jenž mohou mít antineoplastické účinky (Alessi *et al.*, 2006). Jedním z těchto procesů je již zmiňovaná autofágie, nazývaná také jako programovaná buněčná smrt typu II. Jedná se o lyzozomálně zprostředkovanou digesce postradatelných buněčných složek pro získání energie a přežití buňky. Defektní autofágie však může vést k progresi v rakovinu (Edinger *et Thompson*, 2003).

Ačkoli aktivace Akt poskytuje růstovou výhodu, současně v reakci na metabolický stres zhoršuje autofágii a odsuzuje buňky k nekrotické smrti. Nekróza stimuluje zánět a zvýšená infiltrace makrofágů do nádoru může následně urychlit nádorový růst (Degenhardt *et al.*, 2006). Tato zjištění podporuje představu, že ztráta schopnosti autofágie v buňkách nekompetentních pro apoptózu může mít účinky na podporu malignity. K tomuto může dojít v buňkách s konstitutivně aktivovaným Akt. V těchto buňkách je spouštěn silný antiapoptotický signál, který zahrnuje zejména inaktivaci pro-apoptického proteinu BAD (Bcl-2 associated death promotor) a transkripčního faktoru FOXO (Forkhead box O) (Vivanco *et Sawyers*, 2002).

Při nedostatku živin AMPK indukuje autofágii způsobem závislým na p53 a vyvolává apoptózu serinovou fosforylací IRS-1 (insulin receptor substrate-1), který

inhibuje signální dráhu PI3K/Akt (Tzatsos *et* Tsiachlis., 2007). V tomto ohledu inhibice Akt prostřednictvím fenofibrátu, významně potlačuje migraci buněk *in vitro*. Existuje studie (Grabacka *et al.*, 2004), kdy léčba fenofibrátem snížila metastatické šíření buněk melanomu do plic na modelu křečka. Tato inhibice buněčné migrace a narušená invazivita buněk byla pravděpodobně spojena se změnami ve struktuře cytoskeletu. Je zajímavé, že AMPK se rovněž podílí na udržování polarity epitelálních buněk ovlivněním distribuce aktinových vláken během energetické deprivace (Grabacka *et* Reiss, 2008).



Obrázek 6: Aktivita PPAR α a AMPK v rakovinných buňkách vystavených energetickému stresu.

(upraveno podle Grabacka *et* Reiss, 2008; vytvořeno v BioRender.com)

V souvislosti s PPAR α bylo dále prokázáno, že se podílí na regulaci melanogeneze, kde negativně ovlivňuje syntézu melaninu v buňkách. Hladina exprese PPAR α v buněčné linii B16F10, odvozené od myšího melanomu, nepřímo koreluje s obsahem melaninu, tedy buňky s nižší expresí PPAR α jsou tmavé kvůli silné pigmentaci a buňky se zvýšenou hladinou PPAR α jsou slabě pigmentované nebo bez pigmentu. Bylo zjištěno, že fenofibrát snižuje obsah melaninu v buňkách bez ohledu na hladinu exprese PPAR α . To poukazuje na fakt, že depigmentační účinek fenofibrátu je nezávislý na PPAR α . Studie totiž dále uvádí, že fenofibrát potlačuje melanogenezi prostřednictvím down-regulace genové exprese receptoru melanokortin 1 (MC1R), který hraje rozhodující roli v regulaci pigmentace. Snížená hladina melaninu je paralelně doprovázena poklesem aktivity tyrozinázy, která řídí přeměnu tyrosinu na melanin. Navíc buněčné linie reagovali na fenofibrát zastavením růstu bez známek cytotoxicity nebo buněčné smrti. Inhibice

melanogeneze v melanových buňkách B16F10 je výsledkem nezávislého účinku jak fenofibrátu, tak PPAR α (Huang *et al.*, 2013; Grabacka *et al.*, 2017).

Deregulace lipidového metabolismu, projevující se hyperlipidemií, byla popsána jako významný rizikový faktor pro vznik kolorektálního karcinomu (McKeown-Eyssen, 1994). U pacientů s familiární adenomatózní polypózou byla pozorována v séru zvýšená hladina triglyceridů a cholesterolu. Studie u myši s deficiencí proteinu APC ukázala, že při léčbě bezafibrátem, ligandem PPAR α a zároveň lékem normalizující hladinu lipidů, dochází k výrazně nižšímu vzniku střevních polypů. Toto ochranné působení agonistů PPAR α se jeví z terapeutického hlediska jako slibné řešení proti kolorektální karcinogenezi. Pro pacienty s FAP může být přínosem nejenom normolipidemická aktivita PPAR α , ale zároveň jeho antineoplastické účinky (Niho *et al.*, 2003).

3.2.4 PPAR α a iniciace karcinogeneze

Nadměrná exprese PPAR α vede k progresi růstu nádoru u řady rakovin, včetně rakoviny ledvin, hepatocelulárního karcinomu, rakoviny prsu a glioblastomu (De Lellis *et al.*, 2018). Mezi aktivátory PPAR α tzv. proliferátory peroxizómů, řadíme mimo jiné například herbicidy (laktofen), změkčovadla (estery ftalátů) nebo rozpouštědla (trichlorethylen), tedy látky, které jsou známé jako kontaminanty podzemních vod, ale jejich dopad na lidské zdraví je zatím nejasný (Pyper *et al.*, 2010). Na druhou stranu jsou prokázanými negenotoxickými karcinogeny hlodavců, způsobující nepřímou buněčnou transformaci (Rakhshandehroo *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že podávání proliferátorů peroxizómů potkanům, zvyšuje expresi několika proteinů běžně spojených s buněčným dělením. Předpokládá se, že mechanismus účinku nongenotoxických karcinogenů je způsoben mitogenním účinkem doprovázeným genetickými změnami, které vznikají spontánně. Genetické poškození může být výsledkem chyb během replikace DNA nebo přímého poškození způsobeného elektrofilu generovanými buněčným metabolismem. V případě proliferátorů peroxizómů by se mohlo jednat o poškození DNA způsobené prostřednictvím přebytku H₂O₂ (Gonzalez *et al.*, 1998).

Bylo prokázáno, že PPAR α zprostředkovává hepatokarcinogenezi vyvolanou dlouhodobým podáváním fibrátů na modelech hlodavců. Dochází k jaterně specifické odpovědi vedoucí k peroxizomální proliferaci, hepatomegalii, a nakonec k hepatocelulárnímu karcinomu (Lee *et al.*, 1995). Indukce proliferace peroxizómů

a rozvoj rakoviny jater u primátů ani lidí nebyl dosud prokázán (Ahmad *et al.*, 2017). Mechanismus, který je základem druhově specifické hepatokarcinogeneze, je zprostředkován myší PPAR α -dependentní regulací mikroRNA, která vede ke zvýšené expresi onkoproteinu MYC. Současný zájem zaměřit se na PPAR α pro prevenci určitých druhů rakovin, včetně tlustého střeva a leukémie, je založen na studiích, které ukazují, že agonisté PPAR α inhibují proliferaci endoteliálních buněk a potenciálně interferují s Warburgovým efektem (Peters *et al.*, 2012).

Některé studie na potkanech uvádějí, že změna exprese PPAR α a/nebo aktivace PPAR α může vyvolat karcinogenezi i u jiných orgánů než pouze u jater, a to například varlat (Leydigovy buňky) nebo slinivky břišní. Nádory Leydigových buněk a pankreatických acinárních buněk byly pozorovány pouze u potkanů, ale nikoliv u myši (Klaunig *et al.*, 2003). Další studie popisují reprodukční a vývojovou toxicitu fibrátů, konkrétně klofibrátu a gemfibrozilu, během březosti u potkanů a myši. Vlivem těchto látek může docházet k atypické změně jater jak u matky, tak i u plodu, jenž mohou souviset s proliferací peroxizómů po aktivaci PPAR α (Cibelli *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1991), avšak dávka potřebná k vyvolání těchto účinků je podstatně vyšší než terapeuticky používaná, a žádné důkazy o zjevné teratogenezi vyvolané fibráty nebyly nalezeny (Pantaleoni *et Valeri*, 1974; Fitzgerald *et al.*, 1987).

Zvýšená hladina exprese mRNA PPAR α je důležitým determinantem jaterní tumorigenicity u hladovců. Podobný trend byl pozorován i u izolovaných epitelových buněk mléčné žlázy potkanů, kde v karcinomech mléčné žlázy byla detekována zvýšená hladina PPAR α ve srovnání s normálními buňkami (Roberts-Thomson *et Snyderwine*, 2000). V souladu s touto studií byla potvrzena přítomnost PPAR α rovněž u buněčných linií lidského karcinomu prsu, kdy aktivace PPAR α ligandem Wy-14 643 vedla ke zvýšené proliferaci buněk. Podpora proliferace v buněčných liniích rakoviny prsu po aktivaci PPAR α byla v ostrém kontrastu s účinky ligandů aktivujících PPAR γ , které naopak proliferaci buněk snižovaly (Suchanek *et al.*, 2002).

3.2.5 Role PPAR α v diferenciaci

Zapojení PPAR α v procesu diferenciaci byla prokázána u řady nezávislých experimentů, které využívaly různé buněčné modely. Například dřívější studie prokázala, že ligandy PPAR α stimulují diferenciaci a inhibují buněčnou proliferaci v kultivovaných lidských keratinocytech (Hanley *et al.*, 1998). V návaznosti na tuto studii bylo testováno,

zda mají aktivátory PPAR α stejný efekt i na intaktní myší pokožku *in vivo*. Po léčbě agonisty PPAR α , konkrétně klofibrátem a Wy-14 643, došlo v obou případech k výraznému snížení tloušťky epidermis ve srovnání s neošetřenými kontrolními místy. To může být důsledek inhibice proliferace epidermálních keratinocytů nebo zvýšené rychlosti apoptózy buněk v pokožce. Rovněž bylo možné po ošetření aktivátory PPAR α pozorovat signifikantní zvýšení exprese markerů diferenciaci pro keratinocyty v epidermis. Tomu, že PPAR α hraje roli v regulaci diferenciaci epidermálních keratinocytů, naznačují i experimenty s knock-out genem pro samotný PPAR α u myších modelů (Kömüves *et al.*, 2000). Ligandy receptoru vedou k rychlejší regeneraci pokožky po mechanickém poškození, což by mohlo být prospěšné v klinické praxi a mohlo by tak dojít ke snížení kožních abnormalit (Kömüves *et al.*, 2000). Narušení pokožky totiž stimuluje produkci epidermálních cytokinů (Wood *et al.*, 1992), které mohou vést ke kožnímu zánětu, a zároveň při obnově pokožky dochází ke stimulaci syntézy DNA (Proksch *et al.*, 1991), což může mít za následek epidermální hyperplazii.

PPAR α zároveň pomáhá udržovat kostní homeostázi a podporuje tvorbu kostí. Studie (Gong *et al.*, 2017) uvádí, že PPAR α podporuje osteogenní diferenciaci prostřednictvím signální dráhy závislé na sirtuin-1 (Sirt1). Sirtuiny patří do rodiny NAD⁺-dependentních proteinových deacetyláz, které hrají významnou roli v modulaci transkripčních faktorů (Wang *et al.*, 2011). Podpora osteogenní diferenciaci osteoblastů by mohla v budoucnu cílit na diabetickou osteoporózu, která je způsobena úbytkem kostní hmoty.

Diferenciaci adipocytů je povětšinou dávána do souvislosti s PPAR γ (Evans *et al.*, 2004), který se podílí na akumulaci energie v tukové tkáni indukci odpovídajících genů. Jeho dlouhodobá aktivace může způsobit těžkou obezitu a inzulinovou rezistenci (Rocchi *et al.*, 2001). Na druhé straně stojí PPAR α , který je zapojen do opačného procesu, tedy regulace spotřeby energie. Obecně aktivací PPAR α dochází ke zvýšené oxidaci mastných kyselin v periferních tkáních, jako jsou játra, srdce nebo kosterní svalstvo (Lefebvre *et al.*, 2006). Podobně jako v hepatocytech nebo myocytech můžeme podobný trend pozorovat i v případě adipocytů, kde se navíc PPAR α zapojuje v procesu diferenciaci. Dochází zde ke zvýšené expresi mRNA adipocytových markerových genů, které jsou pod kontrolou PPAR γ a jejichž promotory obsahují sekvenci PPRE. Na rozdíl od regulace diferenciaci prostřednictvím PPAR γ není u PPAR α pozorováno signifikantní zvýšení množství akumulovaných lipidů. Není však známo, proč pouze PPAR α může indukovat

oxidaci mastných kyselin, zatímco aktivace PPAR α , stejně jako aktivace PPAR γ , mohou indukovat diferenciaci adipocytů. Jednou z možností se nabízí, že sekvence PPRE v promotorové oblasti genů související s oxidací mastných kyselin vykazuje vyšší afinitu k PPAR α než k PPAR γ . Role PPAR α v diferenciaci a oxidaci mastných kyselin v lidských adipocytech by mohla zlepšit rezistenci na inzulín bez akumulace lipidů. Toho by se dalo využít pro zvládnutí diabetických stavů, které jsou často doprovázeny obezitou, protože agonisté PPAR γ , používané jako antidiabetika, vykazují kromě zlepšení inzulínové rezistence také nadměrnou akumulaci lipidů v adipocytech (Lee *et al.*, 2011).

Metabolický syndrom je komplexní porucha zahrnující obezitu, hyperglykémii, hypertenzi či hyperlipidémii, což má za následek zvýšení hladiny glukózy v krvi, inzulínovou rezistenci, dyslipidémii a zhoršenou schopnost obnovy endotelu (Eckel *et al.*, 2005; Sorrentino *et al.*, 2007). Tyto metabolické dysfunkce mají negativní vliv na diferenciaci a funkčnost endoteliálních progenitorových buněk (EPC), odvozených z kostní dřeně. Existuje nedávná studie (Vergori *et al.*, 2018), která uvádí, že mikročástice, malé membránové vezikuly nesoucí PPAR α , jsou schopné u myši krmených stravou bohatou na tuky, přeprogramovat diferenciaci hematopoetických buněk a obnovit tím tak narušenou funkčnost angiogenní aktivity, která je spojena s tvorbou nových krevních cév.

O roli PPAR α v diferenciaci střevních buněk není zatím mnoho známo. V rámci předchozí práce (Hanyk, 2019) na buněčné linii HT-29, odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva, bylo pozorováno snížení proliferační aktivity a nárůst exprese markerů diferenciaci (villin a intestinální alkalická fosfatáza), po ovlivnění buněk fenofibrátem, v porovnání s kontrolními buňkami. Tyto výsledky by tak mohly naznačovat, že PPAR α hraje v procesu diferenciaci buněk střevního epitelu určitou roli.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimentální část byla použita adherentní nádorová buněčná linie Caco-2, odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu (ECACC 86010202). Buněčná linie byla autentizována pomocí STR lokusů na Ústavu klinické genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc.

Vzorky tkáně tlustého střeva a kolorektálního karcinomu (**Tabulka 3**; Přílohy), pocházející vždy od stejného pacienta, byly získány z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma Aldrich, kat.č. D6171)
- fetální bovinní sérum (HyClone, kat.č. SH 30249.01)
- penicilin-streptomycin (ThermoFisher Scientific, kat.č. 15140163)
- 100 nmol·l⁻¹ pyruvát sodný (ThermoFisher Scientific, kat.č. 11360070)
- glutamax (ThermoFisher Scientific, kat.č. 35050061)
- 0,25% Trypsin-EDTA (ThermoFisher Scientific, kat.č. 25200-056)
- 15 mmol·l⁻¹ GW6471 (Sigma Aldrich, kat.č. G5045)
- Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, kat.č. 11 644 807 001)
- 30% H₂O₂ (Sigma Aldrich, kat.č. H1009)
- primární králičí polyklonální protilátka villin (GeneTex, kat.č. GTX110034)
- primární králičí polyklonální protilátka PPAR α (GeneTex, kat.č. GTX28934)
- primární myší monoklonální protilátka CYP2J2 (Novus Biologicals, kat.č. NBP2-01178)
- primární králičí polyklonální protilátka solubilní epoxid hydroláza (GeneTex, kat.č. GTX84570)
- hematoxylin (Supelco, kat.č. H9627)
- xylen (Sigma Aldrich, kat.č. 534056)
- montovací médium (Pertex, kat.č. HI-00801)

Použité soupravy:

- Pierce Colorimetric In-Cell ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. 62200)
- detekční systém Dako RealTM EnVisionTM, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Dako, kat.č. K5007)

Použité roztoky a jejich příprava:

- 10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 32,1 g Na₂HPO₄ a 2 g KH₂PO₄; doplnit na objem 1 l dH₂O
- 10% dimethylsulfoxid (DMSO): 100 µl DMSO; doplnit na objem 1 ml dH₂O
- 1X Tris Buffered Saline (TBS): 2,5 ml 20X TBS; doplnit na objem 50 ml dH₂O
- 4% formaldehyd: 36-40% formaldehyd ředit do 1X TBS
- 1X permeabilizační pufr: 0,11 ml Thermo ScientificTM Surfact-AmpsTM X-100 Detergent; 11 ml 1X TBS
- Quenching roztok: 0,38 ml 30% H₂O₂; 11 ml 1X TBS
- oplachovací pufr: 7,5 ml 20X TBS; 1,5 ml Surfact-Amps 20 Detergent; doplnit na objem 150 ml dH₂O
- diluent pro protilátky: blokovací pufr a oplachovací pufr v poměru 1:1
- Diluted HRP konjugát: 30 µl HRP konjugát; 12 ml oplachovacího pufru
- citrátový pufr (pH 6,0–6,2): roztok A – 10 mmol·l⁻¹ kyseliny citrónové (10,505 g kyseliny citrónové v 500 ml dH₂O); roztok B – 10 mmol·l⁻¹ citronan sodný (14,705 g v 500 ml dH₂O); smíchat 9 ml roztoku A a 41 ml roztoku B; doplnit na objem 500 ml dH₂O
- 0,5M TRIS pufr (pH 7,6): 61 g TRIS BASE + 1 l dH₂O; úprava pH pomocí koncentrované HCl
- 0,5M TRIS + Tween 20 (0,05%): 500 µl Tween na 1 l TRIS pufru

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- flowbox – MCS-Advantage (Thermo Scientific)
- inkubátor s atmosférou CO₂ (HeraCell)
- vodní lázeň – TW8 (Julaba)
- inverzní mikroskop – Eclipse TS100 (Nikon)
- centrifuga – MR22i (Jouan)

- ELISA reader – PowerWave XS (Bio-Tek)
- tkáňový mikroprocesor – HistosPro (Milestone)
- lednička (4 °C) a mrazák (Gorenje)
- světelný mikroskop – BX40 (Olympus)
- orbitální třepačka – 3005 (GFL)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Kultivace buněčné linie Caco-2 a aplikace inhibitoru GW6471

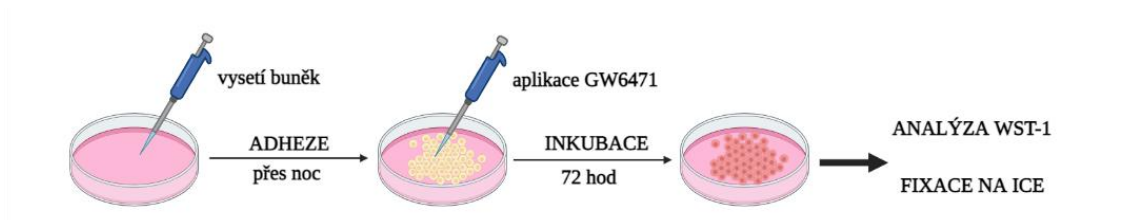
Buňky nádorové linie Caco-2 byly pěstovány v kultivačních lahvích v inkubátoru za standardních podmínek při 37 °C a 5% CO₂ v atmosféře. Základním kultivačním médiem pro linii Caco-2 je Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM). Kompletní růstové médium navíc obsahovalo 15% fetální bovinní sérum, penicilin (100 U·ml⁻¹), streptomycin (100 mg·l⁻¹), 1% pyruvát sodný a 1% glutamax. Buňky byly pasážovány 2x týdně standardním postupem při konfluenci přibližně 80 %.

Inhibitor PPAR α GW6471 byl testován ve dvou různých koncentracích (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a aplikován na nediferencované a diferencované buňky. Buněčná linie Caco-2 je charakteristická schopností spontánní diferenciaci při dlouhodobé kultivaci po dosažení konfluencí za normálních kultivačních podmínek.

4.4.1.1 Nediferencované buňky

Buňky byly vysety na 96-jamkovou kultivační destičku v triplicátech pro WST-1 test a v doubletech pro ICE (In-Cell ELISA) o hustotě 6 500 buněk/jamka v 80 μl kultivačního média. Buňky přes noc adherovaly v inkubátoru při standardních podmínkách (37 °C a 5% CO₂).

Zásobní roztok GW6471 o koncentraci 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním v DMSO. Po adhezi bylo k buňkám přidáno 20 μl roztoku GW6471 rozředěného v kultivačním médiu tak, aby bylo v jamkách dosaženo finální koncentrace – 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Finální objem v jamce kultivační destičky činil 100 μl . Kontrolní vzorky obsahovaly 0,1% DMSO v kultivačním médiu. Buňky byly s inhibitorem GW6471 inkubovány 72 hod za standardních podmínek a následně byl proveden proliferační WST-1 test nebo fixace buněk pro ICE.

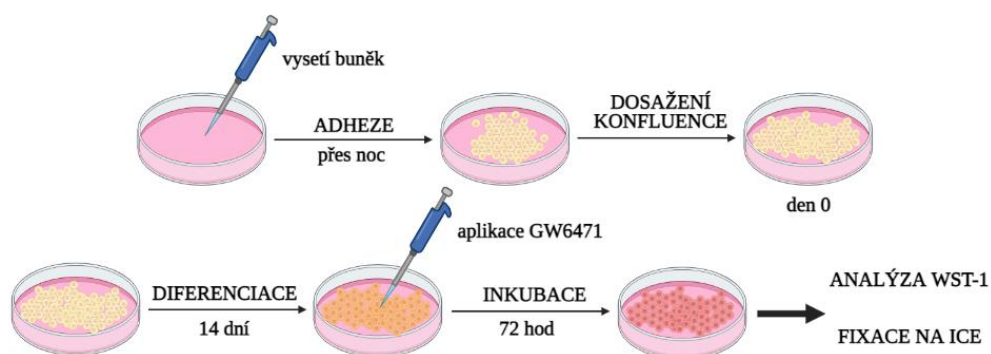


Obrázek 7: Schéma ovlivnění nediferencovaných buněk inhibitorem GW6471.

(vytvořeno v BioRender.com)

4.4.1.2 Diferencované buňky

Buňky byly vysety na 96-jamkovou kultivační destičku obdobným způsobem jako v případě nediferencovaných buněk, pouze s rozdílem hustoty buněk – 12 000 buněk/jamka v 80 μ l kultivačního média. Po dosažení konfluence (den 0), kontrolované pomocí světelného mikroskopu, byly buňky dále kultivovány 14 dní pro dosažení diferencovaného stavu. Buňkám bylo měněno kultivační médium 2x týdně. V den 14 bylo buňkám vyměněno kultivační médium a na buňky stejným způsobem aplikován inhibitor GW6471, případně 0,1% DMSO u kontrolních vzorků, po dobu 72 hod za standardních podmínek.



Obrázek 8: Schéma ovlivnění diferencovaných buněk inhibitorem GW6471.

(vytvořeno v BioRender.com)

4.4.2 Test proliferace (WST-1 test)

Jedná se o kolorimetrický test pro spektrofotometrickou kvantifikaci buněčné proliferace a životaschopnosti buněčné populace. Princip metody je založen na štěpení tetrazoliové soli (WST-1 reagent) na rozpustný formazan pomocí enzymu sukcinát dehydrogenáza (EC 1.3.99.1). Enzym je přirozenou součástí dýchacího řetězce mitochondrií a je aktivní pouze v metabolicky intaktních buňkách. Hodnota absorbance přímo koreluje s počtem životaschopných buněk.

Na buňky ovlivněné inhibitorem GW6471 bylo aplikováno 10 µl WST-1 reagentu (Roche) a následně byly inkubovány 30–60 min v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5% CO₂). Nakonec byla spektrofotometrem změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Vyhodnocení:

- Zprůměrovat hodnoty absorbancí v triplicátech.
- Odečíst průměrné hodnoty slepého vzorku (vzorek bez buněk) od průměrných hodnot kontroly a buněk ovlivněných inhibitorem.
- Výpočet proliferační aktivity:

$$\text{proliferační aktivita [\%]} = \frac{\text{absorbance}_{\text{ovlivněné buňky}}}{\text{absorbance}_{\text{kontrola}}} \times 100$$

- Kontrola se rovná 100 %. Hodnoty ovlivněných buněk pod 100 % značí zástavu proliferace nebo úmrtí buněk, zatímco hodnoty nad 100 % podporu proliferace buněk.

4.4.3 In-Cell Elisa (ICE)

Imunocytochemická metoda používaná ke kvantifikaci cílového proteinu – villin, PPAR α , CYP2J2 a sEH – přímo v kultivovaných buňkách. Kolorimetrická detekce je založena na sekundární protilátce značené enzymem – křenová peroxidáza; HRP (EC 1.11.1.7), která hydrolyzuje chromogenní substrát TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin) na barevný produkt. Hodnota absorbance přímo koreluje s koncentrací detekovaného proteinu.

Po ukončení stanovené doby inkubace buněk s inhibitorem GW6471 následuje fixace buněk, kdy nejprve dochází k odstranění média a oplachu pomocí PBS. Fixace buněk se provádí 80–100 µl 4% formaldehydu v 1X TBS po dobu 15 min. Po uplynutí této doby se odstraní formaldehyd a provede se 2x oplach 1X TBS (100 µl/jamka). V tomto kroku je možné buňky uchovávat v mrazáku při -20 °C.

Při samotné In-Cell ELISA dochází k odstranění 1X TBS a přidání permeabilizačního pufru (100 µl/jamka), inkubace 15 min. Následuje odstranění permeabilizačního pufru a oplach 1X TBS. Přidání Quenching solution (100 µl/jamka), obsahující 1% H₂O₂ v 1X TBS pro vysycení endogenní peroxidázy, inkubace 20 min a poté oplach 1X TBS.

Následuje přidání blokovacího pufru (100 µl/jamka) a inkubace 60 min.

Aplikace primární protilátky (předem naředěné prostřednictvím diluentu pro protilátky podle **Tabulky 2**) do příslušných jamek (50 µl/jamka) a k negativním kontrolám pouze diluent pro protilátky. Vzorky s primárními protilátkami zalepit a nechat inkubovat přes noc v lednici při 4 °C.

Tabulka 2: Poměr ředění pro primární protilátky použité při ICE.

| protein | poměr ředění |
|----------------|---------------------|
| villin | 1:1500 |
| PPAR α | 1:1000 |
| CYP2J2 | 1:1000 |
| sEH | 1:50 |

Další den odstranit primární protilátky a provést 3x oplach oplachovacím pufrem (100 µl/jamka). Přidání HRP konjugátu (100 µl/jamka), enzymaticky značená sekundární protilátka, inkubovat 30 min a poté 3x oplach oplachovacím pufrem (200 µl/jamka). Přidat TMB substrát (100 µl/jamka), inkubovat ve tmě 15 min – dochází k tvorbě modrého produktu. Následně přidat TMB Stop solution (100 µl/jamka), obsahující kyselinu sírovou, která převádí modrý produkt na žlutý, změřit absorbanci při 450 nm (pozn. do 30 min od přidání roztoku). Po naměření absorbancí odstranit roztoky z kultivační destičky a provést 2x oplach dH₂O (200 µl/jamka). Přidat Janus Green Whole-Cell Stain (100 µl/jamka), inkubovat 5 min. Barvivo odstranit pomocí 3–5 oplachů dH₂O. Nakonec přidat eluční pufr (100 µl/jamka), inkubovat 10 min a změřit absorbance při 615 nm.

Pokud není uvedeno jinak všechny kroky In-Cell ELISA jsou prováděny při pokojové teplotě.

Vyhodnocení:

- Zprůměrovat hodnoty absorbancí při vlnové délce 450 nm pro negativní kontroly.
- Průměrnou hodnotu absorbance pro negativní kontroly odečíst od hodnot absorbancí při vlnové délce 450 nm u buněk ovlivněných inhibitorem.
- Znormalizovat absorbance naměřené při vlnové délce 450 nm (A₄₅₀) s hodnotami naměřenými při vlnové délce 615 nm (A₆₁₅), tj. A₄₅₀/A₆₁₅.

- Zprůměrovat znormalizované hodnoty v doubletech.
- Výpočet exprese zvoleného markeru:

$$\text{exprese markeru [\%]} = \frac{\text{absorbance}_{\text{ovlivněné buňky}}}{\text{absorbance}_{\text{kontrola}}} \times 100$$

4.4.4 Imunochemické barvení

Metoda slouží k identifikaci a detekci antigenů (PPAR α) v tkáňových řezech (normální tkáň a adenokarcinom tlustého střeva) nebo potvrzení přítomnosti a subcelulární lokalizace v buněčných liniích (Caco-2), pomocí specifické vazby antigenu a protilátky. Přítomnost antigenu PPAR α je detekována prostřednictvím sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou (EC 1.11.1.7) s chromogenním substrátem DAB (3,3'-diaminobenzidin), za vzniku hnědé sraženiny v místě navázání primární protilátky. Jádra buněk jsou pro lepší orientaci dobarvena hematoxylinem, který vytvoří modré zbarvení.

4.4.4.1 Imunohistochemické barvení

Imunohistochemická detekce byla provedena ve 4 μm tenkých řezech tkání fixovaných ve formolu a zalitých v parafínu. Před samotným imunohistochemickým barevním je třeba provést odparafinování a rehydrataci tkáně, z důvodu provádění metody ve vodném prostředí a zároveň tkáň prosycenou parafinem nelze obarvit. Dochází tak k namáčení vzorků do příslušných lázní po dobu 5 min v následujícím pořadí – xylen 1, xylen 2, 96% etanol a 80% etanol. Dalším krokem je revitalizace antigenu teplem (120 °C; 15 min) pomocí citrátového pufru (pH 6,0) v tkáňovém mikroprocesoru HistosPro (Milestone), za účelem úspěšného rozpoznání antigenu protilátkou a rozrušení můstků mezi proteiny vzniklé při fixaci formolem. Poté nechat vzorky zchladnout a aplikovat po dobu 15 min 5% H₂O₂, aby bylo docíleno vysycení endogenní peroxidázy a zabráněno falešné pozitivitě. Následuje oplach pod tekoucí vodou, zhruba 5 min, poté v samotném pufru TRIS a v pufru TRIS s Tween 20 (5 + 5 min). Aplikovat Protein Block Serum Free (Dako) a nechat inkubovat ve vlhčící komoře po dobu 10 min, aby se zabránilo vzniku nespecifického pozadí. Poté aplikovat primární protilátku PPAR α – ředění 1:100 v Antibody diluent (Dako) – a inkubovat opět ve vlhčící komoře po dobu 60 min.

Po inkubaci byly provedeny oplachy, 2x TRIS pufr a poté 1x v pufru TRIS s Tween 20 (2x5 + 5 min), aby bylo docíleno řádného odstranění zbytků nenávaných protilátek. Následuje inkubace po dobu 30 min s enzymaticky značenou sekundární protilátkou (Dako, EnVision-HRP). Po inkubaci byly provedeny stejné oplachy jako po inkubaci s primární protilátkou, tj. 2x pufr TRIS a poté 1x pufr TRIS s Tween 20 (2x5 + 5 min). Pro vizualizaci byl použit roztok substrátového pufru (Real substrate buffer; Dako) o objemu 1 ml a chromogenu (Real DAB⁺ chromogen; Dako) o objemu 20 µl, po dobu 2–10 min, reakce byla kontrolována pod světelným mikroskopem. Vzorky poté promýty pod tekoucí vodou, zhruba 5 min.

Nakonec byla jádra vzorků dobarvena roztokem hematoxylinu (1-10 min) a vzorky byly promyty pod tekoucí vodou, zhruba 5 min. Na závěr bylo provedeno odvodnění vzorků – 96% etanol (5 min), aceton (3 min) – a jejich projasnění – xylen 3 (5 min) a xylen 4 (5 min). Projasnění xylenem dodá tkáňovým řezům index lomu velmi blízký indexu lomu skla. Pomocí montovacího média byly vzorky trvale uzavřeny krycím sklem.

4.4.4.2 Imunocytochemické barvení

Pro imunocytochemické barvení buněčné linie Caco-2 byly použity kontrolní buňky (ovlivněné 0,5% DMSO) a buňky ovlivněné inhibitorem GW6471 o koncentraci 10 µmol·l⁻¹ po dobu 72 hod. Buňky byly vysety na sterilní 8-jamková kultivační skla (SPL Life Sciences, kat.č. 30108) ve 200 µl kultivačního média počtu 18 000 buněk/jamka a nechaly se přes noc adherovat. Následující den bylo k buňkám přidáno 50 µl roztoku GW6471 v kultivačním médiu tak, aby finální koncentrace byla 10 µmol·l⁻¹. Buňky byly kultivovány 72 hod za standardních podmínek, následně opláchnuty PBS a fixovány 15 min 4% roztokem paraformaldehydu v TBS. Skla je možné uchovávat při -20 °C.

Před samotným barvením byly vzorky rehydratovány vodou po dobu 5 min, permeabilizovány 0,1% roztokem Tritonu-X v TBS po dobu 15 min, po čemž následovalo blokování endogenní peroxidázou pomocí 0,3% H₂O₂ po dobu 15 min a oplach pod tekoucí vodou. Dalším krokem byla revitalizace antigenu teplem (120 °C; 15 min) pomocí citrátového pufru (pH 6,0) v tkáňovém mikroprocesoru HistosPro (Milestone). Následovaly 5 min oplachy v pořadí – H₂O; TRIS pufr; TRIS pufr s Tween 20. Poté, aby se zablokovalo nespecifické pozadí barvení, byly vzorky inkubovány s Protein Block Serum Free (DAKO) po dobu 10 min při pokojové teplotě.

Požadovaný proteinový antigen (PPAR α) byl detekován pomocí primární králičí polyklonální protilátky PPAR α , která byla naředěna v Antibody Diluent (DAKO) v poměru 1:100. Inkubace s primární protilátkou probíhala po dobu 1 hod. Následoval 2x5min oplach TRIS pufr a 1x5min TRIS pufr s Tween. Vizualizace PPAR α byla provedena pomocí detekčního systému Dako RealTM EnVisionTM, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse, který zahrnoval inkubaci se sekundární protilátkou po dobu 30 min a vizualizaci s chromogenním substrátem. Mezi těmito kroky byl proveden oplach – 2x5 min TRIS pufr (pH 7,6) a 1x5 min TRIS pufr s Tween. Jádra vzorků byla dobarvena hematoxylinem a na závěr bylo provedeno odvodnění, projasnění a montování stejným postupem jako v případě 4.4.4.1 Imunohistochemické barvení.

Z imunocytochemického barvení bylo stanoveno % buněk s jadernou pozitivitou PPAR α . Výsledné % jaderné positivity bylo stanoveno z celkového počtu buněk z 5 nezávislých zorných polí. Mikrofotografie byly pořízeny při zvětšení 400x.

4.4.5 Imunohistochemická kvantitativní analýza

Imunohistochemie (IHC) je molekulární technika, která se používá pro kvalitativní hodnocení a nově se zavádí i pro kvantitativní analýzu pomocí programu ImageJ s pluginem IHC Profiler. Pro identifikaci PPAR α a kvantitativní hodnocení imunohistochemicky barvených preparátů byly použity vzorky normální tkáně tlustého střeva a kolorektálního karcinomu, oba vzorky vždy získané od stejného pacienta.

Pro každý vzorek byly pomocí světelného mikroskopu s kamerou pořízeny mikrofotografie z pěti různých zorných polí při zvětšení 200x, tzn. pět mikrofotografií normální tkáně a pět mikrofotografií tkáně nádorové. Použit byl softwarový program Cell Sens 3.1 (Olympus), který je schopný standardizovat hustotu barev a vyvážit bílé pozadí. Všechny získané mikrofotografie byly uloženy ve formátu JPEG.

Samotná analýza fotografií tkáňových vzorků probíhala v softwarovém programu ImageJ s pluginem IHC profiler, podle postupu popsáném v práci Mane *et al.*, 2017. Pro hodnocení byl použit režim IHC profileru označený jako jaderný, přestože lokalizace PPAR α vykazovala jadernou i cytoplazmatickou pozitivitu. Jaderný režim umožňuje označit DAB pozitivní oblasti na základě stanoveného tresholdu bez ohledu na subcelulární lokalizaci, zatímco cytoplazmatický režim detekuje DAB pozitivní oblast automaticky. Plugin IHC zároveň umožňuje dekonvoluci barev, která poskytuje analýzu

pouze DAB pozitivních oblastí. Výsledkem kvantifikace imunoreakce je logaritmické skóre vysoké positivity, positivity, nízké positivity a negativity. Samotné histoskóre se stanovuje jako procentuální podíl (%) nízké positivity, positivity a vysoké positivity.

$$\text{Histoskóre} = 1 \times \% \text{ nízké positivity} + 2 \times \% \text{ positivity} + 3 \times \% \text{ vysoké positivity}$$

Z výsledných hodnot histoskóre byl vypočítán aritmetický průměr pro jednotlivé pacienty, zvláště pro normální tkáň a nádorovou tkáň. Pacienti byli dále rozděleni podle stupně diferencovanosti nádoru (grade) do třech odpovídajících skupin podle **Tabulka 3**, která je součástí přílohy.

4.4.6 Statistické hodnocení

Experimenty byly prováděny v doubletech pro ICE a triplikátech pro WST-1 test. Relativní hodnoty ze tří nezávislých měření pro WST-1 ($n = 3$) a šesti nezávislých měření pro ICE ($n = 6$) jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistická analýza byla prováděna pomocí softwaru GraphPad Prism 8 a hodnocena jednovýběrovým t-testem (studentův t-test), vztaženým na střední hodnotu kontroly, která představovala 100 %. Pro vyhodnocení histoskóre patientských vzorků normální a nádorové tkáně byl použit párový t-test. Všechna statisticky signifikantní data ($P < 0,05$) byla označena příslušným počtem hvězdiček (*) [$P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**); $P < 0,001$ (***)].

5 VÝSLEDKY

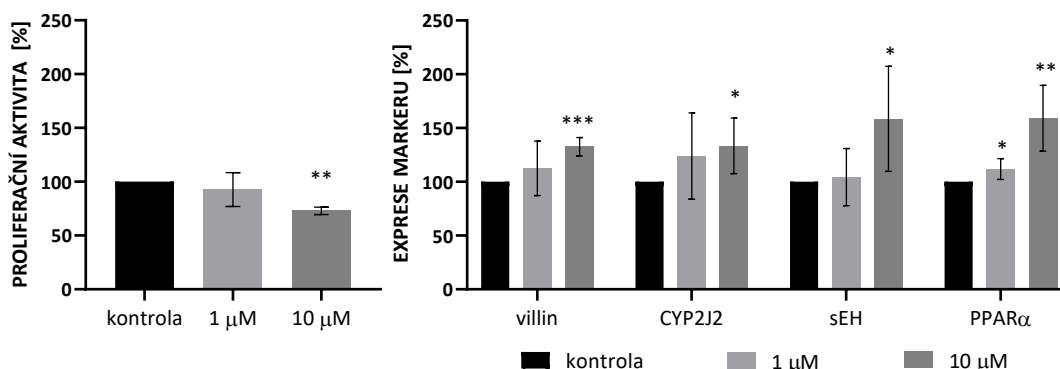
5.1 Hodnocení proliferace a změny exprese sledovaných proteinů v nediferencovaných a diferencovaných buňkách Caco-2

Vliv PPAR α na diferenciaci buněčné linie Caco-2 byl hodnocen na základě proliferačního testu s využitím WST-1 reagentu a metody In-Cell ELISA. Data z těchto měření byla mezi sebou následně porovnána. Testování probíhalo zvláště na nediferencovaných a diferencovaných buňkách *in vitro*, které byly ovlivněny inhibitorem GW6471, jenž funguje jako antagonist PPAR α . Inhibitor GW6471 byl na buňky aplikován ve dvou různých koncentracích – 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vybrané koncentrace byly zvoleny na základě předchozího experimentu, kdy byla stanovena viabilita buněk společně s hodnotou IC₅₀ a IC₁₀ pro jednotlivé testované koncentrace (data z toho měření nejsou součástí diplomové práce).

Metoda In-Cell ELISA sloužila ke kvantifikaci cílových proteinů s využitím enzymaticky značených specifických protilátek. Kromě sledování změny exprese samotného PPAR α , byla diferenciaci buněk Caco-2 indikována změnou proteinové hladiny villinu (molekulární marker kartáčového lemu střevních epitelálních buněk). Současně s villinem byla sledována hladina cytochromu P450 CYP2J2 (epoxygenáza) společně se solubilní epoxid hydrolázou, jenž mají potencionální roli v regulaci diferenciaci střevních buněk.

Nediferencované buňky linie Caco-2 po ovlivnění inhibitorem GW6471 vykazovaly pokles v proliferační aktivitě (**Obrázek 9**). Snížení proliferační aktivity nastalo v případě obou použitých koncentrací, kdy v rámci vyšší koncentrace inhibitoru (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dochází k signifikantnímu poklesu proliferace 72,93 % \pm 3,45 (P = 0,0054) oproti nediferencované kontrole. Zároveň s tím při stejné koncentraci dochází k signifikantnímu nárůstu všech čtyř sledovaných proteinů. Významný nárůst proteinové hladiny zaznamenal villin 132,6 % \pm 8,53 (P = 0,0002) a PPAR α s nárůstem na 159,1 % \pm 30,54 (P = 0,0051) oproti nediferencované kontrole.

NEDIFERENCOVANÁ BUŇKY CACO-2

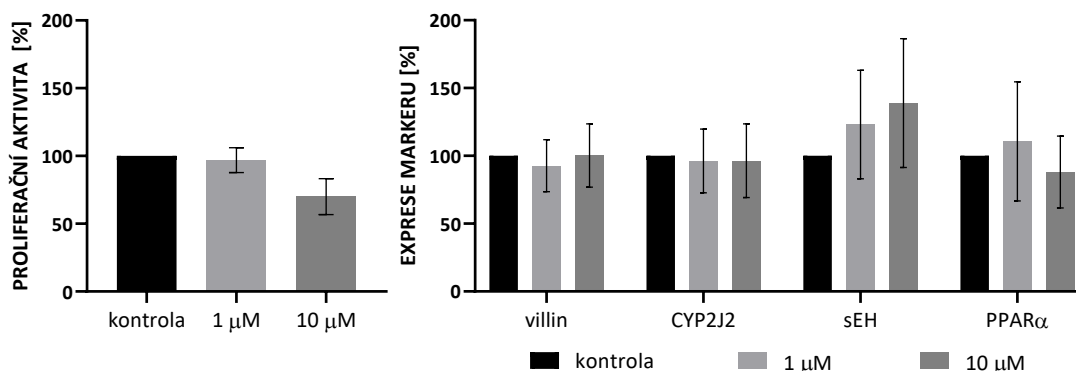


Obrázek 9: Graf proliferační aktivity společně s grafem exprese zvolených proteinů v nediferencované buněčné linii Caco-2.

Výsledky grafů zaznamenány jako průměr ± SD proliferační aktivity (n = 3) a změny exprese (n = 6) vztažené k relativní hodnotě kontroly 100 %.

Diferencované buňky linie Caco-2 vykazují obdobný proliferační a expresní proteinový profil jako v případě nediferencovaných buněk (Obrázek 10). Mírné (nesignifikantní) snížení proliferační aktivity bylo předpokládáno, jelikož diferencované buňky ztrácí dělivou schopnost v rámci funkční a morfologické specializace. V diferencovaných buňkách k významným změnám exprese sledovaných proteinů nedocházelo. Jedinou výraznější změnou byl nárůst exprese sEH, ale ani ten nebyl statisticky signifikantní.

DIFERENCOVANÉ BUŇKY CACO-2



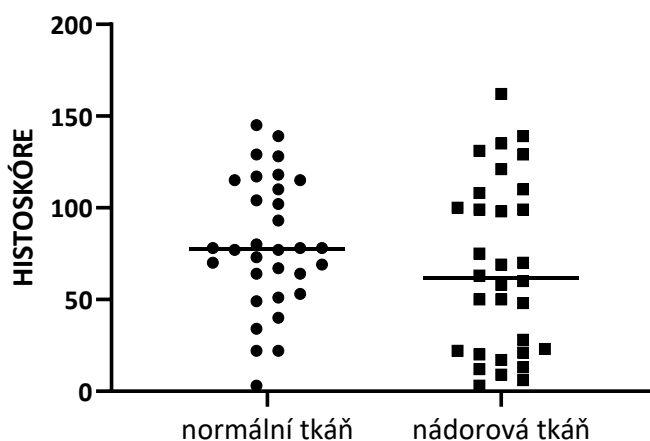
Obrázek 10: Graf proliferační aktivity společně s grafem exprese zvolených proteinů v diferencované buněčné linii Caco-2.

5.2 Imunochemická analýza

Imunohistochemická analýza byla použita ke kvantitativnímu porovnání vzorků normální tkáně tlustého střeva a tkáně kolorektálního karcinomu. Oba vzorky vždy pocházely od stejného pacienta a jeho obecná charakteristika, jako je pohlaví, věk, diagnóza, hodnocení a stanovení TNM jsou shrnuty v Tabulce 3, která je součástí přílohy.

Celkově bylo porovnáváno 64 histologických vzorků od 32 pacientů ($n = 32$) s průměrným věkem 65 let (medián 69 let). Z toho muži tvořili 65,6 % ($n = 21$) z celkového počtu analyzovaných vzorků a ženy 34,4 % ($n = 11$). Průměrný věk muže činil 65 let (medián 69 let) stejně jako v případě žen, kde byl průměrný věk rovněž 65 let (medián 68 let).

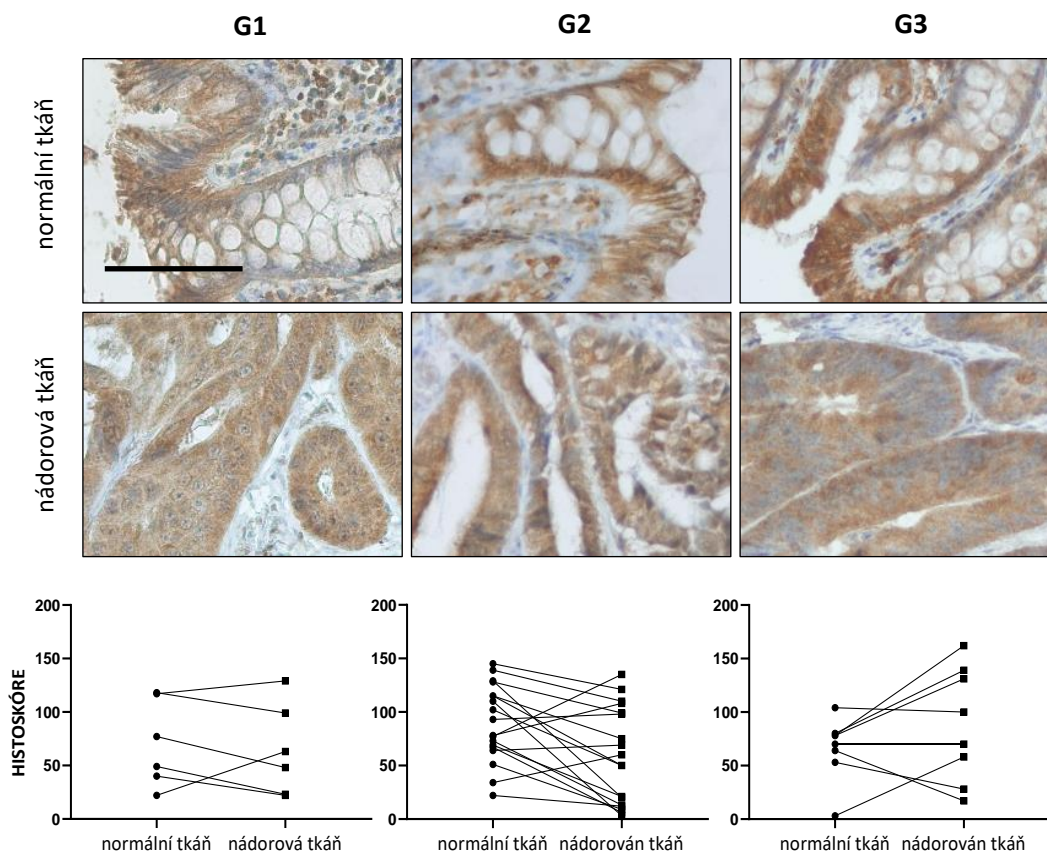
Pokles exprese PPAR α v nádorové tkáni oproti tkáni normální byl pozorován ve 20/32 případech (62,5 %). Dalších 11 pacientů (34,4 %) naopak vykazovalo nárůst proteinové hladiny PPAR α a v jednom případě (3,1 %) ke změně exprese PPAR α nedošlo. Individuální distribuce naměřených hodnot histoskóre pro jednotlivé vzorky normální tkáně (medián 77,5) a nádorové tkáně (medián 61,5) jsou zaznamenány na **Obrázku 11**. Při porovnání výsledků nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl.



Obrázek 11: Individuální hodnoty histoskóre jednotlivých patientských vzorků.

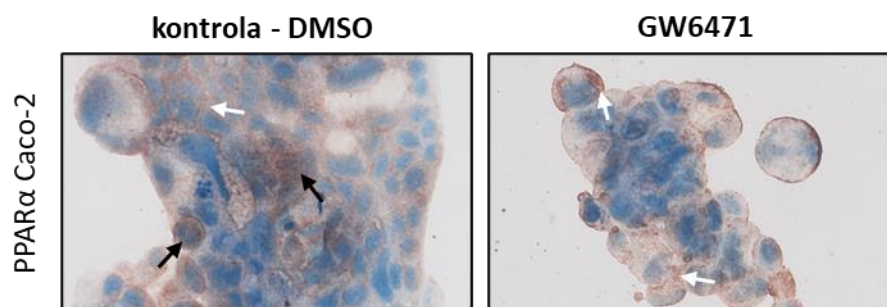
Pro přehlednější uspořádání změn exprese PPAR α , v rámci normální a nádorové tkáně, byli pacienti rozděleni do tří skupin podle gradingu (stupně diferencovanosti nádoru), který byl stanoven patologem při odběru tkáně. Z celkového počtu pacientů ($n = 32$) bylo klasifikováno 6 pacientů jako G1 (18,75 %), 18 pacientů jako G2 (56,25 %)

a 8 pacientů jako G3 (25 %). V první skupině pacientů G1 činil pokles exprese PPAR α v nádorové tkáni 66,7 % (n = 4). Ve druhé skupině pacientů G2 byl pokles exprese v 72,2 % případů (n = 18) a třetí skupina G3 zaznamenala pokles u 37,5 % (n = 3) a v jednom případě (12,5 %) ke změně proteinové hladiny nedošlo (**Obrázek 13**). Změny nárůstu/poklesu exprese PPAR α jsou nezávislé na stupni diferencovanosti adenokarcinomu a nevykazují žádný jednotný profil. Toto zároveň potvrzuje exprese PPAR α v normální a nádorové tkáni demonstrováné na reprezentativních mikrofotografiích (**Obrázek 12**). Fotografie zdravé tkáně zachycuje krypty tlustého střeva s intenzivním hnědým zbarvením (DAB), detekující přítomnost PPAR α , a doprovodné modré zbarvení (hematoxylin) pro snazší orientaci a vizualizaci buněčných jader. Fotografie nádorové tkáně zachycující adenokarcinomy tlustého střeva v různém stupni gradingu, které vykazují obdobnou intenzitou hnědého zbarvení.



Obrázek 12: Reprezentativní mikrofotografie (zvětšeno 100x; měřítko 100 μ m) exprese PPAR α v normální tkáni tlustého střeva a při různém stupni gradingu kolorektálního karcinomu (G1, G2 a G3) společně s hodnotami histoskóre pro jednotlivé patientské vzorky.

Imunocytochemické barvení sloužilo pro potvrzení přítomnosti a určení subcelulární lokalizace PPAR α v buněčné linii Caco-2. Imunobarvení bylo provedeno na kontrolních buňkách (ovlivněné 0,5% DMSO) a buňkách ovlivněných inhibitorem GW6471 o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato metoda sloužila pro aditivní potvrzení, že inhibitor GW6471 skutečně interaguje s PPAR α a inhibuje jeho translokaci z cytoplazmy do jádra buňky. Imunoexprese PPAR α byla detekována v kontrolních buňkách Caco-2 i v buňkách ovlivněných inhibitorem (**Obrázek 13**). Subcelulární distribuce PPAR α byla potvrzena v jaderném i cytoplazmatickém kompartmentu buňky. Zároveň vyšší jaderná pozitivita byla detekována u kontrolních buněk (0,5% DMSO) oproti buňkám ovlivněných inhibitorem GW6471. U kontrolních buněk byla jaderná pozitivita PPAR α detekována u 40,2 % buněk (n = 453). Po aplikaci inhibitoru jaderná pozitivita klesla na 18,8 % (n = 405).



Obrázek 13: **Reprezentativní mikrofotografie** (zvětšeno 400x) **exprese PPAR α** v buněčné linii Caco-2 po ovlivnění inhibitorem GW6471.

Legenda: jaderná pozitivita (černá šipka); cytoplazmatická pozitivita (bílá šipka)

6 DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá účinkem ligandu GW6471 na proces diferenciaci nádorové buněčné linie Caco-2, která je odvozená od lidského kolorektálního adenokarcinomu. Řada studií naznačuje potencionálně příznivé chemopreventivní účinky ligandů PPAR α při karcinogenezi tlustého střeva (Tanaka *et al.*, 2001; Niho *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2005), zatímco jiné poukazují na tendenci ligandů podporovat progresi nádoru (Ikawa *et al.*, 2001; Oshio *et al.*, 2008). Ligand GW6471 funguje jako selektivní inhibitor PPAR α s antagonistickým účinek, který je zprostředkován konformační změnou receptoru, jenž podporuje vazbu korepresorů a zamezuje tím následné transkripční odpovědi (Xu *et al.*, 2002).

Buněčné linie Caco-2 a HT-29, obě odvozené od lidského kolorektálního karcinomu, se mohou za vhodných kultivačních podmínek diferencovat na buňky podobné střevním enterocytům a simulovat podmínky živého organismu *in vitro*. Oproti buněčné linii HT-29, která potřebuje k procesu diferenciaci induktor ve formě butyrátu sodného (Kovářiková *et al.*, 2000), disponuje nádorová linie Caco-2 schopností podstupovat spontánní diferenciaci po dosažení konfluence bez přítomnosti induktoru, což snižuje potencionální riziko interference (Matsumoto *et al.*, 1990). Obě buněčné linie, Caco-2 a HT-29, jsou prokazatelně vhodnými modely pro studium diferenciaci střevních buněk (Čížková *et al.*, 2019).

V rámci experimentu, při sledování účinku GW6471 na buněčné linii Caco-2, byly použity dvě různé koncentrace inhibitoru PPAR α . Nižší koncentrace ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), která neovlivňovala proliferační aktivitu ani viabilitu buněk a vyšší koncentrace ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), jenž měla pouze mírný inhibiční účinek na proliferaci buněk Caco-2 nezávisle na jejich diferenciačním statusu.

Proces diferenciaci enterocytů souvisí s morfologickými a funkčními změnami na jejich apikálním povrchu. Enterocyty patří mezi absorpční buňky, které vytváří četné mikrovilky a jejich strukturní stabilita je zajištěna prostřednictvím villinu, který váže F-aktin. Diferencované střevní buňky vykazují zvýšenou hladinu villinu, a proto se tento protein využívá jako jeden z markerů diferenciaci (Wang *et al.*, 2008; Schimpel *et al.*, 2015). Aplikace inhibitoru GW6471 vedla k nárůstu exprese villinu v nediferencovaných buňkách Caco-2, zatímco v diferencovaných buňkách jeho hladina touto látkou ovlivněna

nebyla. Z uvedených výsledků, popisujících pokles proliferační aktivity buněk a nárůst exprese villinu, by se dalo usuzovat, že inhibice PPAR α je jedním z faktorů, které podporují diferenciaci střevních buněk. Získaná data jsou však v rozporu s domněnkou o roli PPAR α v diferenciaci enterocytů, která byla naznačena v předchozí práci (Hanyk, 2019). Ta měla za cíl sledovat účinky fenofibrátu, syntetického agonisty PPAR α , na buněčné linii HT-29, kdy po ovlivnění buněk fenofibrátem docházelo ke zvýšené expresi villinu, podobně jako intestinální alkalické fosfatázy – další marker diferenciaci. Ukázalo se, že aktivátor i inhibitor PPAR α mají na expresi villinu stejný efekt, což nasvědčuje tomu, že diferenciaci střevních buněk je na PPAR α nezávislá.

Nezávislost tohoto procesu podporuje i jaderná lokalizace PPAR α . S využitím imunocytochemického barvení buněčné linie Caco-2 byla zjištěna cytoplazmatická i jaderná lokalizace PPAR α . Buňky po ovlivnění inhibitorem však vykazovaly nižší jadernou pozitivitu ve srovnání s kontrolními buňkami, což nasvědčuje interakci ligandu GW6471 s receptorem a jeho inhibici translokace z cytoplazmy do buněčného jádra. Umemoto et Fujiki, 2012 popsali dynamický přesun mezi těmito dvěma buněčnými kompartmenty. Ve své práci prokázali, že jadernou pozitivitu PPAR α zvyšuje přítomnost ligandů, což bylo potvrzeno i v předchozí práci (Hanyk, 2019), kdy se jaderná pozitivita PPAR α po aplikaci fenofibrátu zvyšovala.

PPAR α se podílí na regulaci exprese enzymů cytochrom epoxigenázy 2J2 (CYP2J2) a solubilní epoxid hydrolázy (sEH), jenž mají potencionální roli v proliferaci/diferenciaci střevních buněk. Jedna ze studií (Čížková, 2018), prováděných na buněčné linii HT-29, poukázala na to, že fibráty ovlivňují hladinu proteinů CYP2J2 a sEH v závislosti na dávce. Různé koncentrace fibrátů jsou tak spojeny se změnami v expresi těchto enzymů a jejich poměr CYP2J2/sEH úzce souvisí s proliferací střevních buněk. Nižší koncentrace fibrátů (Čížková *et al.*, 2016) vedly ke zvýšení buněčné proliferace. Toto je spojeno s nárůstem exprese CYP2J2 a downregulací sEH. Na druhé straně použití inhibiční koncentrace (IC10) fibrátů, kdy buňky dosahují 90% životaschopnosti ve srovnání s kontrolními buňkami a nedochází tak k proliferaci, se ukázala výrazně vyšší exprese v případě sEH, doprovázená nižší hladinou CYP2J2. Tyto výsledky naznačují, že poměr CYP2J2/sEH je důležitější pro podporu či inhibici buněčné proliferace než samotná úroveň exprese jednotlivých proteinů. Změna poměru v expresi těchto enzymů má totiž za následek odlišnou hladinu příslušných metabolitů. Koncentrace fibrátů, která je doprovázená nárůstem exprese CYP2J2 a poklesem sEH,

pravděpodobně vede k vyšší hladině eikosatrienových kyselin (EETs), které podporují proliferaci buněk (Shen, 2008), zatímco inhibiční koncentrace fibrátů (IC90), při které je potlačena proliferace buněk, má za následek nárůst sEH, jenž hydrolyzuje EETs na odpovídající DHETs, které jsou méně biologicky aktivní.

Role inhibitoru GW6471 vedla u nediferencovaných buněk ke společnému signifikantnímu nárůstu hladiny obou enzymů (CYP2J2 a sEH) ve srovnání s kontrolními buňkami. V případě diferencovaných buněk byl pozorován výraznější nárůst pouze sEH v porovnání s CYP2J2 a kontrolními buňkami. To by mohlo souviset s tím, že hladina EETs budou pravděpodobně udržována ve vyšší koncentraci v nediferencovaných buňkách, z důvodu potencionální účasti na buněčné proliferaci, což je v souladu, s již zmíněnou studií Čížková, 2018. Kromě toho, inhibice PPAR α , prostřednictvím ligandu GW6471, v nediferencovaných buňkách vedla k výraznému zvýšení exprese samotného receptoru, což nebylo pozorováno v případě diferencovaných buněk. To by mohlo naznačovat, že PPAR α hraje důležitější roli v nediferencovaných buňkách střevního epitelu než u buněk diferencovaných.

PPAR α je ve sliznici tlustého střeva přítomen od raného stádia vývoje a jeho exprese se v průběhu embryogeneze postupně mění (Huin et al., 2000). Hladina proteinu PPAR α kolorektálního nádoru, odebraného pacientům v různých stádiích rakoviny, byla po imunochemickém barvení měřena prostřednictvím softwarového programu ImageJ s pluginem IHC Profiler. Výsledky ukazují, že změny v expresi PPAR α mezi normální a nádorovou tkání nevykazují žádný signifikantní rozdíl s jednotným profilem exprese. Nezávislost proteinové hladiny PPAR α v adenokarcinomu je pozorována i v případě různého stupně diferencovanosti nádoru. V našem případě byl pokles exprese PPAR α v nádorové tkáni, bez ohledu na grade, sledován u více jak poloviny patientských vzorků, konkrétně v 62,5 % případů. V současné době neexistuje shoda ohledně toho, zda jsou PPAR α v kolorektálním karcinomu up- nebo downregulovány. Důkazem toho jsou dvě na sobě nezávislé studie, kdy jedna (Luo *et al.*, 2019) uvádí významné snížení exprese PPAR α u vzorků adenokarcinomu, zatímco druhá (Yaghoubizadeh *et al.*, 2020) naopak vykazuje výrazně zvýšenou hladinu PPAR α v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu v porovnání s odpovídající normální tkání. V souladu s uvedenými výsledky a výše zmíněnými studiemi, lze tedy předpokládat, že deregulace exprese PPAR α hraje určitou roli v CRC, ačkoliv jeho přesný mechanismus v tumorigenezi je stále neznámý.

7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv inhibitoru PPAR α na proces diferenciaci nádorové buněčné linie Caco-2, která je odvozená od lidského kolorektálního karcinomu. Výsledná data získaná z měření proliferační aktivity a exprese zvolených proteinů, po aplikaci inhibitoru GW6471, z počátku naznačovala, že inhibice PPAR α by mohla být jedním z faktorů podporující diferenciaci střevních buněk, ale na základě konfrontace s předchozí prací o vlivu fenofibrátu, podpořené o výsledky subcelulární lokalizace receptoru po vazbě ligandů, navrhuje, že účinky fenofibrátu a GW6471 v diferenciaci střevních buněk *in vitro* jsou na PPAR α nezávislé.

Nejasnou roli PPAR α v diferenciaci střevních buněk podporuje i imunohistochemická analýza proteinu PPAR α v kolorektálním karcinomu a zdravé tkáni. Bez ohledu na stupeň gradingu nádoru byla detekována jak nižší, tak vyšší hladina PPAR α . Celkově se však hladina PPAR α v nádorové a zdravé tkáni nelišila.

8 LITERATURA

- Aboud O. A., Donohoe D., Bultman S., Fitch M., Riiff T., Hellerstein M., Weiss R. H. (2015):** PPAR α Inhibition Modulates Multiple Reprogrammed Metabolic Pathways in Kidney Cancer and Attenuates Tumor Growth. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 308 (11).
- Aboud O. A., Wettersten H. I., Weiss R. H. (2013):** Inhibition of PPAR α Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis and Synergizes with Glycolysis Inhibition in Kidney Cancer Cells. *PLoS ONE* 8 (8).
- Ahmad J., Odin J. A., Hayashi P. H., Chalasani N., Fontana R. J., Barnhart H., Cirulli E. T., Kleiner D. E., Hoofnagle J. H. (2017):** Identification and Characterization of Fenofibrate-Induced Liver Injury. *Digestive diseases and sciences* 62 (12): 3596–3604.
- Alessi D. R., Sakamoto K., Bayascas J. R. (2006):** LKB1-Dependent Signaling Pathways. *Annual Review of Biochemistry* 75 (1): 137–163.
- Al-Sohaily S., Biankin A., Leong R., Kohonen-Corish M., Warusavitarne J. (2012):** Molecular Pathways in Colorectal Cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 (9): 1423–1431.
- Ammazzalorso A., Bruno I., Florio R., De Lellis R., Laghezza A., Cerchia C., De Filippis B., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Tortorella P., Veschi S., Liodice F., Lavecchia A., Cama A., Amoroso R. (2020):** Sulfonimide and Amide Derivatives as Novel PPAR α Antagonists: Synthesis, Antiproliferative Activity, and Docking Studies. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 11 (5): 624–632.
- Ammazzalorso A., Carrieri A., Verginelli F., Bruno I., Carbonara G., D'Angelo A., De Filippis B., Fantacuzzi M., Florio R., Fracchiolla G., Giampietro L., Giancristofaro A., Maccallini C., Cama A., Amoroso R. (2016):** Synthesis, in Vitro Evaluation, and Molecular Modeling Investigation of Benzenesulfonimide Peroxisome Proliferator-Activated Receptors α Antagonists. *European Journal of Medicinal Chemistry* 114: 191–200.
- Ammazzalorso A., D'Angelo A., Giancristofaro A., De Filippis B., Di Matteo M., Fantacuzzi M., Giampietro L., Linciano P., Maccallini C., Amoroso R. (2012):** Fibrate-Derived N-(Methylsulfonyl)Amides with Antagonistic Properties on PPAR α . *European Journal of Medicinal Chemistry* 58: 317–322.

- Ammazzalorso A., De Filippis B., Giampietro L., Amoroso R. (2013):** Blocking the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR): An Overview. *ChemMedChem* 8 (10): 1609–1616.
- Ammazzalorso A., Giancristofaro A., D'Angelo A., De Filippis B., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Amoroso R. (2011):** Benzothiazole-Based N-(Phenylsulfonyl)Amides as a Novel Family of PPAR α Antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (16): 4869–4872.
- Ammazzalorso A., De Lellis L., Florio R., Bruno I., De Filippis B., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Perconti S., Verginelli F., Cama A., Amoroso R. (2017):** Cytotoxic Effect of a Family of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Antagonists in Colorectal and Pancreatic Cancer Cell Lines. *Chemical Biology & Drug Design* 90 (5): 1029–1035.
- Anderson K. M., Seed T., Jajeh A., Dudeja P., Byun T., Meng J., Ou D., Bonomi P., Harris J. E. (1996):** An in Vivo Inhibitor of 5-Lipoxygenase, MK886, at Micromolar Concentration Induces Apoptosis in U937 and CML Cells. *Anticancer Research* 16 (5A): 2589–2599.
- Aoyama T., Peters J. M., Iritani N., Nakajima T., Furihata K., Hashimoto T., Gonzalez F. J. (1998):** Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-Metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α). *Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5678–5684.
- Armaghany T., Wilson J. D., Chu Q., Mills G. (2012):** Genetic Alterations in Colorectal Cancer". *Gastrointestinal Cancer Research* 5 (1): 19–27.
- Balkwill F. (2006):** TNF- α in Promotion and Progression of Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 25 (3): 409.
- Benedetti E., d'Angelo M., Ammazzalorso A., Gravina G. L., Laezza Ch., Antonosante A., Panella G., Cinque B., Cristiano L., Dhez A. Ch., Astarita C., Galzio R., Cifone M. G., Ippoliti R., Amoroso R., Di Cesare E., Giordano A., Cimini A. (2017):** PPAR α Antagonist AA452 Triggers Metabolic Reprogramming and Increases Sensitivity to Radiation Therapy in Human Glioblastoma Primary Cells. *Journal of Cellular Physiology* 232 (6): 1458–1466.
- Berger A. H., Knudson A. G., Pandolfi P. P. (2011):** A Continuum Model for Tumour Suppression. *Nature* 476 (7359): 163–169.
- Berger J., Moller D. E. (2002):** The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine* 53: 409–435.

- Bettington M., Walker N., Clouston A., Brown I., Leggett B., Whitehall V. (2013):** The Serrated Pathway to Colorectal Carcinoma: Current Concepts and Challenges. *Histopathology* 62 (3): 367–386.
- Bogaert J., Prenen H. (2014):** Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology* 27 (1): 9–14.
- Buzzai M., Bauer D. E., Jones R. G., DeBerardinis R. J., Hatzivassiliou G., Elstrom R. L., Thompson C. B. (2005):** The Glucose Dependence of Akt-Transformed Cells Can Be Reversed by Pharmacologic Activation of Fatty Acid β -Oxidation. *Oncogene* 24 (26): 4165–4173.
- Castets M., Broutier L., Molin Y., Brevet M., Chazot G., Gadot N., Paquet A., Mazelin L., Jarrosson-Wuilleme L., Scoazec J. Y., Bernet A., Mehlen P. (2011):** DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482 (7386): 534-537.
- Cibelli A., Stefanini S., Ceru M. P. (1998):** Peroxisomal β -oxidation and catalase activities in fetal rat liver: effect of maternal treatment with clofibrate. *Cell Molecular Biology* 34 (2): 191–205.
- 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.
- Čížková K., Birke P., Malohlava J., Tauber Z., Hušková Z., Ehrmann J. (2019):** HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation. *Cells, Tissues, Organs* 208 (1–2): 37–47.
- Čížková K., Steigerová J., Gursky J., Ehrmann J. (2016):** Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning. *Lipids in Health and Disease* 15 (164).
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee Ch., Shi Y., Gélinas C., Fan Y., Nelson D. A., Jin S., White E. (2006):** Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Restricts Necrosis, Inflammation, and Tumorigenesis". *Cancer Cell* 10 (1): 51–64.
- De Lellis L., Cimini A., Veschi S., Benedetti E., Amoroso R., Cama A., Ammazalorso A. (2018):** The Anticancer Potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Antagonists. *ChemMedChem* 13 (3): 209–219.
- Desvergne B., Wahli W. (1999):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* 20 (5): 649–688.

- Dowell P.**, Ishmael J. E., Avram D., Peterson V. J., Nevriy D. J., Leid M. (1997): P300 Functions as a Coactivator for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor A. *Journal of Biological Chemistry* 272 (52): 33435–33443.
- Dubois V.**, Eeckhoutte J., Lefebvre P., Staels B. (2017): Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* 127 (4): 1202–1214.
- Eckel R. H.**, Grundy S. M., Zimmet P. Z. (2005): The Metabolic Syndrome. *The Lancet* 365 (9468): 1415–1428.
- Edinger A. L.**, **Thompson C. B.** (2003): Defective Autophagy Leads to Cancer. *Cancer Cell* 4 (6): 422–424.
- Elstrom R. L.**, Bauer D. E., Buzzai M., Karnauskas R., Harris M. H., Plas D. R., Zhuang H., Cinalli R. M., Alavi A., Rudin Ch. M., Thompson C. B. (2004): Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cancer Research* 64 (11): 3892–3899.
- Engeland M.**, Derks S, Smits K. M., Meijer G. A., Herman J. G. (2011): Colorectal Cancer Epigenetics: Complex Simplicity. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (10): 1382–1391.
- Escher P.**, Braissant O., Basu-Modak S., Michalik L., Wahli W., Desvergne B. (2001): Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. *Endocrinology* 142 (10): 4195–4202.
- Evans R. M.**, Barish G. D., Wang Y. (2004): PPARs and the Complex Journey to Obesity. *Nature Medicine* 10 (4): 355–361.
- Farkas S. A.**, Vymetalkova V., Vodickova L., Vodicka P., Nilsson T. K. (2014): DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes. *Epigenomics* 6 (2):179-191.
- Fearon E. R.**, **Vogelstein B.** (1990): A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61 (5): 759–767.
- Feige J. N.**, Gelman L., Michalik L., Desvergne B., Wahli W. (2006): From Molecular Action to Physiological Outputs: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Nuclear Receptors at the Crossroads of Key Cellular Functions. *Progress in Lipid Research* 45 (2): 120–159.
- Fitzgerald J. E.**, Petrere J. A., de la Iglesia F. A. (1987): Experimental Studies on Reproduction with the Lipid-Regulating Agent Gemfibrozil. *Toxicological Sciences* 8 (4): 454–464.

- Florio R.**, De Lellis L., di Giacomo V., Di Marcantonio M. C., Cristiano L., Basile M., Verginelli F., Verzilli D., Ammazalorso A., Prasad S. Ch., Cataldi A., Sanna M., Cimini A., Mariani-Costantini R., Mincione G., Cama A. (2017): Effects of PPAR α inhibition in head and neck paraganglioma cells. *PLoS ONE* 12 (6).
- Fucci A.**, Colangelo T., Votino C., Pancione M., Sabatino L., Colantuoni V. (2012): The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Esophageal, Gastric, and Colorectal Cancer. *PPAR Research*. Hindawi.
- Garami A.**, Zwartkruis F. J. T., Nobukuni T., Joaquin M., Roccio M., Stocker H., Kozma S. C., Hafen E., Bos J. L., Thomas G. (2003): Insulin Activation of Rheb, a Mediator of MTOR/S6K/4E-BP Signaling, Is Inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell* 11 (6): 1457–1466.
- Global Cancer Observatory.** [online] [navštíveno 17.2.2021] Dostupné z <https://gco.iarc.fr/>
- Goldstein N. S.** (2006): Serrated Pathway and APC (Conventional)-Type Colorectal Polyps: Molecular-Morphologic Correlations, Genetic Pathways, and Implications for Classification. *American Journal of Clinical Pathology* 125 (1): 146–153.
- Gong K.**, Qu B., Wang C., Zhou J., Liao D., Zheng W., Pan X. (2017): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Facilitates Osteogenic Differentiation in MC3T3-E1 Cells via the Sirtuin 1-Dependent Signaling Pathway. *Molecules and Cells* 40 (6): 393–400.
- Gonzalez F. J.**, Peters J. M., Cattley R. C. (1998): Mechanism of Action of the Nongenotoxic Peroxisome Proliferators: Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Journal of the National Cancer Institute* 90 (22): 1702–1709.
- 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.
- 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.
- Grabacka M.**, Reiss K. (2008): Anticancer Properties of PPAR - Effects on Cellular Metabolism and Inflammation. *PPAR Research*. Hindawi.
- Grabacka M.**, Wiczorek J., Michalczyk-Wetula D., Malinowski M., Wolan N., Wojcik K., Plonka P. M. (2017): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) Contributes to Control of Melanogenesis in B16 F10 Melanoma Cells. *Archives of Dermatological Research* 309 (3): 141–157.

- Grady W. M., Carethers J. M. (2008):** Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135 (4): 1079–1099.
- Hager G. L., Lim C. S., Elbi C., Baumann Ch. T. (2000):** Trafficking of Nuclear Receptors in Living Cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74 (5): 249–254.
- Han L., Shen W., Bittner S., Kraemer F. B., Azhar S. (2017):** PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiology* 13 (3): 259–278.
- Hanley K., Jiang Y., He S. S., Friedman M., Elias P. M., Bikle D. D., Williams M. L., Feingold K. R. (1998):** Keratinocyte Differentiation Is Stimulated by Activators of the Nuclear Hormone Receptor PPARalpha. *The Journal of Investigative Dermatology* 110 (4): 368–375.
- Hanyk J. (2019):** Vliv fibrátů na diferenciaci střevních buněk in vitro. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého, Olomouc.
- Hashimoto Y., Miyachi H. (2005):** Nuclear Receptor Antagonists Designed Based on the Helix-Folding Inhibition Hypothesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (17): 5080–5093.
- Hebbar P. B., Archer T. K. (2003):** Chromatin Remodeling by Nuclear Receptors. *Chromosoma* 111 (8): 495–504.
- Huang Y., Liu K., Chiou Y., Yang Ch., Chen T., Li T., Liu L. (2013):** Fenofibrate Suppresses Melanogenesis in B16-F10 Melanoma Cells via Activation of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Chemico-Biological Interactions* 205 (3): 157–164.
- Huin C., Corriveau L., Bianchi A., Keller J. M., Collet P., Krémarik-Bouillaud P., Domenjoud L., Bécuwe P., Schohn H., Ménard D., Dauca M. (2000):** Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in the Developing Human Fetal Digestive Tract. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 48 (5): 603–611.
- Chew M. H., Tan W. S., Liu Y., Cheah P. Y., Loi C. T., Tang Ch. L. (2015):** Genomics of Hereditary Colorectal Cancer: Lessons Learnt from 25 Years of the Singapore Polyposis Registry. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 44 (8): 290–296.
- Ikawa H., Kameda H., Kamitani H., Baek S. J., Nixon J. B., His L. C., Eling T. E. (2001):** Effect of PPAR Activators on Cytokine-Stimulated Cyclooxygenase-2 Expression in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research* 267 (1): 73–80.

- Issemann I., Green S. (1990):** Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators. *Nature* 347 (6294): 645–650.
- Jass J. R. (2004):** Hyperplastic Polyps and Colorectal Cancer: Is There a Link? *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 2 (1): 1–8.
- 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.
- Jones S., Chen W., Parmigiani G., Diehl F., Beerenwinkel N., Antal T., Traulsen A., Nowak M. A., Siegel Ch., Velculescu V. E., Kinzler K. W., Vogelstein B., Willis J., Markowitz S. D. (2008):** Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (11): 4283–4288.
- Jones R. G., Plas D. R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M. J., Thompson C. B. (2005):** AMP-Activated Protein Kinase Induces a P53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* 18 (3): 283–293.
- Kang G. H. (2011):** Four Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Precursor Lesions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135 (6): 698–703.
- Kehrer J. P., Biswal S. S., La E., Thuillier P., Datta K., Fischer S. M., Heuvel J. P. V. (2001):** Inhibition of Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor (PPAR)Alpha by MK886. *The Biochemical Journal* 356 (3): 899–906.
- Kersten S., Mandard S., Escher P., Gonzalez F. J., Tafuri S., Desvergne B., Wahli W. (2001):** The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Regulates Amino Acid Metabolism. *The FASEB Journal* 15 (11): 1971–1978.
- Klaunig J. E., Babich M. A., Baetcke K. P., Cook J. C., Corton J. Ch., David R. M., DeLuca J. G., Lai D. Y., McKee R. H., Peters J. M., Roberts R. A., Fenner-Crisp P. A. (2003):** PPAR α Agonist-Induced Rodent Tumors: Modes of Action and Human Relevance. *Critical Reviews in Toxicology* 33 (6): 655–780.
- Kohno H., Suzuki R., Sugie S., Tanaka T. (2005):** Suppression of Colitis-Related Mouse Colon Carcinogenesis by a COX-2 Inhibitor and PPAR Ligands. *BMC Cancer* 5: 46.

- Kömüves** L. G., Hanley K., Lefebvre A. M., Man M. Q., Ng D. C., Bikle D. D., Williams M. L., Elias P. M., Auwerx J., Feingold K. R. (2000): Stimulation of PPAR α Promotes Epidermal Keratinocyte Differentiation in Vivo. *The Journal of Investigative Dermatology* 115 (3): 353–360.
- Koppenol** W. H., Bounds P. L., Dang Ch. V. (2011): Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11 (5): 325–337.
- Kovaříková** M., Pacherník J., Hofmanová J., Zadák Z, Kozubík A. (2000): TNF-Alpha Modulates the Differentiation Induced by Butyrate in the HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cell Line. *European Journal of Cancer* 36 (14): 1844–1852.
- Král** J., Slyšková J., Vodička P., Špičák J. (2016): Molekulární genetika kolorektálního karcinomu. *Klinická onkologie* 29 (6): 419–427.
- Krey** G., Braissant O., L'Horsset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M. G., Wahli W. (1997): Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Molecular Endocrinology* 11 (6): 779–791.
- Kuipers** E. J., Grady W. M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J. J., Boelens P. G., van de Velde C. J. H., Watanabe T. (2015): Colorectal Cancer. *Nature Reviews. Disease Primers* 1: 15065.
- Kumar** S., Saradhi M., Chaturvedi N. K., Tyagi R. K. (2006): Intracellular Localization and Nucleocytoplasmic Trafficking of Steroid Receptors: An Overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246 (1–2): 147–156.
- Kwong** L. N., Dove W. F. (2009): APC and its modifiers in colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 656: 85-106.
- Lamy** A., Blanchard F., Le Pessot F., Sesboué R., Di Fiore F., Bossut J., Fiant E., Frébourg T., Sabourin J. (2011): Metastatic Colorectal Cancer KRAS Genotyping in Routine Practice: Results and Pitfalls. *Modern Pathology* 24 (8): 1090–1100.
- Laurenti** G., Benedetti E., D'Angelo B., Cristiano L., Cinque B., Raysi S., Alecci M., Cerú M. P., Cifone M. G., Galzio R., Giordano A., Cimini A. (2011): Hypoxia Induces Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) and Lipid Metabolism Peroxisomal Enzymes in Human Glioblastoma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (12): 3891–3901.
- Lee** J., Hashizaki H., Goto T., Sakamoto T., Takahashi N., Kawada T. (2011): Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Enhances Fatty Acid Oxidation in Human Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407 (4): 818–22.

- 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.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J, Staels B. (2006):** Sorting out the Roles of PPAR α in Energy Metabolism and Vascular Homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (3): 571–580.
- Lengauer C., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1997):** Genetic Instability in Colorectal Cancers. *Nature* 386 (6625): 623–627.
- Li L., Prabhakaran K., Zhang X., Borowitz J. L., Isom G. E. (2006):** PPAR α -Mediated Upregulation of Uncoupling Protein-2 Switches Cyanide-Induced Apoptosis to Necrosis in Primary Cortical Cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 93 (1): 136–145.
- Lochhead P., Chan A. T., Giovannucci E., Fuchs Ch. S., Wu K., Nishihara R., O'Brien M., Ogino S. (2014):** Progress and Opportunities in Molecular Pathological Epidemiology of Colorectal Premalignant Lesions. *The American journal of gastroenterology* 109 (8): 1205–1214.
- Luo Y., Xie C., Brocker Ch. N., Fan J., Wu X., Feng L., Wang Q., Zhao J., Lu D., Tandon M., Cam M., Krausz K. W., Liu W. (2019):** Intestinal PPAR α Protects Against Colon Carcinogenesis via Regulation of Methyltransferases DNMT1 and PRMT6. *Gastroenterology* 157 (3): 744-759.
- Mane D. R., Kale A. D., Belaldavar Ch. (2017):** Validation of immunoexpression of tenascin-C in oral precancerous and cancerous tissues using ImageJ analysis with novel immunohistochemistry profiler plugin: An immunohistochemical quantitative analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 21 (2): 211–217.
- Markowitz S. D., Bertagnolli M. M. (2009):** Molecular Origins of Cancer. *The New England journal of medicine* 361 (25): 2449–2460.
- Martens J. A., Winston F. (2003):** Recent Advances in Understanding Chromatin Remodeling by Swi/Snf Complexes. *Current Opinion in Genetics & Development* 13 (2): 136–142.
- Martinez-Outschoorn U. E., Peiris-Pagés M., Pestell R. G., Sotgia F., Lisanti M. P. (2017):** Cancer Metabolism: A Therapeutic Perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14 (1): 11–31.

- Matsumoto H.**, Erickson R. H., Gum J. R., Yoshioka M., Gum E., Kim Y. S. (1990): Biosynthesis of Alkaline Phosphatase during Differentiation of the Human Colon Cancer Cell Line Caco-2. *Gastroenterology* 98 (5): 1199–1207.
- Mazelin L.**, Bernet A., Bonod-Bidaud C., Pays L., Arnaud S., Gespach C., Bredesen D. E., Scoazec J. Y., Mehlen P. (2004): Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431 (7004): 80-84.
- McKenna N. J.**, O'Malley B. W. (2002): Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* 108 (4): 465–474.
- McKeown-Eyssen G.** (1994): Epidemiology of Colorectal Cancer Revisited: Are Serum Triglycerides and/or Plasma Glucose Associated with Risk? *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 3 (8): 687–695.
- Mehlen P.**, Fearon E. R. (2004): Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (16): 3420–3428.
- Messmer D.**, Lorrain K., Stebbins K., Bravo Y., Stock N., Cabrera G., Correa L., Chen A., Jacintho J., Chiorazzi N., Yan X. J., Spaner D., Prasit P., Lorrain D. (2015): A Selective Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α Antagonist Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of CLL Cells In Vitro and In Vivo. *Molecular Medicine* 21: 410–419.
- Naccarati A.**, Polakova V., Pardini B., Vodickova L., Hemminki K., Kumar R., Vodicka P. (2012): Mutations and Polymorphisms in TP53 Gene--an Overview on the Role in Colorectal Cancer. *Mutagenesis* 27 (2): 211–218.
- Niho N.**, Takahashi M., Kitamura T., Shoji Y., Itoh M., Noda T., Sugimura T., Wakabayashi K. (2003): Concomitant Suppression of Hyperlipidemia and Intestinal Polyp Formation in Apc-Deficient Mice by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands. *Cancer Research* 63 (18): 6090–6095.
- Nolte R. T.**, Wisely G. B., Westin S., Cobb J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeld M. G., Willson T. M., Glass C. K., Milburn M. V. (1998): Ligand Binding and Co-Activator Assembly of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma. *Nature* 395 (6698): 137–143.
- Obuch J. C.**, Pigott C. M., Ahnen D. J. (2015): Sessile Serrated Polyps: Detection, Eradication, and Prevention of the Evil Twin. *Current treatment options in gastroenterology* 13 (1) (březen): 156–170.

- Oshio H., Abe T., Onogawa T., Ohtsuka H., Sato T., Ii T., Fukase K., Muto M., Katayose Y. Oikawa M., Rikiyama T., Egawa S., Unno M. (2008):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activates Cyclooxygenase-2 Gene Transcription through Bile Acid Transport in Human Colorectal Cancer Cell Lines". *Journal of Gastroenterology* 43 (7): 538–549.
- Pantaleoni G. C., Valeri P. (1974):** Studies of the Interactions of Clofibrate with the Reproductive Function. *La Clinica Terapeutica* 69 (4): 321–328.
- Peters J. M., Shah Y. M., Gonzalez F. J. (2012):** The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Nature Reviews. Cancer* 12 (3): 181–195.
- Pino M. S., Chung D. C. (2010):** The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 138 (6): 2059–2072.
- Plas D. R., Thompson C. B. (2005):** Akt-Dependent Transformation: There Is More to Growth than Just Surviving. *Oncogene* 24 (50): 7435–7442.
- 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-Alpha-Dependent Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (24): 17685–1795.
- Proksch E., Feingold K. R., Man M. Q., Elias P. M. (1991):** Barrier Function Regulates Epidermal DNA Synthesis. *The Journal of Clinical Investigation* 87 (5): 1668–1673.
- Pyper S. R., Viswakarma N., Yu S., Reddy J. K. (2010):** PPARalpha: Energy Combustion, Hypolipidemia, Inflammation and Cancer. *Nuclear Receptor Signaling* 8: e002.
- Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S. (2010):** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Research* 2010. Hindawi.
- Renaud J. P., Moras D. (2000):** Structural Studies on Nuclear Receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57 (12): 1748–1769.
- Rex D. K., Ahnen D. J., Baron J. A., Batts K. P., Burke C. A., Burt R. W., Goldblum J. R., Guillem J. G., Kahi Ch. J., Kalady M. F., O'Brien M. J., Odze R. D., Ogino S., Parry S., Snover D. C., Torlakovic E. E., Wise P. E., Young J., Church J. (2012):** Serrated Lesions of the Colorectum: Review and Recommendations from an Expert Panel. *The American Journal of Gastroenterology* 107 (9): 1315–1329.

- 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.
- Rocchi S., Picard F., Vamecq J., Gelman L., Potier N., Zeyer D., Dubuquoy L., Bac P., Champy M., Plunket K. D., Leesnitzer L. M., Blanchard S. G., Desreumaux P., Moras D., Renuad J., Auwerx J. (2001):** A Unique PPAR γ Ligand with Potent Insulin-Sensitizing yet Weak Adipogenic Activity. *Molecular Cell* 8 (4): 737–747.
- Salma N., Xiao H., Mueller E., Imbalzano A. N. (2004):** Temporal Recruitment of Transcription Factors and SWI/SNF Chromatin-Remodeling Enzymes during Adipogenic Induction of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Nuclear Hormone Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 24 (11): 4651–4663.
- Shaw R. J. (2006):** Glucose Metabolism and Cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 18 (6): 598–608.
- Shen G., Jiang., Fu X., Wang D. (2008):** Promotive effects of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on proliferation of tumor cells. *Chinese Journal of Cancer* 27 (11): 1130–1136.
- Schimpel Ch., Werzer O, Fröhlich E., Leitinger G., Absenger-Novak M., Teubl B., Zimmer A., Roblegg E. (2015):** Atomic force microscopy as analytical tool to study physico-mechanical properties of intestinal cells. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6: 1457–1466.
- Schupp M., Lazar M. A. (2010):** Endogenous Ligands for Nuclear Receptors: Digging Deeper. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40409–40415.
- Simon K. (2016):** Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging* 11: 967–976.
- Sobin L. H., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. (2009):** TNM Classification of Malignant Tumours. 7th edition, Wiley-Blackwell.
- Sorrentino S. A., Bahlmann F. H., Besler Ch., Müller M., Schulz S., Kirchhoff N., Doerries C., Horváth T., Limbourg A., Limbourg F., Fliser D., Haller H., Drexler H., Landmesser U. (2007):** Oxidant Stress Impairs in Vivo Reendothelialization Capacity of Endothelial Progenitor Cells from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Restoration by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist Rosiglitazone. *Circulation* 116 (2): 163–173.

- Spaner** D. E., Lee E., Shi Y., Wen F., Li Y., Tung S., McCaw L., Wong K., Gary-Gouy H., Dalloul A., Ceddia R., Gorzycynski R. (2013): PPAR-Alpha Is a Therapeutic Target for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* 27 (5): 1090–1099.
- 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.
- 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* 34 (4): 165–171.
- Surapureddi** S., Yu S., Bu H., Hashimoto T., Yeldandi A. V., Kashireddy P., Cherkaoui-Malki M., Qi Ch., Zhu Y., Rao M. S., Reddy J. K. (2002): Identification of a Transcriptionally Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α -Interacting Cofactor Complex in Rat Liver and Characterization of PRIC285 as a Coactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18): 11836–11841.
- Tanaka** T., Kohno H., Yoshitani S., Takashima S., Okumura A., Murakami A., Hosokawa M. (2001): Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Gamma Inhibit Chemically Induced Colitis and Formation of Aberrant Crypt Foci in Rats. *Cancer Research* 61 (6): 2424–2428.
- Thomas** R. M., **Sobin** L. H. (1995): Gastrointestinal Cancer. *Cancer* 75 (1): 154–170.
- Tsugane** S., **Inoue** M. (2010): Insulin Resistance and Cancer: Epidemiological Evidence. *Cancer Science* 101 (5): 1073–1079.
- Tzatsos** A., **Tsichlis** P. N. (2007): Energy Depletion Inhibits Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling and Induces Apoptosis via AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *Journal of Biological Chemistry* 282 (25): 18069–18082.
- Umamoto** 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.
- Vergori** L., Lauret E., Soleti R., Andriantsitohaina R., Martinez M. C. (2018): Microparticles Carrying Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Restore the Reduced Differentiation and Functionality of Bone Marrow-Derived Cells Induced by High-Fat Diet. *STEM CELLS Translational Medicine* 7 (1): 135–145.
- Vivanco** I., **Sawyers** Ch. L. (2002): The Phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT Pathway in Human Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2 (7): 489–501.

- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000):** Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810): 307-310.
- Wang Y., Liang Y, Vanhoutte P. M. (2011):** SIRT1 and AMPK in Regulating Mammalian Senescence: A Critical Review and a Working Model. *FEBS Letters* 585 (7): 986–994.
- Wang Y., Srinivasan K., Siddiqui M. R., George S. P., Tomar A., Khurana S. (2008):** A Novel Role for Villin in Intestinal Epithelial Cell Survival and Homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (14): 9454–9464.
- Warburg O. (1956):** On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123 (3191): 309–314.
- Weitz J., Koch M., Debus J., Höhler T., Galle P. R., Büchler M. W. (2005):** Colorectal Cancer. *Lancet* 365 (9454): 153–165.
- Weinhouse S., Warburg O., Burk D., Schade A. L. (1956):** On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* 124 (3215): 267–272.
- Wilson G. N., King T., Argyle J. C., Garcia R. F. (1991):** Maternal Clofibrate Administration Amplifies Fetal Peroxisomes. *Pediatric Research* 29 (3): 256–262.
- Wolin K. Y., Carson K., Colditz G. A. (2010):** Obesity and Cancer. *The Oncologist* 15 (6): 556–565.
- Wood L. C., Jackson S. M., Elias P. M, Grunfeld C, Feingold K. R. (1992):** Cutaneous Barrier Perturbation Stimulates Cytokine Production in the Epidermis of Mice. *The Journal of Clinical Investigation* 90 (2): 482–487.
- Xu H. E., Lambert M. H., Montana V. G., Plunket K. D., Moore L. B., Collins J. L., Oplinger J. A., Kliewer S. A., Gampe Jr. R. T., McKee D. D., Moore J. T., Willson T. M. (2001):** Structural Determinants of Ligand Binding Selectivity between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (24): 13919–13924.
- Xu H. E., Stanley T. B., Montana V. G., Lambert M. H., Shearer B. G., Cobb J. E., McKee D. D., Galardi C. M., Plunket K. D., Nolte R. T., Parks D. J., Moore J. T., Kliewer S. A., Willson T. M., Stimmel J. B. (2002):** Structural Basis for Antagonist-Mediated Recruitment of Nuclear Co-Repressors by PPAR α . *Nature* 415 (6873): 813–817.
- Yaghoobizadeh M., Pishkar L., Basati G. (2020):** Aberrant Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Colorectal Cancer and Their Association with Cancer Progression and Prognosis. *Gastrointestinal Tumors* 7: 11-20.
- Zavoral M., Vojtěchová G., Suchánek Š. (2013):** Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 7 (4): 172–175.

9 PŘÍLOHA

Tabulka 3: Charakteristika vzorků tkáně tlustého střeva a kolorektálního karcinomu pro imunohistochemické barvení.

| vzorek | pohlaví | věk | diagnóza | lokalizace | stádium T | stádium N | stádium M | grade |
|--------|---------|-----|---------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| 1. | muž | 71 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G2 |
| 2. | žena | 66 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G2 |
| 3. | muž | 66 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G3 |
| 4. | muž | 51 | adenokarcinom | sigmoideum | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 5. | žena | 63 | adenokarcinom | sestupný tračník, rectum | T3 | N1 | M1 | G2 |
| 6. | muž | 72 | adenokarcinom | sestupný tračník, rectum | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 7. | muž | 70 | adenokarcinom | sestupný tračník, rectum | T3 | N0 | M0 | G2 |
| 8. | žena | 74 | adenokarcinom | sestupný tračník, rectum | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 9. | muž | 76 | adenokarcinom | sigmoideum | T4a | N0 | M0 | G2 |
| 10. | žena | 50 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G1 |
| 11. | muž | 72 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N1a | M0 | G2 |
| 12. | žena | 50 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N2b | M1b | G3 |
| 13. | muž | 77 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G3 |
| 14. | muž | 69 | adenokarcinom | ascendens | T3 | N2b | M0 | G2 |
| 15. | muž | 64 | adenokarcinom | sigmoideum | T2 | Nx | Mx | G1 |

Pokračování Tabulka 3: **Charakteristika vzorků tkáně tlustého střeva a kolorektálního karcinomu pro imunohistochemické barvení.**

| vzorek | pohlaví | věk | diagnóza | lokalizace | stádium T | stádium N | stádium M | grade |
|---------------|----------------|------------|---------------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| 16. | muž | 34 | adenokarcinom | pravé colon | T2 | Nx | M0 | G1 |
| 17. | žena | 79 | adenokarcinom | ascendens | T2 | Nx | M0 | G1 |
| 18. | muž | 83 | adenokarcinom | sestupný tračník, rectum | T2 | Nx | M0 | G1 |
| 19. | muž | 70 | adenokarcinom | sigmoideum | T4a | N0 | M1a | G2 |
| 20. | muž | 57 | adenokarcinom | sigmoideum | T2 | Nx | Mx | G2 |
| 21. | muž | 71 | adenokarcinom | sigmoideum | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 22. | muž | 54 | adenokarcinom | sigmoideum | T2 | N0 | M0 | G3 |
| 23. | žena | 68 | adenokarcinom | přechod IC | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 24. | muž | 60 | adenokarcinom středně dif | sigmoideum | T4a | N2a | M0 | G2 |
| 25. | žena | 39 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N1a | M0 | G3 |
| 26. | muž | 47 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G2 |
| 27. | žena | 70 | adenokarcinom | sestupný tračník, rektum | T3 | N2a | M0 | G3 |
| 28. | žena | 73 | adenokarcinom | sestupný tračník, rektum | T2 | N0 | M0 | G2 |
| 29. | žena | 84 | adenokarcinom | sestupný tračník, rektum | T3 | N0 | M0 | G1 |
| 30. | muž | 76 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G3 |
| 31. | muž | 55 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N2b | M0 | G2 |
| 32. | muž | 69 | adenokarcinom | sigmoideum | T3 | N0 | M0 | G3 |