

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav histologie a embryologie



**Expresse CYP epoxygenáz a solubilní epoxid hydrolázy
v prenatálním vývoji člověka a jejich regulace ligandy
PPAR α *in vitro***

Dizertační práce

Mgr. Kateřina Čížková

Školitelka: MUDr. Radka Lichnovská, Ph.D.

Studijní obor: Anatomie, histologie, embryologie

Olomouc 2016

Palacky University in Olomouc
Faculty of Medicine and Dentistry
Department of Histology and Embryology



**Expression patterns of CYP epoxygenases and soluble
epoxide hydrolase during human prenatal
development and their regulation by PPAR α *in vitro***

Dissertation Thesis

Mgr. Kateřina Čížková

Supervisor: MUDr. Radka Lichnovská, Ph.D.

Field of study: Anatomy, histology, embryology

Olomouc 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Radky Lichnovské, Ph.D. a za použití citované literatury.

Jsem seznámena s tím, že tato dizertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

Vznik této dizertační práce byl podpořen interními granty Lékařské fakulty Univerzity Palackého LF_2011_009, LF_2013_006, LF_2014_003 a LF_2015_008.

V Olomouci

.....

Mgr. Kateřina Čížková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za ochotu konzultovat, vstřícnost, komunikativnost a mnohé cenné rady, kterých se mi během studia dostalo. Děkuji své školitelce MUDr. Radce Lichnovské, Ph. D. za rady a připomínky a ochotu konzultovat při zpracování mé dizertační práce. Moje poděkování si také zaslouží kolegové z Ústavu histologie a embryologie, především laborantky, a kolegové z Ústavu klinické a molekulární patologie, kteří mi pomáhali a radili mi, když bylo třeba.

Mé díky patří také mým přátelům, kteří mě podporovali v dobách lehkých a nelehkých, a mé rodině. Děkuji všem, kteří věřili, že tuto práci dokončím.

SOUHRN

Cytochrom P450 (CYP) epoxygenázy, konkrétně podrodiny CYP2C a CYP2J, hrají nezanedbatelnou úlohu v metabolismu léčiv. Jejich aktivní přítomnost (spolu s dalšími CYPs) v nádorových tkáních může mít negativní dopad na účinnost chemoterapie, protože deaktivují protinádorová léčiva a tím přispívají k rozvoji mnohočetné lékové rezistence u pacientů s různými typy nádorů. Neméně významná je jejich endogenní role. CYP epoxygenázy přeměňují arachidonovou kyselinu na čtyři regioizomery epoxyeikosatrienových kyselin (EETs). Jde o vysoce aktivní molekuly, které se účastní řady biologických procesů, mimo jiné ovlivňují procesy, které jsou relevantní pro vývoj jedince, jako je regulace a uvolňování intracelulárních signálních molekul, proteinkinázové aktivity, buněčná diferenciaci a mitogeneze. EETs jsou dále metabolizovány solubilní epoxid hydrolázou (sEH) na méně aktivní dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs). CYP epoxygenázy a sEH patří mezi cílové geny jaderného receptoru PPAR α .

Cílem této dizertační práce je zmapovat expresi CYP epoxygenáz, sEH a jaderného receptoru PPAR α ve střevech, játrech a ledvinách během prenatálního vývoje člověka a následně ověřit regulaci exprese CYP epoxygenáz a sEH v buněčných liniích odvozených z těchto orgánů ovlivněných ligandy PPAR α .

Výsledky dosažené studiem lidských embryonálních a fetálních vzorků tkání prokazují přítomnost CYP epoxygenáz, sEH a PPAR α již v raných stádiích prenatálního vývoje. Distribuce CYP epoxygenáz a sEH také ukazuje na možný vliv těchto enzymů a jejich metabolitů v diferenciaci buněk.

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

Klíčová slova: CYP epoxygenázy, solubilní epoxid hydroláza, prenatální vývoj člověka, proliferace, diferenciaci, receptor aktivovaný proliferátory peroxizomů α

SUMMARY

Cytochrom P450 (CYP) epoxygenases, namely CYP2C and CYP2J, play non-negligible role in drug metabolism. Their activity (together with other members of CYP superfamily) in tumour tissue may have negative impact on successful chemotherapy. They can deactivate antitumour drugs and thus contribute to multidrug resistance in cancer patients. CYP epoxygenases have also important endogenous role. They convert arachidonic acid into four regioisomers of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). EETs are biologically active molecules with many functions in organism. Besides other things, they regulate a variety of processes potentially relevant to development such as releasing of intracellular signaling molecules, activity of protein kinases, cellular proliferation and differentiation. EETs are metabolized to less active dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs) by soluble epoxide hydrolase (sEH). CYP epoxygenases and sEH are target genes of nuclear receptor PPAR α .

The aim of this dissertation thesis is investigation of expression profiles of CYP epoxygenases, sEH and PPAR α in intestines, liver and kidney during human prenatal development and examine regulation of expression of CYP epoxygenases and sEH by ligands of PPAR α .

The results show that CYP epoxygenases, sEH, and PPAR α are present early in prenatal development. Expression patterns of studied proteins indicate their possible influence in cellular differentiation.

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

Key words: CYP epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, human prenatal development, proliferation, differentiation, peroxisome-proliferator activated receptor α

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 PODOBNOST MEZI EMBRYONÁLNÍM VÝVOJEM A TUMORIGENEZÍ	10
2.2 MNOHOČETNÁ LÉKOVÁ REZISTENCE A METABOLIZMUS XENOBIOTIK	12
2.2.1 DETOXIKAČNÍ PROCES	13
2.2.2 ORGÁNY ZAHRNUTÉ V METABOLIZMU XENOBIOTIK	15
2.2.3 EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ STŘEV, JATER A LEDVIN	15
2.3 ENZYMY I. FÁZE BIOTRANSFORMACE	20
2.3.1 CYTOCHROMY P450	20
2.3.2 ROLE CYTOCHROMŮ P450 V PRENATÁLNÍM VÝVOJI	22
2.3.3 CYTOCHROM P450 EPOXYGENÁZY A SOLUBILNÍ EPOXID HYDROLÁZA	24
2.3.4 EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH V NORMÁLNÍ A NÁDOROVÉ TKÁNI	26
2.3.5 EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE U ČLOVĚKA	29
2.3 RECEPTORY AKTIVOVANÉ PROLIFERÁTORNY PEROXIZÓMŮ (PPARs)	31
2.3.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA, FUNKCE A STRUKTURA	31
2.3.2 MECHANIZMUS ÚČINKU PPARs	32
2.3.3 EXPRESE PPARs V PRENATÁLNÍM VÝVOJI	33
2.4 VZTAH CYP EPOXYGENÁZ, sEH A PPAR α	33
2.4.1 <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i> STUDIE NA ZVÍŘECÍCH MODELECH	34
2.4.2 <i>IN VITRO</i> STUDIE NA LIDSKÝCH BUŇKÁCH	35
3 CÍLE PRÁCE	37
4 MATERIÁL A METODY	38
4.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE CYP EPOXYGENÁZ, sEH a PPAR α V LIDSKÝCH PRENATÁLNÍCH A DOSPĚLÝCH TKÁNÍCH	38
4.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL PRO IHC	38
4.1.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ	40
4.1.3 HODNOCENÍ	41
4.1.4 ROZTOKY POUŽITÉ PRO IHC	42
4.2 TEST VIABILITY BUNĚK WST-1	42
4.2.1 BUNĚČNÉ LINIE A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	42

4.2.2	POUŽITÉ LIGANDY PPAR α	43
4.2.3	STANOVENÍ KONCENTRACE S MAXIMÁLNÍ VIABILITOU, IC10 A IC50 VYBRANÝCH LIGANDŮ PPAR α V BUNĚČNÝCH LINIÍCH	44
4.3	WESTERN BLOTTING	44
4.3.1	PŘÍPRAVA VZORKU	44
4.3.2	SDS-PAGE, PŘENOS PROTEINŮ NA MEMBRÁNU A JEJICH DETEKCE.	45
4.3.3	ROZTOKY POUŽITÉ PRO WESTERN BLOTTING	47
5	VÝSLEDKY.....	49
5.1	EXPRESSE CYP EPOXYGENÁZ BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE A V DOSPĚLOSTI	49
5.1.1	STŘEVO.....	49
5.1.2	JÁTRA.....	53
5.1.3	LEDVINA.....	57
5.2	EXPRESSE sEH V PRENATÁLNÍM VÝVOJI A V DOSPĚLOSTI	62
5.2.1	STŘEVO.....	63
5.2.2	JÁTRA.....	63
5.2.3	LEDVINA.....	64
5.3	SROVNÁNÍ EXPRESSE CYP EPOXYGENÁZ A sEH BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE.....	65
5.4	EXPRESSE PPAR α V PRENATÁLNÍM VÝVOJI A V DOSPĚLOSTI	68
5.4.1	STŘEVO.....	68
5.4.2	JÁTRA.....	68
5.4.3	LEDVINA.....	69
5.5	VIABILITA BUNĚK PO OVLIVNĚNÍ RŮZNÝMI LIGANDY PPAR α	72
5.6	ZMĚNA EXPRESSE CYP EPOXYGENÁZ A sEH V BUNĚČNÝCH LINIÍCH PO OVLIVNĚNÍ LIGANDY PPAR α	73
6	DISKUZE	77
7	ZÁVĚR.....	85
8	SEZNAM ZKRATEK.....	87
9	POUŽITÁ LITERATURA	90
10	SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ	102

1 ÚVOD

I když to nemusí být na první pohled patrné, vývoj embrya a nádorů se v mnohých aspektech podobají. Poprvé s myšlenkou podobnosti embryí a nádorů přišli již v 19. století Joseph Claude Anselme Recamier (1829) a Robert Remak (1854), kteří popsali, že nádorová tkáň vypadá jako tkáň embryonální (Sell, 2009). Progres v oblasti molekulární biologie, nádorové imunologie, vývojové biologie a experimentální embryologie vede k nashromáždění řady důkazů, které podobnost embryogeneze a tumorigeneze potvrzují.

Moderní vývojová biologie studuje genetickou kontrolu růstu, diferenciaci a morfogeneze. Tyto procesy dávají vznik tkáním a orgánům. Klíčovým problémem vývojové biologie je tedy diferenciace. Z pohledu diferenciaci představuje tumorigeneze narušení normálního diferenciačního procesu, který je regulován řadou onkogenů a tumorsupresorů; genů, jejichž mutace vede ke vzniku a rozvoji nádorového onemocnění.

Propojení vývojové a nádorové biologie tak umožňuje lepší pochopení procesů, které se odehrávají během prenatálního vývoje. Tyto poznatky potenciálně otevírají možnosti vývoje nové generace prognostických a terapeutických přístupů v léčbě nádorů. A zpětně znalosti získané studiem různých typů nádorů nám mohou pomoci porozumět normálnímu embryonálnímu vývoji (Ma et al., 2010).

Tato dizertační práce se zaměřuje na proteiny, které se účastní metabolismu xenobiotik, v prenatálním vývoji a jejich regulaci. Jedná se o skupinu cytochrom P450 epoxygenáz. Ty se v organismu účastní metabolismu kyseliny arachidonové, která je nedílnou součástí výživy, ale také představují jeden z mechanismů, kterými nádorové buňky získávají rezistenci na léčiva. Zjištěné údaje mohou přispět nejenom k pochopení jejich úlohy během prenatálního vývoje, ale také přispět k pochopení vzniku mnohočetné lékové rezistence u pacientů s nádorovým onemocněním.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 PODOBNOST MEZI EMBRYONÁLNÍM VÝVOJEM A TUMORIGENEZÍ

Vývoj časného embrya a nádorová transformace buněk vykazuje řadu podobností jak na molekulární úrovni, tak na úrovni chování buněk. Významné podobnosti lze nalézt v migraci a invazivním chování buněk, jejich expresních a proteinových profilech, aktivních signálních drahách, buněčné diferenciaci, způsobech úniku před rozpoznání imunitním systémem, atd (Ma et al., 2010).

Embryo se vyvíjí z embryonálních kmenových buněk. V dospělosti se v tkáních vyskytují dospělé kmenové buňky, které zajišťují doplnění nových buněk do tkání a jejich opravu. Pro kmenové buňky je charakteristická schopnost sebeobnovy a také schopnost diferencovat do různých specializovaných buněčných typů (Yu et al., 2012). Embryonální kmenové buňky i dospělé kmenové buňky mají mnoho mechanismů, které je chrání před potenciálními mutagenními mechanismy spojenými se zánětem, infekcí a toxiny ze stravy (Baguley, 2010). V roce 1994 byla poprvé potvrzena teorie, že existují nádorové kmenové buňky. Jde o malou skupinu dormantních buněk, které mají podobné vlastnosti jako další typy kmenových buněk, zejména schopnost sebeobnovy a diferenciaci, neomezený proliferační potenciál, aktivované mechanismy obrany proti xenobiotikům (Park et al., 2009; Yu et al., 2012).

V embryonálních a nádorových buňkách se exprimují geny, které se účastní deprogramování, proliferace a dediferenciaci. Tyto geny nejsou vůbec nebo jen zřídka exprimovány v somatických buňkách, které podléhají diferenciaci a senescenci. Jde často o protoonkogeny a růstové faktory, které jsou během embryonálního vývoje exprimovány v určitých tkáních a určitém vývojovém období, např. c-myc, c-kit, c-src, fgf-2 (Papaioannou, 1993; Baudino et al., 2002; Dvorak et al., 2006). Během časně embryogeneze se exprimuje gen OCT4. Tento gen je také exprimován v nádorové tkáni na rozdíl od tkání zdravých, kde nebyl prokázán. (Monk et Holding, 2001). Kromě jednotlivých genů jsou pro tumorigenezi klíčové také evolučně konzervované vývojové signální dráhy, hlavně Wnt, FGF, Notch, BMP a Hedgehog. Ty jsou nezbytné pro synchronizaci řady buněčných aktivit a morfogeneze. (Wang et Steinbeisser, 2009). Embryonální a nádorové buňky jsou také charakteristické vysokým stupněm proliferace (Baudino et al., 2002).

Podobnosti mezi embryem a nádorovou tkání lze nalézt také v jejich proteinovém profilu. Syntéza některých proteinů, které se vyskytují pouze během prenatálního vývoje, byla prokázána i u pacientů s některými typy nádorů. Označují se jako onkofetální proteiny a využívají se jako biomarkery pro diagnostiku, léčbu a prognózu řady nádorových onemocnění. Mezi onkofetální biomarkery patří karcinoembryonální antigen (CEA), α -fetoprotein, survivin a řada dalších (Chen et al., 1997; Duffy, 2001; Megliorino et al., 2005; Ma et al., 2010).

Podobnosti mezi embryogenezí a tumorigenezí lze nalézt také na epigenetické úrovni. Pro časnou embryogenezi a tumorigenezi je typická demethylace genomu (Mayer et al., 2000; Sharma et al., 2010). V obou případech byla prokázána vysoká hladina DNA metyl transferáz. Průvodním jevem je i zvýšená exprese a transpozice retrotranspozonů, pravděpodobně jako důsledek demethylace (Monk and Holding, 2001).

Výraznou podobnost lze pozorovat mezi chováním invazivních buněk trofoblastu při implantaci embrya a vývoji placenty a invazivními nádorovými buňkami. Nádorové buňky využívají stejných mechanismů, ve kterých hrají roli integriny a další adhezivní molekuly, mezibuněčná hmota a matrixové metaloproteinázy při tvorbě metastáz. Pro vyvíjející se embryo i přežití nádoru je kritická angiogeneze. Endotelie využívají podobné buněčné mechanismy k rozložení okolní matrix, migraci a formování nových cév (Murray and Lessey, 1999).

Embryo jako „cizorodý štěp“ v těle matky a buňky nádorové tkáně využívají obdobné obranné prostředky jako např. rezistence vůči imunitnímu systému. Jde o ztrátu antigenicity, nedostatečnou expresi HLA-I molekul, produkci imunosupresivních cytokinů, snížení exprese kostimulačních molekul v antigen prezentujících buňkách a indukci apoptózy u infiltrujících lymfocytů (Ridolfi et al., 2009).

Ačkoliv se embryonální vývoj a tumorigeneze v mnoha aspektech podobají, některé charakteristiky těchto procesů jsou odlišné. Dceřiné buňky odvozené z embryonálních kmenových buněk nakonec vytváří zralé, plně diferencované buňky a dávají vznik novému organismu. Dceřiné buňky odvozené od nádorových kmenových buněk vytváří neustále se dělící progenitorové buňky, které nedozrávají. Tumorigeneze je také často provázána instabilitou genomu, která přispívá k aktivaci onkogenů a inaktivaci tumorsupresorových genů (Ma et al., 2010).

2.2 MNOHOČETNÁ LÉKOVÁ REZISTENCE A METABOLIZMUS XENOBIOTIK

Nádorové, ale i jiné typy buněk (např. bakteriální), vykazují schopnost odolávat cytotoxickým vlivům určitých léčiv. Rezistence se může objevit již při prvním podání léčiva. V tomto případě se jedná o rezistenci primární (přírozenou). Pokud se rezistence vyvine až v průběhu léčby, jde o rezistenci sekundární (získanou). V případě mnohočetné lékové rezistence (MDR) jsou buňky rezistentní na širokou škálu léků odlišných strukturně i mechanismem účinku. MDR představuje závažnou komplikaci při léčbě nádorových onemocnění (Nosková et al., 2000; Baguley, 2010).

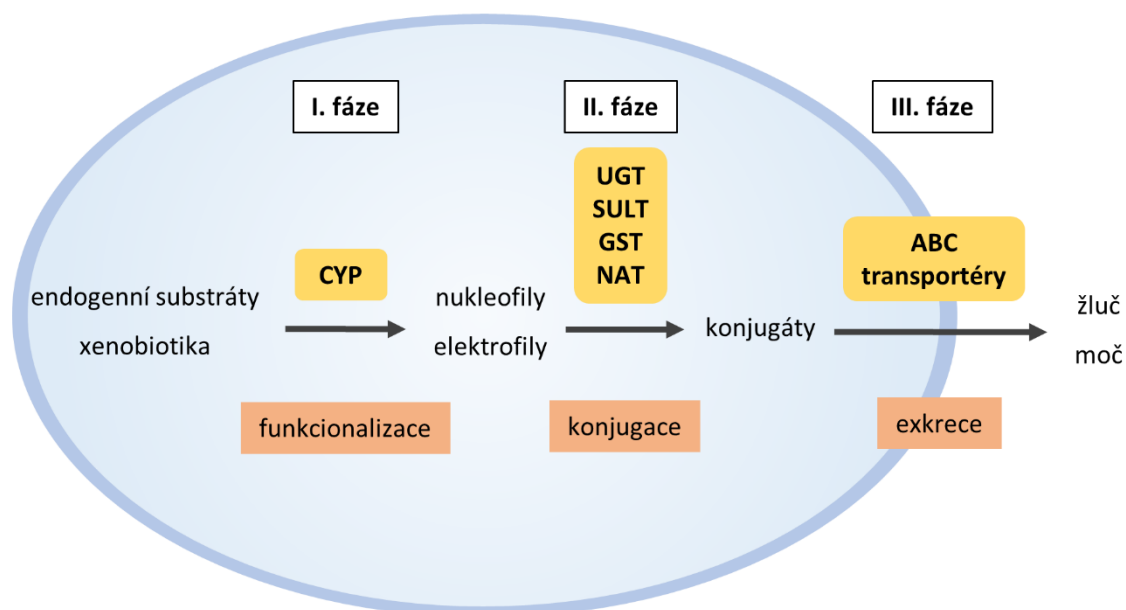
Existuje široké spektrum mechanismů MDR, které se pravděpodobně vyvinuly v normálních buňkách jako obranné mechanismy proti karcinogenům z prostředí. Různé mechanismy MDR shrnuje Tab. 1. (Baguley, 2010; Mellor and Callaghan, 2008; Gillet and Gottesman, 2010)

MECHANIZMUS MDR	POPIS
transport léčiv do buňky	snížená exprese transportérů přijímajících léky (redukované folátové přenašeče) a změny v lipidovém metabolismu mění biofyzikální vlastnosti lipidové dvojvrstvy a ovlivňují transport léčiva do buňky
aktivace detoxikačních enzymů	inaktivace léčiv enzymy I. a II. fáze metabolismu xenobiotik
zachycení léčiva	léčiva mohou být zachycena v buněčných organelách, jako jsou lysozomy a endozomy, a následně vyloučeny z buňky
vyhnutí se apoptóze	nastává nejčastěji přes mitochondriální dráhu; narušení rovnováhy mezi pro- a antiapoptotickými faktory vede k přežití nádorových buněk
zesílení oprav DNA	buňky s poškozenou DNA se vyhýbají senescenci, apoptóze a nekróze
zvýšená exprese membránových přenašečů	zvýšený eflux léčiv pomocí ABC transportérů
změny cílových molekul	metylace DNA, mutace topoizomerázy I a II
mikroprostředí	pH, hypoxie, přítomnost klidových buněk („quiescent cells“)
změny signálních drah	blok apoptózy a exprese genů účastnících se oprav DNA a efluxních pump

Tab. 1: **Souhrn mechanismů MDR.**

2.2.1 DETOXIKAČNÍ PROCES

Detoxikační mechanismy se v organismu účastní metabolismu řady endogenních a exogenních molekul. Detoxikace probíhá ve třech fázích: I. a II. fáze metabolismu xenobiotik (biotransformace) a vyloučení metabolitů z buňky (shrnuje Obr. 1). Většina xenobiotik jsou látky nepolární. Jejich metabolismus vede ke zvýšení polaritě těchto látek, a tím usnadnění jejich exkrece močí či stolicí z organismu.



Obr. 1: **Detoxikační proces.** Za I. fází biotransformace jsou zodpovědné hlavně cytochrom P450 (CYP). II. fázi biotransformace katalyzují různé konjugační enzymy jako glutathion-S-transferáza (GST), UDP-glukuronosyltransferáza (UGT), sulfotransferáza (SULT) a arylamin N-acetyltransferáza (NAT). Ve III. fázi je molekula vyloučena z buňky pomocí ABC transportérů (upraveno podle Barbier et al., 2004).

Reakce I. fáze metabolismu xenobiotik (biotransformace) jsou katalyzovány hlavně cytochromy P450 (CYP) a epoxid hydrolázami. V tomto kroku probíhají reakce oxidoredukční a hydrolytické. Ve většině případů vedou reakce I. fáze biotransformace k detoxikaci. V jiných případech mohou tyto reakce vést k metabolické aktivaci léčiv na jejich aktivní formu. Transformací na elektrofilní látky mohou ale také vznikat aktivní škodlivé molekuly (např. potenciální karcinogeny). Reverzibilní a ireverzibilní inhibice CYPs způsobuje nežádoucí interakce mezi léčivy či mezi léčivy a potravinou (Barbier et al, 2004; Brown et al., 2008).

Reakce II. fáze detoxikace je konjugace reaktivních produktů vzniklých během I. fáze s různými nabitými molekulami, jako je glutathion, glukuronová kyselina, sulfát či glycin. V této fázi biotransformace vznikají hydrofilní konjugáty. Tyto reakce katalyzují enzymy jako glutathion-S-transferázy (GST), sulfotransferázy (SULT), UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) a arylamin N-acetyltransferázy (NAT).

Během III. fáze dochází k vyloučení konjugované molekuly ven z buňky pomocí různých přenašečů. Nejvýznamnější skupinou přenašečů jsou ABC transportéry (ATP binding cassette transporters) (Barbier et al, 2004; Brown et al., 2008).

Biotransformační procesy neprobíhají u všech jedinců stejně. Metabolismus xenobiotik ovlivňuje řada faktorů, jako je věk, pohlaví a v neposlední řadě také polymorfismus v enzymech zodpovědných za biotransformaci (Dostálek, 2006).

2.2.2 ORGÁNY ZAHRNUTÉ V METABOLIZMU XENOBIOTIK

Xenobiotika v organismu podstupují čtyři základní procesy: absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci. Těchto procesů v těle se účastní řada orgánů.

Mezi hlavní orgány zahrnuté v absorpci, distribuci, metabolismu a eliminaci xenobiotik náleží tenké střevo, játra a ledviny. Tenké střevo slouží primárně pro absorpci živin a vody, ale dochází zde také ke vstřebávání xenobiotik. V epitelu tenkého střeva byla prokázána exprese řady enzymů fáze I a II biotransformace, spolu s asociovanými proteiny (Kaminsky et Zhang, 2003). Metabolická kapacita tenkého střeva je ale nižší než metabolická kapacita jater, která představují centrální orgán metabolismu xenobiotik. Hladké endoplazmatické retikulum hepatocytů obsahuje širokou škálu biotransformačních enzymů. Vzniklé metabolity poté přecházejí do žluče či krve. Významným eliminačním orgánem jsou ledviny, protože většina léčiv se vylučuje z organismu močí (Dostálek, 2006).

Kromě těchto orgánů se na metabolismu xenobiotik podílí také další orgány, jako plíce, kůže a placenta.

2.2.3 EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ STŘEV, JATER A LEDVIN

2.2.3.1 Střevo

Ontogeneze střeva probíhá ve třech po sobě jdoucích stádiích: nejprve dochází k buněčné proliferaci a morfogenezi, poté následuje buněčná diferenciace, při které vznikají jednotlivé buněčné typy charakteristické pro střevní epitel. Poslední fází je funkční dozrávání.

Ve 3. týdnu intrauterinního vývoje (IUV) dochází v důsledku růstu a vývoje mozkových váčků a somitů k ohýbání původně plochého zárodečného terčíku. Tím

dochází k postupnému vtahování stále větší části dutiny žloutkového váčku do těla zárodku. Vzniká tak základ pro budoucí trávicí trakt, primitivní střevo. Krátce po svém vzniku je primitivní střevo tvořeno jednou vrstvou cylindrického entodermu obklopeného mezodermem splachnopleury, ze kterého se diferencuje vazivo, svalovina a peritoneum. V hlavové části embrya se vytváří přední střevo, v kaudální části zadní střevo. Část mezi nimi se označuje jako střední střevo a přechodně zůstává ve spojení se žloutkovým váčkem prostřednictvím ductus omphaloentericus (Sadler, 2011).

Z distální části předního střeva se vyvíjí proximální část duodena a velké žlázy trávicího traktu – játra a pankreas. Ze středního střeva vzniká zbylá část duodena, jejunum, ileum, slepé střevo, processus vermiformis, colon ascendens a část colon transversum. Ze zadního střeva se vyvíjí zbylá část colon transversum, colon sigmoideum, rektum a horní část análního kanálu (Sadler, 2011).

Identita orgánu, který se z primitivního střeva vyvine, je dána již v době, kdy se embryo ohýbá v transverzální rovině a uzavírá se přední strana trupu. Specifikace je dána koncentračním gradientem kyseliny retinové, jejíž koncentrace se zvyšuje kaudálním směrem. Tento gradient řídí expresi specifických transkripčních faktorů v entodermu (Gilbert, 2010). Hranice jednotlivých orgánů stabilizuje epitelovo-mezenchymální interakce, která je nezbytná pro regulaci morfogeneze, proliferace a diferenciaci (Ménard et al., 2006). Jakmile jsou stanovené hranice jednotlivých orgánů, může začít jejich diferenciaci.

Střevní epitel se vyvíjí z jednovrstevného cylindrického entodermu. Začátkem 2. měsíce IUV epitel rychle prolifereje a vytváří se epitel vrstevnatý. Během 6. a 7. týdne IUV dochází k dočasnému uzavření lumina tenkého střeva.

Histogeneze sliznice střeva probíhá v kraniokaudálním směru. V 8. týdnu IUV se začínají v duodenu a proximálním jejunu formovat klky. Spolu s vývojem klků dochází k reorganizaci vrstevnatého epitelu na jednovrstevný cylindrický a iniciaci diferenciaci buněk na jednotlivé buněčné typy charakteristické pro střevní epitel. Lieberkühnovy krypty se formují později. Jejich vývoj začíná mezi 10. a 12. týdnem IUV. Klky se během prenatalního vývoje vytvářejí i v tlustém střevě. V 14. – 16. týdnu IUV je klky pokryta celá sliznice tlustého střeva. Po 30. týdnu IUV klky z tlustého střeva mizí. Mezi 18. a 20. týdnem IUV se v epitelu střeva objevuje apoptóza (Ménard et al., 2006; Carlson, 2013).

V kryptách se nachází kmenové buňky, které dávají vznik novým buňkám. Nově vzniklé buňky migrují směrem nahoru a diferencují v enterocyty a buňky sekreční (pohárkové a enteroendokrinní). Na vrcholu klku podléhají apoptóze a uvolňují se z epitelu. Epitel střeva se obnovuje po celý život (Sancho et al., 2004).

Organogeneze střeva je kompletní kolem 13. týdne IUV (Montgomery et al., 1999) a následně začíná jeho funkční maturace, i když trávení a resorpce živin začíná až po narození. Přibližně kolem 14. týdne vývoje začínají být aktivní enzymy kartáčového lemu. Nižší aktivita enzymů kartáčového lemu je přítomna i v tlustém střevě. Ta ale mizí spolu se zánikem klků (Ménard et al., 2006). Během 4. měsíce IUV se objevuje také peristaltika a plod začíná polykat amniovou tekutinu (Montgomery et al., 1999).

2.2.3.2 Játra

Játra jsou derivátem předního střeva. Základ jater, hepatické divertikulum, se objevuje na kaudální části předního střeva v polovině 3. týdne IUV. Buňky endodermu prolifерují a vrůstají do septum transversum, které odděluje dutinu perikardu a stopku žloutkového váčku. Spojení základu jater s duodenem se postupně zužuje a vzniká ductus choledochus. Na ventrální straně ductus choledochus se vytváří malá výchlípka, ze které vzniká žlučník a ductus cysticus (Sadler, 2011).

Během proliferace se epitelové buňky formují do trámců. Ty se dostávají do kontaktu s venae omphalomesentericae a venae umbilicales, které tvoří jaterní sinusoidy. Epitelové buňky se diferencují na hepatocyty a výstelku intrahepatálních žlučovodů.

Hlavní funkcí embryonálních jater je hematopoéza, která začíná v 6. týdnu IUV. Krvetvorné buňky a Kupferovy buňky vznikají z mezodermy septum transversum. Hematopoetické buňky se vyvíjí ve skupinkách mezi trámci jaterního parenchymu a stěnou cév. Hematopoéza v průběhu posledních dvou měsíců prenatalního vývoje ustává a při narození jsou v játrech přítomny jen malé krvetvorné ostrůvky.

Přibližně ve 12. týdnu IUV začínají hepatocyty tvořit žluč. Vývodné žlučové cesty jsou v tomto období již vyvinuté a žluč může odtékat do duodena. Obsah duodena tak získává zelenou barvu. Během prenatalního vývoje hepatocyty postupně získávají kapacitu pro biochemické funkce charakteristické pro diferencovanou jaterní tkáň (Carlson, 2013).

2.2.3.3 Ledviny

Během prenatalního vývoje se u člověka postupně tvoří v kраниokaudálním směru tři zčásti se překrývající systémy exkretčních orgánů: pronefros, mezonefros a metanefros.

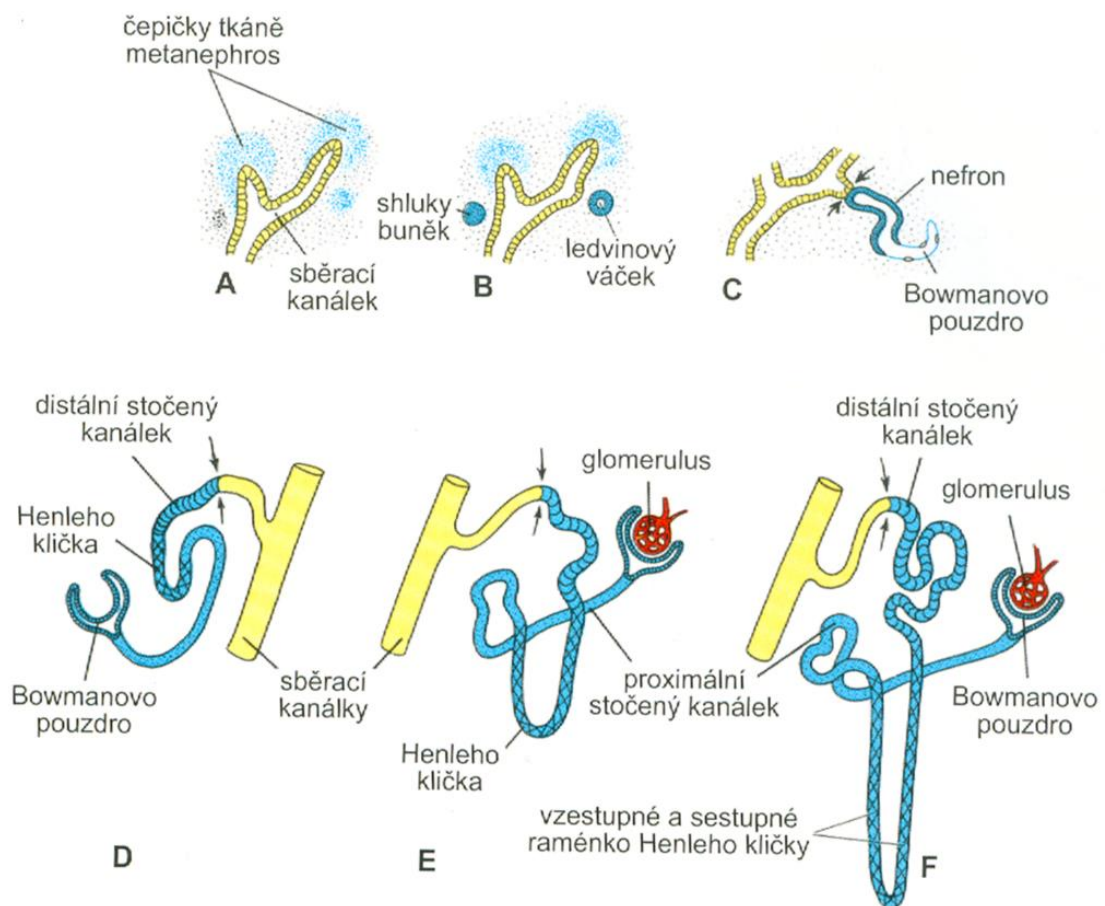
Základy pronephros (předledvina) vznikají na začátku 4. týdne IUV jako shluky buněk v cervikální oblasti, které formují kanálky pronephros v kраниokaudálním pořadí. U člověka se jedná o rudimentární vylučovací jednotky, které na konci 4. týdne IUV zanikají.

Během zániku pronephros se v průběhu 4. týdne IUV vyvíjejí v hrudní a horní bederní oblasti primitivní vylučovací kanálky mezonephros (prvoledvina) z mezonefrogenního blastému (který vzniká splynutím nefrotomů), které vyúsťují do ductus mezonephricus (ductus Wolffii) původně vytvořeného pro pronephros. Mezonephros jsou funkční jen v krátkém úseku časného fetálního období, většina kanálků zaniká (Sadler, 2011).

Metanefros (definitivní ledvina) se začíná vyvíjet v 5. týdnu IUV. Vylučovací jednotky metanefros se vyvíjejí z metanefrogenního blastému, tvořící buněčný pás mezodermu v rozsahu 3. – 5. lumbálního prvosegmentu. Vývoj vylučovacích jednotek ledvin znázorňuje Obr. 2. Sběrací kanálky definitivní ledviny se vyvíjejí z ureterového pupene, který je, kromě sběracího systému, základem pro močovod, renální pánvičku, renální kalichy. Ureterový pupen vzniká 28. den IUV jako výchlipka ductus mesonephricus, vrůstá do tkáně metanefros a postupně se větví. Metanefrogenní blastém vytváří v ledvině nefrogenní zónu. Je to vnější část kůry ledviny, kde vznikají nové nefrony. Buňky metanefrogenního blastému se na koncích větvení ureterového pupenu kondenzují a vytváří čepičky mezodermu. Z nich se postupně vyvíjí většina epitelu nefronů. Tyto buňky musí nejdříve projít mezenchymálně-epiteliální tranzicí. Spolu s aktivací epiteliálních genů dochází k morfologickým změnám. Čepičky metanefrogenního blastému tvoří nejdříve malé váčky, které postupně mění tvar na měsíčitý („comma-shaped bodies“). Z nich se postupně vytváří kanálky ve tvaru S („S-shaped bodies“). Z proximální části kanálku se vytváří Bowmanovo pouzdro, ze střední části kanálku vznikají proximální tubuly a z distální části se vytváří distální tubuly, které se napojují na sběrací kanálky. Proti Bowmanovu pouzdru roste klubičko kapilár, které je nakonec do pouzdra zavzato a vytváří glomerulus. Poté vylučovací kanálek roste do délky a diferencuje se na proximální stočený kanálek, Henleovu kličku a distální stočený kanálek (Faa et al., 2012).

Nefrony se formují během prenatalního vývoje až do 36. týdne IUV. Diferencující nefrony se posunují do hlubších vrstev kůry (Faa et al., 2012). Počet nefronů kolísá od 300 000 do 1 800 000 v každé ledvině v závislosti na genetických předpokladech a také faktorech okolního prostředí, které nastanou během těhotenství (Georgas et al., 2009).

Ledviny začínají pracovat mezi 9. a 12. týdnem IUV. V prenatalním období neslouží jako hlavní vylučovací orgán zplodin metabolismu, protože tuto funkci plní placenta. Fetální moč je hypotonická, jelikož resorpční mechanismy koncentrování moči v renálních tubulech nejsou ještě funkčně zcela diferencované. Vzniklá moč je odváděna do amniové dutiny, kde se mísí s amniovou tekutinou (Sadler, 2011; Carlson, 2013).



Obr. 2: Vývoj vylučovacích jednotek ledvin (převzato z Sadler, 2011).

2.3 ENZYMY I. FÁZE BIOTRANSFORMACE

Za reakce I. fáze metabolismu xenobiotik jsou zodpovědné hlavně cytochromy P450 a epoxid hydrolázy.

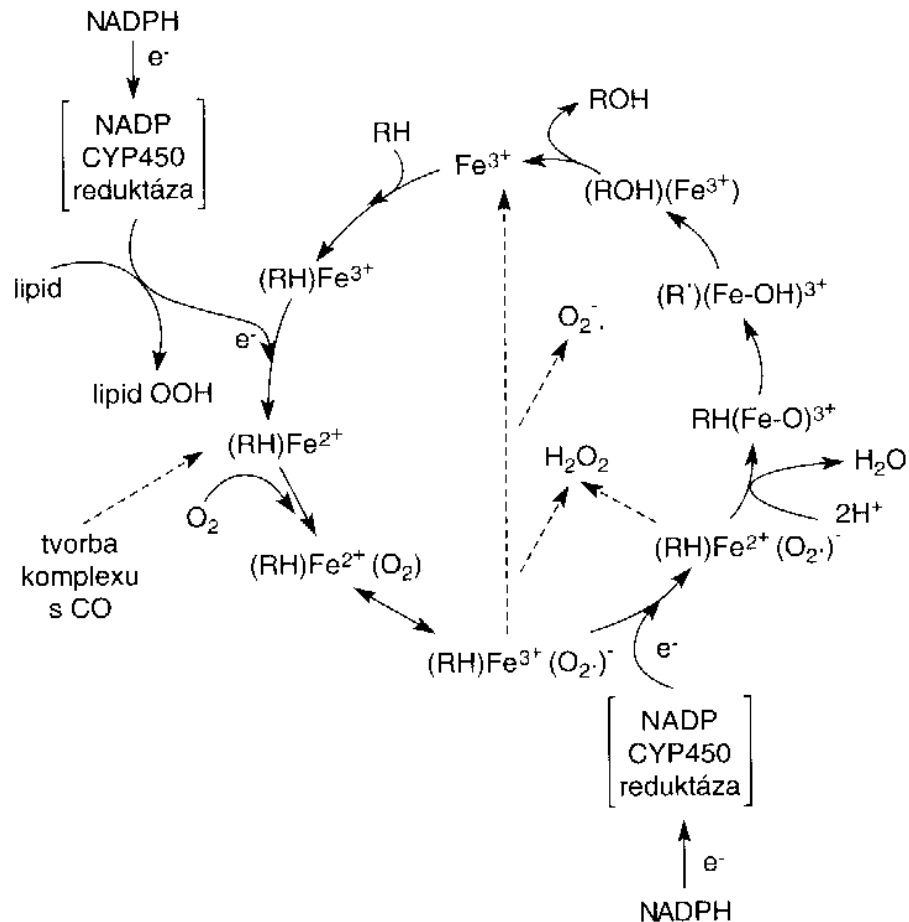
2.3.1 CYTOCHROMY P450

Cytochromy P450 (CYPs) jsou enzymy přítomné u živočichů, rostlin i bakterií. Mnoho genů pro CYPs jsou vysoce konzervované napříč různými druhy (Stoilov, 2001). Cytochromy P450 získaly svůj název na základě silné absorpce redukované díky formy enzymu v komplexu s CO při 450 nm (Dostálek, 2006). V lidském organismu zahrnuje nadrodina cytochromů P450 57 enzymů, které se dělí do 18 rodin a 44 podrodin na základě podobnosti v primární struktuře. V lidském genomu se nachází také 58 pseudogenů (Nelson, 2009).

CYPs jsou globulární hemoproteiny. Společnou vlastností všech cytochromů P450 je přítomnost hemu, jehož pátým ligandem je thiolátový (merkaptidový) aniont pocházející z cysteinu. Šestým ligandem hemu se v průběhu reakce stává molekula kyslíku (Dostálek, 2006). CYPs jsou v eukaryotních buňkách lokalizovány v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Mitochondriální CYPs se účastní převážně metabolismu endogenních substrátů, zatímco CYPs endoplazmatického retikula (mikrozomální) metabolizují endogenní i exogenní substráty. Tyto enzymy fungují primárně jako monooxygenázy. CYPs vnáší jeden atom z molekuly kyslíku do substrátu a druhý do vody. Tyto reakce obvykle vedou ke změně hydrofobních molekul na polární látky, což zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě. Reakce vyžaduje zdroj elektronů. Jako zdroj elektronů se v endoplazmatickém retikulu uplatňuje NADPH cytochrom P450 reduktáza, v mitochondriích ferredoxin (Brown et al, 2008; Gillet and Gottesman, 2010). Reakční cyklus cytochromů P450 ukazuje Obr. 3.

Přítomnost aktivních CYPs v nádorových tkáních může mít negativní dopad na účinnost chemoterapie, protože deaktivují protinádorová léčiva. Cytochromy P450 zodpovědné za metabolismus léčiv jsou rodiny CYP1, CYP2 a CYP3. Nejdůležitější skupinou enzymů je podrodina CYP3A, hlavně enzym CYP3A4 (Brown et al. 2008). Rozdílná exprese CYPs v nádorové a okolní zdravé tkáni může být potenciálně využita pro specifickou nádorovou terapii. Těchto poznatků lze využít při vývoji proléčiv („prodrugs“), které jsou netoxické pro normální zdravé buňky. V nádorové tkáni se

aktivují na cytotoxické formy specifickými CYPs exprimovanými nádorovými buňkami. Preferenční exprese některých CYPs v nádorech by mohla také sloužit jako cíl pro nádorovou imuoterapii (McFadyen et al., 2004)



Obr. 3: Schéma reakce katalyzované cytochromem P450. Substrát (RH) se váže na oxidovanou formu cytochromu. Vazba substrátu vede ke konformační změně, která usnadní transport elektronu z NADPH pomocí NADPH cytochrom P450-reduktázy a redukcí Fe³⁺ na Fe²⁺. Na volné koordinační místo hemového železa se váže kyslík. Následuje příjem dalšího elektronu od NADPH cytochrom P450-reduktázy. Komplex reaguje se dvěma protony za vzniku vody. Kyslík vázaný na železo se naváže na substrát, čímž vzniká produkt reakce. Následuje uvolnění produktu a enzym se vrací do původního stavu (převzato z Dostálek, 2006).

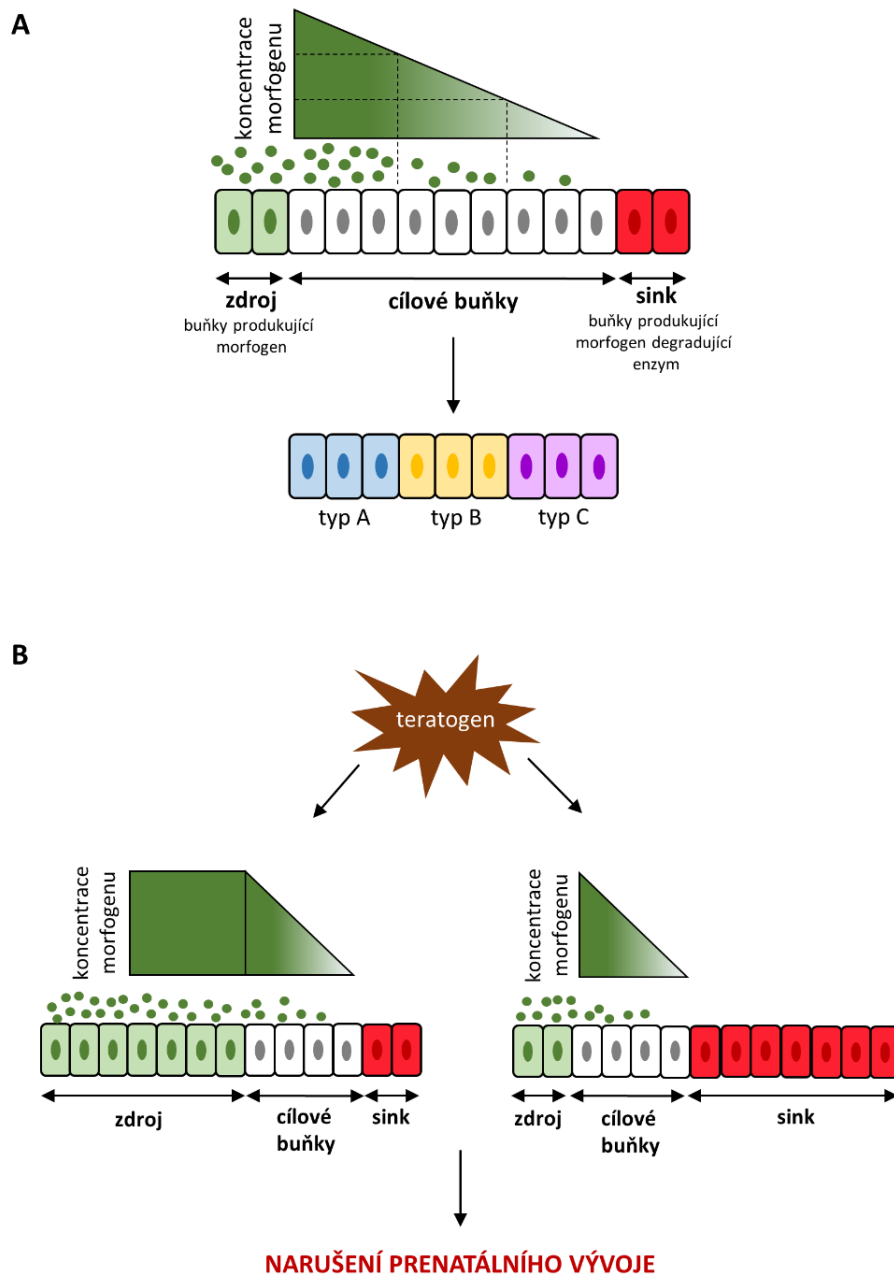
2.3.2 ROLE CYTOCHROMŮ P450 V PRENATÁLNÍM VÝVOJI

Ačkoliv jsou cytochromy P450 jsou známé převážně jako metabolizátory léčiv, jejich význam je rovněž spojován s řadou významných endogenních funkcí. Tyto enzymy se u různých organismů vyskytovaly miliony let před průmyslově vyráběnými léčivy a znečištěním prostředí (Stoilov, 2001).

Některé cytochromy P450 mohou také hrát roli v prenatálním vývoji tím, že se účastní regulace základních vývojových procesů, jako je vytváření vzorů („pattern formation“), morfogeneze, buněčné diferenciaci a růstu. Důležitost CYPs v prenatálním vývoji podporuje také fakt, že homozygotní delece NADPH-cytochrom P450 reduktázy, primárního zdroje elektronů pro CYPs, je během organogeneze letální (Shen et al., 2002). Cytochromy P450 metabolizují řadu molekul, které mohou mít podle teorie poziční informace funkci morfogenu (Stoilov, 2001).

Teorii poziční informace představil v roce 1969 Lewis Wolpert jako univerzální mechanismus pro převedení genetické informace do prostorového uspořádání buněčné diferenciaci (viz. Obr. 4A). Podle této teorie se v embryu ustavuje gradient morfogenu synchronizovanou činností buněk, které morfogen produkují (zdroj) a buněk, které morfogen degradují (sink). Buňky v určité oblasti reagují na rozdílné koncentrace morfogenů spuštěním specifických vývojových programů (Wolpert, 1969). Morfogeny jsou malé, spíše hydrofobní signální molekuly, které jsou schopné se z místa vzniku šířit difuzí.

Známým morfogenem je kyselina retinová. Na udržování gradientu kyseliny retinové podél anterior-posteriorní osy embrya se podílí CYP26. Na metabolismu kyseliny retinové se účastní také CYP1B1, který je nezbytný pro správný vývoj lidského oka. V takovém případě je nezbytná přísná časoprostorová kontrola exprese těchto CYPs. Pokud by došlo během vývoje k narušení tohoto rozložení, mohlo by to mít pro vyvíjející se organismus fatální následky (viz. Obr. 4B) (Stoilov, 2001).



Obr. 4: **Vliv gradientu morfogenů na diferenciaci buněk.** A) Činností buněk, které produkují morfogen a buněk, které produkují morfogen degradující enzymy (včetně CYP) vzniká gradient morfogenu. Na ten reagují cílové buňky diferenciací v různé buněčné typy. B) Xenobiotika mohou narušit expresi enzymů, které udržují gradient morfogenu, což může mít za následek narušení vývoje (upraveno podle Stoilov, 2001).

2.3.3 CYTOCHROM P450 EPOXYGENÁZY A SOLUBILNÍ EPOXID HYDROLÁZA

Enzymy, které náleží k podrodinám CYP2C a CYP2J se označují jako CYP epoxygenázy. U člověka tvoří podrodinu CYP2C čtyři vysoce homologní enzymy: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Geny pro tyto enzymy jsou lokalizované v asi 500-kb velkém klastru na velkém raménku chromozomu 10 v lokusu 10q24. Podrodina CYP2C představuje asi 18 % celkového množství CYPs v lidských játrech (Koukouritaki et al., 2004). Enzymy podrodiny CYP2C jsou vysoce polymorfní. CYP2J2 představuje jediného člena CYP2J u člověka. Gen pro CYP2J2 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 v lokusu 1p32.1. CYP2J2 tvoří 1 – 2 % celkového obsahu CYPs v játrech. Jeho exprese je ale vysoká v extrahepatálních tkáních (Lee et al., 2010; Nelson, 2009; Narjoz et al., 2014).

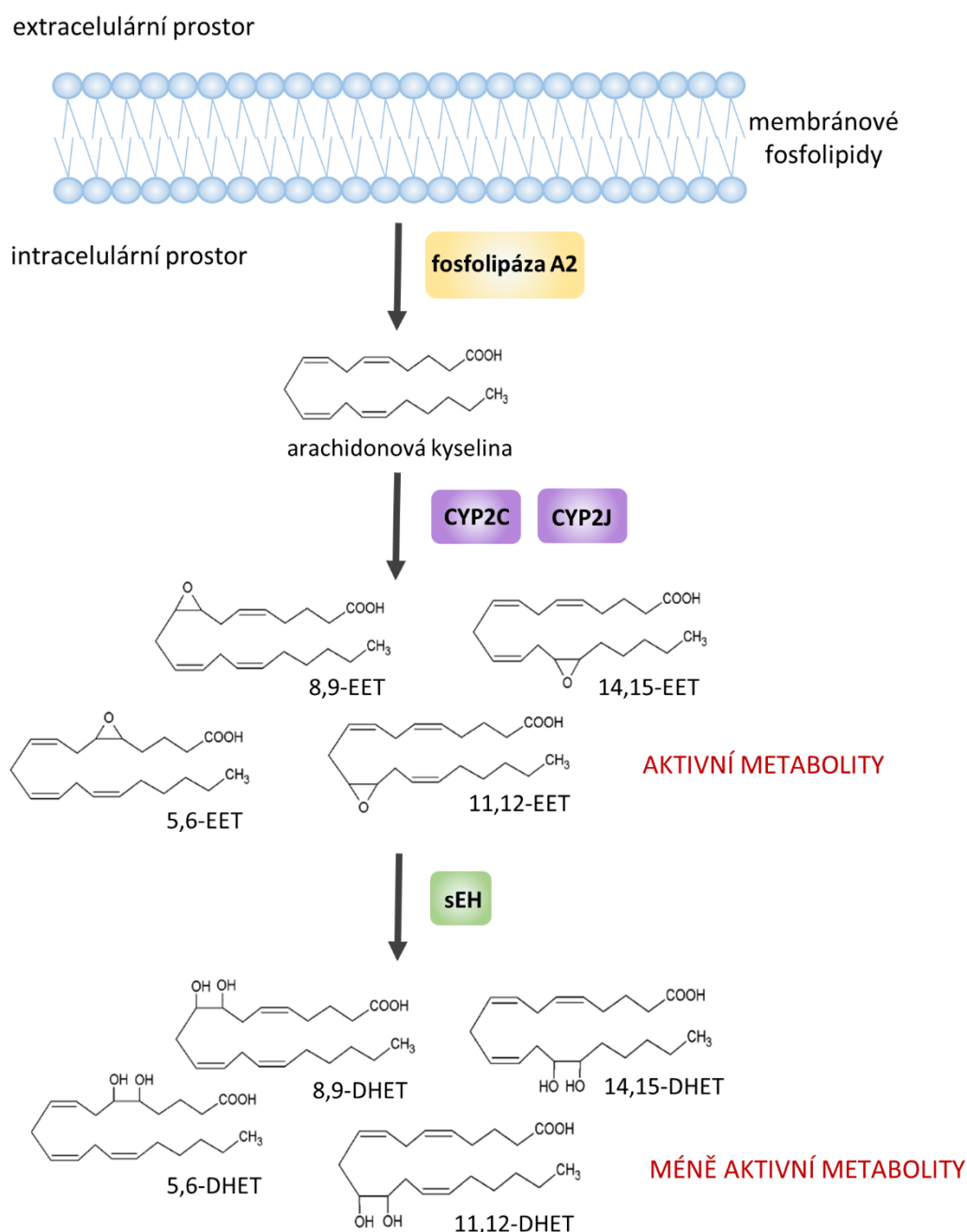
Podrodina CYP2C hraje nezanedbatelnou úlohu v metabolismu léčiv. Tyto enzymy metabolizují přibližně 20 % klinicky užívaných léčiv (Koukouritaki et al., 2004). Z protinádorových léčiv patří mezi substráty CYP2C paklitaxel, bexaroten, cyklofosfamid, ifosfamid, imatinib mesylát, idarubicin, tamoxifen a tretionin (Scripture et al., 2005). CYP2J2 se také podílí na metabolismu xenobiotik. Mezi jeho substráty patří inhibitory tyrozin kináz, jako je dasatinib, imatinib, nilotinib apod. (Lee et al., 2010; Narjoz et al., 2014).

Solubilní epoxid hydroláza (sEH) se také účastní I. fáze metabolismu xenobiotik. Lidská sEH je kódovaná genem EPHX2, který je lokalizován na chromozomu 8 v lokusu 8p21-p12. Jde o bifunkční enzym. Jeho N-koncová doména má fosfatázovou aktivitu, zatímco C-koncová doména má epoxid hydrolázovou aktivitu, která katalyzuje hydrolýzu řady endogenních a exogenních epoxidů na příslušné dioly přidáním vody. Produkty reakce mohou být poté konjugovány v II. fázi biotransformace. Stejně jako CYP epoxygenázy, i sEH je polymorfní (Spector et al., 2004; Harris et Hammock, 2013).

2.3.3.1 Endogenní funkce CYP epoxygenáz a sEH

Neméně důležitá je endogenní funkce CYP epoxygenáz. Tyto enzymy přeměňují arachidonovou kyselinu na čtyři regioizomery epoxyeikosatrienových kyselin (EETs), konkrétně 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET. Každá CYP epoxygenáza produkuje všechny regioizomery, ale jeden nebo dva obvykle převládají. EETs jsou vysoce aktivní molekuly, které se účastní řady biologických procesů. EETs mají

protizánětlivé účinky, regulují tonus v cévách srdce a ledvin a účastní se angiogeneze. Ovlivňují také proliferaci, apoptózu a regeneraci tkání. sEH metabolizuje EETs tvořené CYP epoxygenázami na dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs), které jsou méně aktivní než EETs. Metabolismu arachidonové kyseliny na EETs a DHETs znázorňuje Obr. 5. (Spector et al., 2004; Shen et al., 2008; Panigrahy et al., 2010; Panigrahy et al., 2013).



Obr. 5: **Konverze kyseliny arachidonové na EETs a DHETs.** Fosfolipáza A2 uvolňuje arachidonovou kyselinu z vazby na membránové fosfolipidy. CYP epoxygenázy metabolizují arachidonovou kyselinu na EETs a ty dále sEH na DHETs.

Část EETs je také inkorporována do membránových fosfolipidů, nebo vstupuje do dalších metabolických drah, jako je částečná β -oxidace, prodlužování řetězce, oxidace cyklooxygenázami, lipoxygenázami a CYP ω -oxidačními enzymy a konjugace s glutationem. Kromě CYP epoxygenáz se na tvorbě EETs podílí také CYP4X1 a CYP11. Jejich vliv je ale minoritní (Spector et al., 2004; Panigrahy et al., 2010).

2.3.4 EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH V NORMÁLNÍ A NÁDOROVÉ TKÁNI

Množství cytochromů P450 v jednotlivých tkáních není absolutní, jejich obsah závisí na genetickém polymorfizmu, vlivu látek z vnějšího prostředí, výživě, užívaných lécích, věku, pohlaví, apod. (Dostálek., 2006).

Expresi CYP epoxygenáz a sEH byla detekována v řadě lidských normálních i nádorových tkáních. Enayetallah et al., (2004) detekovali CYP epoxygenázy CYP2C8, 2C9 a 2J2 a sEH v různých tkáních pomocí imunohistochemie. Bièche et al., (2007) studovali expresi různých CYPs na úrovni mRNA v řadě tkání. Läpple et al., (2003) studovali expresi CYP2C na úrovni mRNA a proteinů v tenkém střevě a játrech. Expresi CYP epoxygenáz a sEH na úrovni mRNA a proteinů shrnuje Tab. 2. Zatímco enzymy podrodiny CYP2C jsou exprimovány převážně v játrech, CYP2J2 je detekován hlavně v ostatních tkáních (Bièche et al., 2007). Expresi různých CYP mRNA v plicní tkáni studovali Leclerc et al. (2010) Prokázali expresi CYP2C8, 2C9, 2C18 a 2C19 v bronchiální sliznici a parenchymových buňkách.

CYP2C se exprimuje také v nádorové tkáni. CYP2C9 byl detekován v cholangiokarcinomu, adenokarcinomu žaludku a plic, karcinomu prsu, dlaždicobuněčném karcinomu ústní dutiny, jazyka, hltanu a hrtanu a bazocelulárním karcinomu kůže. V těchto tkáních nebyla ale prokázána exprese CYP2C8. V adenokarcinomu prostaty a karcinomu endometria byla prokázána exprese CYP2C9 i 2C8 (Enayetallah et al., 2006). CYP2C8 se exprimuje také ve většině nádorů vaječníků bez ohledu na jejich histologický typ a stupeň diferenciaci (DeLoia et al., 2008). Snížená exprese CYP2C mRNA v porovnání se zdravou tkání byla detekována v dlaždicobuněčném karcinomu plic (Leclerc et al., 2010).

TKÁŇ	PROTEIN	mRNA
Trávicí systém		
slinné žlázy	CYP2C8, 2C9, sEH	CYP2C8, 2C18, 2C19, 2J2
žaludek	CYP2C9, sEH	
játra	CYP2C9, 2C19, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
slinivka břišní	CYP2C9, 2J2, sEH	
tenké střevo	CYP2C8, 2C9, 2C19, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
tlusté střevo	CYP2C8, 2C9, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Vylučovací systém		
močový měchýř		CYP2C8, 2C18, 2J2
ledviny	CYP2C8, 2C9, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Endokrinní systém		
nadledviny	CYP2C8, 2C9, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
hypofýza	CYP2C9, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2J2
Kardiovaskulární systém		
myokard	CYP2C9, 2J2, sEH	CYP2C8, 2J2
Lymfatický systém		
mandle	CYP2C8, 2C9, sEH	
slezina	CYP2C9, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
lymfatické uzliny	CYP2C9, sEH	
thymus		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Dýchací systém		
trachea		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
plíce	CYP2C9, 2J2, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Kůže		
epidermis	CYP2C9, sEH	
mléčná žláza		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Reprodukční systém		
endometrium	CYP2C9, sEH	
vaječníky		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
děloha		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
placenta		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
prostata	CYP2C9, sEH	CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
varlata		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2
Muskuloskeletální systém		
kostní dřeň		CYP2C8, 2C18, 2J2
kosterní sval		CYP2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2J2

Tab. 2: Expresse CYP epoxygenáz a sEH v různých tkáních.

Jiang et al. (2005) při porovnání nádorové a okolní nenádorové tkáně prokázali zvýšenou expresi CYP2J2 v nádorech jícnu, plic, prsu, žaludku, jater, tlustého střeva a ledvin. Zvýšenou expresi CYP2J2 v karcinomu ledvin oproti okolní nenádorové tkáni prokázali také Narjoz et al. (2014). Exprese CYP2J2 v hepatocelulárním karcinomu byla v porovnání s okolní nenádorovou tkání naopak snižena. Enayetallah et al. (2006) také prokázali nižší hladinu exprese CYP2J2 v karcinomu jater. Na rozdíl od výše zmíněných prací ale stanovili sníženou expresi CYP2J2 u karcinomu ledvin v porovnání s okolní nenádorovou tkání. Navíc nedetekovali protein CYP2J2 v adenokarcinomu prostaty a pankreatu. V případě dlaždicobuněčného karcinomu plic a adenokarcinomu plic byla exprese CYP2J2 detekována jen v některých případech (Enayetallah et al., 2006). Leclerc et al. (2010) prokázali zvýšenou expresi CYP2J2 v plicním adenokarcinomu, ale v případě dlaždicobuněčného karcinomu plic byla detekována nižší hladina CYP2J2 mRNA. Zvýšená exprese CYP2J2 byla prokázána také u nádorů vaječníků (Freedman et al. 2007). Selektivní exprese CYP2J2 byla zjištěna také u hematologických maligních onemocnění (Chen et al., 2011). Exprese CYP2J2 byla také prokázána v nádorových buněčných liniích, zatímco nenádorové buněčné linie byly negativní (Jiang et al. 2005).

Exprese sEH byla detekována v cholangiokarcinomu, adenokarcinomu žaludku, plic a prostaty, karcinomu prsu, dlaždicobuněčném karcinomu ústní dutiny, jazyka, hltanu a hrtanu a bazocelulárním karcinomu kůže. Exprese sEH byla doprovázena expresí alespoň jedné z CYP epoxygenáz. U karcinomu endometria nebyla exprese sEH prokázána (Enayetallah et al., 2006).

2.3.4.1 Účinek CYP epoxygenáz EETs na nádorovou tkáň

Změny v tvorbě EET sehrávají důležitou roli v rámci vývoje nádorové tkáně. CYP epoxygenázy a jejich metabolity se účastní angiogeneze, která je pro růst, přežití a metastatický potenciál nádorů nezbytná. Proces, jakým se EETs účastní angiogeneze není zcela objasněn. V endoteliálních buňkách se EETs účastní několika signálních drah, včetně PI3K/Akt, ERK1/2 a Src/STAT-3. 11,12-EET aktivuje sfingosin kinázu 1 a tím aktivují Akt kinázu a transaktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) (Yan et al., 2008). 11,12-EET, stejně jako zvýšená exprese CYP2C9 vede ke zvýšení exprese EphB4, což je důležitý faktor ovlivňující vývoj cév během embryogeneze (Webler et al., 2008a). 14,15-EET indukuje expresi VEGF a angiogenezi

zprostředkovanou přes Src-STAT-3 (Cheranov et al., 2008). VEGF také stimuluje fosforylaci AMP-aktivované proteinkinázy, což vede k indukci exprese CYP2C (Webler et al, 2008b). Dalším faktorem, který indukuje expresi CYP2C8 a 2C9, je hypoxie.

CYP2J2 zvyšuje metastatický potenciál upregulací matrixové metaloproteinázy 9 (MMP9) (Jiang et al., 2007). Navíc EETs podporují růst nádoru zvýšením proliferační aktivity přes PI3K a MAPK signální dráhu a také transaktivací EGFR. Navíc inhibují apoptózu nádorových buněk (Shen et al., 2008). Zvýšená exprese CYP2C8, 2C9 a 2J2 a zároveň snížená exprese sEH u karcinomu prsu zvyšuje hladinu regioizomeru 14,15-EET. Toto zvýšení je spojené s vyšší agresivitou nádoru (Wei et al., 2014).

Dalším způsobem, jakým CYP epoxygenázy a jejich metabolity ovlivňují nádorovou tkáň, je modulace imunitní odpovědi. Vysoký stupeň imunosuprese v buňkách u lidské akutní monocytické leukemie může souviset s vysokou expresí CYP2J2 (Bystrom et al., 2011).

2.3.5 EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE U ČLOVĚKA

Expresí CYP epoxygenáz během prenatální vývoje u člověka se zabývá několik studií. V nejstarší práci Treluyer et al. (1997) studovali enzymy podrodiny CYP2C na úrovni mRNA a proteinů ve fetálních játrech v období mezi 16. a 40. týdnem IUV. V této studii byly prokázány CYP2C8, 2C9 a 2C18 mRNA a to v množství, které odpovídá asi 10 % obsahu těchto mRNA detekovaném v dospělé tkáni. Proteiny a proteinová aktivita detekované nebyly, což naznačuje možnou posttranslační modifikaci.

V novější studii byla prokázána exprese proteinu CYP2C9 a 2C19 ve fetálních játrech v období mezi 8. až 24. týdnem IUV. Množství detekovaného proteinu odpovídalo 1 - 2 % detekovaného u dospělých jedinců. Exprese CYP2C9 narůstá s věkem plodu, v průběhu 3. trimestru dosahuje asi 30 % v porovnání s dospělými. Protein CYP2C19 byl rovněž prokázán. Na rozdíl od jater dospělých jedinců byla exprese proteinu CYP2C19 ve fetálních játrech vyšší než exprese CYP2C9 (Koukouritaki et al., 2004). Expresi CYP2C8, 2C9, 2C18 a 2C19 mRNA ve fetálních játrech potvrdil také Bièche et al. (2007).

V játrech a dalších orgánech lidských zárodků byla prokázána také exprese CYP2J2 mRNA (Bièche et al., 2007; Gaedigk et al., 2006). CYP2J2 mRNA je detekovatelná již v 11. týdnu IUV. Nejvyšší exprese CYP2J2 během prenatálního vývoje je v játrech a srdci, a to ve srovnatelném množství. Nižší množství transkriptů CYP2J2 bylo také prokázáno ve střevech, plicích, ledvinách, nadledvinách, varlatech a mozku. Na hladině mRNA byla pozorována pouze nízká interindividuální variabilita, zatímco na proteinové úrovni je interindividuální variabilita více patrná (Gaedigk et al., 2006). Velké množství CYP2J2 mRNA je přítomné také v placentě (Bièche et al., 2007).

Informací o expresi sEH v průběhu lidského prenatálního vývoje je k dispozici jen málo. Pacifici et al. (1988) ve své práci prokázal aktivitu sEH ve fetálních játrech, nadledvinách, ledvinách, plicích a střevech. Aktivita sEH byla také prokázána v placentě (Wixtrom et al., 1988).

2.3.5.1 Potenciální účinek EETs v prenatálním vývoji

EETs se účastní procesů, které jsou relevantní pro vývoj organismu, jako je regulace a uvolňování intracelulárních signálních molekul, proteinkinázové aktivity, buněčná diferenciaci a mitogeneze. Celkově je účinek EETs cytoprotektivní. EETs jsou malé, vysoce aktivní molekuly, které by mohly být morfogenem podle teorie poziční informace (Stoilov, 2001).

EETs vznikají z kyseliny arachidonové (AA). AA je polynenasycená ω -6 mastná kyselina. Organismus savců si není schopný syntetizovat ω -3 a ω -6 mastné kyseliny *de novo*. Proto všechny tyto kyseliny v plodu musí být převzaté z organismu matky přenosem přes placentu. AA je odvozená z kyseliny linolové, což je esenciální mastná kyselina tvořící se v rostlinách a přijímaná potravou. Koncentrace AA v plazmě plodu je vyšší než v plazmě matky, což poukazuje na významnou roli této mastné kyseliny pro vyvíjející se organismus. Transport mastných kyselin přes placentu je umožněn na membránu vázanými a cytosolickými proteiny vázajícími mastné kyseliny (FABPs). Tyto přenašeče upřednostňují ω -6 mastné kyseliny nad neesenciálními mastnými kyselinami a AA před jejím prekurzorem - linolovou kyselinou (Haggarty, 2002; Innis, 2005).

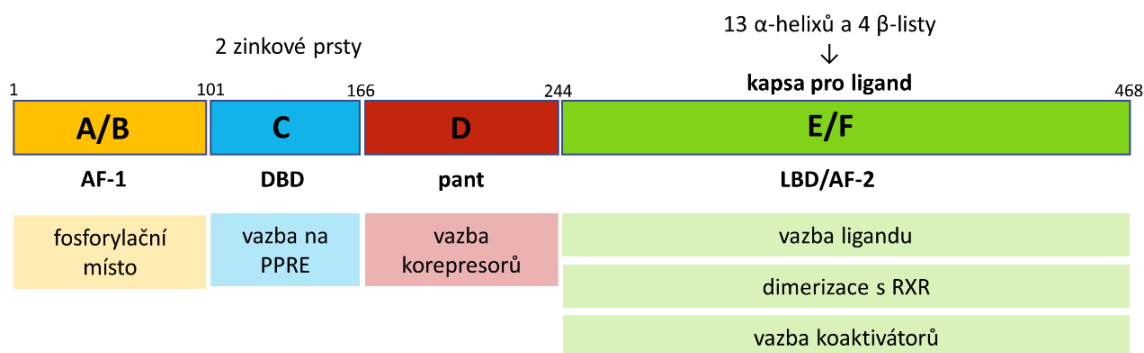
2.3 RECEPTORY AKTIVOVANÉ PROLIFERÁTORŮ PEROXIZÓMŮ (PPARs)

2.3.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA, FUNKCE A STRUKTURA

Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPARs) jsou transkripční faktory závislé na ligandech. Mezi jejich ligandy patří řada endogenních a exogenních látek, jako jsou např. nasycené a nenasycené mastné kyseliny, eikosanoidy, hypolipidemika, ftaláty, nesteroidní antiflogistika a další (Vanden Heuvel et Peters, 2010).

Rodina jaderných receptorů PPARs se skládá ze tří členů: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) a PPAR γ (NR1C3), které jsou kódovány různými geny. Každý z těchto receptorů má odlišné ligandy, cílové geny a biologické funkce. Jejich exprese je v různých tkáních variabilní. PPAR α se exprimuje hlavně v buňkách s vysokou oxidací mastných kyselin, jako jsou hepatocyty, kardiomyocyty, enterocyty a buňky proximálních tubulů ledvin. Exprese PPAR β/δ je ubikvitiní a její hladina je často vyšší než hladina exprese PPAR α a PPAR γ . PPAR γ se exprimuje hlavně v tukové tkáni a také v buňkách imunitního systému. PPARs jsou důležité pro energetickou homeostázu, vývoj, diferenciaci, apoptózu, neoplastickou transformaci, zánětlivou odpověď a regeneraci tkání. Hrají také důležitou roli v chronických onemocněních jako je diabetes mellitus, obezita a atheroskleróza (Kota et al., 2005; Chen et al., 2006; Vanden Heuvel et Peters; 2010).

PPARs se skládají ze čtyř funkčních domén. Strukturu receptoru PPAR α znázorňuje Obr. 6. N-terminální doména A/B je nejméně konzervovaná a obsahuje aktivační funkci 1 (AF-1). Jde o sekvenci zodpovědnou za aktivaci receptoru nezávisle na ligandu (např. fosforylací od MAPK). C doména je nejvíce konzervovaná. Je to doména vazající DNA (DBD), která obsahuje 2 motivy zinkových prstů, které zajišťují vazbu receptoru na DNA. D doména zajišťuje flexibilní spojení mezi DBD a LBD. E/F doména je doména vazající ligand (LBD) zodpovědná za ligandovou specifitu. 13 α helixů a 4 β listy vytváří kapsu pro vazbu ligandu. Také se zde nachází aktivační funkce 2 (AF-2), která je na ligandu závislá (Aranda et Pascual, 2001; Pyper et al., 2010; Vandern Heuvel et Peters, 2010).



Obr. 6: **Struktura jaderného receptoru PPAR α** (upraveno podle Pyper et al., 2010; Vandern Heuvel et Peters, 2010).

2.3.2 MECHANIZMUS ÚČINKU PPARs

Po vazbě ligandu dojde v PPARs ke konformačním změně, která vede k uvolnění histondeacetylázy (HDAC) a korepresorů. To umožňuje heterodimerizaci PPARs s retinoidním X receptorem (RXR). Na heterodimer se váže RNA polymeráza II a koaktivátory s histonacetyltransferázovou (HAT) aktivitou. Mezi koaktivátory PPARs patří PPAR vázající protein (PBP), SRC-1, p300, CBP, PGC-1 α . Celý komplex se váže na promotor cílových genů na sekvenci PPRE (responzivní element proliferátorů peroxizomů). Poté dochází k remodelaci chromatinu a zvýšení transkripce cílových genů. PPARs mohou také snižovat genovou expresi interferencí s dalšími proteiny a transkripčními faktory mechanismem transreprese. Expresi cílových genů inhibují korepresory jako SMRT a N-CoR. PPAR α a v menší míře PPAR β/δ jsou asociované s komplexy heat shock proteinů (Kota et al., 2005; Vandern Heuvel et Peters, 2010; Peters et al., 2012).

Stejně jako další jaderné receptory jsou PPARs fosfoproteiny. Z tohoto důvodu může být jejich transkripční aktivita ovlivněna fosforylací a defosforylací. Vliv fosforylace závisí na buněčném kontextu, izoformě receptoru a metabolizované látce. Například MAPK dráha v hepatocytech aktivuje PPAR α , ovšem v adipocytech naopak inhibuje aktivitu PPAR γ (Burns et Vandern Heuvel, 2007).

2.3.3 EXPRESE PPARs V PRENATÁLNÍM VÝVOJI

PPARs hrají důležitou roli ve vývoji pohlavních buněk a embryí. Všechny tři izoformy PPARs jsou exprimované v zárodečných buňkách vaječníků a varlat (Rees et al., 2008). PPAR β/δ a PPAR γ jsou také nezbytné pro správnou implantaci embrya do děložní sliznice (Nadra et al., 2006). Homozygotní delece PPAR γ způsobí smrt u myších embryí 10. den prenatálního vývoje. Dochází u nich k abnormálnímu vývoji fetálních i mateřských cév v placentě, závažnému ztenčení myokardu a celkové růstové retardaci (Barak et al., 1999; Kubota et al., 1999). Homozygotní delece PPAR β/δ je u většiny myších embryí také letální v 10. dni vývoje z důvodu selhání placenty. PPAR β/δ řídí diferenciaci buněk trofoblastu. PPAR γ a PPAR β/δ jsou také nezbytné pro akumulaci lipidových kapének v placentě (Barak et al., 1999; Nadra et al., 2006).

Pokusy na hlodavcích ukázaly, že PPAR α participuje při vývoji kůže (Michalik et Wahli, 2007). PPAR β/δ je dávana do souvislosti s vývojem kůže a vlasových folikulů, svalů a nervového systému (Michalik et Wahli, 2007; Hall et al., 2008; Rees et al., 2008). Vývoj nervového systému a svalů ovlivňuje také PPAR γ . PPAR β/δ a PPAR γ společně ovlivňují diferenciaci tukové tkáně.

Během lidského prenatálního vývoje dochází k vysoké expresi PPAR γ v placentě, kde je nezbytná pro diferenciaci a funkci trofoblastu (Fournier et al., 2007). Přítomnost jednotlivých izoform PPARs byla v prenatálním vývoji prokázána v srdci, plicích, žaludku, játrech, střevech, nadledvinách, ledvinách, slezině a thymu (Huin et al., 2000; Abbott et al., 2010).

2.4 VZTAH CYP EPOXYGENÁZ, sEH A PPAR α

PPARs jsou známé jako senzory lipidového metabolismu. PPAR α reguluje také expresi řady enzymů I. a II. fáze biotransformace. I když jsou *in vitro* a *in vivo* studie na zvířecích modelech v mnoha případech velmi užitečným nástrojem, jsou známy rozdíly v metabolismu xenobiotik mezi hlodavčími a lidskými buňkami. Ligandy PPAR α regulují expresi CYP epoxygenáz jak v člověka, tak u hlodavců, ale jiným způsobem.

2.4.1 IN VITRO A IN VIVO STUDIE NA ZVÍŘECÍCH MODELECH

2.4.1.1 Myš

V myších játrech vede aktivace PPAR α ke snížení exprese CYP2C11, 2C12 a 2C29 (Rakhshandehroo et al., 2010). CYP epoxygenázy a jejich metabolity mají u hlodavců (stejně jako u člověka) podporují angiogenezi. Myší CYP2C44 je katalytický homolog lidských enzymů CYP2C8 a 2C9. Experimenty na myších s knokautovaným genem pro CYP2C44 prokázaly, že CYP2C44 je cílovým genem pro PPAR α . Ligand PPAR α WY-14643 snižuje u myší syntézu EETs snížením exprese CYP2C44 a vede ke značnému zmenšení velikosti a vaskularizace xenograftových nádorů. Tento efekt je závislý na jaderném receptoru PPAR α a nastává i u myší s lidským genem pro PPAR α (Pozzi et al., 2007; Pozzi et al., 2010).

Ligandy PPAR α u myší ovlivňují také sEH. WY-14643 zvyšuje expresi sEH mRNA v myších hepatocytech (Anderson et al., 2004). Podávání klofibrátu v potravě zvyšuje expresi sEH mRNA ve střevech, ledvinách, srdci a játrech (Johansson et al., 1995) a aktivitu sEH v játrech a ledvinách (Pinot et al., 1995).

2.4.1.2 Potkan

In vitro experimenty s potkaními hepatocyty ukazují, že fenofibrát i EMD 392949 (ligand PPAR α i PPAR γ) snižují expresi CYP2C (Richet et al., 2008). Efekt WY-14643 v potkaních hepatocytech není jasný. Dřívější studie ukazuje, že WY-14643 snižuje expresi proteinu CYP2C11 (Corton et al., 1998). Novější studie popisuje, že WY-14643 a endogenní ligandy 11,12-EET a 14,15-DHET zvyšují expresi sEH a CYP2C11 v potkaních hepatocytech, rovněž byl zde také detekován slabý nárůst exprese CYP2C23 (Ng et al., 2007).

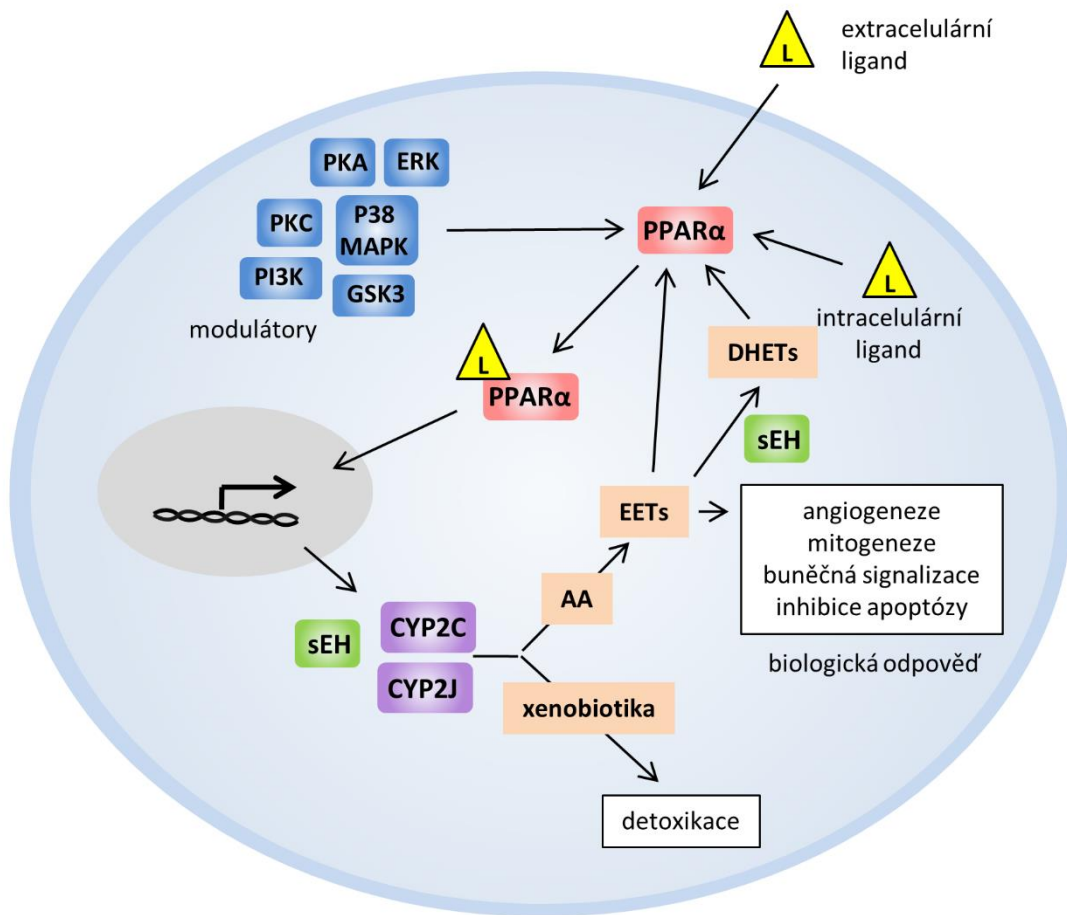
Pokles exprese enzymů CYP2C v játrech potkanů byl prokázán v souvislosti s orální aplikací různých ligandů PPAR α *in vivo*. Klofibrát snižuje expresi CYP2C11 snížením transkripční aktivity STAT5b (Shaban et al., 2005). Expresi CYP2C11 v játrech snižuje také WY-14643, gemfibrozil a fenofibrát (Corton et al., 1998; Večeřa et al., 2011). Fenofibrát také v menší míře snižuje expresi CYP2C6 mRNA (Večeřa et al., 2011). Naproti tomu fenofibrát u potkanů zvyšuje expresi proteinu CYP2C23 v kůře ledvin a epitelu renálních arterioli (Zhao et al., 2008). Rozdílný efekt ligandů PPAR α může být způsoben použitím různých kmenů potkanů a také podáváním různých vysokých dávek testovaných ligandů PPAR α (Ng et al., 2007).

2.4.1.3 Primáti

U makaků vede orální podávání EMD 392949 naopak ke zvýšení exprese CYP2C9. Po ukončení podávání byl pozorován návrat k původním hodnotám (Richert et al., 2008).

2.4.2 IN VITRO STUDIE NA LIDSKÝCH BUŇKÁCH

Stejně jako u laboratorních zvířat, ligandy PPAR α v lidských buňkách ovlivňují expresi CYP epoxygenáz a sEH. Jejich vzájemný vztah znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7: Vzájemný vztah PPAR α , CYP epoxygenáz a sEH. Aktivace PPAR α vede k expresi CYP epoxygenáz (CYP2C, CYP2J) a sEH. CYP epoxygenázy metabolizují arachidonovou kyselinu na EETs, které mají cytoprotektivní efekt. sEH převádí EETs na DHETs. EETs a DHETs mohou sloužit jako ligandy PPAR α . CYP epoxygenázy a sEH také metabolizují xenobiotika.

V lidských hepatocytech zvyšuje ligand PPAR α WY-14643 expresi CYP2C8, 2C9 a 2J2 mRNA (Rakhshandehroo et al. 2010). Expresi CYP2C8 mRNA v lidských hepatocytech zvyšují také klofibrát, fenofibrát a gemfibrozil (Richet et al., 2003; Prueksaritanont et al., 2005). Klofibrát a fenofibrát zvyšují také aktivitu tohoto enzymu. Gemfibrozil naopak snižuje aktivitu CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19 (Wen et al., 2001; Prueksaritanont et al., 2005). V lidských hepatocytech rovněž dochází k silné indukci CYP2C8 po ovlivnění EMD 392949 (Richert et al., 2008).

EETs a DHETs, které vznikají z arachidonové kyseliny pomocí CYP epoxygenáz a sEH, působí také jako ligandy PPAR α . PPAR α může na oplátku regulovat expresi enzymů zodpovědných za tvorbu těchto eikosanoidů. To ukazuje na mechanismus zpětné vazby (Ng et al., 2007; Wray et al., 2009).

PPAR α u člověka se podílí na regulaci sEH (Rakhshandehroo et al. 2010). Oblasti 5'UTR genu pro sEH ale neobsahuje PPAR α responzivní element (Tanaka et al., 2008).

3 CÍLE PRÁCE

1. Stanovení profilu exprese CYP epoxygenáz (CYP2C8, 2C9, 2C19 a 2J2), sEH a jaderného receptoru PPAR α ve vzorcích střev, jater a ledvin získaných v různých stádiích prenatalního vývoje člověka a jejich srovnání s expresí těchto proteinů u dospělých.
2. Stanovení koncentrací ligandů PPAR α (fenofibrátu, bezafibrátu, gemfibrozilu a WY-14643), které jsou významné pro viabilitu buněčných linií HEK293, HepG2 a HT-29.
3. Sledování změn exprese CYP2C8, 2J2 a sEH v buněčných liniích HEK293, HepG2 a HT-29 po ovlivnění dvěma různými koncentracemi ligandů PPAR α (fenofibrátu, bezafibrátu, gemfibrozilu a WY-14643).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE CYP EPOXYGENÁZ, sEH a PPAR α V LIDSKÝCH PRENATÁLNÍCH A DOSPĚLÝCH TKÁNÍCH

Imunohistochemická detekce (IHC) slouží k vizualizaci sledovaného proteinu (antigenu) v tkáňových řezech pomocí specifické primární protilátky. Pro dosažení dostatečné síly signálu se využívá nepřímá dvoj- a trojstupňová metoda, kdy se na primární protilátku váže značená protilátka sekundární, respektive biotinylovaná sekundární protilátka a na ni se váže komplex streptavidin-peroxidáza (Ramos-Vara, 2005).

4.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL PRO IHC

Pro účely této práce byly jako vhodné orgány vybrány střeva, játra a ledviny, protože jde o hlavní orgány, které se účastní absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace xenobiotik.

Vzorky lidských embryonálních a fetálních tkání byly získány z archivu Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Vzorky tkání byly fixovány ve formolu nebo methacarnu a zality do parafinu. Počet vzorků embryonálních a fetálních jater, střev a ledvin v jednotlivých stádiích prenatálního vývoje shrnuje Tab. 3. Využití tkáňových bloků bylo schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

Vzorky dospělých tkání duodena, jater a ledvin pro porovnání expresních profilů mezi dospělou a nezralou tkání byly získány z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Jde o vzorky pacientů, kteří podstoupili biopsii za účelem diagnostiky a jejichž histologický obraz byl normální. Počet vzorků a jejich základní charakteristika je uvedena v Tab. 4.

věk	CYP epoxygenázy			sEH			PPAR α		
	střeva	játra	ledviny	střeva	játra	ledviny	střeva	játra	ledviny
5	-	1	-	-	-	-	-	1	-
6	-	3	2	-	1	-	-	2	1
7	4	2	1	2	2	1	2	2	1
8	2	1	3	2	-	1	2	1	3
9	3	-	1	1	3	-	1	2	-
10	2	2	3	2	5	3	2	2	1
11	4	3	1	3	2	1	3	2	-
12	3	2	4	1	2	2	1	2	4
13	-	-	2	1	-	1	1	-	1
14	2	3	2	2	3	3	2	2	2
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	3	2	-	3	1	-	3	2	-
17	1	1	-	1	1	-	1	1	-
18	3	2	5	2	2	3	2	2	4
19	1	-	-	1	1	-	1	1	-
20	1	1	1	-	1	-	-	1	-
celkem	29	23	25	21	24	15	21	23	17

Tab. 3: Počet embryonálních a fetálních tkání použitých pro imunohistochemickou detekci studovaných antigenů. Věk je v týdnech IUV.

	orgán	pohlaví	věk	celkem
CYP epoxygenázy	duodenum	muž	3	29 - 56
		žena	2	39 - 59
	játra	muž	2	16 - 42
		žena	3	33 - 73
	ledvina	muž	4	37 - 76
		žena	1	59
sEH, PPARα	duodenum	muž	3	29 - 47
		žena	2	39 - 59
	játra	muž	2	16
		žena	2	41 - 73
	ledvina	muž	4	37 - 58
		žena	1	59

Tab. 4: Počet a základní charakteristika tkání získaných od dospělých jedinců.

4.1.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ

Použité primární protilátky a detekční systémy shrnuje Tab. 5. Ředění primárních protilátek bylo stanoveno barvením příslušných pozitivních kontrol.

PROTILÁTKA (označení, výrobce)	DRUH / KLONALITA	ŘEDĚNÍ	POZITIVNÍ KONTROLA	DETEKČNÍ SYSTÉM
CYP2C8 (16546-1-AP, Proteintech)	králík / poly	1 : 50	játra	DAB
CYP2C9 (AP7881c, Abgent)	králík / poly	1 : 50	játra	DAB
CYP219 (NBP1-19698, NovusBiologicals)	králík / poly	1 : 50	hepatocelulární karcinom	AP
CYP2J2 (ab69651, Abcam)	králík / poly	1 : 50	srdce	AP
sEH (sc-166961, Santa Cruz)	myš / mono	1 : 200	tenké střevo	DAB
PPARα (ab8934, Abcam)	králík / poly	1 : 50	játra	DAB

Tab. 5: **Použité primární protilátky, jejich původ, klonalita, ředění, pozitivní kontrola a použitý detekční systém.** mono – monoklonální protilátka, poly – polyklonální protilátka, DAB - EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAKO), AP - EnVisin™ G2 System/AP, Rabbit/Mouse-Permanent Red (DAKO).

Z parafinových bloků byly připraveny 4 μ m silné řezy a nataženy na podložní skla SuperFrost Plus® (Thermo Scientific, MA, USA). Řezy byly následně ponechány přes noc v termostatu při 56°C, aby tkáň ke sklu lépe přilnula.

Řezy byly deparafinovány ve dvou lázních xylenu po 5 min a poté rehydratovány v řadě lázní: etanol 96 %, etanol 80 % a destilovaná voda, vždy po 5 min. Následovalo odmaskování antigenu v citrátovém pufru (pH 6) při teplotě 120°C a zvýšeném tlaku po dobu 15 min (Histos Pro, Milestone). Po vychladnutí řezů byla u protilátek detekovaných pomocí DAB po dobu 30 min blokována aktivita endogenní peroxidázy v 5% H₂O₂ v destilované vodě. Řezy byly opláchnuty v destilované vodě a poté v pufru: 2 x 5 min v 1x TRIS a 5 min v 1x TRIS + Tween20. Pro zajištění zablokování nespecifického přibarvení pozadí byly řezy inkubovány 30 min v Protein Block serum free (DAKO) při pokojové teplotě. Poté byly řezy

inkubovány 60 min s primární protilátkou v příslušném ředění. Protilátky byly ředěny v Dako REAL™ Antibody Diluent (DAKO). Následoval opět oplach v pufru (2 x 5 min v 1x TRIS a 5 min v 1x TRIS + Tween20).

U protilátek detekovaných pomocí DAB (viz. Tab. 5) následovala inkubace s EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAKO) po dobu 60 min. Následně byly řezy opět opláchnuty pufrům (2 x 5 min v 1x TRIS a 5 min v 1x TRIS + Tween20). U protilátek detekovaných pomocí alkalické fosfatázy byl použit detekční kit EnVisin™ Gl2 System/AP, Rabbit/Mouse-Permanent Red (DAKO) podle návodu výrobce (Rabbit/Mouse LINK (vial 1) 30 min, 2x 5 min oplach 1x TRIS, AP enzyme ENHANCER (vial 2) 30 min, 2 x 5 min oplach 1x TRIS). Následovalo přidání chromogenu k řezům (DAB nebo Permanent Red (součást detekčního kitu)), oplach vodou a destilovanou vodou.

Ve všech případech byla jádra buněk dobarvena pomocí kamencového hematoxylinu po dobu 1 až 2 min. Poté se řezy praly 5 min v tekoucí vodě. Řezy, ve kterých byly sledované antigeny vizualizovány pomocí DAB, byly odvodněny v lázni 96 % etanolu a acetonu po 5 min a projasněny ve dvou lázních xylenu po 5 min. Řezy, u kterých byla k detekci použita alkalická fosfatáza, se nechaly uschnout na vzduchu (instrukce výrobce detekčního kitu). Všechny řezy byly zamontovány do Entellanu®.

4.1.3 HODNOCENÍ

Hodnocení exprese sledovaných proteinů v jednotlivých strukturách tkání bylo semikvantitativní: '-' negativní výsledek, '+' slabá exprese, '++' středně silná exprese a '+++' silná exprese proteinu. U proteinu PPAR α byla hodnocena i jeho subcelulární lokalizace: C – cytoplazmatická pozitivita, N – jaderná pozitivita, PM – pozitivní plazmatická membrána.

V případě CYP epoxygenáz bylo navíc ve výše uvedených vzorcích orgánů určeno histoskóre pro vybrané struktury. Histoskóre se určuje jako intenzita exprese vynásobená podílem pozitivních buněk. Intenzita exprese byla hodnocena následovně: 0 = negativní struktura, 1 = slabá exprese, 2 = středně silná exprese, 3 = silná exprese. Podíl pozitivních buněk byl rozdělen do těchto kategorií: 0, pokud bylo pozitivních buněk méně než 5 %, 1 pro 5 – 30 % pozitivních buněk, 2 pro 30 až 60 % pozitivních buněk a 3, pokud bylo v dané struktuře více než 60 % pozitivních buněk. Maximální

možné histoskóre je tedy 9. Průměrné histoskóre pro jednotlivá stádia IUV v závislosti na gestačním věku znázorňují grafy. Pro porovnání jsou zobrazeny také průměrné hodnoty získané pro dospělou tkáň.

4.1.4 ROZTOKY POUŽITÉ PRO IHC

citrátový pufr (pH 6,0)

Bylo smícháno 9 ml roztoku A (21,01 g kyseliny citronové v 1 l ddH₂O) a 41 ml roztoku B (29,41 g citrátu sodného v 1 l ddH₂O). Následovalo doplnění ddH₂O do 500 ml.

TRIS pufr (pH 7,6)

Zásobní roztok 10x TRIS byl připraven rozpuštěním 61 g TRIS-(hydroxymetyl)aminometátu v 1 l ddH₂O. Hodnota pH byla upravena pomocí koncentrované HCl.

1x TRIS + Tween20 se připravuje přidáním 500 µl Tween20 do 1 l 1x TRIS.

4.2 TEST VIABILITY BUNĚK WST-1

Kolorimetrické stanovení viability za pomoci WST-1 je založeno na principu přeměny tetrazoliové soli WST-1 na rozpustný formazan enzymy živých buněk. Množství vzniklého formazanu koreluje s množstvím metabolicky aktivních buněk v kultuře (Berridge et al., 2005).

4.2.1 BUNĚČNÉ LINIE A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

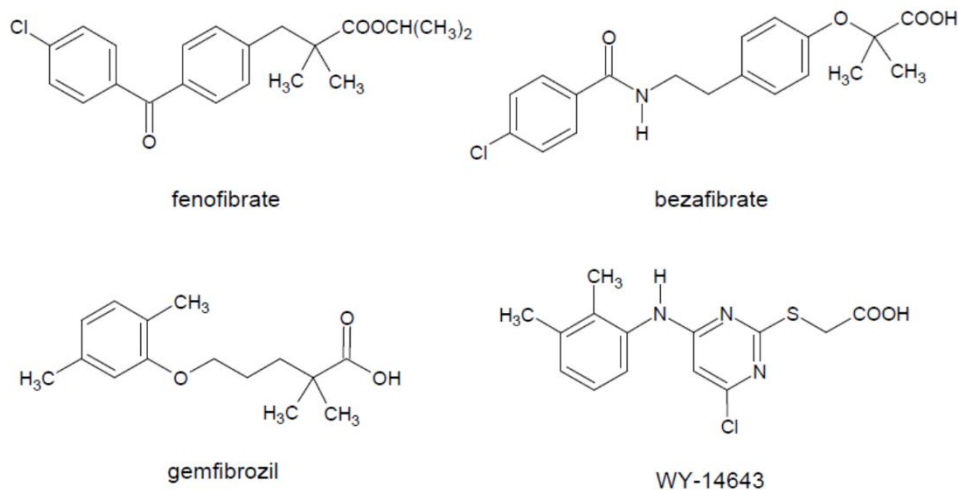
Buněčné linie použité v této práci jsou odvozené od střeva, jater a ledviny. Buněčná linie HEK293 (human embryonic kidney) je odvozena z buněk fetální ledviny transfekcí adenovirem 5 (Stepanenko et Dmitrenko, 2015). HepG2 (hepatocellular carcinoma) je buněčná linie odvozená z buněk hepatocelulárního karcinomu. Linie je vhodná pro studium enzymů metabolizujících xenobiotika (Wilkeming et al., 2003).

Linie HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) je odvozená z kolorektálního adenokarcinomu a je vhodná pro studium diferenciacie střevního epitelu *in vitro* (Simon-Assmann et al. 2006).

HEK293 a HepG2 byly pěstovány v DMEM (HyClone), buňky HT-29 byly pěstovány v RPMI-1640 (Sigma Aldrich), obě s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS; HyClone), penicilinem (100U/ml) a streptomycinem (100 mg/l). Buňky byly inkubovány při 37°C a 5 % CO₂ v atmosféře. Pasáž byla prováděna 2x týdně. Všechny 3 buněčné linie byly autentizovány pomocí jejich STR profilů na Ústavu klinické genetiky Lékařské fakulty Univerzity Palackého.

4.2.2 POUŽITÉ LIGANDY PPAR α

Pomocí WST-1 se stanovoval vliv čtyř ligandů PPAR α : fenofibrátu (Cayman), bezafibrátu (Cayman), gemfibrozilu (Sigma Aldrich) a WY-14643 (Sigma Aldrich). Vzorce použitých ligandů PPAR α ukazuje Obr. 7. Z ligandů byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mM v DMSO. Fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil jsou klinicky široce využívaná hypolipidemika (Piřha, 2001). WY-14643 je specifický aktivátor PPAR α využívaný experimentálně (Ng. et al., 2007).



Obr. 7: Vzorce použitých ligandů PPAR α .

4.2.3 STANOVENÍ KONCENTRACE S MAXIMÁLNÍ VIABILITOU, IC10 A IC50 VYBRANÝCH LIGANDŮ PPAR α V BUNĚČNÝCH LINIÍCH

Buňky byly vysazeny do 96-jamkových destiček v koncentraci 5000 buněk / jamka u linie HEK293 a 10000 buněk / jamka u HepG2 a HT-29. Buňky adherovaly přes noc a následující den byly ovlivněny různými koncentracemi fenofibrátu, bezafibrátu, gemfibrozilu a WY-14643. Celkový objem kultivačního média s ligandem v jamce byl 100 μ l. Buňky byly inkubovány 72 hod při 37°C a 5 % CO₂ v atmosféře. Následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ l reagentu WST-1 (Roche). Buňky byly s reagentem inkubovány dalších 90 min za standartních podmínek. Poté se měřila absorbance destiček na ELISA readeru (Power Wave XS, Bio-Tek) při vlnové délce 450 nm.

Koncentrace s maximální viabilitou, IC10 a IC50 byly stanoveny za pomoci MS Excel 2010. Koncentrace všech ligandů ve všech sledovaných liniích byly stanoveny ve třech nezávislých opakováních a následně zprůměrovány.

4.3 WESTERN BLOTTING

4.3.1 PŘÍPRAVA VZORKU

Buňky HEK293 v koncentraci 4 x 10⁵ / miska a HepG2 a HT-29 v koncentraci 6 x 10⁵ / miska byly vysazeny do 6 cm kultivačních misek, adherovaly přes noc a následující den byly ovlivněny jednotlivými ligandy PPAR α v koncentracích s maximální viabilitou a IC10 stanovených pomocí WST-1 testu. Buňky byly inkubovány s ligandy v testovaných koncentracích po dobu 24 a 72 hod za standartních podmínek. Buňky sloužící jako kontrola (neovlivněné) byly vysety na stejné misky ve stejných koncentracích a pěstovány v médiu.

Po uplynutí doby inkubace byly buňky ztrypsinizovány a stočeny 5 min při 1200 rpm při RT. Peleta byla promyta studeným PBS. Následovalo opět stočení 5 min při 1200 rpm. K peletě byl na ledu přidán lyzační Ripa pufr. Vzorky byly zvortexovány a ponechány 20 min na třepačce na ledu. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min při 15000 rpm při teplotě 4°C. Supernatant obsahující proteiny byl převeden do čistých mikrozkrumavek. Manipulace se všemi vzorky probíhala na ledu. Vzorky byly uchovávány při -80°C.

Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla stanovena pomocí metody Bradfordové. Byla připravena koncentrační řada BSA (bovinního sérového albuminu) ředěného v dH₂O o koncentracích 0 (blank), 100, 200, 300, 400 a 500 µg/ml. Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno 10 µl standardů koncentrací a jednotlivých vzorků (1 µl lyzátu + 9 µl ddH₂O), vše v duplikátu. Po 10 min inkubaci byla změřena absorbance na ELISA readeru (Power Wave XS, Bio-Tek) při 595 nm. Za pomoci MS Excel 2010 byla sestavena kalibrační přímka a z ní odečtena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

4.3.2 SDS-PAGE, PŘENOS PROTEINŮ NA MEMBRÁNU A JEJICH DETEKCE

Proteiny ve vzorcích byly separovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Složení 10% separačního a 5% zaostřovacího gelu ukazuje Tab. 6.

SLOŽKA	10% SEPARAČNÍ GEL (10 ml)	5% ZAOSTŘOVACÍ GEL (2 ml)
dH ₂ O	4,0	1,4
30% akrylamid	3,3	0,33
1,5 M TRIS-HCl pH 8,8	2,5	-
1,0 M TRIS-HCl pH 6,8	-	0,25
10% SDS	0,1	0,02
10% amonium persulfát	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002

Tab. 6: Složení 10% separačního a 5% zaostřovacího polyakrylamidového gelu. Uvedené objemy jsou v ml.

Vzorky byly před nanesením do gelu smíchány v poměru 4:1 s 4x koncentrovaným LSB pufrem tak, aby každá jamka obsahovala 20 µg proteinů. Vzorky byly zvortexovány a zahřáty na 1 min na 95°C. Poté byly naneseny do gelu. Elektroforetická separace probíhala v 5x koncentrovaném ELFO pufru při napětí 110 V po dobu 120 min.

Po dokončení separace byla z gelů odstraněna zaostřovací část. Gely byly promývány 20 min na třepačce v 20% transfer pufru. V 20% transfer pufru byly promyty i blotovací papíry (Bio-Rad) a membrána Amersham Hybond-ECL (GE Healthcare). Následně probíhal polosuchý přenos proteinů (Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) 50 min při 10 V. Pro potvrzení přenosu byly membrány 5 min barveny pomocí Ponceau S (Serva) a následně opláchnuty dH₂O.

Suchá membrána byla rozdělena na 2 části těsně nad úrovní 38 kDa podle hmotnostního markeru Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare). Část membrány s proteiny o velikosti nad 38 kDa byla použita k detekci sledovaných proteinů (CYP2C8, 2J2, sEH – velikost okolo 50 kDa), zbylá část sloužila k detekci GAPDH (velikost okolo 36 kDa), který byl využit jako endogenní kontrola. Membrány byly blokovány v blokovacím pufru na třepačce po dobu 60 min. Poté byla na membrány nanášena primární protilátka v příslušném ředění, které je uvedeno v Tab. 7. Všechny protilátky byly ředěny v blokovacím pufru bez Tween20. Inkubace probíhala přes noc při 4°C.

PROTILÁTKA (označení, výrobce)	POUŽITÍ	DRUH / KLONALITA	ŘEDĚNÍ	POUŽITÝ PUFR
CYP2C8 (GTX113666, GeneTex)	primární	králík / poly	1:1000	TBS
CYP2J2 (NBP2-01178, NovusBiologicals)	primární	myš / mono	1:1000	PBS
sEH (sc-166961, Santa Cruz)	primární	myš / mono	1:500	PBS
GAPDH (G8795, Sigma Aldrich)	primární	myš / mono	1:25000	PBS
anti-mouse IgG, HRP-linked (7076, Cell Signalling)	sekundární	kůň	1:6000	PBS/TBS
anti-rabbit IgG, HRP-linked (7074, Cell Signalling)	sekundární	koza	1:5000	PBS/TBS

Tab. 7: **Protilátky použité na western blot, jejich klonalita, ředění a použitý pufrový systém.** mono – monoklonální protilátka, poly – polyklonální protilátka.

Následující den byly membrány 3x 5 min promývány v promývacím pufru 1x PBS + Tween20 nebo 1x TBS + Tween20 (v závislosti na použité primární protilátce) a následně na ně byla nanesena sekundární protilátka. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 60 min při RT. Membrány byly opět 3x 5 min promývány v promývacím pufru.

K vizualizaci bylo využito chemoluminiscence. Membrány byly inkubovány 5 min ve tmě s chemiluminiscenčním substrátem Femto nebo Duro (Thermo Scientific). Výsledky byly zachyceny ve fotokomoře na fotografický papír. Suché filmy byly naskenovány pomocí denzitometru GS-700 (BioRad).

4.3.3 ROZTOKY POUŽITÉ PRO WESTERN BLOTTING

zásobní 10x koncentrovaný PBS pH 7,6

V dH₂O bylo rozpuštěno 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄ a 2 g KHPO₄. Následně byl objem doplněn do 1 l dH₂O.

zásobní 10x koncentrovaný TBS

V přibližně 700 ml ddH₂O bylo rozpuštěno 24,2 g TRIS a 80,0 g NaCl. Následně bylo upraveno pH koncentrovanou HCl na hodnotu 7,6. Objem byl doplněn pomocí ddH₂O do 1 l.

1,0M TRIS-HCl pufr pH 6,8

V 1 l dH₂O bylo rozpuštěno 121,1 g TRIS. Poté bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 6,8.

1,5M TRIS-HCl pufr pH 8,8:

V 1 l dH₂O bylo rozpuštěno 181,65 g TRIS. Poté bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na 8,8.

5x koncentrovaný elektroforetický pufr:

V dH₂O bylo rozpuštěno 15,1 g TRIS, 5,09 g SDS a 72 g glycinu. Objem byl doplněn pomocí dH₂O na 1 l.

Ripa pufr:

Bylo smícháno 1,66 ml 50mM TRIS-HCl pH 8,0, 7,5 ml 1M NaCl, 500 µl NP-40, 5 ml 5% deoxycholátu sodného, 500 µl 10% SDS a 34,84 ml ddH₂O. K roztoku byly přidány 2 tablety cOmplete (Roche) a 3 tablety PhosSTOP (Roche). Vše se nechá rozpustit na třepačce. Alikvoty po 1 ml a 1,5 ml byly uchovávány při -20°C. Rozmražený pufr se znovu nezmrazoval.

vzorkovací pufr 4x LSB:

Smíchalo se 3,5 ml ddH₂O, 0,5 ml 1M TRIS pH 6,8, 1,6 ml glycerolu, 1,6ml 10 % SDS, 0,4 ml β-merkaptoetanolu a 0,4 ml 5% bromfenolové modře.

20% transferový pufr:

Bylo smícháno 2,9 g glycinu, 5,8 g TRIS, 0,37 g SDS a 200 ml metanolu. Následně se byl pomocí dH₂O doplněn objem na 1 l.

blokovací pufr:

Šlo o 5% roztok mléka v 1x PBS nebo 1xTBS s Tween20 (v závislosti na použité primární protilátce). 5 g sušeného odtučněného mléka bylo rozpuštěno ve 100 ml příslušného pufru. Následně bylo přidáno 100 µl Tween20.

roztok Bradfordové:

Bylo smícháno 0,02 g Coomassie Brilliant Blue G250, 10 ml etanolu a 20 ml kyseliny orthofosforečné. Následně byl doplněn objem do 40 ml dH₂O.

5 VÝSLEDKY

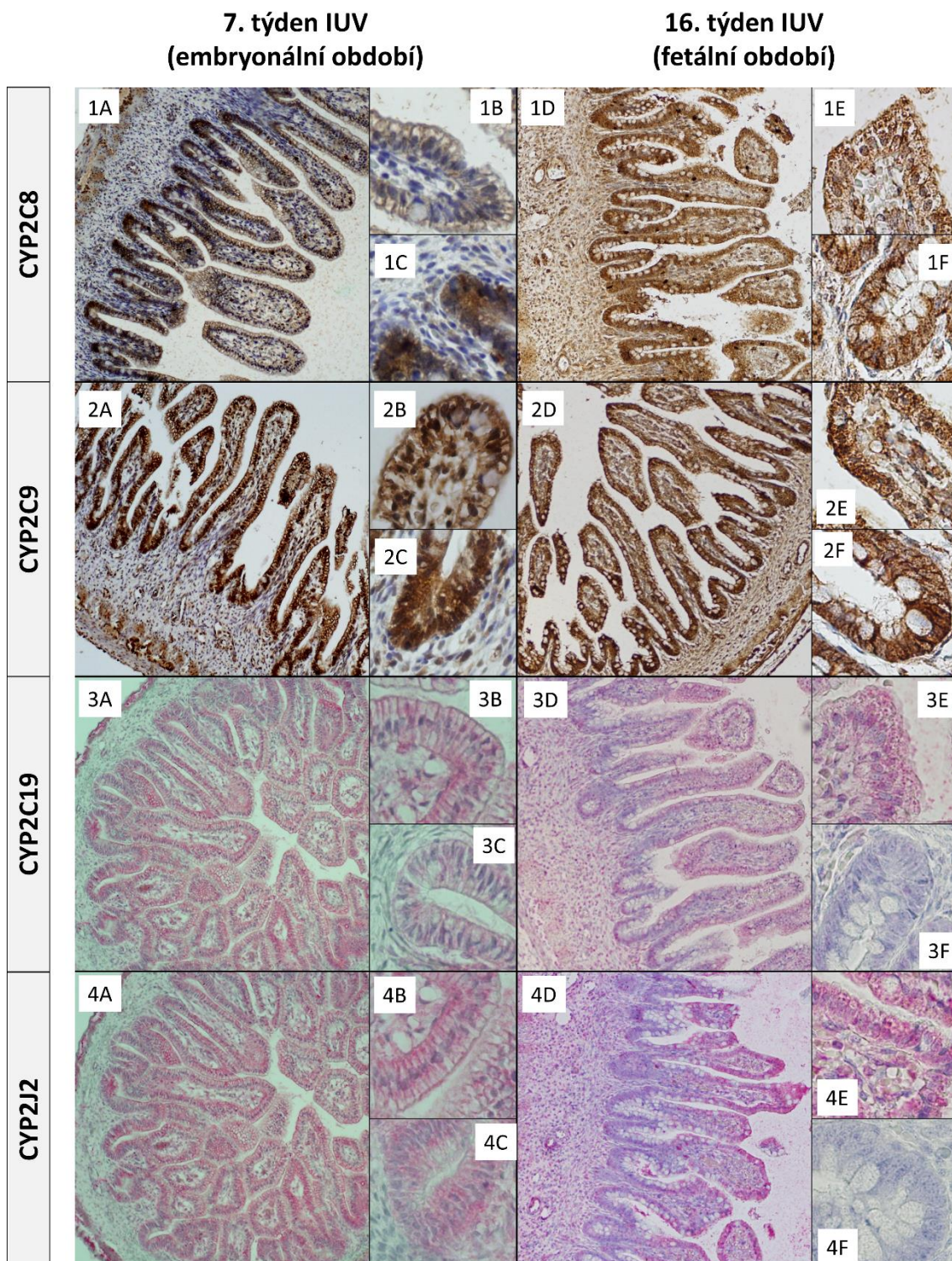
5.1 EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE A V DOSPĚLOSTI

Všechny sledované CYP epoxygenázy (CYP2C8, 2C9, 2C19 a 2J2) vykazovali cytoplazmatickou pozitivitu. Semikvantitativní hodnocení intenzity barvení jednotlivých CYP epoxygenáz ve studovaných tkáních ukazují Tab. 8 – 10.

5.1.1 STŘEVO

Ve sledovaném období prenatálního vývoje byla prokázána exprese CYP epoxygenáz (Obr. 8). Kromě semikvantitativního hodnocení intenzity IHC barvení byla exprese CYP epoxygenáz v buňkách střevního epitelu hodnocena pomocí histoskóre. Závislost histoskóre na stáří lidských zárodků znázorňuje Obr. 9. Od 7. do 16. týdne IUV byl pozorován nárůst exprese CYP2C8 v cytoplazmě enterocytů. Expresse CYP2C19 byla nejslabší, přechodně se zvýšila mezi 11. a 14. týdnem vývoje. Expresse CYP2J2 byla po celé sledované období na stejné úrovni. CYP2C8 a 2C9 jsou silněji exprimovány v oblasti mezi klky. Poté, co se vyvinou krypty, je zde exprese sledovaných proteinů intenzivnější než v apikální části klků. V průběhu 4. měsíce IUV byla zaznamenána změna v distribuci proteinů CYP2C19 a 2J2 (Obr. 8). V časnějším období vývoje byla prokázána stejná intenzita exprese CYP2C19 a 2J2 jak v oblasti budoucích krypt a v kryptách, tak v apikální části klku. V průběhu 4. měsíce došlo k vymizení exprese CYP2C19 a 2J2 v oblasti krypt, a to 2C19 ve 14. týdnu a 2J2 v 16. týdnu IUV. Slabá exprese CYP epoxygenáz byla detekována také ve vyvíjejících se vrstvách svaloviny a v krevních cévách. Ve vazivu střev nebyl zaznamenán signifikantní průkaz exprese sledovaných proteinů.

Všechny sledované CYP epoxygenázy byly detekovány také ve vzorcích z duodena získaných od dospělých jedinců (n = 5). Obecně byla intenzita barvení v kryptách a v apikálních částech klků srovnatelná. Intenzita barvení byla u jednotlivých vzorků variabilní. CYP2J2 nebyl detekován ve všech vzorcích – pozitivita byla prokázána ve 3 vzorcích z 5.



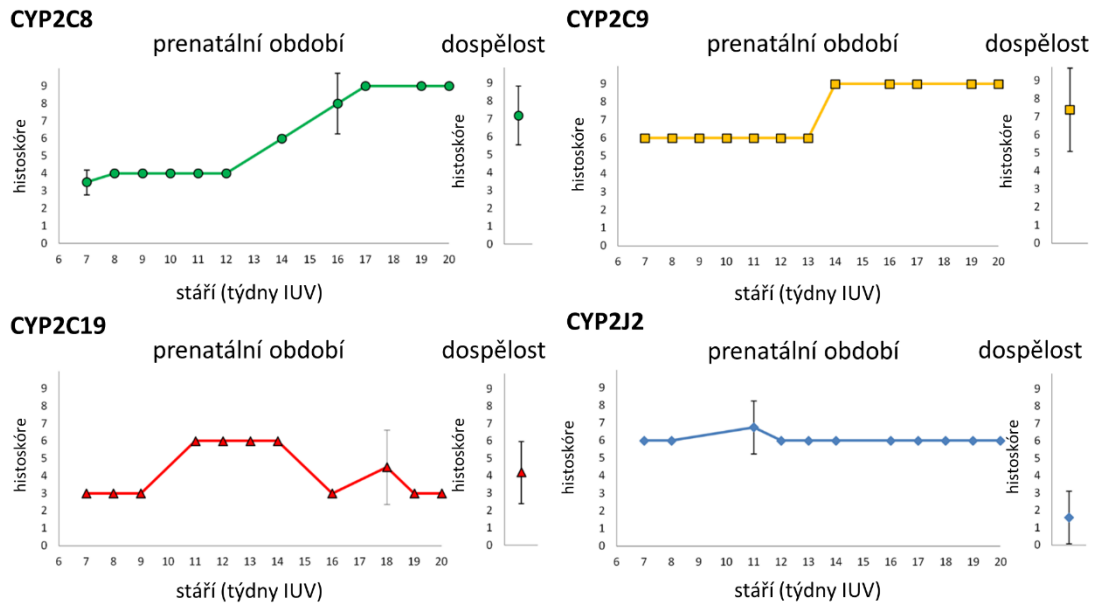
Obr. 8: Srovnání exprese CYP epoxygenáz ve střevě v embryonálním a fetálním období. Během 4. měsíce IUV mizí z oblasti krypt pozitivita CYP2C19 a 2J2. Zvětšení 100x (1 - 4A, 1 - 4D), detaily apikální části klku (1 - 4B, 1 - 4E) a krypt (1 - 4C, 1 - 4F) 400x.

CYP2C8						
STÁŘÍ (týdny IUV)	n	EPITEL		VAZIVO	KREVNÍ CÉVY	SVALOVINA
		KLKY	KRYPTY			
7	4	+	+	-/+	+	+
8	2	+	++	-/+	-	-
9	3	+	++	-/+	-	-
10	2	+	++	-/+	-	-
11	4	+	++	-/+	-	-
12	3	+	++	-	+	-
13	1	+/++	++	-/+	-/+	-
14	2	++	++/+++	-/+	-/+	+
16	3	++	++/+++	-/+	+	+
17	1	++	++/+++	-/+	+	+
18	3	+++	+++	-/+	+	-
19	1	+++	+++	-/+	+	+
20	1	+++	+++	-/+	+	-
dospělost	5	++/+++	++/+++	-/+	-	-
CYP2C9						
7	4	++	++/+++	-/+	+	+
8	2	++	++/+++	-/+	+	+
9	3	++	++/+++	-/+	+	+
10	2	++	++/+++	-	-/+	+
11	4	++	++/+++	-	+	+
12	3	++	++/+++	-/+	+	+
13	1	++	++/+++	-	+	-/+
14	2	+++	+++	-/+	+	+
16	3	+++	+++	-/+	-/+	+
17	1	+++	+++	-	+	+
18	3	+++	+++	-/+	+	-/+
19	1	+++	+++	-	+	+
20	1	+++	+++	-/+	+	+
dospělost	5	+++	+++	-	+	+

Tab. 8: Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz ve střevech. '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++' silná pozitivita, n – počet vzorků.

CYP2C19						
STÁŘÍ (týdny IUV)	n	EPITEL		VAZIVO	KREVNÍ CÉVY	SVALOVINA
		KLKY	KRYPTY			
7	4	+	+	-/+	-	-
8	2	+	+	-	-	-/+
9	3	+	+	-/+	-/+	-
10	2	+ / ++	+	-	-	-
11	4	++	++	-	+	+
12	3	++	++	-	+	+
13	1	++	++	-/+	+	+
14	2	++	++	-	+	+
16	3	+	-	-	-	+
17	1	+ / ++	-	-	- / +	+
18	3	+ / ++	- / +	-	+	- / +
19	1	+	-	-	-	+
20	1	+	-	-	-	-
dospělost	5	+ / ++		-	-	-
CYP2J2						
7	4	++	++	+ / ++	-	-
8	2	++	++	+	+	-
9	3	++	++	- / +	+	-
10	2	++	++	-	- / +	-
11	4	++ / +++	++	- / +	+	+
12	3	++	++	- / +	+	+
13	1	++	++	- / +	-	- / +
14	2	++	-	-	+	+
16	3	++	-	-	+	+
17	1	++	-	-	- / +	-
18	3	++	-	-	+	-
19	1	++	-	-	+	+
20	1	++	-	-	- / +	-
dospělost	5	- / +	- / +	-	-	-

Tab. 8 – pokračování: **Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz ve střevech.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++' silná pozitivita, n – počet vzorků.

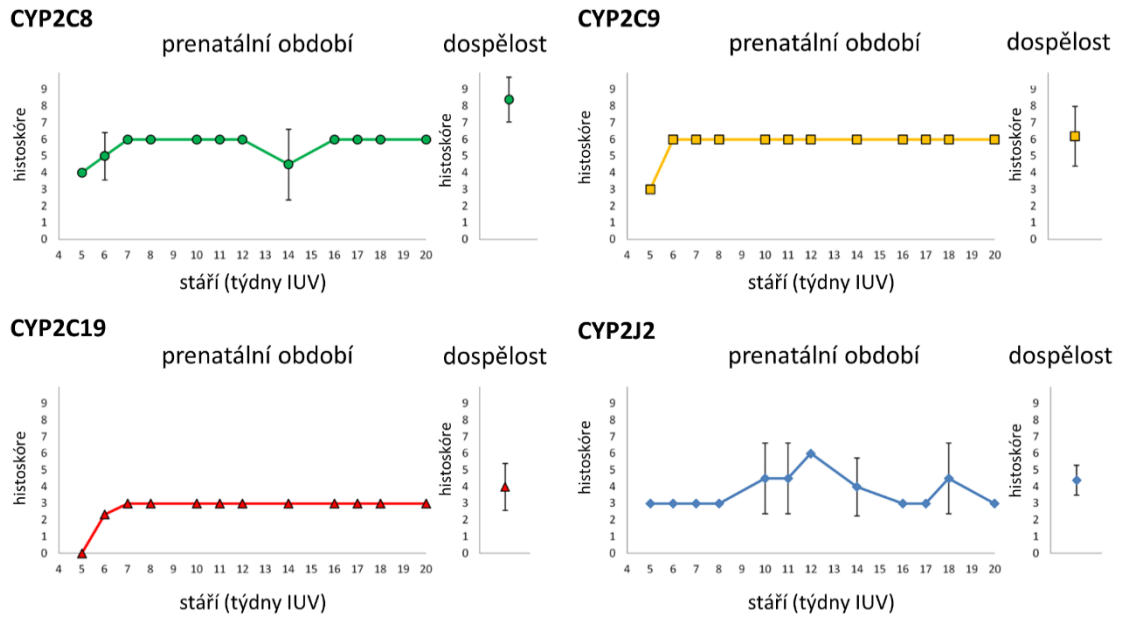


Obr. 9: Expres CYP epoxygenáz ve střevním epitelu během intrauterinního vývoje a v dospělosti. Grafy ukazují průměrné histoskóre, chybové úsečky reprezentují standartní odchylku.

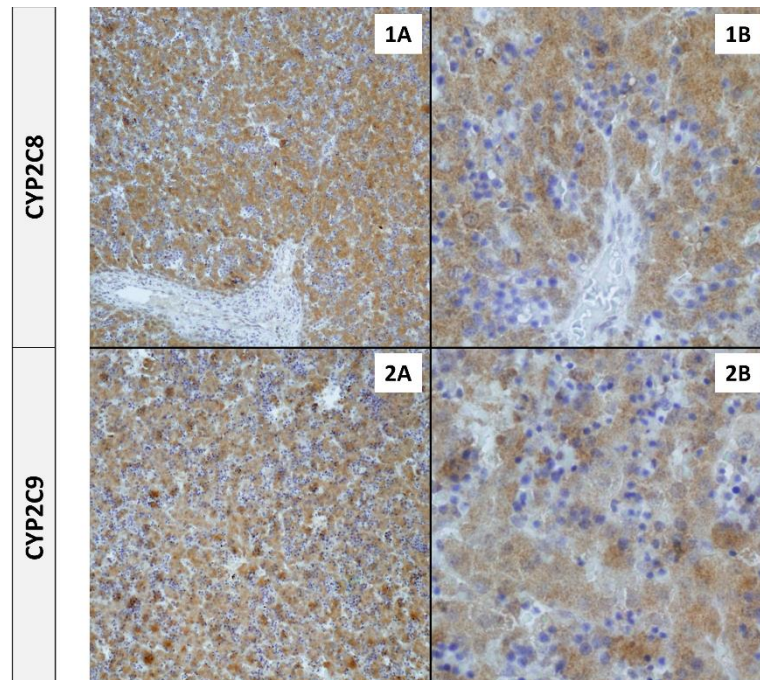
5.1.2 JÁTRA

Expres CYP epoxygenáz v hepatocytech hodnocená pomocí histoskóre v závislosti na gestačním věku ukazuje Obr. 10. Expres CYP2C8, 2C9 a 2J2 ve vzorcích z embryonální jaterní tkáně byla přítomna již v 5. týdnu IUV. V 6. týdnu IUV byla prokázána expres CYP2C19. Nárůst intenzity exprese CYP2C8 byl pozorován do 7. týdne IUV, hodnoty exprese zůstaly pro následující časové období beze změn. Nárůst exprese CYP2C9 byl sledován do 6. týdne, poté se intenzita exprese již dále neměnila. Intenzita exprese CYP2J2 byla mezi jednotlivými vzorky různá (slabá nebo střední). Slabá expres CYP epoxygenáz byla rovněž detekována v některých vyvíjejících se krevních elementech. Expresi CYP2C8 a 2C9 v embryonálním období ukazuje Obr. 11.

Všechny vzorky jaterní tkáně od dospělých jedinců byly pozitivní na všechny testované proteiny. V případě proteinů CYP2C19 a 2J2 nebyla prokázána pozitivita u všech hepatocytů. Podíl pozitivních jaterních buněk se pohybuje v rozmezí 30 – 60 %. Jednotlivé vzorky také vykazovaly odlišnou intenzitu barvení.



Obr. 10: **Expresse CYP epoxygenáz v hepatocytech během intrauterinního vývoje a v dospělosti.** Grafy ukazují průměrné histoskóre, chybové úsečky reprezentují standardní odchylku.



Obr. 11: **Expresse CYP2C8 a 2C9 v prenatalním období v játrech v 7. týdnu IUV.** Zvětšení 100x (1A, 2A), detaily (1B, 2B) 400x.

CYP2C8				
STÁŘÍ (týdny IUV)	n	HEPATOCYTY	KREVNÍ ELEMENTY	VAZIVO
5	1	+/+++	-/+	-
6	3	+/+++	-/+	-
7	2	++	-/+	-
8	1	++	-/+	-
10	2	++	+	-
11	3	++	+	-
12	2	++	-/+	-
14	3	+/+++	+	-
16	2	++	-/+	-
17	1	++	-/+	-
18	2	++	-/+	-
20	1	++	-/+	-
dospělost	5	++/+++	X	-
CYP2C9				
5	1	+	-/+	-
6	3	++	-/+	-
7	2	++	-/+	-
8	1	++	-/+	-
10	2	++	+	-
11	3	++	-/+	-
12	2	++	-/+	-
14	3	++	-/+	-
16	2	++	-/+	-
17	1	++	+	-
18	2	++	-/+	-
20	1	++	-/+	-
dospělost	5	++/+++	X	-

Tab. 9: **Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz v játrech.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

CYP2C19				
STÁŘÍ (týdny IUUV)	n	HEPATOOCYTY	KREVNÍ ELEMENTY	VAZIVO
5	1	-	-	-
6	3	-/+	-	-
7	2	+	-	-
8	1	+	-/+	-
10	2	+	-/+	-
11	3	+	-/+	-
12	2	+	-/+	-
14	3	+	-/+	-
16	2	+	-/+	-
17	1	+	-	-
18	2	+	-	-
20	1	+	-	-
dospělost	5	++	X	-
CYP2J2				
5	1	+	-	-
6	3	+	-/+	-
7	2	+	-/+	-
8	1	+	-/+	-
10	2	+/+++	-/+	-
11	3	+/+++	-/+	-
12	2	++	-/+	-
14	3	+/+++	-/+	-
16	2	+	-/+	-
17	1	+	-/+	-
18	2	+/+++	-/+	-
20	1	+	-/+	-
dospělost	5	++	X	-

Tab. 9 – pokračování: **Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz v játrech.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ ' silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

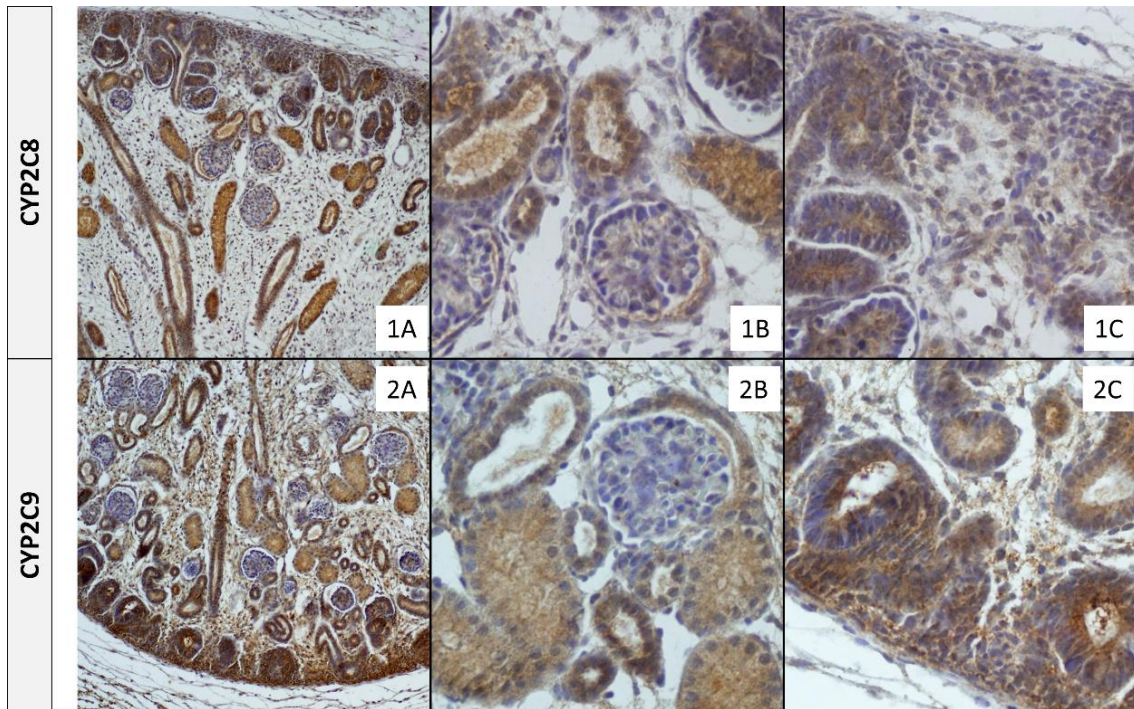
5.1.3 LEDVINA

CYP epoxygenázy byly detekovány převážně v tubulárním systému ledvin (Obr. 12). Závislost histoskóre na gestačním věku v proximálních tubulech a ve zbytku tubulárního systému (Henleova klička, distální tubuly, sběrací kanálky) je zobrazena na Obr. 13.

V 7. týdnu IUV byl pozorován nárůst exprese CYP2C8 v cytoplazmě buněk proximálních tubulů, poté již žádná změna exprese pozorována nebyla. Ve zbytku tubulárního systému byla v porovnání s proximálními tubuly zjištěna nižší intenzita exprese CYP2C8. Hlavní CYP epoxygenázou v tubulárním systému ledviny je CYP2C9. Od 7. týdne IUV byla v proximálních tubulech detekována vyšší exprese CYP2C9 než ve vzorcích zralého renálního parenchymu. Ve zbývajících úsecích tubulárního systému byla exprese CYP2C9 slabší. Expres CYP2C19 je v tubulárním systému ledvin nízká. V celém tubulárním systému dochází také v 10. týdnu IUV ke zvýšení exprese CYP2J2. V rozmezí 10. – 20. týdne IUV je tak exprese tohoto enzymu vyšší než v dospělé tkáni.

Slabá exprese CYP epoxygenáz byla prokázána také v renálních tělískách, především v parietálním listu Bowmanova pouzdra. V glomerulech byla exprese CYP epoxygenáz sotva detekovatelná. Slabá až střední intenzita exprese CYP epoxygenáz byla prokázána také v neogenní zóně ledvin. Vazivová tkáň byla negativní.

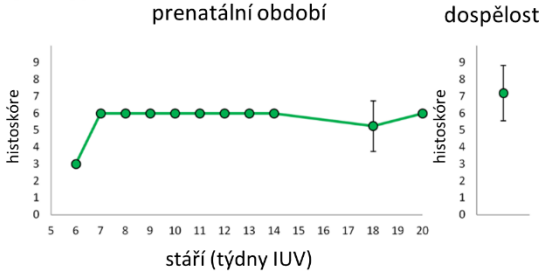
V dospělé tkáni byly prokázány všechny sledované CYP epoxygenázy. Intenzita barvení se lišila mezi jedinci. Silnější exprese CYP2C8 a 2J2 byla detekována v proximálních tubulech na rozdíl od zbytku tubulárního systému. U CYP2C9 a 2C19 byl expresní profil opačný. Expres CYP2J2 byla ve vzorcích zralého renálního parenchymu v porovnání s prenatálními vzorky nižší.



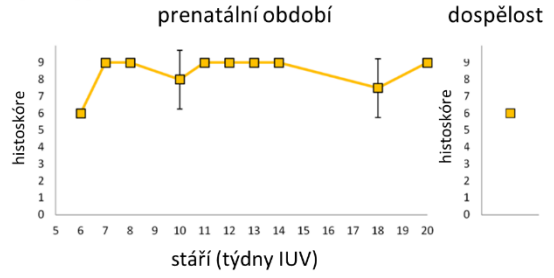
Obr. 12: **Expresse CYP2C8 a 2C9 v prenatálním období v ledvinách (8. týden IUV).**
 Zvětšení 100x (1A, 2A), detaily glomerulů, tubulárního systému (1B, 2B) a neogenní zóny (1C, 2C) 400x.

A)

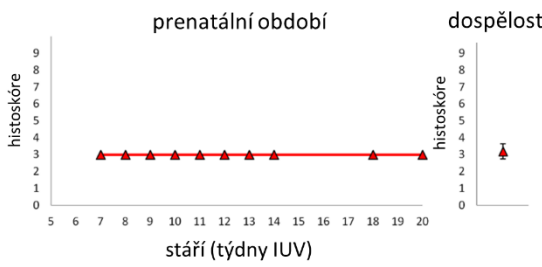
CYP2C8



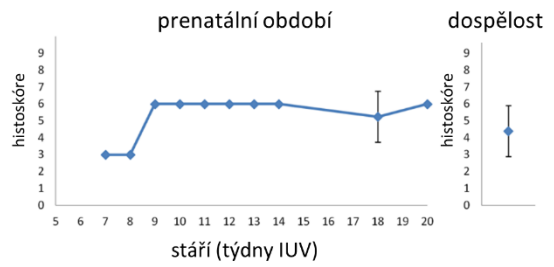
CYP2C9



CYP2C19

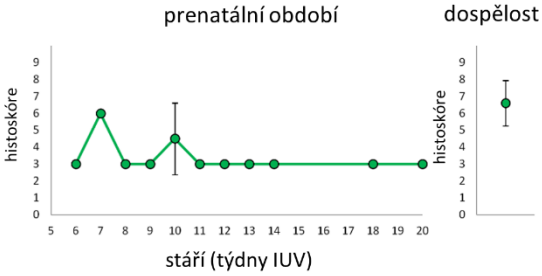


CYP2J2

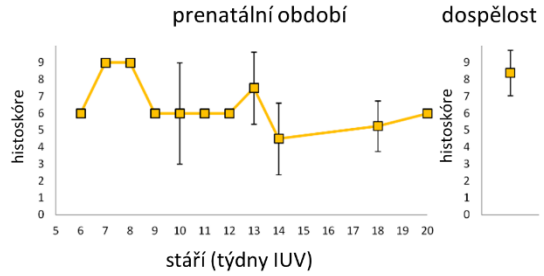


B)

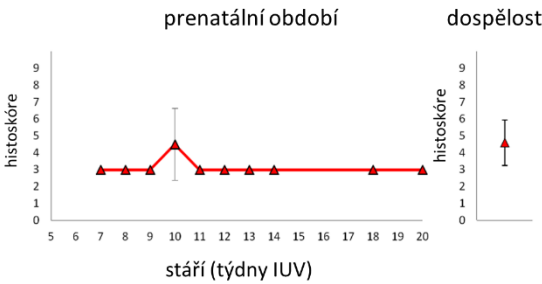
CYP2C8



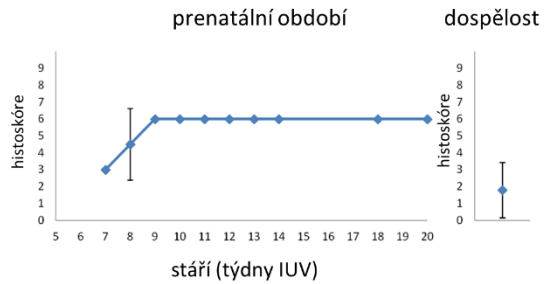
CYP2C9



CYP2C19



CYP2J2



Obr. 13: Expres CYP epoxygenáz v proximálních tubulech (A) a v dalších částech tubulárního systému (B) během prenatalního vývoje a v dospělosti. Grafy ukazují průměrné histoskóre, chybové úsečky reprezentují standardní odchylku.

CYP2C8						
STÁŘÍ (týdny IUV)	n	RENÁLNÍ TĚLÍSKA	PROXIM. TUBULY	OSTATNÍ TUBULY	NEOGENNÍ ZÓNA	VAZIVO
6	2	-/+	+	+	+	-
7	1	-/+	++	++	+/++	-
8	3	+	++	+	+/++	-
9	1	+	++	+	+	-
10	3	+/++	++	+/++	++	-/+
11	1	+	++	+	+	-
12	4	-/+	++	+	+	-
13	2	-/+	++	+/++	+	-
14	2	-/+	++	++	+	-
18	5	-/+	+/++	++	+	-
20	1	-/+	++	+	+	-
dospělost	5	-	++/+++	++	X	-
CYP2C9						
6	2	+	++	++	+	-
7	1	++	+++	+++	+	-/+
8	3	+	++/+++	+++	++	-/+
9	1	+	++	+	+	-
10	3	+/++	++/++	++	+/++	+
11	1	+	+++	++	-/+	-
12	4	+	+++	++	+	-
13	2	+	+++	++/+++	+/++	+
14	2	+	+++	++	+	-/+
18	5	+	++/+++	+/++	+/++	-/+
20	1	+	+++	++	+	-/+
dospělost	5	+	++	++/+++	X	-

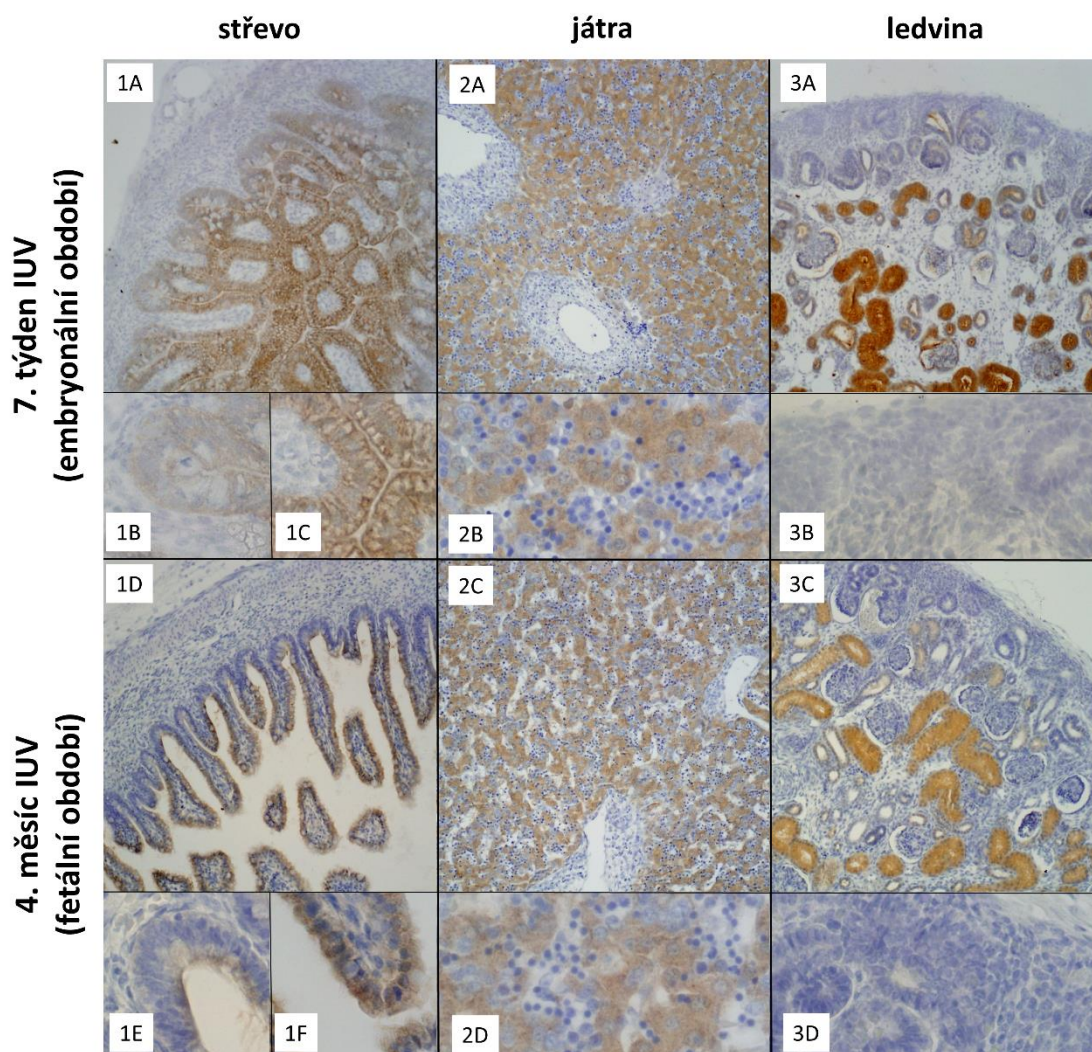
Tab. 10: Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz v ledvinách. '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

CYP2C19						
STÁŘÍ (týdny IUV)	n	RENÁLNÍ TĚLÍSKA	PROXIM. TUBULY	OSTATNÍ TUBULY	NEOGENNÍ ZÓNA	VAZIVO
6	2	-/+	+	+	+	-/+
7	1	-/+	+	+	+	-
8	3	-/+	+	+	+	-
9	1	-/+	+	+	+	-
10	3	+/>+++	+	+/>+++	+/>+++	-/+
11	1	-/+	+	++	+	-
12	4	-/+	+	+	+	-
13	2	-/+	+	+	+	-
14	2	-/+	+	+	+	-
18	5	-/+	-/+	+	-/+	-
20	1	-/+	+	+	-/+	-
dospělost	5	-/+	+/>+++	++	X	-
CYP2J2						
6	2	+	+/>+++	++	-/+	+
7	1	-/+	+/>+++	+/>+++	-/+	-
8	3	+	+/>+++	+/>+++	++	-
9	1	+	++	++	++	+
10	3	+/>+++	++	++	+/>+++	+
11	1	+/>+++	++	++	+	+
12	4	+	++	++	+	-
13	2	+	++	++	+/>+++	-
14	2	+	++	++	+	-
18	5	+	++	++	+/>+++	-
20	1	+	++	++	+	-/+
dospělost	5	-/+	+/>+++	-/+	X	-

Tab. 10 - pokračování: **Semikvantitativní hodnocení exprese CYP epoxygenáz v ledvinách.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

5.2 EXPRESE sEH V PRENATÁLNÍM VÝVOJI A V DOSPĚLOSTI

Výskyt sEH v cytoplazmě byla prokázána jak v embryonálních a fetálních tkáních (Obr. 14), tak v tkáních dospělých. Semikvantitativní hodnocení intenzity exprese sEH během prenatálního vývoje a v dospělosti shrnují Tab. 11 - 13. V případě sEH nebyla detekována závislost intenzity exprese tohoto proteinu na gestačním věku.



Obr. 14: Exprese sEH ve střevech, v játrech a v ledvinách v embryonálním (7. týden IUV) a fetálním období (4. měsíc IUV). Zvětšení 100x (1A, 2A, 3A, 1D, 2C, 3C). 1B, 1E – detail krypty, 1C, 1F – detail sliznice apikální části klku, 2B, 2D – detail hepatocytů, 3B, 3D – detail neogenní zóny, zvětšení 400x.

5.2.1 STŘEVO

Byly prokázány rozdíly v distribuci exprese sEH v buňkách střevního epitelu mezi oblastmi krypt a apikálními částmi klků. Silnější exprese sEH byla přítomna v apikální části klků než v kryptách. V pojivové tkáni, v krevních cévách a ve svalovině byla exprese sEH sotva detekovatelná.

V případech vzorků duodena získaných od dospělých osob se intenzita exprese pohybovala od střední (++) po silnou (+++). Rozložení exprese v jednotlivých strukturách bylo obdobné jako v prenatálním vývoji.

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	EPITEL		VAZIVO	KREVNÍ CÉVY	SVALOVINA
		KLKY	KRYPTY			
7	2	+++	++	-	-/+	-
8	2	+++	++	-	-	-
9	1	+++	+	-	-	-
10	2	+++	++	-	-	-
11	3	++/+++	+/>++	-	-	-/+
12	1	+++	++	-	-	-/+
13	1	+++	++	-	-/+	-/+
14	2	+++	++	-	-	-/+
16	3	+++	++	-	-	-
17	1	+++	++	-	-	-/+
18	2	+++	++	-	-	-
19	1	+++	+	-	-	-/+
dospělost	5	++/+++	+/>++	-	-	-

Tab. 11: **Expres sEH ve střevě.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

5.2.2 JÁTRA

Intenzita exprese sEH v hepatocytech se během prenatálního vývoje pohybovala od střední (++) po silnou (+++). Vyvíjející se krevní elementy byly negativní, stejně jako pojivová tkáň.

Ve zralé jaterní tkáni část hepatocytů (20 - 40 %) vykazovala vysokou pozitivitu (+++), ve zbytku hepatocytů dosahovala intenzita exprese sEH středních hodnot (++)

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	HEPATOOCYTY	KREVNÍ ELEMENTY	VAZIVO
6	1	+++	-	-
7	2	+++	-	-
9	3	++/+++	-	-
10	5	++	-	-
11	2	++/+++	-	-
12	2	++/+++	-	-
14	3	++	-	-
16	1	++	-	-
17	1	++	-	-
18	2	++	-	-
19	1	+++	-	-
20	1	+++	-	-
dospělost	5	++/+++	X	-

Tab. 12: **Expres sEH v játrech.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

5.2.3 LEDVINA

sEH se exprimuje převážně v tubulárním systému. Vyšší exprese sEH byla prokázána v proximálních tubulech v porovnání s ostatními úseky renálních tubulů. V renálních tělískách bylo slabě pozitivní Bowmanovou pouzdro. Neogenní zóna ledviny byla sEH negativní.

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	RENÁLNÍ TĚLÍSKA	PROXIM. TUBULY	OSTATNÍ TUBULY	NEOGENNÍ ZÓNA	VAZIVO
7	1	-/+	+++	+	-	-/+
8	1	++	+++	+/+++	-/+	-
10	3	-/+	++	+/+++	-	-
11	1	-	++	+	-	-
12	2	+	++	++	-	-/+
13	1	+	++	++	-	-/+
14	3	+	+++	+++	-/+	-/+
18	3	+	+++	+++	-	-/+
dospělost	5	-	++/+++	+/+++	X	-

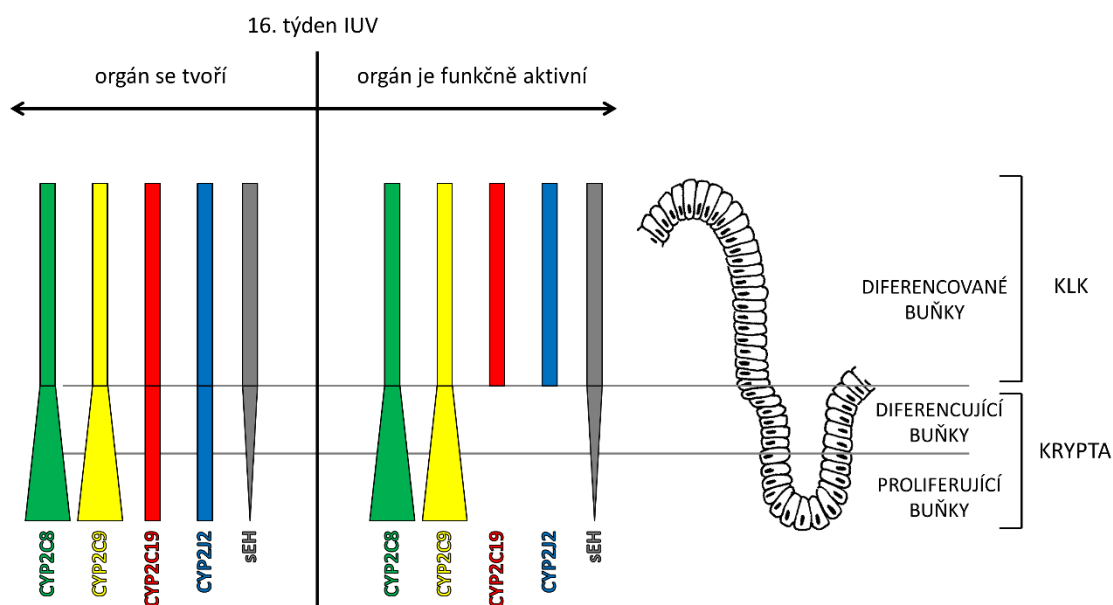
Tab. 13: **Expres sEH v ledvinách.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, n – počet vzorků.

Ve vzorcích zralé tkáně byly nejvíce pozitivní strukturou, podobně jako v prenatálním období, proximální tubuly. Na rozdíl od prenatálního vývoje byla renální tělíska sEH negativní.

5.3 SROVNÁNÍ EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH BĚHEM PRENATÁLNÍHO VÝVOJE

Zatímco exprese CYP epoxygenáz se během prenatálního vývoje převážně zvyšuje, exprese sEH nevykazuje signifikantní závislost na stáří zárodku. Intenzita exprese CYP epoxygenáz a sEH se v průběhu prenatálního vývoje ve sledovaných strukturách střev, jater a ledvin liší.

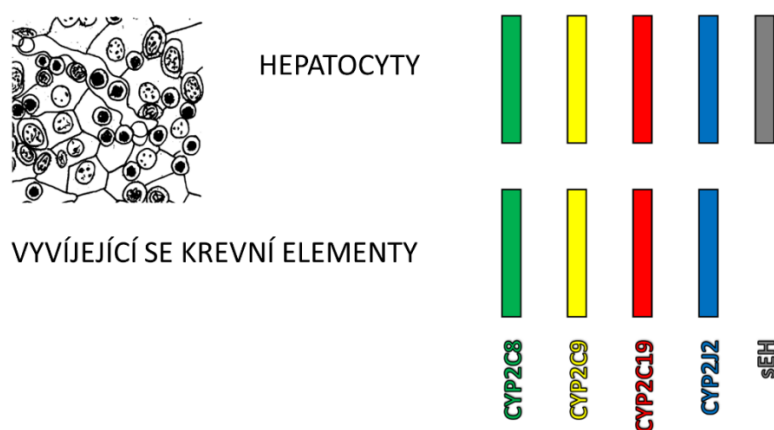
Buňky střevního epitelu v apikálních částech klků vykazovaly slabší intenzitu exprese CYP2C8 a 2C9 na rozdíl od buněk v ostatních úsecích střevní výstelky. Distribuce sEH je opačná. V oblasti budoucích a vyvinutých krypt byla exprese nižší, směrem k apikální části klků byl pozorován její nárůst (Obr. 15).



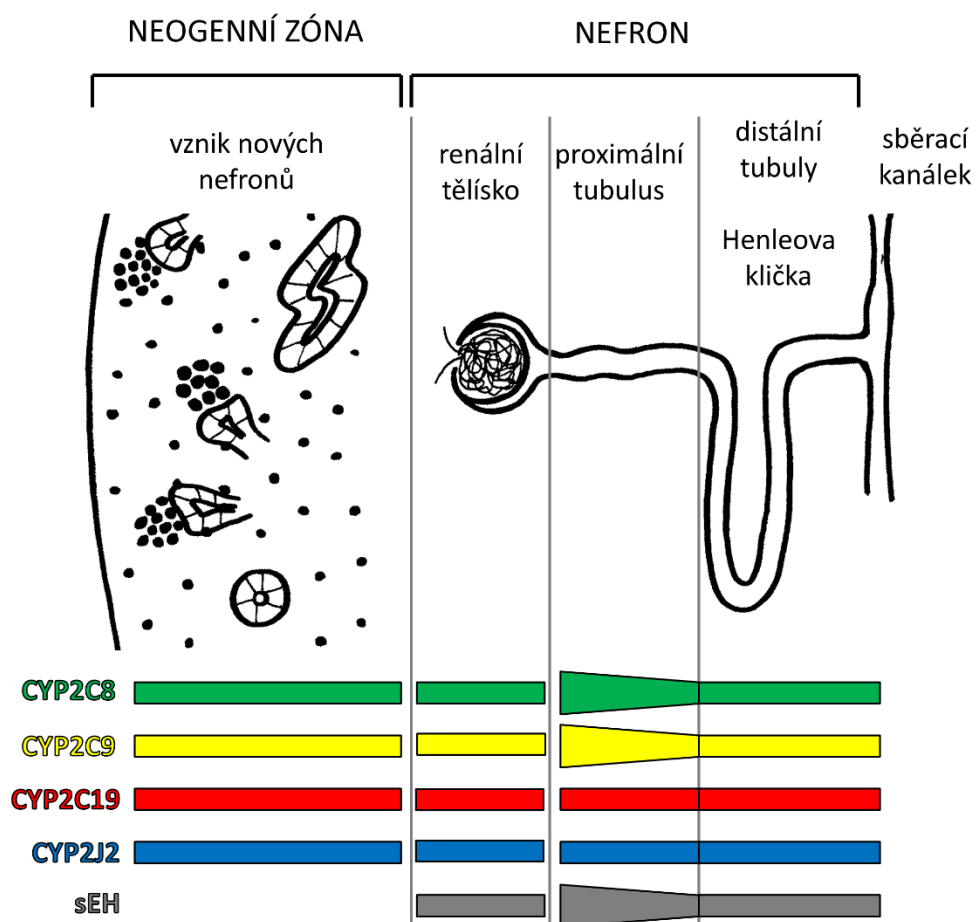
Obr. 15: Srovnání expresního profilu CYP epoxygenáz a sEH v epitelu střeva v prenatálním období. V oblasti budoucích krypt a později v kryptách je silnější exprese CYP2C8 a 2C9, zatímco exprese sEH je nižší v porovnání s apikální částí klku.

Hepatocyty byly pozitivní jak na CYP epoxygenázy, tak na sEH. Rozdíly lze nalézt u vyvíjejících se krevních elementů. Zde byla zjištěna pouze exprese CYP epoxygenáz. Exprese sEH ve vyvíjejících se krevních elementech prokázána nebyla (Obr. 16).

Významným rozdílem v ledvinách je odlišná exprese CYP epoxygenáz a sEH v neogenní zóně. Tato oblast vykazovala pozitivitu na CYP epoxygenázy, exprese sEH zde prokázána nebyla (Obr. 17).



Obr. 16: Srovnání expresního profilu CYP epoxygenáz a sEH v játrech v prenatálním období. V hepatocytech jsou exprimovány jak CYP epoxygenázy, tak sEH. Ve vyvíjejících se krevních elementech se exprimují jen CYP epoxygenázy.



Obr. 17: Srovnání expresního profilu CYP epoxygenáz a sEH v ledvině během prenatálního období. CYP epoxygenázy a sEH jsou exprimovány převážně v tubulárním systému ledvin. V neogenní zóně se exprimují pouze CYP epoxygenázy, exprese sEH zde prokázána nebyla.

5.4 EXPRESE PPAR α V PRENATÁLNÍM VÝVOJI A V DOSPĚLOSTI

Distribuci PPAR α v jednotlivých strukturách studovaných tkání a jejich subcelulární lokalizaci shrnují Tab. 14 – 16 a Obr. 18.

5.4.1 STŘEVO

Hlavním místem exprese PPAR α je střevní epitel. Během prenatálního vývoje expresní profil PPAR α vykazoval změny intenzity exprese v jednotlivých úsecích střevního epitelu – od krypty po apikální část. Do 11. týdne byla exprese silnější v místech budoucích krypt, ve vyšších vývojových stádiích byla intenzita exprese PPAR α srovnatelná jak v kryptách, tak v apikálních částech klku. Kromě intenzity se mění také subcelulární lokalizace receptoru. PPAR α byl prokázán převážně v cytoplazmě, jaderná pozitivita byla rovněž detekovatelná. Jádra enterocytů vykazovala pozitivitu převážně v epitelových buňkách kryjící apikální části klků. Krevní cévy a svalové buňky byly také pozitivní na PPAR α , pojivová tkáň byla negativní.

Ve vzorcích dospělé tkáně buňky střevního epitelu na povrchu apikálních částí klků vykazovaly silnější intenzitu exprese PPAR α v porovnání s epitelovými buňkami v oblasti krypt. Exprese byla detekovatelná jak v cytoplazmě, tak v jádře.

5.4.2 JÁTRA

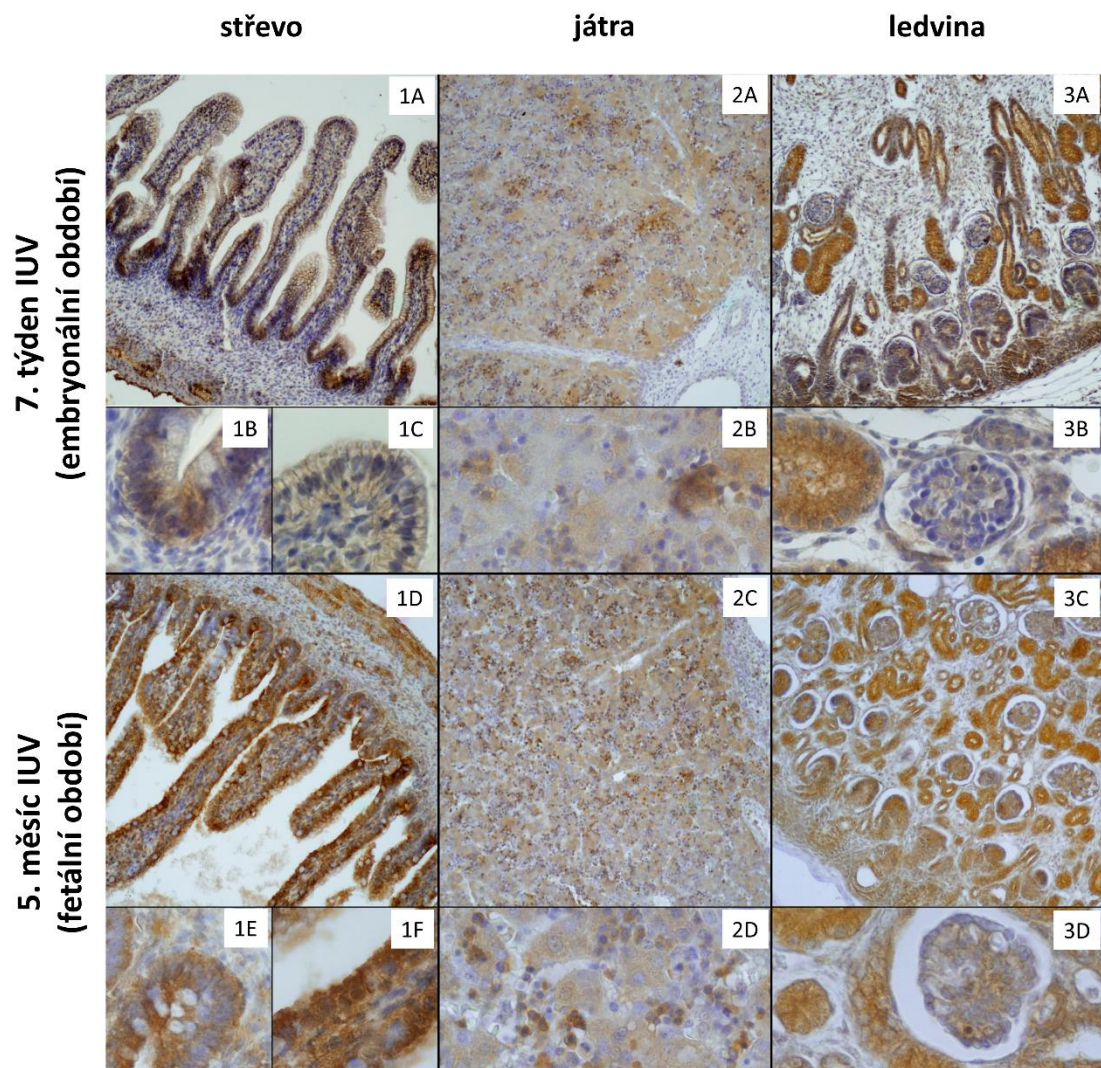
V 18. týdnu IUV byl pozorován nárůst exprese PPAR α v hepatocytech. Silná, převážně jaderná, pozitivita byla detekována v některých vyvíjejících se krevních elementech (30 – 50 %). Vazivová tkáň byla PPAR α negativní.

Slabá intenzita exprese PPAR α byla prokázána ve všech hepatocytech ve vzorcích jaterní tkáně od dospělých jedinců. Část hepatocytů (30 – 40 %) vykazovala intenzitu vyšší (++) . Vazivová tkáň byla negativní.

5.4.3 LEDVINA

Silná intenzita exprese PPAR α byla prokázána v proximálních tubulech. Střední intenzita exprese byla detekována ve zbytku tubulárního systému (Henleova klička, distální tubuly, sběrací kanálky) a také v neogenní zóně ledvin. V renálním tělísku byla exprese PPAR α prokázána jak v glomerulu, tak v Bowmanově pouzdře. V glomerulech byl po 12. týdnu IUV pozorován nárůst intenzity exprese PPAR α .

V dospělé tkáni se proximální tubuly barvily s nižší intenzitou než ostatní části tubulárního systému. Renální tělíska byla negativní.



Obr. 18: Exprese PPAR α v embryonálním (7. týden IUV) a fetálním období (5. měsíc IUV). Zvětšení 100x (1A, 2A, 3A, 1D, 2C, 3C), 1B, 1E – detail krypty, 1C, 1F – detail sliznice apikální části klku, 2B, 2D – detail hepatocytů, 3B, 3D – detail neogenní zóny, zvětšení 400x.

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	EPITEL		VAZIVO	KREVNÍ CÉVY	SVALOVINA
		KLKY	KRYPTY			
7	2	++ (C,N)	+++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
8	2	++ (C,N,M)	+++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
9	1	++ (C,N,M)	+++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
10	2	++ (C,N,M)	+++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
11	3	++ (C,N,M)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
12	1	++ (C,N,M)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)
13	1	++ (C,N,M)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)
14	2	++ (C,N,M)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
16	3	++ (C,N)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
17	1	++ (C,N)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
18	2	++ (C,N)	++ (C,N)	- (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
19	1	++ (C,N)	++ (C,N)	-/+ (C,N)	+++ (C,N)	+++ (C,N)
dospělost	5	+++/ (C,N)	+++ (C,N)	-	-	X

Obr. 14: **Expresse PPAR α ve střevě.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, C – cytoplazmatická lokalizace, N – jaderná lokalizace, M – pozitivní plazmatická membrána, n – počet vzorků.

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	HEPATOOCYTY	KREVNÍ ELEMENTY	VAZIVO
5	1	++ (C,N)	+ (C,N)	-
6	2	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
7	2	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
8	1	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
9	2	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
10	2	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
11	2	++ (C,N)	++/+++ (C,N)	-
12	2	++ (C,N)	+++ (C,N)	-
14	2	++ (C,N)	+++ (C,N)	-
16	2	++ (C,N)	+++ (C,N)	-
17	1	++ (C,N)	+++ (C,N)	-
18	2	+++ (C,N)	+++ (C,N)	-
19	1	++ (C,N)	+++ (C,N)	-
20	1	+++ (C,N)	+++ (C,N)	-
dospělost	5	+/ (C,N)	X	-

Tab. 15: **Expresse PPAR α v játrech.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++ silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, C – cytoplazmatická lokalizace, N – jaderná lokalizace, M – pozitivní plazmatická membrána, n – počet vzorků.

STÁŘÍ (týdny IUV)	n	RENÁLNÍ TĚLÍSKA	PROXIM. TUBULY	OSTATNÍ TUBULY	NEOGENNÍ ZÓNA	VAZIVO
6	1	+ (C,N)	++ (C,N)	+/ +++ (C,N)	+ (C,N)	-
7	1	+ (C,N)	+++ (C,N)	+/ +++ (C,N)	++ (C,N)	-
8	3	+ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-
10	1	+ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-
12	4	+ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-
13	1	+/ +++ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-/ + (C,N)
14	2	+/ +++ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-/ + (C,N)
18	4	++ (C,N)	+++ (C,N)	++ (C,N)	++ (C,N)	-/ + (C,N)
dospělost	5	-/ + (C,N)	+/ +++ (C,N)	++ (C,N)	X	-

Tab. 16: **Expresse PPAR α v ledvině.** '-' negativní struktura, '+' slabá pozitivita, '++' střední pozitivita, '+++' silná pozitivita, X – struktura se ve vzorku nenachází, C – cytoplazmatická lokalizace, N – jaderná lokalizace, M – pozitivní plazmatická membrána, n – počet vzorků.

5.5 VIABILITA BUNĚK PO OVLIVNĚNÍ RŮZNÝMI LIGANDY PPAR α

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

**5.6 ZMĚNA EXPRESE CYP EPOXYGENÁZ A sEH
V BUNĚČNÝCH LINIÍCH PO OVLIVNĚNÍ LIGANDY PPAR α**

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

6 DISKUZE

Cytochromy P450 (CYPs) jsou dobře známé pro svoji roli v metabolismu léčiv. Bylo ale prokázáno, že některé CYPs jsou nezbytné pro správný prenatální vývoj (Stoilov, 2001). Prvním krokem v identifikaci CYPs, které se vývoje organismu účastní, je stanovení jejich přítomnosti a expresního profilu v embryonálních a fetálních tkáních. V nezralé tkáni střev, jater a ledvin byl stanoven profil exprese CYP2C8, 2C9, 2C19, 2J2, sEH a PPAR α . Stáří vzorků se pohybovalo od 5. do 20. týdne IUV. Toto období pokrývá konec organogeneze (konec 8. týdne), kdy se jednotlivé orgány tvoří a začátek fetálního období, kdy buňky a orgány dozrávají funkčně. Vybrané orgány představují hlavní orgány, které se účastní absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace xenobiotik.

CYP epoxygenázy a sEH jsou enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik. Kromě toho se podílí na metabolismu arachidonové kyseliny. Jde o ω -6 mastnou kyselinu, která je pro prenatální vývoj velmi důležitá. Její transport přes placentu má přednost před transportem linolové kyseliny a neesenciálních mastných kyselin. Koncentrace arachidonové kyseliny v krevní plazmě plodu je dokonce vyšší než koncentrace v plazmě matky (Innis, 2005). CYP epoxygenázy (CYP2C, CYP2J) konvertují arachidonovou kyselinu na čtyři regioizomery epoxyeikosatrienových kyselin (EETs). Jde o vysoce aktivní metabolity, které se účastní mimo jiné regulace proliferace a diferenciac buněk. Tyto epoxidy jsou následně za účasti sEH rychle metabolizovány na příslušné dioly (DHETs), které jsou méně aktivní (Spector et al., 2004). Objevil se také názor, že EETs by mohly během vývoje hrát roli morfogenu podle teorie poziční informace (Stoilov, 2001).

CYP epoxygenázy a sEH patří mezi geny, jejichž expresi řídí transkripční faktor PPAR α , který je aktivován řadou endogenních a exogenních ligandů, mezi které patří také výše zmíněná arachidonová kyselina a její metabolity (EETs a DHETs) (Ng et al., 2008; Raksandehroo et al., 2010).

Ontogeneze tenkého střeva se skládá ze tří po sobě jdoucích fází: morfogeneze a buněčné proliferace, buněčné diferenciac a funkční maturace. Organogeneze střeva je kompletní přibližně ve 13. týdnu IUV (Montgomery et al., 1999). Nové buňky střevního epitelu vznikají v kryptách z kmenových buněk, migrují směrem nahoru a diferencují se v enterocyty a v sekreční buňky. Na apikálním povrchu klku se uvolňují a podléhají

apoptóze (Sancho et al., 2004). Tento proces probíhá nejen v prenatalním období, ale obnova střevního epitelu je tímto způsobem zajištěna celý život jedince.

Naše výsledky ukazují, že se v průběhu vývoje střeva zvyšuje intenzita exprese CYP2C8 a 2C9. Během 4. měsíce IUV (CYP2C8 v 16. týdnu a CYP2C9 ve 14. týdnu) dosahuje intenzity srovnatelné s expresí v dospělé tkáni. Intenzita exprese CYP2J2 je v prenatalním období vyšší než v dospělosti a ve sledovaném období prenatalního vývoje se dále nemění. Vyšší exprese CYP2J2 v porovnání se zdravou tkání byla potvrzena v různých typech nádorů a nádorových buněčných liniích (Jiang et al., 2005), což poukazuje na další podobnosti mezi prenatalním vývojem a tumorigenezí. Přítomnost transkriptů tohoto enzymu ve vyvíjejícím se lidském střevě potvrdil také Gaedigk et al. (2006). Naproti tomu intenzita exprese sEH není závislá na gestačním věku.

Rozložení exprese studovaných enzymů se v jednotlivých oblastech střevního epitelu liší. CYP2C8 a 2C9 vykazují silnou expresi v oblasti budoucích krypt a později v plně diferencovaných Lieberkhünových kryptách. Na druhou stranu je exprese CYP2C19 a 2J2 v oblasti budoucích krypt a na apikálních částech klků srovnatelná. Toto rozložení se mění v průběhu 4. měsíce IUV. Ve 14. týdnu mizí exprese CYP2C19 z oblasti krypt, k eliminaci exprese CYP2J2 dochází v 16. týdnu. I když v literatuře neexistuje jednotný názor, kdy střevo začíná být funkční, dochází k tomu ve 4. měsíci prenatalního vývoje. V tomto období začínají být funkční enzymy, dochází k sekreci žluče a je detekovatelná peristaltika. Fétus polyká plodovou vodu, která je absorbována právě střevním epitelem a recyklována v ledvinách. V dospělosti je exprese sledovaných CYP epoxygenáz v oblasti krypt a na apikálních částech klků srovnatelná. Distribuce exprese sEH také není ve střevním epitelu jednotná. V oblasti budoucích krypt je slabší než v apikálních částech klků. Toto rozložení je stejné i v dospělosti.

Během prenatalního vývoje střeva se také mění rozložení exprese PPAR α . Do 11. týdne IUV je exprese tohoto receptoru silnější v oblasti budoucích krypt než na apikálních částech klků. Poté je exprese jak v kryptách, tak na apikálních částech klků srovnatelná. V dospělé tkáni je exprese PPAR α silnější na apikálních částech klků. Kromě rozložení intenzity exprese se také mění subcelulární lokalizace receptoru. Lokalizace PPAR α je často popisována jako jaderná, v některých typech buněk byly PPAR α prokázány také v cytoplasmě (Chinetti et al., 1998; Bordji et al., 2000; Reynders et al., 2006). Nedávno byl popsán vzájemný přenos receptoru mezi

cytoplazmou a jádrem, který je regulován řadou drah. Jadernou lokalizaci PPAR α zvyšuje přítomnost jeho ligandu (Umamoto et Fujiki, 2012). Ve vzorcích střeva embryí a fétů byl PPAR α lokalizován převážně v cytoplazmě. Jaderná pozitivita byla detekována a to převážně v epitelových buňkách apikálních částí klků, což může být spojeno s diferenciací.

Bylo prokázáno, že CYP epoxygenázy i PPAR α se ve střevě účastní řady fyziologických procesů. CYP2J2 ovlivňuje cévní tonus a také se pravděpodobně účastní uvolňování neuropeptidů, kontoly motility a modulace transportu střevních tekutin a elektrolytů (Zeldin et al., 1997). PPAR α se účastní regulace oxidace mastných kyselin, toku cholesterolu, transportu a metabolismu karbohydrátů a aminokyselin, motility střeva a také snižování oxidačního stresu (deVogel-van den Bosh et al., 2008).

Distribuce CYP epoxygenáz a sEH v jednotlivých částech střevního epitelu vede pravděpodobně k rozdílné koncentraci regioizomerů EETs. Každá CYP epoxygenáza produkuje několik regioizomerů, přičemž jeden z nich obvykle převažuje. CYP2C8 a 2C9 produkují hlavně 14,15- a 11,12-EET. CYP2C19 produkuje hlavně 8,9-EET a CYP2J2 je nejméně regioselektivní epoxygenáza, která vytváří všechny 4 regioizomery (Zeldin, 2001). V oblasti krypt, kde vznikají nové buňky střevního epitelu, je silná exprese CYP2C8 a 2C9. Experimenty prováděné na buněčných liniích prokázaly, že regioizomery 14,15- a 11,12-EET jsou silnější stimulanty proliferace než regioizomer 8,9-EET. Proliferace nastává zvýšením fosforylace ERK1/2 a PI3K (Shen et al., 2008). Rozložení exprese CYP2C8 a CYP2C9 má za následek pravděpodobně nižší koncentraci 14,15- a 11,12-EET v epitelových buňkách na apikálních částech klků než v oblasti krypt. Různá koncentrace EETs ve střevním epitelu je navíc podpořena rozložením exprese sEH, která je v oblasti krypt nižší než na apikálním úseku klku. Ačkoliv sEH převádí všechny EETs na příslušné DHETs, jejím preferovaným substrátem je právě regioizomer 14,15-EET, který má nejvyšší proliferací potenciál (Spector et al., 2004). Popsané rozložení různých EETs v různých oblastech střevního epitelu spolu s faktem, že pro diferenciaci epitelových buněk je nezbytná inaktivace dráhy ERK1/2 a PI3K (Aliaga et al., 1999; Laprise et al., 2002) podporuje názor, že zvyšující se exprese sEH je spojená s diferenciací.

Vliv CYP2J2, sEH a jejich metabolitů na diferenciaci byl prokázán u mezenchymových kmenových buněk a z nich derivovaných adipocytů. V nediferencovaných buňkách je vyšší exprese CYP2J2, vyšší hladina EETs a nižší

hladina sEH a DHETs než v buňkách diferencovaných. Navíc bylo prokázáno, že zablokování aktivity sEH nedovoluje kmenovým buňkám se diferencovat (Kim et al., 2010).

Játra plní v organismu řadu metabolických funkcí, včetně štěpení živin a detoxikačních procesů. Během prenatalního období navíc slouží jako hematopoetický orgán. Již v 5. týdnu prenatalního vývoje je možné v hepatocytech detekovat CYP2C8, 2C9 a 2J2. Expresi CYP2C19 začíná o týden později. Expresi transkriptů CYP2C v játrech během prenatalního vývoje potvrdilo více prací (Koukouritaki et al., 2004; Bièche et al., 2007; Treluyer et al., 1997). Studie, kterou provedli Treluyer et al. (1997) ovšem neprokázala přítomnost proteinů ani enzymatickou aktivitu. Přítomnost a enzymatickou aktivitu CYP2C9 a 2C19 později prokázali Koukouritaki et al. (2004). Detekovali zvyšující se množství proteinu CYP2C9 v rozmezí 8. až 24. týdne IUV. Množství proteinu CYP2C19 se ve sledovaném období neměnilo. Naše výsledky ukazují zvyšující se množství proteinu CYP2C9 pouze v období mezi 5. a 6. týdnem IUV. Tato neshoda může souviset s rozdílnou citlivostí použitých detekčních metod. Expresi CYP2J2 na úrovni mRNA a proteinů v prenatalním období se zabývali Gaedigk et al. (2006). Zjistili, že exprese CYP2J2 na úrovni proteinů vykazovala značnou interindividuální variabilitu, na úrovni mRNA byla variabilita nižší. Intenzita exprese CYP2J2 v hepatocytech v našich vzorcích vykazovala nejvyšší interindividuální variabilitu ze studovaných CYP epoxygenáz. Expresi sEH se v hepatocytech během prenatalního vývoje výrazně nemění. Kromě CYP epoxygenáz a sEH se v hepatocytech exprimuje i receptor PPAR α . Jeho exprese je detekovatelná již v 5. týdnu a zvyšuje se až do 18. týdne IUV. PPAR α je centrální hráč v katabolismu mastných kyselin a udržování homeostázy glukózy (Peeters et Baes, 2010). Interakce PPAR α s ligandy během prenatalního vývoje může být důležitá v adaptaci chromatinové struktury na přísun živin, kterým bude potomek vystaven po narození. Nevhodné metabolické naprogramování, např. nevyváženou stravou matky během těhotenství, je spojováno s vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních a metabolických chorob potomků v dospělosti (Rees et al., 2008).

Protože játra během intrauterinního vývoje plní hematopoetickou funkci, nachází se zde velké množství vyvíjejících se krevních elementů. U některých krevních elementů jsme prokázali slabou expresi CYP epoxygenáz a silnou, převážně jadernou, expresi PPAR α . Expresi sEH zde detekována nebyla. Nedávné studie prokázaly vliv CYP epoxygenáz a sEH na hematopoézu a na angiogenezi embryí ryby *Danio rerio*

(„zebrafish“). Li et al. (2015) prokázali, že 11,12-EET je nezbytný pro zahájení specifikace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk. Frömel et al. (2012) prokázali, že inhibice aktivity sEH u rybích embryí vede k poklesu množství hematopoetických progenitorových buněk a k alteracím ve vývoji žilního systému (kaudálního plexu), změny ve vývoji arterií prokázány nebyly. Embrya s nedostatkem sEH také mají menší oči.

Všechny sledované proteiny byly detekovány také v ledvinách. Během prenatálního vývoje se vnější část kůry ledvin označuje jako neogenní zóna. Je to místo vzniku nových nefronů. V této oblasti jsou exprimovány všechny studované epoxygenázy. Expres sEH zde ovšem prokázána nebyla. Tato oblast je rovněž pozitivní na PPAR α .

Hlavním místem exprese CYP epoxygenáz v ledvinách během prenatálního období i v dospělosti je tubulární systém. Nejvíce exprimovanou izoformou v prenatálním období je CYP2C9. Expres CYP2C8 a 2C9 je vyšší v proximálních tubulech než ve zbytku tubulárního systému (Henleově kličce, distálních tubulech a sběracích kanálcích). Expres CYP2C19 a 2J2 je v celém tubulárním systému srovnatelná. Expres CYP2J2 je mezi 10. a 20. týdnem IUV vyšší v porovnání s dospělou tkání. Zvýšení exprese CYP2J2 nastává přibližně v době, kdy začíná ultrafiltrace. Expresi CYP2J2 v ledvinách na úrovni mRNA během prenatálního vývoje potvrdili Gaedigk et al. (2004). Naše výsledky ukazují, že v dospělosti je expres mezi jednotlivci variabilní. Expres CYP2C8 a 2J2 je vyšší v proximálních tubulech než ve zbytku tubulárního systému, rozložení exprese CYP2C9 a 2C19 je opačné. Stejně jako CYP epoxygenázy, nejvyšší expres sEH je detekována v tubulárním systému. Proximální tubuly vykazují vyšší intenzitu exprese než zbytek tubulárního systému. V proximálních tubulech je také vyšší expres PPAR α než ve zbytku tubulárního systému.

EETs mají v ledvinách specifické funkce. Regulují průtok krve glomerulem, uvolňování reninu, transport iontů a rovněž stimulují proliferaci renálního epitelu (nejúčinnější je regioizomer 14,15-EET) (Capdevila et al., 2000). Dalším možným vysvětlením zvýšené exprese CYP2J2 v ledvinách zárodků oproti dospělým může být určitá souvislost mezi CYP2J2 a aktivitou metaloproteináz (MMP). Na myších s deficiencí MMP-9 bylo prokázáno, že MMP-9 je hlavním regulátorem počtu nefronů, protože zabraňuje apoptóze nefronů během vývoje (Arnould et al., 2009). Jiang et al.,

(2007) prokázali, že CYP2J2 a jeho metabolity v nádorových buňkách zvyšují metastatický potenciál právě zvýšením exprese a aktivity MMP-9. Myší ortolog enzymu CYP2J, Cyp2j5, je regulován během vývoje (Ma et al., 1999).

V renálních tělískách byla slabá exprese CYP epoxygenáz a sEH prokázána v Bowmanově pouzdře. Exprese PPAR α byla prokázána v glomerulech i Bowmanově pouzdře. Po 12. týdnu vývoje se exprese PPAR α v glomerulech zvyšuje. K tomu dochází přibližně v době, kdy v ledvinách začíná ultrafiltrace. PPAR α v ledvinách se účastní metabolismu mastných kyselin a podílejí se na regulaci homeostázy vodního hospodářství (Tachibana et al., 2006). PPAR α také zvyšuje expresi nefrinu, který je nezbytný pro správnou funkci filtrační bariéry (Ren et al., 2005).

Jak bylo uvedeno výše, PPAR α se podílí na regulaci exprese CYP epoxygenáz a sEH (Rakhshandehroo et al., 2010). Významnou skupinu ligandů PPAR α představují fibráty. Fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil se využívají v klinické praxi k léčbě hyperlipidemií. Fibrát WY-14643 je experimentálně používán ke specifické aktivaci PPAR α (Ng et al., 2008).

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

CYP epoxygenázy se účastní také metabolismu léčiv a jejich zvýšená exprese v nádorech může přispívat k mnohočetné lékové rezistenci inaktivací protinádorových léčiv (Gillet et Gottesman, 2010). CYP2C metabolizují přibližně 20 % klinicky užívaných léčiv, včetně protinádorových jako je paklitaxel, bexaroten, cyklofosamid, ifosfamid, imatinib mesylát, idarubicin, tamoxifen a tretionin (Scripture et al., 2005). Ačkoliv metabolismus xenobiotik cytochromy P450 představuje určitý typ ochrany buněk proti potencionálně škodlivým molekulám, jejich exprese v prenatálním vývoji může být zodpovědná za vývojovou toxicitu léčiv a polutantů z prostředí. Změny v expresi těchto CYPs způsobené xenobiotiky mohou mít pro vyvíjející se organismus fatální následky.

Expresa CYP epoxygenáz je ovlivněna jaderným receptorem PPAR α . Mezi ligandy PPAR α patří také řada polutantů z prostředí, jako jsou ftaláty, trichloretylen, a industriálně využívané surfaktanty, např. perfluorooktanová (PFOA) a perfluorononanová kyselina (PFNA) a perfluorooctansulfát (PFOS), které se využívají např. pro povrchovou úpravu textilií, v kosmetice, lubrikantech, zpomalovačích hoření a nepřilnavých povrchů na nádobí (Abbott et al., 2007; Wolf et al., 2010). Výše jmenované průmyslové surfaktanty mají negativní dopad na prenatální vývoj myších zárodků, zprostředkovan právě PPAR α . U myši s lidským PPAR α tento efekt pozorován není. Je ovšem známo, že lidský PPAR α vyžaduje k aktivaci vyšší koncentrace ligandů než myši PPAR α (Albrecht et al., 2013).

Výše zmíněný ligand PPAR α trichloretylen je známý teratogen. Bylo prokázáno, že během embryonálního vývoje kuřete způsobuje trichloretylen změny v expresi CYP2C, které mají za následek nesprávný vývoj srdce u zárodků (Makwana et al., 2013). Zda je ale tato změna exprese CYP epoxygenáz způsobena aktivací receptoru PPAR α není jasné.

7 ZÁVĚR

- Na základě řady laboratorních pokusů, uvedených v experimentální části, byla prokázána exprese CYP2C8, 2C9, 2C19 a 2J2, sEH a PPAR α během prenatalního vývoje člověka v období od 5. do 20. týdne IUV.
- Expresce CYP2J2 je během prenatalního vývoje ve střevním epitelu a tubulárním systému ledvin vyšší než v dospělosti. V dospělosti nebyla prokázána exprese CYP2J2 u všech jedinců. Během prenatalního vývoje dochází ke zvýšení exprese CYP2J2 v tubulárním systému ledvin přibližně v době, kdy začíná ultrafiltrace.
- Rozložení exprese CYP epoxygenáz a sEH v buňkách střevního epitelu a v renálním parenchymu naznačuje, že tyto enzymy a jejich metabolity ovlivňují diferenciaci buněk. Málo diferencované buňky ve střevních kryptách exprimují CYP2C8 a 2C9 více, než diferencované buňky v apikálních částech klku. Distribuce sEH je opačná, v oblasti krypt je slabší než v apikálních částech klku. Buňky neogenní zóny ledvin představují buňky nediferencované, ze kterých vznikají nové nefrony. Tato oblast vykazuje expresi CYP epoxygenáz, ale je negativní na sEH.

NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

Perspektivy do budoucna:

Na základě profilů exprese CYP epoxygenáz, sEH a PPAR α v prenatálním období je možné se domnívat, že tyto proteiny a jejich metabolity hrají ve vývoji určitou roli v diferenačním procesu jednotlivých tkání a orgánů. Kyselina arachidonová je pro prenatální vývoj člověka nezbytná. Je to nedílná součást lidské stravy, je substrátem CYP epoxygenáz a zároveň ligandem PPAR α , stejně jako její metabolity EETs a DHETs.

Protože exprese CYP epoxygenáz a sEH může být potenciálně ovlivněna řadou léčiv a polutantů z prostředí, je další výzkum přesné role těchto proteinů během prenatálního vývoje velmi žádoucí.

8 SEZNAM ZKRATEK

AA	arachidonová kyselina
ABC	ATP-vázající kazeta (ATP- binding cassette)
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce závislá na vazbě ligandu (ligand-dependent activation function 2)
AMP	adenosinmonofosfát
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenic protein)
CEA	karcinoembryonální antigen
CBP	CREB-binding protein
CYP / CYPs	cytochrom P450 / cytochromy P450
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DBD	vazebná doména pro DNA (DNA-binding domain)
ddH ₂ O	deionizovaná voda
dH ₂ O	destilovaná voda
DHET	dihydroxyeikosatrienové kyseliny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EET / EETs	epoxyeikosatrienová kyselina / epoxyeikosatrienové kyseliny
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
EMD 392949	(S)-4-o-tolylsulfanyl-2-(4-trifluormethyl-phenoxy)butyric acid
EphB4	efrinový receptor B4 (ephrin type-B receptor 4)
EPHX2	epoxid hydroláza 2
ERK1	extracellular signal-regulated kinase
FABP	protein vázající mastné kyseliny (fatty acid binding protein)
FGF	růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
GST	glutathion-S-transferáza
HAT	histon acetyl transferáza
HDAC	histon deacetyláza
HEK293	buněčná linie odvozená z lidské embryonální ledviny (human embryonic kidney 29)
HepG2	buněčná linie odvozená z lidského hepatocelulárního karcinomu (hepatocellular carcinoma)

HLA-1	hlavní histokompatibilní komplex
HT-29	buněčná linie dovozená z lidského kolorektálního adenokarcinomu (human colorectal adenocarcinoma)
IUV	intrauterinní vývoj
LBD	vazebná doména pro ligand (ligand-binding domain)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen activated-protein kinase)
MDR	mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance)
MMP9	matrixová metaloproteináza 9
mRNA	mediátorová RNA
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAT	arylamín N-acetyltransferáza
N-CoR	jaderný korepresor receptorů (nuclear receptor corepressor)
NR1C1	jaderný receptor 1C1
OCT4	oktamer-vázající protein 4 (octamer-binding transkription factor 4)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBP	PPARs vázající protein
PFNA	perfluorononanová kyselina
PFOA	perfluoroktanová kyselina
PFOS	perfluorooctansulfát
PGC-1 α	PPAR γ coactivator 1 α
PI3K	fosfoinositol-3-kináza
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů
PPRE	responzivní element proliferátorů peroxizómů
RXR	retinoidní X receptor
SDS	sodium dodecyl sulfát
sEH	solubilní epoxid hydroláza
SMRT	tlumící mediátor pro retinoidy a thyroïdní hormony (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor)
Src	Src kináza
STAT	přenašeče signálu a aktivátory transkripce (signal transducers and activators of transcription)
SULT	sulfotransferáza

UGT	uridin difosfo-(UDP) glukuronyltransferáza	
UTR	netranslatovaný region (untranslated region)	
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)	
WY-14643	pirixinová kyselina pyrimidinylthio]acetic acid)	([4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-

9 POUŽITÁ LITERATURA

1. Abbott BD, Wolf CJ, Schmid JE, Das PK, Zehr RD, Helfant L, Nakayama S, Lindstrom AB, Strynar MJ, Lau C. Perfluorooctanoic acid-induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Toxicol Sci.* 2007; 98(2):571-581.
2. Abbott BD, Wood CR, Watkins AM, Das KP, Lau CS. Peroxisome proliferator-activated receptors α , β , and γ mRNA and protein expression in human fetal tissues. *PPAR Res.* 2010; 2010:690907.
3. Albrecht PP, Torsell NE, Krishnan P, Ehresman DJ, Frame SR, Chang SC, Butenhoff JL, Kennedy GL, Gonzales FJ, Peters JM. A species difference in the peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent response to the developmental effects of perfluorooctanoic acid. *Toxicol Sci.* 2013; 131(2):568-582.
4. Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol.* 1999; 277(3):G631-641.
5. Anderson SP, Howroyd P, Liu J, Qian X, Bahnemann R, Swanson C, Kwak MK, Kensler TW, Corton JC. The transcriptional response to a peroxisome proliferator-activated receptor α agonist includes increased expression of proteome maintenance genes. *J Biol Chem.* 2004; 279(50):52390-52398.
6. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001; 81(3):1269-1304.
7. Arnould C, Lelièvre-Pégorier M, Ronco P, Lelogt B. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(10):2171-2180.
8. Baguley BC. Multidrug resistance in cancer. In: Zhou J, editor. *Multidrug resistance in cancer (Methods in Molecular Biology, vol. 596)*. New York: Humana Press; 2010; p. 1-14.
9. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999; 4(4):585-595.
10. Barbier O, Fontaine C, Fruchart JC, Staels B. Genomic and non-genomic interactions of PPAR α with xenobiotic-metabolizing enzymes. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(7):324-330.
11. Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002; 16(19):2530-2543.

12. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11:127-152.
13. Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics.* 2007; 17(9):731-742.
14. Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B. Evidence for the presence of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) alpha nad gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPAR gamma activation modulates the effects of interleukin-1 on rat chondrocytes. *J Biol Chem.* 2000; 275(16):12243-12250.
15. Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 2008; 40(1):1-100.
16. Burns KA, Vanden Heuvel JP. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1771(8):952-960.
17. Bystrom J, Wray JA, Sugden MC, Holness MJ, Swales KE, Warner TD, Edin ML, Zeldin DC, Gilroy DW, Bishop-Bailey D. Endogenous epoxygenases are modulators of monocyte/macrophage activity. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26591.
18. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenases. *J Lipid Res.* 2000; 41(2):163-181.
19. Carlson BM. *Human Embryology and developmental biology.* Elsevier Saunders, 2013.
20. Corton JC, Fan LQ, Brown S, Anderson SP, Bocos C, Cattley RC, Mode A, Gustafsson JA. Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals. *Mol Pharmacol.* 1998; 54(3):463-473.
21. de Vogel-van den Bosh H, Bünger M, de Groot PJ, Bosch-Vermeulen H, Hooiveld GJEJ, Müller M. PPARalpha-mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC Genomics.* 2008; 9:231-243.
22. DeLoia JA, Zamboni WC, Jones JM, Strychor S, Kelley JL, Gallion HH. Expression and activity of taxane-metabolizing enzymes in ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(2):355-360.
23. Dostálek M. *Farmakokinetika.* Praha: Grada Publishing, 2006.
24. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47(4):624-630.
25. Dvorak P, Dvorakova D, Hampl A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett* 2006; 580(12):2869-2874.

26. Enayetallah AE, French RA, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *J Mol Histol.* 2006; 37(3-4):133-141.
27. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(4):447-454.
28. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, Fanos V. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J Cell Physiol.* 2012; 227:1257-1268.
29. Fournier T, Tsatsaris V, Handschub K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta.* 2007; 28(2-3):65-76.
30. Freedman RS, Wang E, Voicescu S, Patenia R, Bassett RL Jr, Deavers M, Marincola FM, Yang P, Newman RA. Comparative analysis of peritoneum and tumor eicosanoids and pathways in advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(19):5736-5744.
31. Frömel T, Jungblut C, Hu J, Trouvain C, Barbosa-Sicard E, Popp R, Liebner S, Dimmeler S, Hammock BD, Fleming I. Soluble epoxide hydrolase regulates haematopoietic progenitor cell function via generation of fatty acid diols. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 109(25):9995-10000.
32. Gaedigk A, Baker DW, Totah RA, Gaedigk R, Pearce RE, Vyhldal CA, Zeldin DC, Leeder JS. Variability of CYP2J2 expression in human fetal tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319(2):523-532.
33. Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesier E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol.* 2009; 332:273-286.
34. Gilbert SF. *Developmental biology*, ninth edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2010. ISBN:978-0878933846.
35. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. In: Zhou J, editor. *Multidrug resistance in cancer (Methods in Molecular Biology, vol. 596)*. New York: Humana Press; 2010; p. 47-76.
36. Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(10):3028-3036.
37. Grabacka M, Reiss K. Anticancer properties of PPAR α -effects on cellular metabolism and inflammation. *PPAR Res.* 2008; 2008:930705.
38. Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth – a review. *Placenta.* 2002; 23(Suppl A):S28-S38.

39. Hall MG, Quignodon L, Desvergne B. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ in the brain: facts and hypothesis. *PPAR Res.* 2008; 2008:780452.
40. Harris TR, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase: gene structure, expression and deletion. *Gene.* 2013; 526:61-74.
41. Huin C, Corriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Krémarik-Bouillaud P, Domenjoud L, Bécuwe P, Schohn H, Ménard D, Dauca M. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48(5):603-611.
42. Cheema SK, Agellon LB. The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated via peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem.* 2000; 275(17):12530-12536.
43. Chen C, Wei X, Rao X, Wu J, Yang S, Chen F, Ma D, Zhou J, Dackor RT, Zeldin DC, Wang DW. Cytochromes P450 2J2 is highly expressed in hematologic malignant diseases and promotes tumor cell growth. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336(2):344-355.
44. Chen H, Egan JO, Chiu JF. Regulation and activities of alpha-fetoprotein. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7(1-2):11-41.
45. Chen Y, Jimenez AR, Medh JD. Identification and regulation of novel PPAR- γ splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1795(1-2):32-43.
46. Cheranov SY, Karpurapu M, Wang D, Zhang B, Venema RC, Rao GN. An essential role for SRC-activated STAT-3 in 14,15-EET-induced VEGF expression and angiogenesis. *Blood.* 2008; 111(12):5581-5591.
47. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferation-activated receptor alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998; 273(40):25573-25580.
48. Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta.* 2005; 26:Suppl A:S70-S75.
49. Jiang JG, Chen CL, Card JW, Yang S, Chen JX, Fu XN, Ning YG, Xiao X, Zeldin DC, Wang DW. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(11):4707-4715.
50. Jiang JG, Ning YG, Chen C, Ma D, Liu ZJ, Yang S, Zhou J, Xiao X, Zhang XA, Edin ML, Card JW, Wang J, Zeldin DC, Wang DW. Cytochrome P450 epoxygenase promotes human cancer metastasis. *Cancer Res.* 2007; 67(14):6665-6674.

51. Jiao HL, Zhao BL. Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 185(3):172-179.
52. Johansson C, Strak A, Sandberg M, Ek B, Rask L, Meijer J. Tissue specific basal expression of soluble murine epoxide hydrolase and effects of clofibrate on the mRNA levels in extrahepatic tissues and liver. *Arch Toxicol.* 1995; 70(1):61-63.
53. Kaminsky LS, Zhang QY. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(12):1520-1525.
54. Kersten S, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B, Wahli W. The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB J.* 2001; 15(11):1971-1978.
55. Kim DH, Vanella L, Inoue K, Burgess A, Gotlinger K, Manthathi VL, Koduru SR, Zeldin DC, Falck ML, Schwartzman ML, Abraham NG. 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 Dev.* 2010; 19(12):1863-1873.
56. Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005; 51(2):85-94.
57. Koukouritaki SB, Manro JR, Marsh SA, Stevens JC, Rettie AE, McCarver DG, Hines RN. Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308:965-974.
58. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999; 4(4):597-609.
59. Laple F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, Kivisto KT. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics.* 2003; 13(9):565-575.
60. Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem.* 2002; 277(10):8226-8234.
61. Leclerc J, Tournel G, Courcot-Ngoubo N, Pottier N, Lafitte JJ, Jaillard S, Mensier E, Lhermitte M, Broly F, Lo-Guidice JM. Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral tissues: differential expression in non-small cell lung cancers. *Biochimie.* 2010; 92(3):292-306.

62. Lee CA, Neul D, Clouser-Roche A, Dalvie D, Wester MR., Jiang Y, Jones JP3rd, Freiwald S, Zientek M, Totah RA. Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38:347-356.
63. Li P, Lahvic JL, Binder V, Pugach EK, Riley EB, Tamplin OJ, Panigrahy D, Bowman TV, Barrett FG, Heffner GC, McKinney-Freeman S, Schlaeger TM, Daley DQ, zeldin DC, Zon LI. Epoxyeicosatrienoic acids enhance embryonic haematopoiesis and adult marrow engraftment. *Nature.* 2015; 523(7561):468-471.
64. Liang H, Kowalczyk P, Junco JJ, Klug-De Santiago HL, Malik G, Wei SJ, Slaga TJ. Differential effects on lung cancer proliferation by agonists of glucocorticoid and PPAR α receptors. *Mol Carcinog.* 2014; 53(9):753-763.
65. Ma J, Qu W, Scarborough PE, Tomer KB, Moomay CR, Maronpot R, Davis LS, Breyer MD, Zeldin DC. Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P450 highly expressed in kidney. *J Biol Chem.* 1999; 274(25):17777-17788.
66. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2010; 14(12):2697-2701.
67. Makwana O, Ahles L, Lencinas A, Selmin OI, Runyan RB. Low-dose trichlorethylene alters cytochrome P450-2C subfamily expression in the developing chick heart. *Cardiovasc Toxicol.* 2013; 13(1):77-84.
68. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403(6769):501-502.
69. McFadyen MCE, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(3):363-371.
70. Megliorino R, Shi FD, Peng XX, Wang X, Chan EK, Tan EM, Zhang JY. Autoimmune response to anti-apoptotic protein survivin and its association with antibodies to p53 and c-myc in cancer detection. *Cancer Detect Prev* 2005; 29(3):241-248.
71. Mellor HR, Callaghan R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* 2008; 81(4):275-300.
72. Ménard D, Beaulieu JF, Boudreau F, Perreault N, Rivard N, Vachon PH. Gastrointestinal tract. In: Unsicker K, Kriegelstein K, editors. *Cell Signaling and growth factors in development.* Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH; 2006; p. 755-790.
73. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1771(8):991-998.
74. Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(56):8085-8091.

75. Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology*. 1999; 116:702-731.
76. Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathway of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17(3):275-290.
77. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Mol Cell Biol*. 2006; 26(8):3266-3281.
78. Narjoz C, Favre A, McMullen J, Kiehl P, Montemurro M, Figg WD, Beaune P, de Waziers I, Rochat B. Important role of CYP2J2 in protein kinase inhibitor degradation: a possible role in intratumor drug disposition and resistance. *PLoS One*. 2014; 9(5):e95532.
79. Nelson DR. The cytochrome P450 homepage. *Hum Genomics* 2009; 4(1):59-65.
80. Ng VY, Huang Y, Reddy LM, Falck JR, Lin ET, Kroetz DL. Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Drug Metab Dispos*. 2007; 35(7):1126-1134.
81. Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Cwjertka K. Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi, I. typická MDR. *Klin onkol* 2000; 13(speciál 2):4-9.
82. Pacifici GM, Temellini A, Giuliani L, Rane A, Thomas H, Oesch F. Cytosolic epoxide hydrolase in humans: development and tissue distribution. *Arch Toxicol*. 1988; 62(4):254-257.
83. Panigrahy D, Kaipainen A, Greene ER, Huang S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(4):723-735.
84. Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnés CM, Fannon M, Laforme AM, Chaponis DM, Folkman J, Kieran MW. PPAR α agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(3):985-990.
85. Panigrahy D, Kalish BT, Huang S, Bielenberg DR, Le HD, Yang J, Edin ML, Lee CR, Benny O, Mudge DK, Butterfields CE, Mammoto A, Mammoto T, Inceoglu B, Jenkins RL, Simpson MA, Akino T, Lih FB, Tomer KB, Ingber DE, Hammock BD, Falck JR, Manthati VL, Kaipainen A, D'Amore PA, Puder M, Zeldin DC, Kieran MW. Epoxyeicosanoids promote organ and tissue regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(33):13528-13533.
86. Papaioannou VE. Ontogeny, pathology, oncology. *Int J Dev Biol* 1993; 37:33-37.

87. Park CY, Tseng D, Weissman IL. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther* 2009; 17:219-230.
88. Peeters A, Baes M. Role of PPAR α in hepatic carbohydrate metabolism. *PPAR Res.* 2010; 2010:572405.
89. Peters JM, Shah YM, Gonzales FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(3):181-195.
90. Pinot F, Grant DF, Spearow JL, Parker AG, Hammock BD. Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50(4):501-508.
91. Piřha J. Lesk a bída fibrátů. *Interní Med.* 2001; 4:170-174.
92. Pozzi A, Ibanez MR, Gatica AE, Yang S, Wei S, Mei S, Falck JR, Capdevila JH. Peroxisomal proliferator-activated receptor- α -dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2007; 282(24):17685-17695.
93. Pozzi A, Propescu V, Yang S, Mei S, Shi M, Puolitaival SM, Caprioli RM, Capdevila JH. The anti-tumorigenic properties of peroxisomal proliferator-activated receptor α are arachidonic acid epoxidase-mediated. *J Biol Chem.* 2010; 285(27):12840-12850.
94. Prueksaritanont T, Richards KM, Qiu Y, Strong-Basalysa K, Miller A, Li C, Eisenhandler R, Carlini EJ. Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes. *Pharm Res.* 2005; 22(1):71-78.
95. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPAR α : energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal.* 2010; 8:e002.
96. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 2010; 2010:612089.
97. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005; 42(4):405-426.
98. Rees WD, McNeil CJ, Maloney CA. The role of PPARs in the fetal origins of metabolic health and diseases. *PPAR Res.* 2008; 2008:459030.
99. Ren S, Xin C, Beck KF, Saleem Ma, Mathieson P, Pavenstädt H, Pfeilschifter J, Huwiler A. PPAR α activation upregulates nephrin expression in human embryonic kidney epithelial cells and podocytes by a dual mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338(4):1818-1824.
100. Reynders V, Loitsch S, Steinhauer C, Wagner T, Steinhilber D, Bargon J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) down-regulation in cystic fibrosis lymphocytes. *Respir Res.* 2006; 7:104-118.

101. Ridolfi L, Petrini M, Fiammenghi L, Riccobon A, Ridolfi R. Human embryo immune escape mechanisms rediscovered by the tumor. *Immunobiology* 2009; 214(1):61-76.
102. Richet L, Lamboley C, Viollon-Abadie C, Grass P, Hartmann N, Laurent S, Heyd B, Manton G, Chboud SD, Staedtler F. Effect of clofibric acid on mRNA expression profiles in primary cultures of rat, mouse and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 191(2):130-146.
103. Richet L, Tuschl C, Viollon-Abadie C, Blanchard N, Bonet A, Halkic N, Wimmer E, Dolgos H, Mueller SO. Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluoromethylphenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36(4):702-714.
104. Sadler TW. *Langmanova lékařská embryologie*. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN: 978-80-247-2640-3.
105. Saidi SA, Holland CM, Charnock-Jones DS, Smith SK. In vitro and in vivo effects of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer.* 2006; 5:13.
106. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20:695-723.
107. Scripture CD, Sparreboom A, Figg WD. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2005; 6(10):780-789.
108. Sell S. Stem cells and cancer: An introduction. In: Majumred S, editor. *Stem cells and cancer*. Springer; 2009, p. 1-31.
109. Shaban Z, Soliman M, El-Shazly S, El-Bohi K, Abdelazeez A, Kehelo K, Kim HS, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. AhR and PPAR α : antagonistic effects on CYP2B and CYP3A4, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica.* 2005; 35(1):51-68.
110. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31(1):27-36.
111. Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem* 2002; 277:6536-6541.
112. Shen GF, Jiang JG, Fu XN, Wang DW. Promotive effects of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on the proliferation of tumor cells. *Ai Zheng.* 2008; 27(11):390-395.
113. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23(4):241-256.

114. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 2004; 43:55-90.
115. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*. 2015; 569(2):182-190.
116. Stoilov I. Cytochrome P450: coupling development and environment. *Trends Genet*. 2001; 17:629-632.
117. Strakova N, Ehrmann J, Bartos J, Malikova J, Dolezel J, Kolar Z. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors. *Neoplasma*. 2005; 52(2):126-136.
118. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, Lee WJ, Holman NA, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell line MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*. 2002; 34(4):165-71.
119. Tachibana K, Anzai N, Ueda C, Katayama T, Kirino T, Takahashi R, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, Hamakubo T, Ueda Y, Arai H, Sakai J, Kodama T, Doi T. Analysis of PPAR alpha function in human kidney cell line using siRNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf.)*. 2006; 50:257-258.
120. Tanaka H, Kamita SG, Wolf NM, Harris TR, Wu Z, Morisseau C, Hammock BD. Transcriptional regulation of the human soluble epoxide hydrolase gene EPHX2. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1779(1):17-27.
121. Treluyer JM, Gueret G, Cheron G, Sonnier M, Cresteil T. Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility. *Pharmacogenetics*. 1997; 7(6):441-452.
122. Umemoto T, Fujiki Y. Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . *Genes Cells*. 2012; 17(7):579-596.
123. Urbanska K, Pannizzo P, Grabacka M, Croul S, Del Valle L, Khalili K, Reiss K. Activation of PPAR α inhibits IGF-I-mediated growth and survival responses in medulloblastoma cell lines. *Int J Cancer* 2008; 123(5):1015-1024.
124. Vamecq J, Colet JM, Vanden Eynde JJ, Briand G, Porcher N, Rocchi S. PPARs: Interference with Warburg's effect and clinical anticancer trials. *PPAR Res*. 2012; 2012:304760.
125. Vanden Heuvel JP, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptors. In: McQueen CA, Bond J, Ramos K, editors. *Comprehensive toxicology (Cellular and molecular toxicology)*. New York: Elsevier; 2010, pp. 145-167.

126. Večeřa R, Zachařová A, Orolin J, Strojil J, Škottová N, Anzenbacher P. Fenofibrate-induced decrease of expression of CYP2C11 and CYP2C6 in rat. *Biopharm Drug Dispos.* 2011; 32(8):482-487.
127. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest.* 1995; 96(2):741-750.
128. Wang Y, Steinbeisser H. Molecular basis of morphogenesis during vertebrate gastrulation. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(14):2263-2273.
129. Webler AC, Michaelis UR, Poop R, Barbosa-Sicard E, Murugan A, Falck JR, Fisslthaler B, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008b; 295(5):C1292-1301.
130. Webler AC, Popp R, Korff T, Michaelis UR, Urbich C, Busse R, Fleming I. Cytochrome P450 2C9-induced angiogenesis is dependent on EphB4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008a; 28(6):1123-1129.
131. Wei X, Zhang D, Dou X, Niu N, Huang W, Bai J, Zhang G. Elevated 14,15-epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer.* 2014; 14:841.
132. Wen X, Wang JS, Backman JT, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil is a potent inhibitor of human cytochrome P450 2C9. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(11):1359-1361.
133. Wilkeming S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(8):1035-1042.
134. Wixtrom RN, Silva MH, Hammock BD. Cytosolic epoxide hydrolase in human placenta. *Placenta.* 1988; 9(5):559-563.
135. Wolf CJ, Zehr RD, Schmid JE, Lau C, Abbott BD. Developmental effects of perfluorononanoic acid in the mouse are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α . *PPAR Res.* 2010; 2010:282896.
136. Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol.* 1969; 25:1-47.
137. Wray JA, Sugden MC, Zeldin DC, Greenwood GK, Samsuddin S, Miller-Degraff L, Bradbury JA, Holness MJ, Warner TD, Bishop-Bailey D. The epoxygenases CYP2J2 activates the nuclear receptor PPAR α in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2009; 4(10):e7421.
138. Yan G, Chen S, You B, Sun J. Activation of sphingosine kinase-1 mediates induction of endothelial cell proliferation and angiogenesis by epoxyeicosatrienoic acids. *Cardiovasc Res.* 2008; 78(2):308-314.

139. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestel RG. Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(12):2144-2151.
140. Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily cotochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol.* 1997; 51(6):931-943.
141. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem.* 2001; 276(39):36059-36062.
142. Zhao X, Li LY. PPAR-alpha agonist fenofibrate induces renal CYP enzymes and reduces blood pressure and glomerular hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Nephrol.* 2008; 28(4):598-606.

10 SEZNAM PUBLIKACÍ A PREZENTACÍ

1. Práce související s dizertační prací

A) Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Cizkova K, Konieczna A, Erdosova B, Ehrmann J. Time-dependent expression of cytochrome P450 epoxygenases during human prenatal development. *Organogenesis* 2014; 10(1):53-61. (IF 2,800)

Cizkova K, Rajdova A, Ehrmann J. Spatio-temporal expression of peroxisome proliferator-activated receptor α during human prenatal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015; 116(4):361-6. (IF 2,377)

Cizkova K, Rajdova A, Ehrmann J. Soluble epoxide hydrolase as a potential key factor for human prenatal development. Přijato k publikaci v časopise *Cells, tissues, organs* (IF 2,137).

B) Přehledné / souborné vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Cizkova K, Konieczna A, Erdosova B, Lichnovska R, Ehrmann J. Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochrome P450: New way to overcome multidrug resistance? *J Biochem Biotechnol* 2012; 2012:656428. (IF 2,880)

C) Publikovaná abstrakta

Cizkova K, Konieczna A, Procházková J. Influence of methacarn fixation of immunohistochemistry. The 8th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 98th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 4th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc 2012, ISBN 978-80-87327-90-6.

Cizkova K, Erdosova B, Ehrmann J. Spatio-temporal distribution of CYP P450 epoxygenases in human embryos: importance for prenatal development. The 9th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 99th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 5th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc 2013, ISBN 978-80-7471-022-3.

Cizkova K, Steigerova J, Ehrmann J. The effect of fibrates on cell viability. 11. sympóziu molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou a Martinské dni nelékařských pracovníkov v patológii. Martin, Slovensko, 2015, ISBN 978-80-971340-7-5.

Cizkova K, Rajdova A, Ehrmann J. CYP epoxygenases and their relevance for human prenatal development. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2015; 159 Suppl 1:S6 (IF 1,200)

D) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

Cizkova K, Konieczna A, Procházková J. Vliv fixace v metacarnu na výsledek imunohistochemie. The 8th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, The 98th Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, The 4th Olomouc Days of Histology Laboratory Technicians, Olomouc 2012.

Cizkova K, Erdosova B, Ehrmann J. Spatio-temporal distribution of CYP P450 epoxygenases in human embryos: importance for prenatal development. Morphology 2014, 48th International Congress of The Czech Anatomical Society, 51st Lojda Symposium on Histochemistry, Brno 2014.

Cizkova K, Rajdova A, Ehrmann J. Spatio-temporal expression of peroxisome proliferator-activated receptor α during human prenatal development. Morphology 2014, 48th International Congress of The Czech Anatomical Society, 51st Lojda Symposium on Histochemistry, Brno 2014.

2. Práce nesouvisející s dizertační prací

A) Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Konieczna A, Erdosová B, Lichnovská R, Jandl M, Čížková K, Ehrmann J. Differential expression of ABC transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in developing human embryos. J Mol Histol 2011; 42(6):567-74. (IF 1,484)