

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Kateřina Koubová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role solubilní epoxidhydrolázy
v diferenciaci střevních buněk *in vitro***

Bakalářská práce

Kateřina Koubová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů a pod vedením Mgr. Kateřiny Čížkové, Ph.D.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

SOUHRN

Studium diferenciace buněk je důležitým nástrojem k poznávání nových mechanismů metabolismu různých látek a také k vývoji nových metod v léčbě onkologických onemocnění. V této bakalářské práci byla experimentálně studována role enzymu solubilní epoxidhydrolázy v diferenciaci střevních buněk *in vitro* na nádorové buněčné linii HT-29. Buňky v různých stupních diferenciace byly inkubovány s inhibítoem solubilní epoxidhydrolázy a jejich proliferační aktivita byla poté měřena spektrofotometricky. Dále se měřila relativní exprese markerů diferenciace intestinální alkalické fosfatázy a villinu po ovlivnění inhibítoem pomocí In Cell ELISy. Dalším krokem bylo semikvantitativní hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy, která se hodnotila u vzorků normální a nádorové tkáně od pacientů s kolorektálním karcinomem. Po použití inhibítora solubilní epoxidhydrolázy bylo pozorováno snížení proliferace u buněk nediferencovaných a během diferenciace. Relativní exprese markerů diferenciace byla u těchto buněk také snížena. V rámci semikvantitativního hodnocení pak bylo prokázáno snížení exprese solubilní epoxidhydrolázy v nádorové tkáni málo diferencovaných nádorů oproti zdravé tkáni u 6 z 8 pacientů. Může se tak spekulovat o tom, že solubilní epoxidhydroláza hraje zásadní roli při diferenciaci střevních buněk, a že by se jejich účinků dalo využít pro lokální ovlivnění nediferencovaných nádorových buněk, které představují pro pacienta větší nebezpečí a tyto nádory jsou více agresivní.

SUMMARY

Understanding of cell differentiation is an important tool for recognizing new mechanisms of metabolism of various substances and for developing of potential new treatments of oncological diseases. In this bachelor thesis, the potential role of soluble epoxide hydrolase (sEH) in cell differentiation of intestinal cells *in vitro* was studied using the tumor cell line HT-29. The cells in different stages of differentiation were incubated with the inhibitor of soluble epoxide hydrolase and their proliferation activity was measured by spectrophotometry. Then the relative expression of differentiation markers, intestinal alkaline phosphatase and villin, was measured by the In Cell ELISA method. Moreover, the expression of soluble epoxide hydrolase in normal and tumor tissue samples was detected immunohistochemically.

After the inhibitor treatment the decrease in proliferation of the undifferentiated and differentiating cells was observed. Similarly, relative expression of intestinal alkaline phosphatase and villin was lower in undifferentiated and differentiating cells after sEH inhibitor treatment in comparison to control cells. Moreover, the statistically significant decrease in sEH expression in tumor tissue in comparison to normal tissue was observed in 6/8 patients with undifferentiated colorectal carcinoma. It can be speculated that soluble epoxide hydrolase could play essential role during intestinal cells differentiation and these effects could be used for local treatment of undifferentiated tumor cells, which represent higher risk for patients.

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Kateřině Čížkové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a nové zkušenosti, které mi předala a dovedla mě k napsání této práce. Dále chci poděkovat Ústavu histologie a embryologie LF UP a Ústavu molekulární a klinické patologie LF UP. Také děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Histologická stavba trávicí soustavy	3
3.1.1 Tenké střevo	5
3.1.2 Tlusté střevo	7
3.2 Kolorektální karcinom	8
3.2.1 Klasifikace nádorů	10
3.3 Modely pro studium diferenciaci	12
3.4 Metabolismus kyseliny arachidonové	12
3.4.1 Solubilní epoxidhydroláza	13
3.4.3 Diferenciaci buněk a sEH	15
4 MATERIÁL A METODY	16
4.1 Biologický materiál	16
4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy	16
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	17
4.4.1 Kultivace buněčné linie HT-29	18
4.4.2 Aplikace inhibitoru solubilní epoxidhydrolázy	18
4.4.3 WST-1 test	19
4.4.4 In Cell ELISA	20
4.4.5 Imunohistochemické barvení	21
4.4.6 Hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy v tkáni kolorektálního karcinomu a normální intestinální tkáni	22
4.4.7 Statistické hodnocení	23
5 VÝSLEDKY	24
5.1 WST-1 test	24
5.2 In Cell ELISA	26

5.3 Hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy v tkáni kolorektálního karcinomu a normální intestinální tkáni	29
6 DISKUSE.....	32
7 ZÁVĚR	35
8 LITERATURA	36

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO dimethylsulfoxid

FBS fetální bovinní sérum

IAP intestinální alkalická fosfatáza

ICE In Cell ELISA (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay)

mM / μ M milimolární / mikromolární ($M = \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

NaBt butyrát sodný

PBS phosphate buffered saline, fosfátový pufr

PPAR α peroxisome proliferator-activated receptor α , receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů α

RT room temperature, pokojová teplota

SD standard deviation, směrodatná odchylka

sEH solubilní epoxidhydroláza

TBS Tris buffered saline, Trisový pufr

TPPU N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea

TRIS tris(hydroxymethyl)aminomethan

U jednotka látky (U/ml = jednotek na mililitr)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Struktura trávicí trubice.....	3
Obrázek č. 2: Krycí epitely trávicí soustavy, a) schéma epitelů, b) mikrofotografie epitelů.....	4
Obrázek č. 3: Struktura tenkého střeva s klky (villi).....	6
Obrázek č. 4: Struktura stěny tlustého střeva.....	8
Obrázek č. 5: Vývoj kolorektálního karcinomu.....	10
Obrázek č. 6: Klasifikace nádoru podle hloubky prorůstání tkání.....	11
Obrázek č. 7: Přehled metabolismu kyseliny arachidonové.....	13
Obrázek č. 8: Krystalická struktura dimeru solubilní epoxidhydrolázy se zvýrazněnými doménami.....	14
Obrázek č. 9: Reprezentativní mikrofotografie exprese solubilní epoxidhydrolázy ve zdravé tkáni (Z: 100x). Pacient č. 1: muž, 66 let.....	30
Obrázek č. 10: Reprezentativní mikrofotografie exprese solubilní epoxidhydrolázy v kolorektálním karcinomu (G3) (Z: 100x). Pacient č. 1: muž, 66 let.....	31

SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

Tabulka č. 1: Použité objemy butyrátu sodného, DMSO a TPPU v tripletu.....	18
Tabulka č. 2: Použité objemy butyrátu sodného, DMSO a TPPU v doubletu.....	19
Tabulka č. 3: Charakteristika pacientů, od kterých byly získány vzorky adenokarcinomu tlustého střeva a zdravé tkáně.....	22
Tabulka č. 4: Hodnocení intenzity exprese sEH v normální a nádorové tkáni u jednotlivých pacientů.....	29
Graf č. 1: Proliferace buněk HT-29 ovlivněných 5mM butyrátem sodným.....	24
Graf č. 2: Proliferace buněk HT-29 ovlivněných TPPU, a) buňky nediferencované, b) buňky během diferenciaci, c) buňky diferencované.....	25, 26
Graf č. 3: Změna exprese markerů diferenciaci IAP a villinu v diferencovaných buňkách HT-29 (5mM NaBt), a) IAP, b) villin.....	27
Graf č. 4: Změna exprese markerů diferenciaci IAP a villinu v buňkách HT-29 po ovlivnění TPPU v koncentracích 1μM a 10μM, a) IAP nediferencované, b) IAP během diferenciaci, c) IAP diferencované, d) villin nediferencované, e) villin během diferenciaci, f) villin diferencované.....	28
Graf č. 5: Medián semikvantitativního hodnocení exprese sEH v kolorektálním karcinomu (G3) a normální tkáni získaných od 8 pacientů (P = 0,027).....	30

1 ÚVOD

Studium diferenciace lidských buněk patří k důležitým výzkumným aktivitám, které souvisí s objevováním nových funkčních procesů v rámci jednotlivých buněk, a také přispívají ke zlepšování léčby nádorových onemocnění. V rámci střevních buněk se jedná o kolorektální karcinom, který patří k nejčastěji se vyskytujícím nádorům v České republice.

Ke zkoumání byl vybrán enzym běžně se vyskytující v lidském těle solubilní epoxidhydroláza (sEH), který hraje důležitou roli jak v metabolismu xenobiotik, tak v metabolismu endogenních látek. Jeho účinky na diferenciaci střevních buněk byly zkoumány použitím inhibitoru sEH na buněčně linii HT-29 odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva. Dále byla porovnávána změna exprese sEH ve zdravé a nádorové tkáni od pacientů pomocí imunohistochemického barvení.

Získané výsledky mohou sloužit ke zlepšení výběru terapeutických látek v rámci léčby nádorových onemocnění tlustého střeva na základě histologického určení stupně diferenciace nádorové tkáně a k pochopení procesů působení sEH ve zdravé i nádorové tkáni.

2 CÍLE PRÁCE

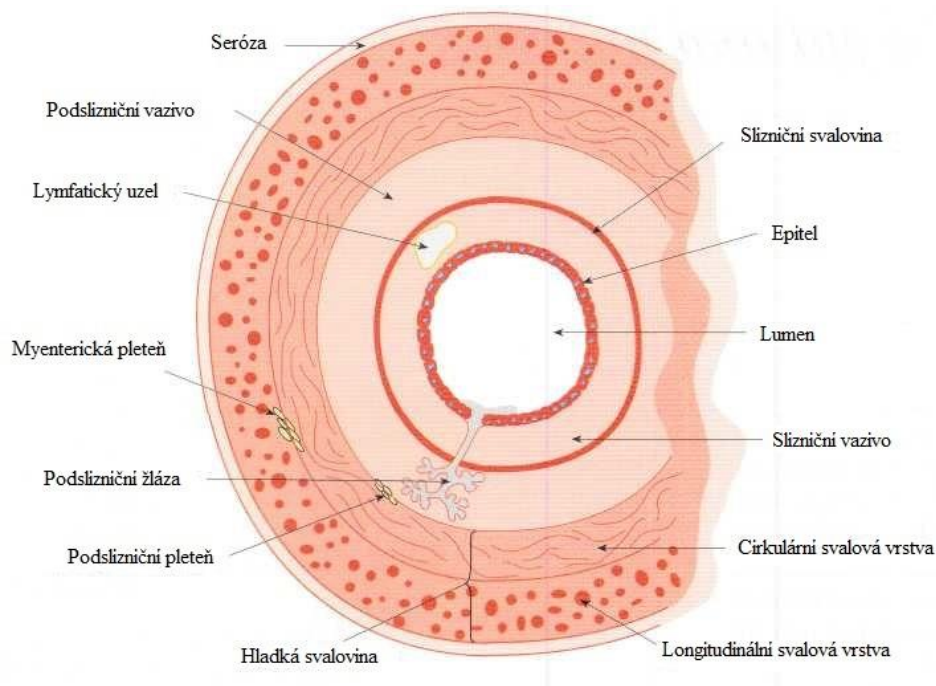
- Literární přehled pro uvedenou tematiku.
- Diferenciace buněčné linie HT-29 butyrátem sodným.
- Ovlivnění buněk inhibitorem solubilní epoxidhydrolázy (sEH).
- Stanovení proliferační aktivity buněk po ovlivnění inhibitorem sEH (WST-1 test).
- Sledování změn v expresi markerů diferenciace villinu a intestinální alkalické fosfatázy pomocí In Cell ELISy (stanovení v nediferencovaných a diferencovaných buňkách a buňkách během diferenciace).
- Imunohistochemická detekce a semikvantitativní hodnocení exprese sEH ve zdravé a nádorové tkáni (kolorektální karcinom).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

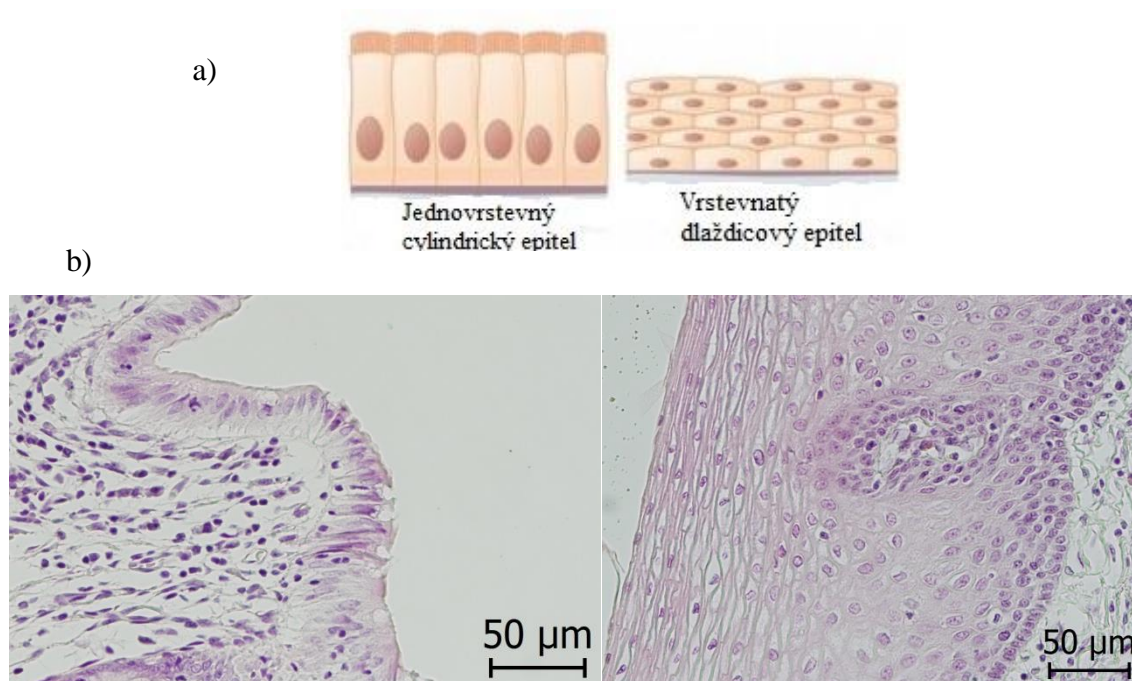
3.1 Histologická stavba trávicí soustavy

Trávicí soustava patří mezi nejdůležitější systém, kterým se tělo dostává do kontaktu s vnějším prostředím a díky kterému získává energii. Stavba trávicí soustavy tak v každé části musí být přizpůsobena své funkci, obsahovat funkční buňky, produkovat různé chemické látky a hraje roli v imunitě organismu. Stěna trávicí soustavy se skládá ze čtyř hlavních vrstev: sliznice (*tunica mucosa*), vrstva podslizničního vaziva (*tunica submucosa*), svalová vrstva (*tunica muscularis*) a adventicie nebo seróza (*tunica adventitia* nebo *tunica serosa*) (Obr. č. 1) (Martínek *et Vacek*, 2009; Mescher, 2010).

Sliznice zahrnuje epitelální výstelku (*lamina epithelialis*), která je všeobecně charakterizovaná apikobazální polarizací, funkčním uspořádáním, mezibuněčným kontaktem pomocí buněčných spojů a bazální membránou (*lamina propria*), na níž je epitel ukotven. Na začátku a konci trávicí soustavy, tedy v dutině ústní, jícnu a anální oblasti, se nachází vrstevnatý dlaždicový epitel, ve zbytku trávicí trubice je epitel jednovrstevný cylindrický (Obr. č. 2) (Lüllmann-Rauch, 2012).



Obrázek č. 1: Struktura trávicí trubice (převzato a upraveno dle GetRevising).



Obrázek č. 2: Krycí epitely trávicí soustavy, a) schéma epitelů (převzato a upraveno dle Owlcation), b) mikrofotografie epitelů (Z: 200x).

Funkcí epitelu trávicí soustavy je poskytnutí selektivně propustné membrány, umožnění přenosu a trávení potravy, umožnění absorpce produktů trávení, produkce hormonů, které ovlivňují aktivitu trávicí soustavy a tvorba hlenu pro snazší průchod potravy a ochranu samotného epitelu. Buněčný kontakt mezi buňkami epitelu vytváří spojovací komplex, který je složen ze za sebou uspořádaných mezibuněčných spojů: *zonula occludens*, *zonula adhaerens* a *desmosom*. Spojovací komplex společně s tight junctions (těsné spoje) slouží jako difuzní bariéra. V případě krycího epitelu sliznic dochází ke konstantní buněčné obnově, která je regulována proliferací, diferenciací a apoptózou buněk. Nové buňky vznikají proliferací kmenových buněk. Po zahájení diferenciacie se buňka blíží k apoptóze (Mescher, 2010; Lüllmann-Rauch, 2012).

Sliznice obsahuje po vrstvě epitelu dále slizniční vazivo (*lamina propria mucosae*) a slizniční svalovinu (*lamina muscularis mucosae*), která se nachází jen v jícnu, žaludku a střevu. Pod těmito vrstvami se nachází podslizniční vazivo, které obsahuje krevní a lymfatické cévy a také pletěň autonomních nervů (*plexus submucosus*). Dále se zde nachází svalová vrstva s buňkami hladké svaloviny, které jsou spirálovitě uloženy a rozdělují se do dvou dalších částí. Vnitřní část (směřující do lumen) je cirkulární (*stratum circulare*), vnější část longitudinální

(*stratum longitudinale*). Mezi těmito vrstvami je pruh cévně zásobené tkáně, ve které se nachází myenterická pletěň autonomních nervů (*plexus myentericus*). S nervovými pleteněmi, které dohromady tvoří enterický nervový systém, jsou spojeny i intersticiální Cajalovy buňky, které jsou spojeny s buňkami hladké svaloviny, a vytváří depolarizační vlny. Cajalovy buňky jsou inervovány z enterického nervového systému a způsobují tak kontrakce svaloviny ve střevech (Mescher, 2010; Lüllmann-Rauch, 2012).

Na povrchu se nachází seróza, která je tenkou vrstvou tkáně bohaté na cévní zásobení. Je pokryta plochým jednovrstevným epitelem – mezotelem (*mesothelium*), který je podložen vrstvou vaziva (*lamina propria serosae*). Seróza je navázána v břišní dutině na mezenteria a je tak napojena na pobřišnici (*peritoneum*). Adventicie je silná vrstva vaziva, která neobsahuje mezotel a nahrazuje serózu v místech, kde jsou orgány připojeny k okolním strukturám (např. část jícnu a dvanáctník) (Martínek *et* Vacek, 2009; Mescher, 2010; 2018; Lüllmann-Rauch, 2012).

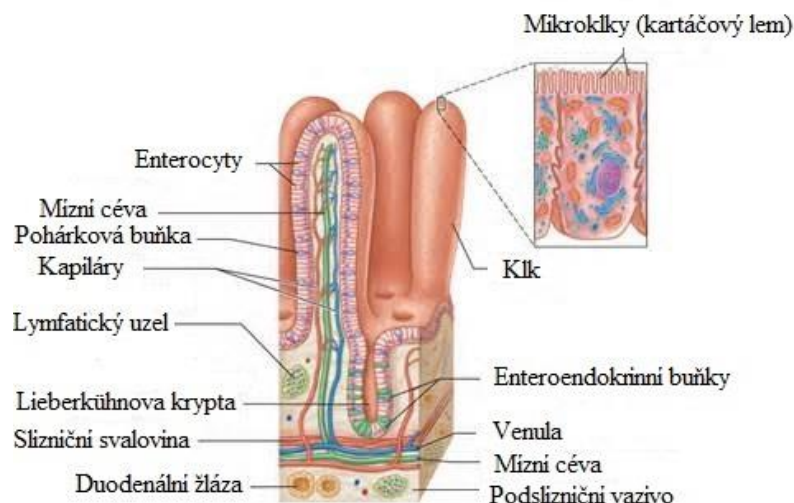
3.1.1 Tenké střevo

Tenké střevo je hlavním orgánem, ve kterém probíhá vstřebávání trávené potravy. Jeho délka je cca 3 m a skládá se z dvanáctníku (*duodenum*), lačníku (*jejunum*) a kyčelníku (*ileum*). Vnitřní stěna střeva se skládá ze stálých cirkulárních záhybů (*plicae circulares*), které jsou tvořeny sliznicí a podslizničním vazivem. Povrch tenkého střeva je pokryt klky (*villi intestinales*), které jsou vysoké 0,5–1,5 mm a vystupují do lumen střeva. Ve stromatu klků se nachází krevní a lymfatické (chylové) cévy, buňky vaziva a imunitní buňky. Klky jsou pokryté jednovrstevným cylindrickým epitelem. Buňky epitelu představují enterocyty, pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky a Panethovy buňky (Obr. č. 3) (Mescher, 2010; 2018; Lüllmann-Rauch, 2012).

Enterocyty jsou buňky nacházející se na klcích, každá s oválným jádrem, které se nachází v bazální části buňky. Vrcholová část enterocytů je pokryta mikrokly, které tvoří tzv. kartáčový lem krytý glykokalyxem. Kartáčový lem ještě více zvětšuje povrch tenkého střeva, a tak dochází k efektivnějšímu vstřebávání (resorpci) rozložené potravy. Produkované disacharázy a peptidázy umožňují rozklad disacharidů a peptidů na základní části těchto molekul (monosacharidy a aminokyseliny). Trávení tuků je výsledkem působení lipázy z pankreatu a žluči z jater. Mezi enterocyty se s menší frekvencí nacházejí pohárkové buňky, které produkují glykoproteinové muciny chránící vnitřní povrch střeva. Ve střevě se dále nacházejí Lieberkühnovy krypty

(*cryptae intestinales*), v nichž dochází k diferenciaci nových střevních buněk z multipotentních kmenových buněk. Na jejich dně ústí vývody pro Brunnerovy žlázy, které produkují mucin a hydrogenuhličitanové ionty (HCO_3^-). V bazální části Lieberkühnových krypt pod úrovní kmenových buněk se nacházejí Panethovy buňky, exokrinní buňky, které ve své cytoplasmě obsahují velká eosinofilní sekreční granula. Tato granula pomocí exocytózy vypouštějí lysozym, fosfolipázu A2 a defenziny, které napadají membrány mikroorganismů a bakteriální stěny (Mescher, 2010; Lüllmann-Rauch, 2012).

Buňky epitelu tenkého střeva žijí cca 5 dní, proto dochází v kryptách k diferenciaci nových střevních buněk. Na dně krypt se aktivují kmenové buňky, které přechází do mitózy a diferencující se buňky stoupají po stěně krypty k lumen střeva. V průběhu apoptózy je buňka uvolněna z bazální membrány (Mescher, 2010; 2018; Lüllmann-Rauch, 2012).



Obrázek č. 3: Struktura tenkého střeva s klky (villi) (převzato a upraveno dle DictBridgat).

Enteroendokrinní buňky se nacházejí podél celého tenkého střeva, sekretují střevní hormony (enterohormony) a tvoří zde difuzní neuroendokrinní systém. Produkované peptidy mají různé funkce jako kontrolu peristaltiky (gastrin, serotonin), regulaci sekrece hormonů potřebných pro trávení (sekretin) a také navození pocitu nasycení po jídle (cholecystokinin). V ileu se nacházejí další specializované buňky tzv. M buňky, které překrývají lymfoidní uzlíky (Peyerovy plaky). Tyto buňky jsou

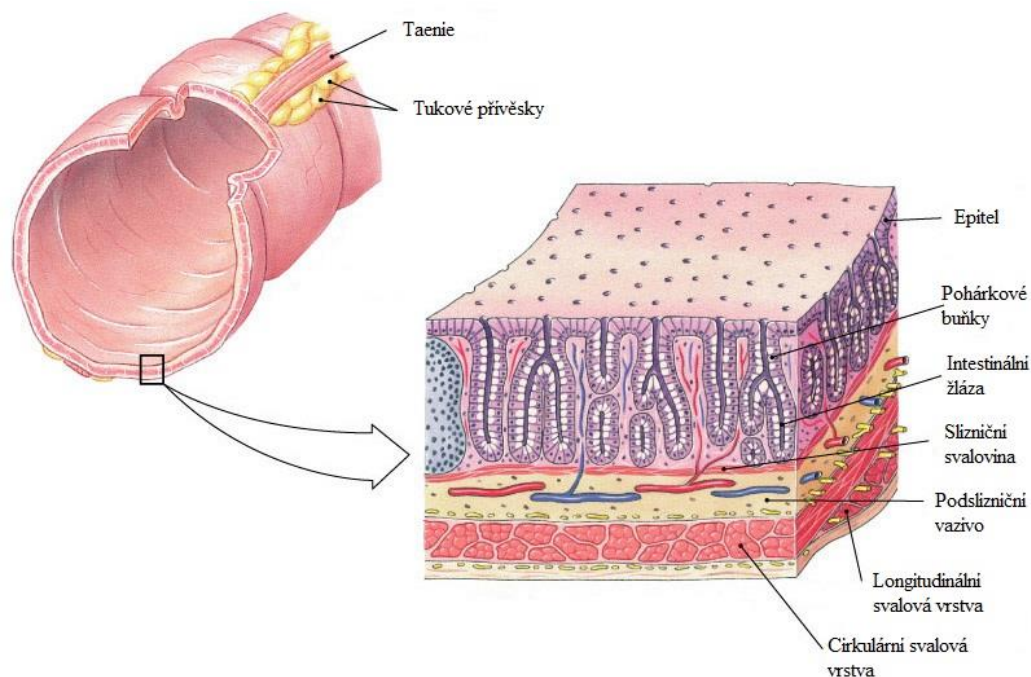
charakteristické přítomností invaginací bazální membrány, které obsahují mnoho intraepiteliálních lymfocytů a antigen-prezentujících buněk. M buňky selektivně pohlcují endocytózou antigeny, které transportují do makrofágů a lymfocytů. Makrofágy a lymfocyty pak putují do lymfoidních uzlin, kde se zahajuje odpověď proti nasbíraným antigenům (Mescher, 2010; Lüllmann-Rauch, 2012).

3.1.2 Tlusté střevo

Tlusté střevo je dlouhé asi 1,3 m a skládá se ze slepého střeva s apendixem (*intestinum caecum*), tračníku (*colon* a *sigmoideum*), konečníku (*rectum*) a análního kanálu (*analís canalis*). V tlustém střevu se již nenacházejí klky, ale je zde velké množství hlubokých Lieberkühnových krypt. Povrchový epitel je tvořen jednovrstevným cylindrickým epitelem, jehož buňky (kolonocyty) mají na apikální části mikrokilky. Mezi kolonocyty je více pohárkových buněk než v tenkém střevu, takže dochází k vyšší produkci hlenu na povrch střeva. Dále jsou zde ve zvýšené míře velké lymfatické uzlíky, které se rozšiřují do podslizničního vaziva. Na povrchu se nachází také endokrinní buňky (EC-buňky). Sliznice a podslizniční vazivo tvoří cirkulární řasy, které často mění svou polohu podle kontrakcí svaloviny. Tračník má ve své podélné svalovině tři pruhy tzv. taenie, které rozdělují svalovinu na tři tenké pruhy. Ve slepém střevu a v konečníku se toto rozdělení svaloviny nenachází. Povrch tlustého střeva je pokrytý adventicií nebo serózou, což záleží na konkrétním místě tlustého střeva. V subserózním vazivu se nacházejí tukové buňky, které v místě taenií tvoří tukové přívěsky (*appendices epiploicae*) (Obr. č. 4) (Martínek *et* Vacek, 2009; Lüllmann-Rauch, 2012).

Tlusté střevo slouží pro vstřebávání vody a solí z potravy. Vstřebávání vody zajišťují kolonocyty mechanismem resorpce sodných a chloridových iontů (Na^+ a Cl^-). Mucin, který je produkován pohárkovými buňkami, zde slouží jako silná vrstva proti bakteriím i jako mechanická ochrana epitelu. Tlusté střevo však obsahuje i komensální bakterie, které nezpůsobují zánětlivou reakci (Lüllmann-Rauch, 2012).

Kolonocyty mají životnost cca 6 dnů a k jejich vzniku dochází v kryptách. V bazální části krypt se nachází kmenové buňky, jejichž dceřiné buňky postupují výše podél stěny krypty za současné diferenciaci a po apoptóze dochází k jejich uvolnění do lumen střeva (Young *et al.*, 2006; Lüllmann-Rauch, 2012).



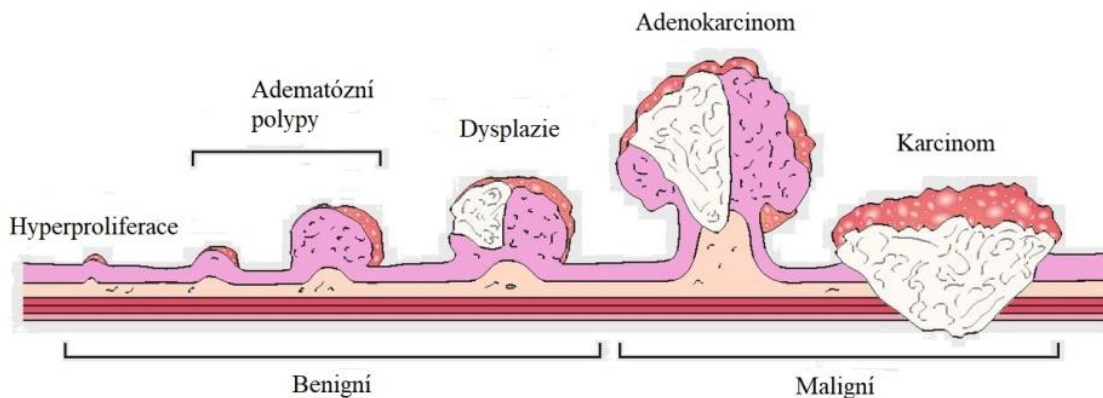
Obrázek č. 4: Struktura stěny tlustého střeva (převzato a upraveno dle Droualb Faculty).

3.2 Kolorektální karcinom

Rakovina tlustého střeva a konečníku je třetí nejčastější nádorové onemocnění na celém světě a v České republice je na prvním místě mezi muži. Faktory ve vzniku kolorektálního karcinomu mohou být dědičné (hereditární) i získané (exogenní). Mezi hereditární faktory patří familiární adenomatózní polypóza nebo Lynchův syndrom, k exogenním faktorům patří nevhodné složení stravy (nadbytek tuků, málo vlákniny), kouření a konzumace alkoholu. Před vznikem karcinomu se mohou nacházet u pacienta predisponující změny, které zvyšují riziko maligního zvratu. Mezi tyto změny patří dysplastické léze, kdy dochází ke hromadění aberantních krypt, vzniku polypů a adenomů (nezhoubných nádorů). Mezi další změny patří ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Kolorektální karcinomy představují z 80 % sporadické formy a 20 % jsou formy familiární. U sporadických forem dochází k vyřazení obou alel genu z funkce, k čemuž je třeba ještě vznik dvou mutací v somatické buňce. U familiární formy je zárodečná mutace přítomna ve všech buňkách jedince. V tomto případě je k rozvoji nádorového bujení třeba jen jedna mutace v somatické buňce, proto se také pravděpodobnost vzniku posouvá k mladším věkovým kategoriím (Holubec *et al.*, 2004; Lipská *et al.*, 2009).

Genetický model vzniku předpokládá mutaci protoonkogenů a inaktivaci tumor supresorových genů. Protoonkogeny jsou aktivovány mutací jedné alely a aktivované protoonkogeny se pak nazývají onkogeny, které narušují normální buněčný růst a buněčnou diferenciaci. V případě kolorektálního karcinomu má největší důležitost mutace genu *K-ras*, která způsobuje vznik dysplazií a karcinomu. Produkty tumor supresorových genů kontrolují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci a inaktivace obou kopií supresorových genů má velký význam právě v kancerogenezi. Jedná se hlavně o gen p53 (na krátkém raménku 17. chromozomu), APC gen (na dlouhém raménku 5. chromozomu) a DCC gen (na dlouhém raménku 18. chromozomu). Mutace nebo delece těchto genů se podílejí na přeměně adenomu v karcinom. U sporadických karcinomů hrají také významnou roli geny MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 a PMS2. Tyto geny kódují proteiny, které opravují chybné seřazení nukleotidů (mismatch repair), které vznikají během replikace DNA. U 90 % familiárních nepolypózních karcinomů se vyskytuje mikrosatelitová nestabilita (MSI) (Holubec *et al.*, 2004).

Kolorektální karcinom nejčastěji vzniká z adenomu, který se tvoří nahromaděním aberantních krypt v epitelu tlustého střeva. Tento jev se nazývá „field defect“, který je počátečním stádiem vzniku nádoru. Je charakterizován proliferací a odchylnou diferenciací epitelu krypt a kromě vzniku adenomu může docházet také ke vzniku dysplazie (Obr. č. 5). Adenom je benigní intramukózní nádor epitelového původu, který může být charakterizován jako polypózní nebo plochá léze. Po vzniku adenomu dochází k jeho růstu a zvyšuje se riziko maligního zvratu, jehož výsledkem je adenokarcinom. Nejčastěji se nachází v oblasti rektosigmoidea, ale také bývá pozorován v tračníku. Karcinom je maligní epitelový nádor, který se vyznačuje penetrací do střevní stěny (submukózy). Může nabývat různých tvarů, i přesto, že vzniká stejným způsobem, tedy jako polypózní adenom. Jako léčba se provádí resekce nádoru, ale také adjuvantní léčba, jako chemoterapie, která má za cíl zlikvidovat latentní nádorovou populaci, dříve než vzniknou klinicky manifestní metastázy. Systémová adjuvantní chemoterapie je založena na podávání 5-fluorouracilu a leukovorinu. Dále se používá také radioterapie (Jablonská *et al.*, 2000; Lipská *et al.*, 2009).

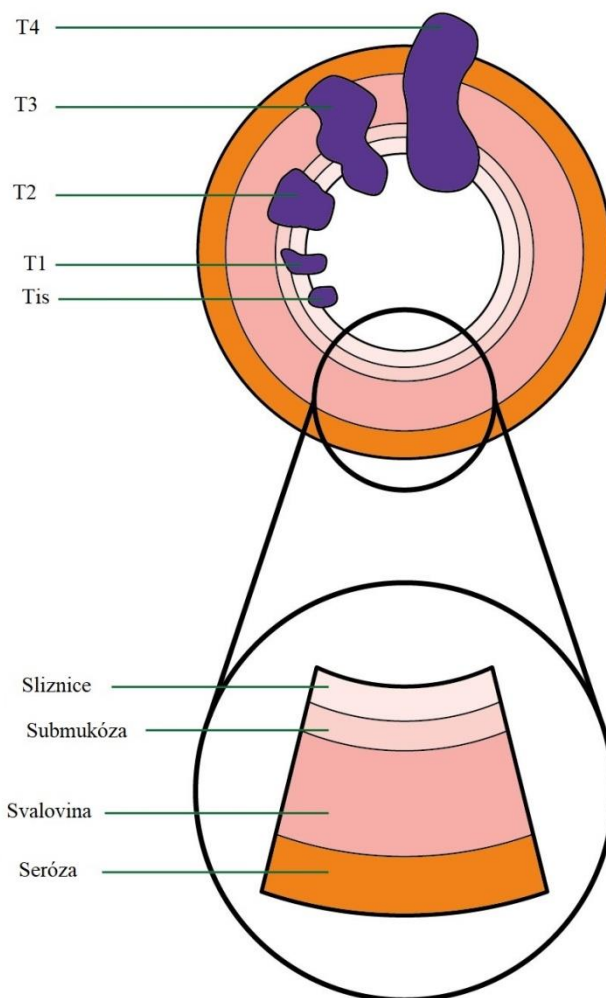


Obr. č. 5: Vývoj kolorektálního karcinomu (převzato a upraveno dle BMJ).

3.2.1 Klasifikace nádorů

Klasifikace nádorů probíhá podle anatomické lokalizace, kdy se udává místo výskytu. Dále se používá staging nádorů, kdy se hodnotí stupeň penetrace nádoru stěvnou, stupeň postižení regionálních uzlin a přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. V rámci staging hodnocení se používají různé systémy. Nejstarší je Dukesova klasifikace, která rozděluje pacienty na stadia A–D. Nejpoužívanějším systémem je TNM klasifikace (Tumor, Node, Metastasis), někdy také označována pTNM (patologické hodnocení). V této klasifikaci se používá číslování pro každé písmeno zvlášť, takže existují kategorie T0–T4 (TX, Tis) (Obr. č. 6), N0–N3 (NX) a M0–M1 (MX). Jednotlivé skupiny jsou dále rozděleny do stádií 0–IV. Staging patří mezi nejdůležitější prognostické faktory. Určuje se zde pětileté přežití pacientů podle typu stádia od stádia I, kde je přežití 80 % až po stádium IV, kde je přežití 5 %. Pokud je nádor v podslizničním vazivu (submukóza), odpovídá stupni T1, ve stěvné muscularis propria T2, v subserózní vazivové tukové tkáni T3, v seróze nebo okolních orgánech T4. Hloubka, do které nádor zasahuje, pak souvisí s metastatickou infiltrací lymfatických uzlin a vzdálených orgánů. Nádorová infiltrace lymfatických uzlin se označuje písmenem N a vzdálené metastázy písmenem M. Dalším hodnocením je histopatologický grading, který určuje stupeň diferenciací nádorových buněk. Stupeň 1 (grade 1) odpovídá dobře diferencovanému adenokarcinomu s pravidelným tubulárním nebo papilárním uspořádáním. Stupeň 2 (grade 2) je středně diferencovaný adenokarcinom, který vytváří nepravidelné žlázné struktury. Nízkému stupni diferenciací odpovídá stupeň 3 (grade 3), který je charakteristický difúzním nebo solidním růstem. Karcinomy s dobrou a střední diferenciací jsou označovány jako níže

maligní, málo diferencované nádory jsou pak vysoce maligní. Nádory se rozdělují také podle histogenetického typu na epitelové a neepitelové. Epitelové nádory představují adenomy, karcinoidy, adenokarcinomy a neuroendokrinní karcinomy. Mezi neepitelové patří lipomy, hemangiomy, neurinomy, GIST (gastrointestinální stromální tumor), maligní lymfomy a sarkomy (Jablonská *et al.*, 2000; Holubec *et al.*, 2004).



Obr. č. 6: Klasifikace nádoru podle hloubky prorůstání tkání (převzato a upraveno dle Macmillan).

3.3 Modely pro studium diferenciace

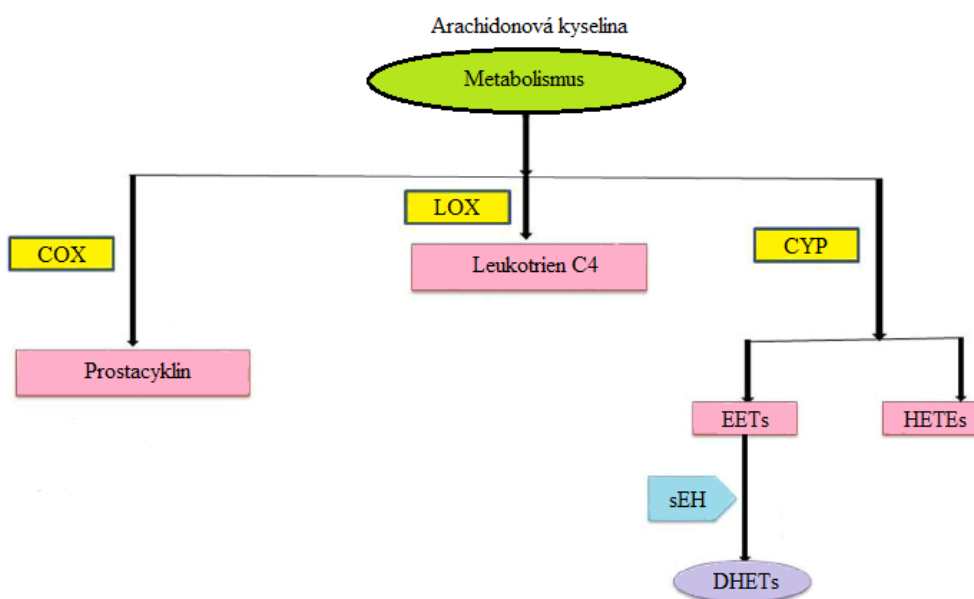
Pro studium diferenciace se používají různé buněčné kultury získané buď z odebraných orgánů, nebo z jejich nádorů. Primární kultury lze imortalizovat pomocí virových onkogenů. Mezi používané linie patří netransformované epiteliální buněčné linie, které jsou získávány ze zvířecího střevního traktu. Lidské buňky střevního traktu se kromě vyjmutých orgánů také odebírají z plodů starých 17–19 týdnů. Tyto buňky ale nejsou schopny projít diferenciací *in vitro*. Proto se pro simulaci podmínek *in vivo* využívá spojení buněk s mezenchymem, který dokáže vyvolat diferenciaci. Jako 3D *in vitro* modely se používají intestinální organoidy, které pochází z kmenových buněk nebo Lieberkühnových krypt a izolují se na základě markeru Lgr5 (Simon-Assman *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2009).

Nádorové buněčné linie tlustého střeva byly poprvé využity v roce 1964, kdy Jorgen Fogh uvedl první buněčnou linii adenokarcinomu tlustého střeva HT-29. V dalších letech bylo odvozeno od nádorů tlustého střeva více buněčných linií s různým stupněm diferenciace. Buněčné linie mají mezi sebou velkou diverzitu v metabolismu buněk, proliferaci i diferenciaci, které odpovídají diverzitě v nádorech a jejich původu. Většina nádorových buněčných linií však stále není schopná diferenciace za standardních kultivačních podmínek. Diferenciace se u nich vyvolává uměle např. butyrátem sodným. Některé buněčné linie jsou po uměle indukované diferenciaci schopné produkovat buňky podobné normálním intestinálním buňkám, jako enterocyty nebo pohárkové buňky. Mezi tyto nádorové buněčné linie patří např. Caco-2 nebo HT-29. V případě linie Caco-2 lze ale také diferenciaci docílit přirozeně po dosažení konfluencí buněk, u uměle vyvolané diferenciace se u této linie využívá laminin 1 či výše zmíněný butyrát sodný. Kromě již zmíněného butyrátu sodného se k její diferenciaci mohou využít forskolin nebo metotrexát. Buněčné linie HT-29 a Caco-2 se také používají společně jako kokultura. Buněčnou linii HT-29 lze také *in vitro* diferencovat na buňky tvořící muciny (Simon-Assman *et al.*, 2006; Martínez-Maqueda *et al.*, 2015; Ferraretto *et al.*, 2018).

3.4 Metabolismus kyseliny arachidonové

Kyselina arachidonová je polynenasycená n-6 mastná kyselina, kterou si žádná savčí buňka neumí syntetizovat *de novo*. Proto je do organismu dodávána z rostlinné potravy, kde je ve formě kyseliny linolové a kyselina arachidonová je od ní odvozena.

Kyselina arachidonová může být metabolizována třemi hlavními cestami: pomocí cyklooxygenáz (COX), lipoxygenáz (LOX) a cytochrom P450 (CYPs) (Obr. č. 7). Cyklooxygenázy metabolizují arachidonovou kyselinu na prostacyklin D. Druhou cestou je přeměna na leukotrien C4 pomocí lipoxygenázy (LOX). Cytochromy P450 mohou tvořit buď 19- a 20-hydroxyeicosatrienovou kyselinu (19-HETE, 20-HETE), nebo epoxyeicosatrienové kyseliny (EETs). HETEs jsou produktem CYP4A a CYP4F, zatímco EETs jsou tvořeny pomocí CYP epoxygenáz, hlavně CYP2C a CYP2J. Pomocí těchto enzymů vznikají celkem 4 regioizomery epoxyeicosatrienových kyselin (5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET). Vzniklé regioizomery EETs jsou poté metabolizovány solubilní epoxidhydrolázou (sEH) na své dioly, dihydroxyeicosatrienoické kyseliny (DHETs), nebo jsou inkorporovány do membránových fosfolipidů (Zhang *et al.*, 1999; Čížková *et al.*, 2014; 2016; Tripathi *et al.*, 2018).



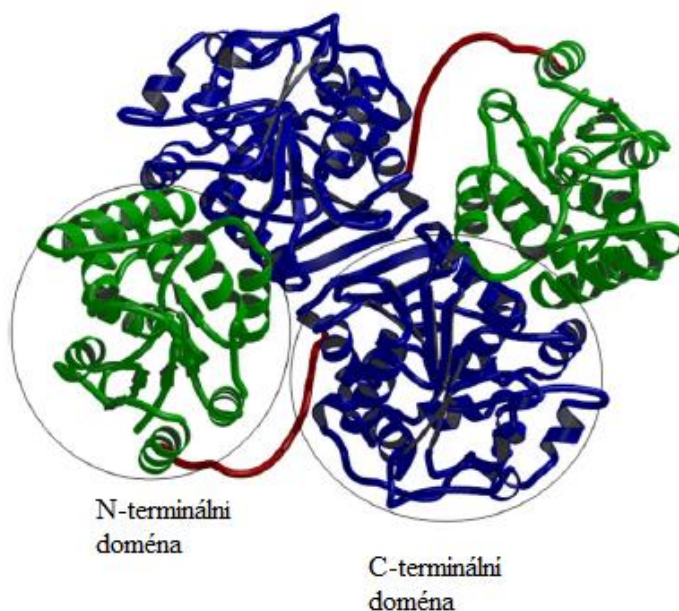
Obr. č. 7: Přehled metabolismu kyseliny arachidonové (převzato a upraveno dle Tripathi *et al.*, 2018).

3.4.1 Solubilní epoxidhydroláza

Solubilní epoxidhydroláza (sEH, EC 3.3.2.10) je enzym skládající se ze dvou monomerů o molekulové hmotnosti 60 kDa spojených můstkem obsahujícím prolin (Obr. č. 8). Lidská sEH je kódovaná genem EPHX2, který se nachází na chromosomu 8. Enzym obsahuje C-terminální doménu s epoxidhydrolázovou aktivitou a N-terminální

doménu s fosfatázovou aktivitou. C-terminální doména hydrolyzuje různé endogenní i exogenní epoxidy na látky, které mohou vstupovat do druhé fáze metabolismu xenobiotik. Významným endogenním substrátem sEH jsou epoxyeicosatrienové kyseliny (EETs), které jsou v organismu tvořeny pomocí některých cytochromů P450 (CYPs). Metabolismu epoxidů se kromě sEH účastní také mEH nebo ChEH, sEH je však jediná, která kromě toho hydrolyzuje epoxymastné kyseliny (EFAs). EFAs přispívají k utlumení zánětlivé reakce, k vazodilataci a ke zrychlení regenerace (Butov *et al.*, 2016; Čížková *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016).

Byly však pozorovány i pozitivní účinky po inhibici sEH, při kterých docházelo ke snížení krevního tlaku a dalších nemocí. Exprese sEH byla detekována v různých lidských tkáních, největší exprese byla pozorována např. v játrech, střevech, ledvinách, nadledvinkách a cévách. Naproti tomu v nádorech jater, ledvin i tlustého střeva byla exprese sEH snižena nebo úplně vymizela. V nádorech varlat a v cholangiokarcinomech byla exprese sEH zvýšená, oproti její nízké expresi v těchto zdravých tkáních (Enayetallah *et al.*, 2004; 2006; Butov *et al.*, 2016; Tripathi *et al.*, 2018).



Obr. č. 8: Krystalická struktura dimeru solubilní epoxidhydrolázy se zvýrazněnými doménami (převzato a upraveno dle Harris *et* Hammock, 2013).

3.4.3 Diferenciace buněk a sEH

Zdá se, že sEH a CYP epoxygenázy hrají roli i při diferenciaci buněk. U nediferencovaných adipocytů odvozených od mezenchymových kmenových buněk byla pozorována vyšší exprese CYP enzymů a EETs v porovnání s diferencovanými buňkami. Také byla pozorována nižší exprese sEH než u diferencovaných buněk. Při použití inhibitoru sEH pak byla snížena diferenciace adipocytů, což podporuje hypotézu o úloze sEH v diferenciaci buněk (Kim *et al.*, 2010).

CYP epoxygenázy a sEH pravděpodobně hrají roli také v diferenciaci střevních buněk. V embryonálních a fetálních tkáňových vzorcích, stejně jako ve vzorcích zralého duodena, byla pozorována odlišná síla exprese sEH v buňkách nediferencovaných a diferencovaných. V Lieberkühnových kryptách, kde se v bazální části nacházejí nediferencované buňky, byla exprese sEH slabší nebo žádná, na rozdíl od apikální části, kde se nachází již buňky diferencované (Čížková *et al.*, 2016).

Zvýšení exprese sEH také doprovází diferenciaci buněčných linií HT-29 a Caco-2 *in vitro*. Diferenciace byla navozena inkubací s butyrátem sodným a u linie Caco-2 také spontánně kultivací po dosažení konfluence. Jako markery diferenciace byly využity intestinální alkalická fosfatáza (IAP) a villin, které se nachází v apikálních částech diferencovaných buněk. Exprese sEH byla u diferencovaných buněk také zvýšená (Čížková *et al.*, 2019).

Naproti tomu EETs, substráty sEH, proliferaci buněk podporují a brání apoptóze. To bylo potvrzeno nejenom experimenty *in vitro* na buněčných liniích, ale také u nádorů prsu, kde bylo zjištěno, že snížení exprese sEH či nárůst EETs jsou spojeny s větší agresivitou nádoru. Zdá se, že exprese sEH, stejně jako CYP epoxygenáz je pod kontrolou jaderného receptoru PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α , receptor aktivovaný proliferátory peroxizómů α), což je na ligandu závislý transkripční faktor. Mezi ligandy PPAR α patří mimo jiné mastné kyseliny, včetně kyseliny arachidonové a jejích metabolitů. Ovlivnění nediferencovaných buněk HT-29 různými fibráty, ligandy PPAR α , v závislosti na použité koncentraci ovlivňuje proliferaci buněk. Zvýšená proliferace buněk je doprovázena právě snížením sEH a nárůstem exprese CYP2J2. Použití inhibiční koncentrace fibrátů pak vede k zastavení proliferace a k nárůstu exprese sEH (Shen *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2014; Čížková, 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita buněčná linie odvozená od adenokarcinomu lidského tlustého střeva HT-29 (American Type Culture Collection). Buněčná linie byla autentizována pomocí STR profilu na Ústavu klinické genetiky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vzorky adenokarcinomu tlustého střeva pro hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy (sEH) byly získány z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2 Použité chemikálie, roztoky a soupravy

- **Použité chemikálie a roztoky**

Aceton, butyrát sodný (NaBt, Sigma Aldrich, B5887), deionizovaná voda, destilovaná voda, hemathoxylin, montovací médium (PERTEX), králičí polyklonální primární protilátky pro intestinální alkalickou fosfatázu (IAP, GeneTex, GTX112100) a villin (GeneTex, GTX110034), myší monoklonální protilátka sEH (Santa Cruz, sc-166961), TPPU (N-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea, Sigma Aldrich, SML0750), trypsin, WST reagent (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, cat. no. 11644807001), xylene

- Citrátový pufr (pH 6–6,2) – příprava: bereme 9 ml roztoku A a 41 ml roztoku B, doplní se vodou do 500 ml (roztoky A, B viz níže)
- 10% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich, D6171, obsahuje 10 % fetálního bovinního séra (Hyclone, SV30160.03), 1 % penicilin/streptomycin, 1 % pyruvát sodný, 1 % glutamax)
- 10% DMSO (dimethylsulfoxid)
- 70%, 80%, 96% ethanol
- 10% formol (formol ředěný do 1x TBS)
- 1x PBS
- Roztok A pro přípravu citrátového pufru (10mM kyselina citrónová) – příprava: 10,505 g kyseliny citrónové/500 ml destilované vody
- Roztok B pro přípravu citrátového pufru (10mM citronan sodný) – příprava: 14,705 g citronanu sodného/500 ml destilované vody

- roztok peroxidu vodíku – příprava: 10 ml 30% peroxidu vodíku a 50 ml destilované vody
- 1x TBS
- 0,05% TRIS + Tween pufr – příprava: 500 µl Tween20/1 l pufru
- 0,5M zásobní TRIS pufr (pH 7,6 10x) – příprava: 61 g TRIS Base a 1 l destilované vody, úprava pH pomocí koncentrované HCl)

- **Použité soupravy**

- Pierce Colorimetric In-Cell ELISA Kit (Thermo Scientific; 62200)
- Detekční systém Dako RealTM - EnVisionTM, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAKO, K5007)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga (Jouan MR22i)
- ELISA reader (Bio-Tek Power Wave XS)
- Flowbox (Thermo Scientific MSC-Advantage)
- Inkubátor (HeraCell)
- Inverzní mikroskop (Nikon Eclipse TS100)
- Lednička (4 °C) + mrazák (Gorenje)
- Pikofuga (Eppendorf)
- Světelný mikroskop (Olympus BX)
- Tkáňový histoprocesor (Histos, Milestone)
- Vodní lázeň (Julaba TW8)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Buněčná linie HT-29 byla kultivována za standardních podmínek, tj. 37 °C a 5% CO₂. Pro hodnocení proliferační aktivity (viability) buněk po ovlivnění TPPU byl použit WST-1 test a In Cell ELISA (ICE). K hodnocení exprese sEH v kolorektálním karcinomu (adenokarcinomu) a normální intestinální tkáni pacientů bylo využito semikvantitativní hodnocení pomocí světelného mikroskopu. Byly použity preparáty nabarvené pomocí imunohistochemického barvení. Pro statistické vyhodnocení byl použit MS Excel 2010 a R Studio 3.5.1.

4.4.1 Kultivace buněčné linie HT-29

Kultivace buněčné linie HT-29 probíhala za standardních podmínek pro kultivaci buněčných linií, tj. 37 °C, 5% CO₂. Bylo použito kultivační médium DMEM obsahující 10 % fetálního bovinního séra (FBS), penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 mg/l). Pasáž se prováděla dvakrát týdně. Pro dosažení diferenciací byly buňky kultivovány s 5mM butyrátem sodným po dobu 72 hod (Čížková *et al.*, 2019).

4.4.2 Aplikace inhibitoru solubilní epoxidhydrolázy

Inhibitor solubilní epoxidhydrolázy, N-[-1-(1-oxopropyl)-4-piperidiny]-N'-[-4-(trifluoromethoxy)phenyl]urea (TPPU), se aplikoval na adherované buňky buněčné linie HT-29 ve dvou různých koncentracích (1μM a 10μM). Sledovaly se účinky na nediferencované buňky, diferencované buňky a na buňky během jejich diferenciací. Bylo vyseto 10000 buněk na jednu jamku v 96jamkové mikrotitrační destičce do 80 μl média v tripletech pro WST-1 test a v doubletech pro In Cell ELISu. Používal se zásobní roztok butyrátu sodného o koncentraci 0,5 M v 10% DMSO ve sterilní deionizované vodě a zásobní roztok TPPU o koncentraci 25 mM v DMSO.

Při ovlivnění nediferencovaných buněk se buňky vysadily a adherovaly přes noc (37 °C, 5% CO₂). Poté se ovlivňovali butyrátem sodným, DMSO (jako kontrola) a TPPU podle níže uvedených tabulek č. 1 a 2 v objemu 20 μl.

Tabulka č. 1: Použité objemy butyrátu sodného, DMSO a TPPU v tripletu.

Koncentrace v jamce	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku [μl]	Objem média [μl]
5mM NaBt	25mM NaBt	4,2	80
1μM TPPU	5μM TPPU	0,4	80
10μM TPPU	50μM TPPU	4,2	80
0,2% DMSO	1% DMSO	0,8	80

Tabulka č. 2: Použité objemy butyrátu sodného, DMSO a TPPU v doubletu.

Koncentrace v jamce	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku [μ l]	Objem média [μ l]
5mM NaBt	25mM NaBt	3,1	60
1 μ M TPPU	5 μ M TPPU	0,3	60
10 μ M TPPU	50 μ M TPPU	3,2	60
0,2% DMSO	1% DMSO	0,6	60

Buňky se nechaly inkubovat 72 hod (37 °C, 5% CO₂) a poté se provedlo vyhodnocení WST-1 testem nebo pomocí In Cell ELISy. V případě ovlivnění diferencovaných buněk se nediferencované buňky po vyšetí a adherování přes noc vystavily na 72 hod působení 5mM butyrátu sodného. Poté se médium s butyrátem sodným odsálo a přidalo se 80 μ l čerstvého média. Buňky se dále ovlivňovaly TPPU a kontrolní buňky 0,2% DMSO ve stejných koncentracích a objemech jako u nediferencovaných buněk. TPPU a 0,2% DMSO u kontrolních buněk se nechali inkubovat s buňkami 72 hod a poté se prováděl WST-1 test nebo In Cell ELISA.

Buňky ovlivňované během diferenciaci se nechaly adherovat přes noc a inkubovat 72 hod v médiu s butyrátem sodným, do kterého se ředily zásobní roztoky TPPU a DMSO ve stejných objemech a koncentracích jako u nediferencovaných a diferencovaných buněk.

4.4.3 WST-1 test

WST-1 test proliferační aktivity buněk hodnotí životnost buněk na základě funkčnosti jejich mitochondriálních dehydrogenáz. WST reagent, který se aplikoval do každé jamky po 10 μ l, obsahuje tetrazoliové soli, které byly štěpeny na formazan mitochondriálními dehydrogenázami a kvantifikace měření se prováděla spektrofotometricky. Destičky se nechaly inkubovat 30–60 min v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) a poté se měřila absorbance při vlnové délce 450 nm.

Byla provedena 3 nezávislá měření jednotlivých ovlivnění, každé provedeno v tripletu. Z hodnot absorbance v tripletu se vypočítal aritmetický průměr, od hodnot kontroly a ovlivnění se odečetla absorbance slepého vzorku a poté se spočítal poměr ovlivnění/kontrola. Kontrolní vzorky se rovnají 100 %. Hodnoty nad 100 % značí

zvýšenou nebo nezměněnou proliferaci buněk a hodnoty pod 100 % zástavu proliferace nebo smrt buněk (v tomto případě mrtvé buňky plavou v médiu).

4.4.4 In Cell ELISA

Další použitou metodou byla In Cell ELISA. Jedná se o metodu, kterou se kvantifikují proteiny přímo v buňkách. Buňky z linie HT-29 byly vysety do 96jamkové mikrotitrační destičky v doubletech a hodnotily se v různých stupních diferenciaci. Po 72 hod inkubace (37 °C, 5% CO₂) s butyrátem sodným, TPPU nebo DMSO se odstranilo médium a provedl oplach PBS. Buňky se fixovaly 10% formolem 15 min při pokojové teplotě (RT, ~ 23 °C). Poté se formol odstranil, buňky se dvakrát opláchly 1x TBS (100 µl/jamka) a po jeho odstranění se přidal permeabilizační pufr obsahující TritonX (100 µl/jamka), který se nechal inkubovat 15 min při RT. Po oplachu 1x TBS se k buňkám přidal Quenching solution (100 µl/jamka) obsahující 1% H₂O₂ v 1x TBS a nechal se inkubovat 20 min při RT. Po odstranění Quenching solution se provedl jedenkrát oplach 1x TBS. Poté se buňky nechaly inkubovat 60 min s Blocking Buffer (100 µl/jamka) při RT.

Naředění primárních protilátek villinu a intestinální alkalické fosfatázy se provádělo pomocí diluentu pro protilátky (roztok Blocking Buffer a Washing Buffer v poměru 1:1). Ředění villinu bylo 1 : 1500 a intestinální alkalické fosfatázy 1 : 500. Naředěné primární protilátky se přidávaly po odstranění Blocking Buffer v objemu 50 µl/jamka a k negativním kontrolám se přidával pouze diluent bez protilátek. Destička se zalepila originální fólií a nechala se inkubovat přes noc při 4 °C.

Po inkubaci se odstranila primární protilátka a provedl třikrát oplach oplachovacím pufrem (100 µl/jamka). Poté se k buňkám přidala sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou (HRP, ředění 1 : 400, 100 µl/jamka) a nechala se inkubovat 30 min při RT. Po odstranění sekundární protilátky se provedl třikrát oplach oplachovacím pufrem (200 µl/jamka) a do jamek se přidal TMB substrát (100 µl/jamka), který se nechal inkubovat 15 min při RT. Poté se přidal TMB stop solution (100 µl/jamka) a změřila se absorbance při vlnové délce 450 nm. Roztoky se po měření absorbance odstranily a destička se dvakrát opláchla deionizovanou vodou (200 µl/jamka). Do jamek se přidal Janus Green Whole-Cell Stain (100 µl/jamka) a nechal se inkubovat 5 min při RT. Jamky se vymyly deionizovanou vodou a po odstranění vody se do jamek přidal Elution Buffer (100 µl/jamka), nechal se inkubovat 10 min při RT a poté se změřila absorbance při vlnové délce 615 nm.

Pro výpočet relativní exprese villinu a intestinální alkalické fosfatázy z naměřených absorbancí se vypočítaly aritmetické průměry absorbancí doubletů při 450 nm pro negativní kontroly a tyto hodnoty se odečetly od příslušných absorbancí při 450 nm u jednotlivých jamek ovlivněných butyrátem sodným a TPPU. Pro každou jamku se provedla normalizace absorbance naměřené při 450 nm na absorbanci naměřenou při 615 nm poměrem těchto dvou hodnot. Z normalizovaných hodnot absorbancí se vypočítaly aritmetické průměry pro jednotlivé doublety a určila se změna v expresi (fold change) jako poměr mezi hodnotami absorbance ovlivněných buněk a absorbancí kontroly.

4.4.5 Imunohistochemické barvení

Pro identifikaci antigenů sEH v tkáni adenokarcinomu tlustého střeva se používala imunohistochemická metoda barvení založená na specifické vazbě antigenu a protilátky. Na primární protilátku se váže sekundární protilátka, na které je již navázaný enzym křenová peroxidáza (EC 1.11.1.7). Po přidání substrátu s chromogenem dochází ke vzniku hnědé sraženiny na místech, kde se primární protilátka navázala. Pro lepší orientaci se pak používá obarvení jader hematoxylinem na modro.

Tkáně se nejprve zbavily parafinu pomocí dvou lázní xylenu a následně rehydratovaly sestupnou řadou alkoholů (96%, 80%, 70%) a vodou (každý krok trvá 5 min). Dále bylo třeba zrušit zesíťování methylenovými můstky, které vzniká fixací tkáně 10% formolem. Pro úspěšné rozpoznání antigenu protilátkou se použilo natravování v citrátovém pufru (pH 6) při zahřívání na teplotu 120 °C po dobu 15 min při zvýšeném tlaku pomocí tkáňového histoprocessoru Histos. Poté se vzorky nechaly zchladnout a opláchly se destilovanou vodou. Vzorky se nechaly 30 min inkubovat v roztoku H₂O₂, aby se zabránilo falešné pozitivitě výsledků. Provedl se oplach destilovanou vodou, dvakrát TRIS pufrem po dobu 5 min a 5 min v TRIS + Tween pufru. Po opláchnutí se na vzorky nanasíl Protein Block Serum Free (DAKO) a nechal se inkubovat ve vlhčící komoře 30 min, aby se předešlo nespecifickému zbarvení pozadí. Skla se oklepala do buničiny a bez oplachu se pak aplikovala primární protilátka sEH (Santa Cruz) ředěná 1 : 200 v Antibody diluent (DAKO) a inkubovala se po dobu 60 min.

Po inkubaci se prováděly oplachy dvakrát TRIS pufrem a jednou TRIS + Tween pufrem každý po dobu pěti minut. Poté probíhala inkubace vzorků s enzymově

značeným polymerem (DualLink EnVision-HRP, DAKO) 60 min. Po inkubaci se provedly oplachy dvakrát 5 min TRIS pufrem a jednou 5 min TRIS + Tween pufrem. Pro vizualizaci se na vzorky aplikoval roztok substrátového pufru a chromogenu (1 ml Real substrate buffer a 1 kapka Real DAB⁺ chromogen, DAKO) po dobu 5 minut. Dále se vzorky promyly pod tekoucí vodou a dobarvily se pomocí roztoku hematoxylinu. Vzorky se znovu promyly pod tekoucí vodou, provedlo se odvodnění a projasnění pomocí řady 96% alkoholu, acetonu a dvou lázní xylenu. Dále se provedlo montování, díky kterému se vzorek trvale uzavřel krycím sklem.

4.4.6 Hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy v tkáni kolorektálního karcinomu a normální intestinální tkáni

Pro semikvantitativní hodnocení imunohistochemicky barvených preparátů byly použity vzorky adenokarcinomu tlustého střeva a normální tkáně z archivu Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP. Od každého pacienta byla vždy k dispozici nádorová i normální tkáň. Charakteristiky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Charakteristika pacientů, od kterých byly získány vzorky adenokarcinomu tlustého střeva a zdravé tkáně.

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Lokalizace	Stádium	Stádium	Stádium	Grade
					T	N	M	
1	muž	66	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
2	žena	50	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N2b	M1b	G3
3	muž	77	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
4	žena	39	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N1a	M0	G3
5	muž	63	adenokarcinom nízce diferencovaný	sestupný tračník, rektum	T3	N2b	M0	G3
6	žena	70	adenokarcinom	sestupný tračník, rektum	T3	N2a	M0	G3
7	muž	76	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3
8	muž	69	adenokarcinom	sigmoideum	T3	N0	M0	G3

Preparáty se hodnotily pomocí mikroskopu a pro hodnocení se používala stupnice intenzity hnědého zbarvení značící intenzitu exprese solubilní epoxidhydrolázy. Pro negativní preparáty se použil znak -, pro lehké zbarvení +, pro střední zbarvení ++ a pro silné zbarvení +++. Všechny vzorky se hodnotily dvakrát v různém čase.

4.4.7 Statistické hodnocení

Změny v proliferační aktivitě a změny exprese intestinální alkalické fosfatázy a villinu mezi kontrolními buňkami a buňkami ovlivněnými TPPU byly hodnoceny pomocí jednovýběrového t-testu. Porovnání exprese solubilní epoxidhydrolázy ve zdravé a nádorové tkáni ve vzorcích získaných od pacientů byly hodnoceny pomocí Wilcoxova testu. Výpočty pro t-test byly prováděny pomocí MS Excel 2010, Wilcoxův test v R Studiu (verze 3.5.1.), všechny s hladinou signifikance $P < 0,05$.

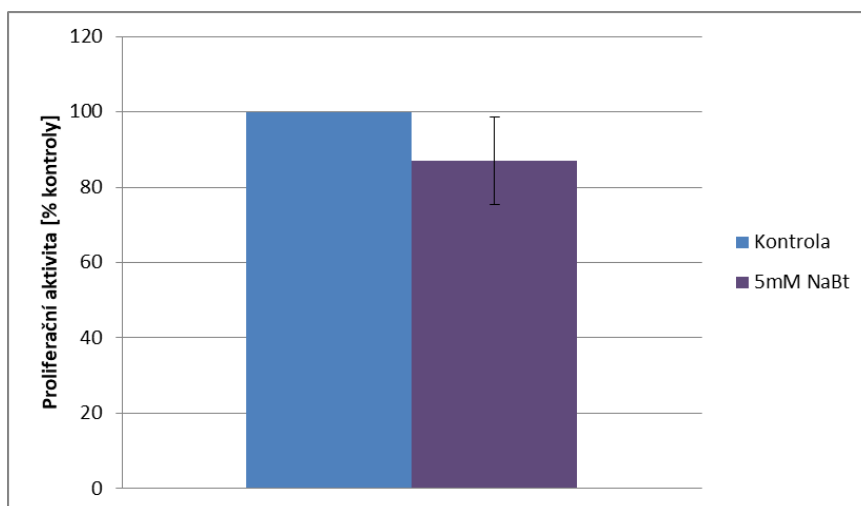
5 VÝSLEDKY

V této kapitole jsou shrnuty výsledky provedených experimentů na buněčné linii HT-29, a to formou měření proliferace (viability) pomocí WST-1 testu, změny exprese markerů diferenciaci villinu a intestinální alkalické fosfatázy (IAP) a hodnocení exprese enzymu solubilní epoxidhydrolázy (sEH) u pacientů v kolorektálním karcinomu a normální intestinální tkáni.

5.1 WST-1 test

Pomocí WST-1 testu se měřila proliferační aktivita buněk z buněčné linie HT-29, které byly ovlivněny butyrátem sodným a TPPU v různých stupních diferenciaci. K diferenciaci buněk HT-29 byla použita inkubace 72 hod s butyrátem sodným v koncentraci 5mM. Jeho vliv na proliferaci buněk shrnuje graf č. 1. Proliferace buněk v tomto případě dosahovala 87,07 % v porovnání s kontrolou. Toto snížení proliferační aktivity ale nebylo statisticky signifikantní ($P = 0,195$).

Graf č. 1: Proliferace buněk HT-29 ovlivněných 5mM butyrátem sodným. Proliferační aktivita je vztažena ke kontrole (100% proliferace). Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ze tří nezávislých pokusů.



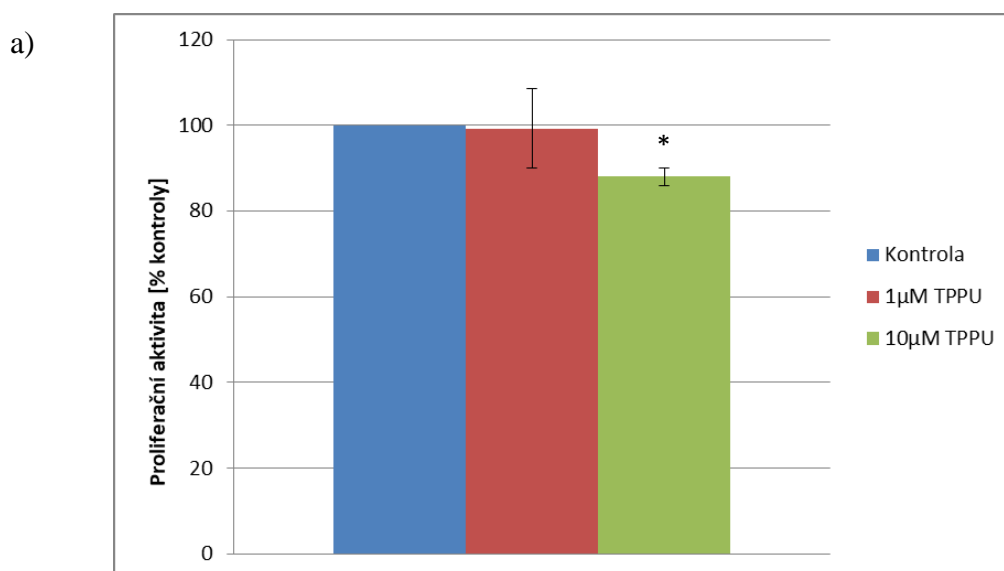
Vliv inhibitoru sEH na proliferaci nediferencovaných buněk, diferencovaných buněk a buněk během diferenciaci shrnuje graf č. 2 (a, b, c). Obecně byla v porovnání s kontrolou u nediferencovaných buněk a buněk během diferenciaci pozorována zástava růstu buněk. Naopak u buněk diferencovaných došlo k nárůstu proliferace v porovnání s kontrolou. V případě nediferencovaných buněk HT-29 je snížená proliferace závislá

na použité koncentraci. Nižší koncentrace TPPU ($1\mu\text{M}$) nepůsobila u nediferencovaných buněk oproti kontrole změnu. Proliferace byla 99,3 % ($P = 0,909$). Vyšší koncentrace TPPU ($10\mu\text{M}$) snižuje proliferační aktivitu buněk na 88,0 % vůči kontrole a toto snížení je statisticky signifikantní ($P = 0,010$).

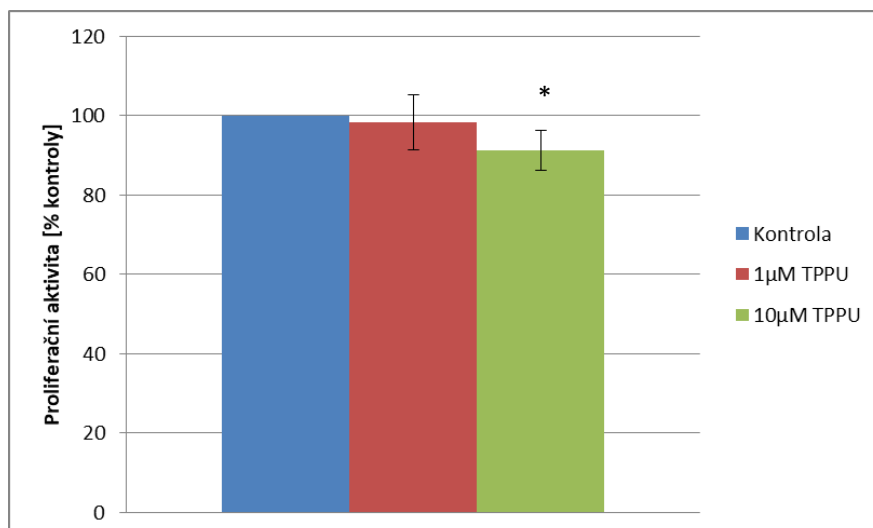
U buněk ovlivněných během diferenciacce je viditelné mírné snížení proliferace (98,3 a 91,3 %) při použití obou koncentrací TPPU. Rozdíl oproti kontrole ale opět není statisticky významný ($P = 0,713$, $P = 0,097$).

U diferencovaných buněk lze naopak pozorovat, že proliferace buněk je v případě použití obou koncentrací TPPU mírně vyšší než 100 %, konkrétně 111,9 % pro koncentraci $1\mu\text{M}$ a 109,4 % pro koncentraci $10\mu\text{M}$, ale rozdíl oproti kontrole není statisticky signifikantní ($P = 0,442$, $P = 0,555$).

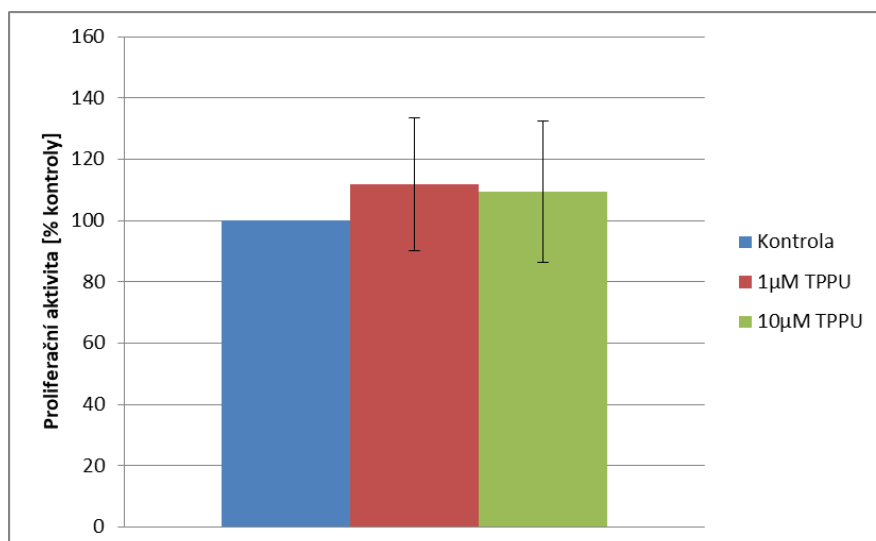
Graf č. 2: Proliferace buněk HT-29 ovlivněných TPPU. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Statisticky signifikantní výsledky jsou označeny * ($P < 0,05$). Legenda: a) nediferencované buňky, b) buňky během diferenciacce, c) diferencované buňky.



b)



c)

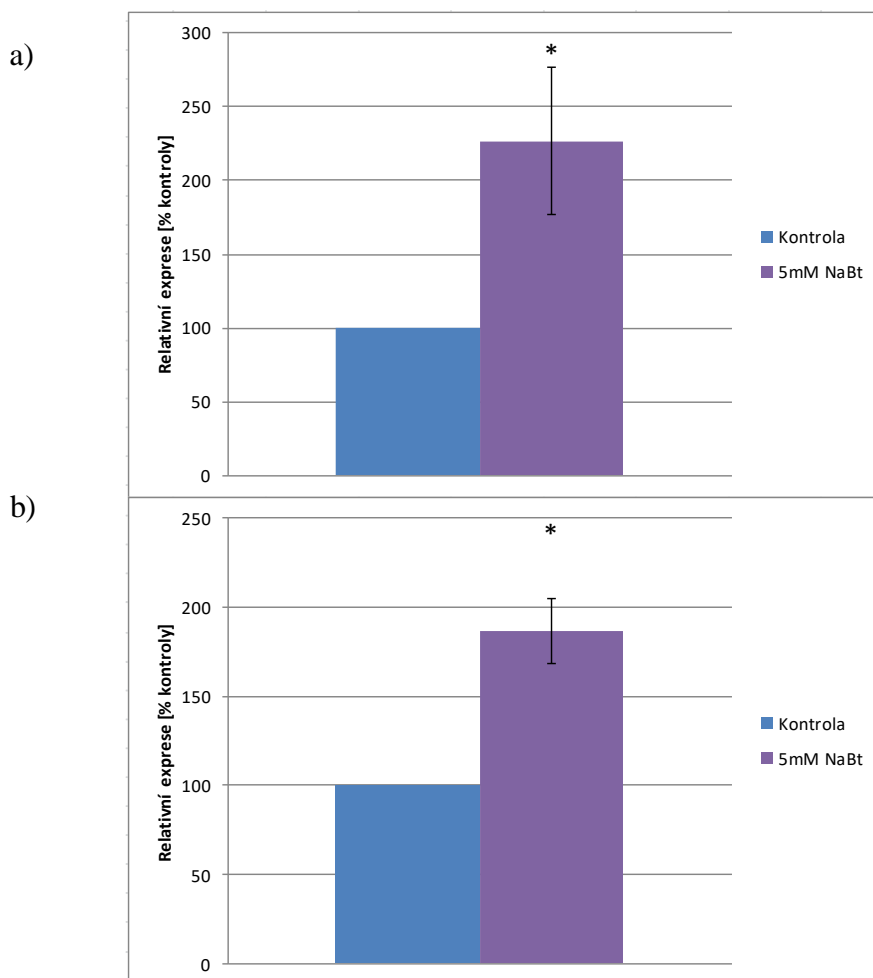


5.2 In Cell ELISA

Pomocí metody In Cell ELISA se sledovala relativní exprese markerů diferenciac villinu a alkalické fosfatázy buněk HT-29 po ovlivnění TPPU v různých stádiích diferenciac.

U diferencovaných buněk je v porovnání s nediferencovanými patrný statisticky významný nárůst exprese obou markerů diferenciac. Expres IAP je 226,6 % ($P = 0,048$) a expres villinu je 186,7 % ($P = 0,014$). Výsledky shrnuje graf č. 3 (a, b).

Graf č. 3: Změna exprese markerů diference IAP a villinu v diferencovaných buňkách HT-29 (5mM NaBt). Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ze tří nezávislých pokusů. Statisticky signifikantní výsledky jsou označeny * ($P < 0,05$). Legenda: a) IAP, b) villin.

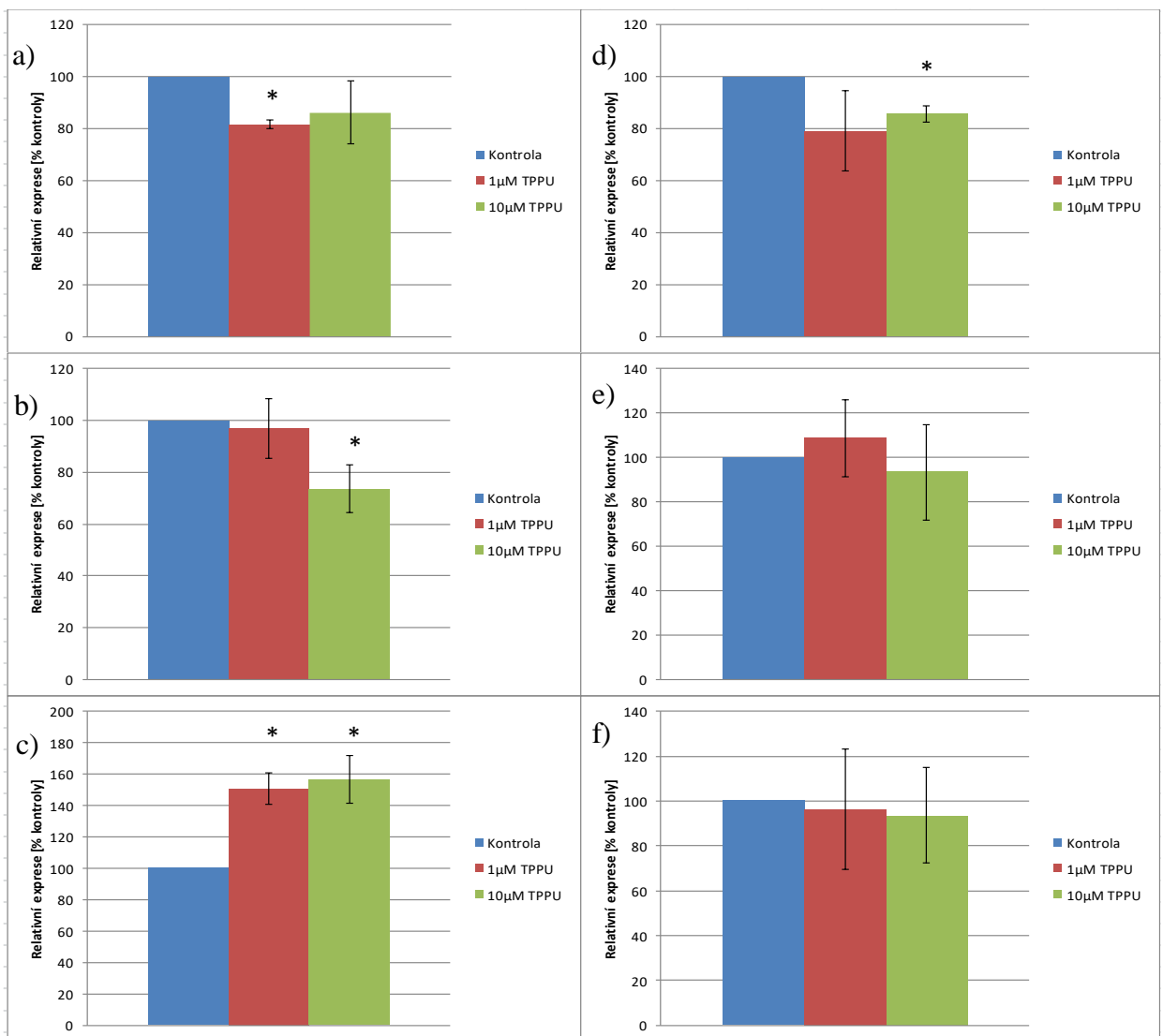


U nediferencovaných buněk ovlivněných TPPU je relativní exprese IAP i villinu nižší oproti kontrole při použití obou koncentrací TPPU ($1\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$). U IAP je statisticky signifikantní exprese po ovlivnění $1\mu\text{M}$ TPPU, exprese IAP je 81,6 % ($P = 0,003$). U villinu je statisticky významná změna exprese po ovlivnění $10\mu\text{M}$ TPPU, exprese je 85,6 % ($P = 0,014$). Výsledky jsou shrnuty v grafu č. 4 (a, d).

Buňky HT-29 ovlivněné TPPU během diference mají expresi IAP v porovnání s kontrolou, což jsou buňky diferencované 5mM butyrátem sodným, sníženou v obou případech koncentrace TPPU ($1\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$), exprese IAP je 97 % ($P = 0,696$) a 73,5 % ($P = 0,038$). Exprese villinu je v tomto případě vyšší oproti kontrole i IAP (108,6 a 93,4 %), ale výsledky nejsou statisticky významné ($P = 0,483$, $P = 0,646$). Výsledky jsou shrnuty v grafu č. 4 (b, e).

U diferencovaných buněk je exprese IAP vyšší než kontrola u obou koncentrací TPPU. Při porovnání těchto dvou koncentrací (1 μ M a 10 μ M) je exprese IAP po ovlivnění 10 μ M TPPU vyšší než po 1 μ M TPPU, exprese je 156,6 % (P = 0,023). Expresce villinu je nižší než kontrola (96,2 a 93,6 %), ale rozdíl není statisticky významný (P = 0,829, P = 0,654). Shrnutí výsledků je znázorněno v grafu č. 4 (c, f).

Graf č. 4: Změna exprese markerů diference IAP a villinu v buňkách HT-29 po ovlivnění TPPU v koncentracích 1 μ M a 10 μ M. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ze tří nezávislých měření. Statisticky signifikantní výsledky jsou označeny * (P < 0,05). Legenda: a) IAP nediferencované, b) IAP během diference, c) IAP diferencované, d) villin nediferencované, e) villin během diference, f) villin diferencované.



5.3 Hodnocení exprese solubilní epoxidhydrolázy v tkáni kolorektálního karcinomu a normální intestinální tkáni

Expres solubilní epoxidhydrolázy (sEH) u 8 pacientů v nádorové (grade 3) a okolní zdravé tkáni se hodnotila semikvantitativně v mikroskopu. Pro přehled pacientů viz tabulka č. 3 (str. 22). Snížená exprese sEH v nádorové tkáni oproti tkáni nenádorové byla pozorována u 6 z 8 pacientů. U zbývajících dvou je exprese sEH v obou vzorcích srovnatelná. Výsledky shrnuje tabulka č. 4.

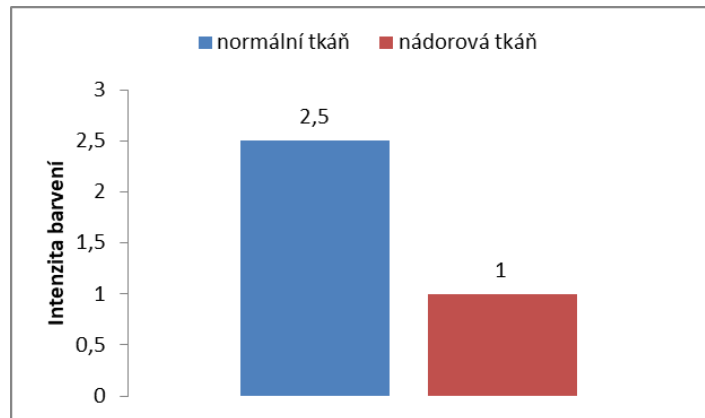
Tabulka č. 4: Hodnocení intenzity exprese sEH v normální a nádorové tkáni u jednotlivých pacientů.

Číslo vzorku	Normální tkáň	Nádorová tkáň
1	++	-
2	++	+
3	+++	++
4	+++	+++
5	++	+
6	+++	-
7	-	-
8	+++	+++

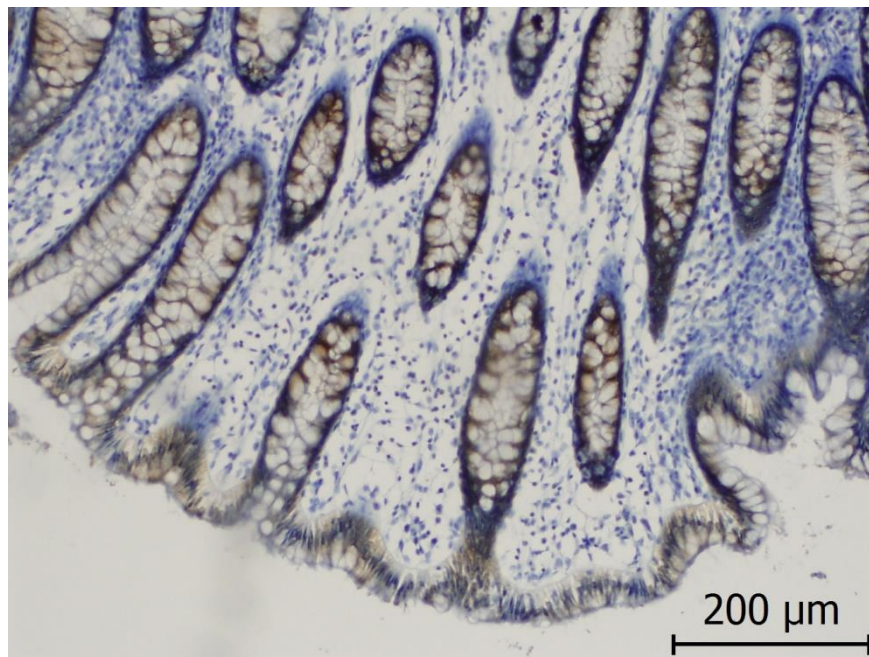
Legenda: - pro negativní vzorky, + pro lehké zbarvení, ++ pro střední zbarvení a +++ pro silné zbarvení.

Celkově je exprese sEH v nádorové tkáni oproti normální zdravé tkáni snížena. Medián intenzity barvení pro normální a nádorovou tkáň ukazuje graf č. 5. Rozdíl v mediánech je statisticky signifikantní ($P = 0,027$).

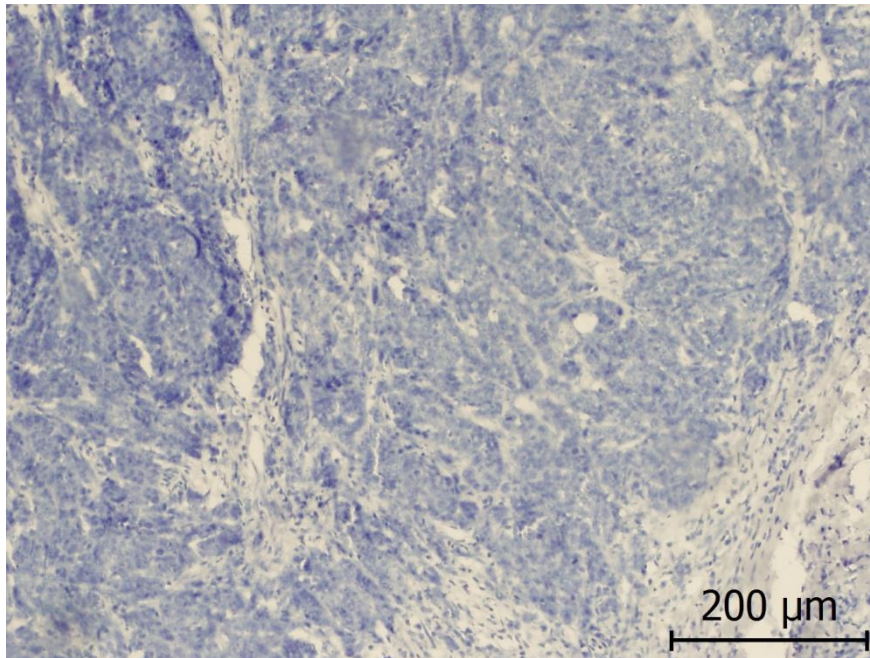
Graf č. 5: Medián semikvantitativního hodnocení exprese sEH v kolorektálním karcinomu (G3) a normální tkáni získaných od 8 pacientů. Rozdíl mezi mediány je statisticky signifikantní ($P = 0,027$).



Reprezentativní mikrofotografie exprese sEH ve zdravé a nádorové tkáni demonstrují obrázky č. 9 a 10. Vzorok tkáně pochází od stejného pacienta. Fotka zdravé tkáně zobrazuje krypty tlustého střeva s patrným intenzivním hnědým zbarvením, v nádorové tkáni lze pozorovat adenokarcinom tlustého střeva bez zjevného zbarvení.



Obrázek č. 9: Reprezentativní mikrofotografie exprese solubilní epoxidhydrolázy ve zdravé tkáni (Z: 100x). Pacient č. 1: muž, 66 let.



Obrázek č. 10: Reprezentativní mikrofotografie exprese solubilní epoxidhydrolázy v kolorektálním karcinomu (G3) (Z: 100x). Pacient č. 1: muž, 66 let.

6 DISKUSE

Diferenciace střevních buněk je důležitým procesem, při kterém vznikají funkce schopné buňky, a zároveň její míra nepřímo úměrně ovlivňuje závažnost a agresivitu nádorů. Pro indukování diferenciace střevních buněk HT-29 byl použit butyrát sodný (NaBt), který se přirozeně vyskytuje v lidském těle, kde je produktem metabolismu bakterií. U normálních střevních buněk NaBt podporuje proliferaci a má protizánětlivé účinky, u nádorových buněk však proliferační aktivitu inhibuje (Yamane *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2008). V experimentální části této bakalářské práce bylo prokázáno, že proliferační aktivita buněk HT-29 po aplikaci butyrátu sodného se v koncentraci 5mM snížila (87,07 %), což odpovídá výsledkům experimentů dle Bailón *et al.* (2010). Snížení počtu buněk po ovlivnění buněk HT-29 5mM NaBt po dobu 48 hod popsali také Hodin *et al.* (1996). Účinky NaBt v různých koncentracích byly také sledovány Zhuang *et al.* (2008) na nádorových buňkách žaludku a v případě koncentrace NaBt 4mM byla proliferace buněk dramaticky snížena až o 80 %. Další výsledky byly pozorovány Qiu *et al.* (2017), kdy koncentrace kolem 1mM NaBt neměla na proliferaci prasečích střevních buněk žádný vliv, ale u koncentrace od 5mM již byl zaznamenán pokles proliferace buněk. Antiproliferační účinky by bylo možné využít při prevenci nádorových onemocnění nebo jako podpora protinádorové léčby (Zeng *et al.*, 2017).

Použití inhibitoru solubilní epoxidhydrolázy (sEH) TPPU ve dvou různých koncentracích (1 μ M a 10 μ M) v různých stádiích diferenciace buněk vede k rozdílným odpovědím v proliferační aktivitě buněk. U buněk nediferencovaných a buněk vystavených účinkům inhibitoru během diferenciace byla proliferační aktivita buněk snížena při použití vyšší koncentrace TPPU. Naopak u buněk diferencovaných došlo k nárůstu proliferační aktivity. Snížení proliferační aktivity při koncentraci TPPU 4,2 μ M u fibroblastů myši prokázali Sirish *et al.* (2013). Použité střevní buňky mají ale původ epiteliální, a proto TPPU nemusí mít stejné účinky na tento typ buněk. Předchozí výsledky ukazují, že sEH hraje významnou roli v diferencovaných buňkách (Kim *et al.*, 2010; Čížková *et al.*, 2016; 2019). Její inhibice vede pravděpodobně k nárůstu koncentrací EETs, které jsou metabolizovány sEH na příslušné dioly. EETs mají obecně cytoprotektivní charakter a mimo jiné zvyšují proliferaci i v nádorových buňkách (Shen *et al.*, 2008). Zvýšení proliferace buněk je také spojeno s aktivací EGF receptoru EETs a zvýšená exprese EETs vede k angiogenezi (Fleming, 2006;

Čížková *et al.*, 2012). Cytoprotektivní charakter EETs v tkáních potvrdili Wei *et al.* (2014), kteří prokázali spojitost mezi agresivností nádorových buněk prsu a stupněm diferenciaci spojený se sníženou expresí sEH. Je však nutné brát v potaz, že existují rozdíly mezi zdravými střevními buňkami a použitými nádorovými buňkami HT-29.

Markery diferenciaci villin a intestinální alkalická fosfatáza (IAP) byly použity pro sledování uměle indukované diferenciaci buněk HT-29 vyvolané butyrátem sodným (Kovaříková *et al.*, 2000). Hodin *et al.* (1996) aplikovali 5mM NaBt na buňky HT-29 stejně jako je použito v této bakalářské práci, a mRNA IAP i villinu byly zvýšené. Villin je protein zodpovědný za formaci aktinových vláken v mikroklycích kartáčového lemu (Schimpel *et al.*, 2015). IAP je enzym exprimovaný v kartáčovém lemu enterocytů a zodpovídá za detoxifikaci bakteriálních endotoxinů a regulaci absorpce lipidů (Park *et al.*, 2018). Snížení exprese villinu a IAP na proteinové úrovni po aplikaci TPPU bylo pozorováno u nediferencovaných buněk a buněk během diferenciaci. U diferencovaných buněk byla exprese villinu po aplikaci TPPU také snížena, ale exprese IAP byla při použití obou koncentrací TPPU zvýšená. Snížení exprese villinu pravděpodobně vede k narušení struktury kartáčového lemu. Snížená exprese villinu byla detekována Al-Maghrabi *et al.* (2013) u pacientů s kolorektálním karcinomem. V tomto případě se jedná hlavně o málo diferencované nádory (Arango *et al.*, 2012). Zvýšení exprese IAP u diferencovaných buněk ovlivněných TPPU je překvapivé. Předpokládalo se, že zvýšení exprese IAP ukazuje více na diferencované buňky. Snížení villinu ale naznačuje nestabilitu kartáčového lemu, a tudíž narušení diferenciačního procesu, což by mělo vést ke snížení exprese IAP. Bhonchal *et al.* (2007) však také popsali zvýšenou expresi IAP při současném poškození mikroklyků, a to u chronických alkoholiků. Dochází zde ke zpomalení diferenciaci buněk v kryptách, ale buňky již diferencované mají delší životnost, což vysvětluje zvýšenou expresi IAP.

Pro ověření exprese sEH ve vzorcích tkání kolorektálního karcinomu bylo použito imunohistochemické barvení. Byla zjištěna snížená exprese sEH u nádorů nízké diferencovaných (grade 3) oproti zdravé intestinální tkáni. Podle Čížková *et al.* (2019) je diferenciaci buněk HT-29 po ovlivnění butyrátem sodným provázána zvýšením exprese sEH. V nádorech, které nejsou dobře diferencované a mají sníženou expresi sEH, jsou tedy více přítomny EETs, které by jinak sEH metabolizovala, a buňky pak méně podléhají apoptóze (Guo *et al.*, 2018). Regioizomer 14,15-EET byl detekován v nádorech prsu, kde byl jeho výskyt 2,5krát vyšší než ve zdravé tkáni

(Wei *et al.*, 2014). EETs slouží také jako ligandy pro PPAR α , který se účastní regulace metabolismu lipidů a xenobiotik a může hrát roli ve vzniku nádorů (Čížková *et al.*, 2016). Pokud by sEH měla vliv na diferenciaci střevních buněk podle získaných dat, mohla by se testovat lokální aplikace tohoto enzymu do málo diferencovaných nádorů. Tímto by mohlo dojít k postupné diferenciaci a apoptóze buněk. Samotné EETs však regulují krevní tlak a mají protektivní účinky na kardiovaskulární systém. To vyvolává otázku, jestli by v důsledku jejich snížení pro léčbu nádorů nedošlo ke vzniku hypertenze a dalším kardiovaskulárním chorobám (Guo *et al.*, 2018). Doporučuje se tedy další výzkum v této oblasti.

7 ZÁVĚR

Diferenciace buněk je důležitým procesem ve vývoji organismu, který ale také hraje roli v rozvoji nádorů, u nichž stupeň diferenciace udává i jejich závažnost. V rámci střevních buněk byl studován vliv solubilní epoxidhydrolázy (sEH) na diferenciaci buněk *in vitro*. Pomocí inhibitoru sEH bylo zjištěno, že by tento enzym přirozeně se vyskytující v těle, mohl ovlivňovat i diferenciaci střevních buněk. U nediferencovaných buněk a buněk ovlivněných během diferenciace byla po použití inhibitoru sEH snížena proliferační aktivita a relativní exprese markerů diferenciace byla snížena také. Exprese sEH se hodnotila u vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem, konkrétně s grade 3 karcinomy, které jsou málo diferencované. Bylo zjištěno, že existuje rozdíl mezi expresí v normální střevní tkáni a mezi nádory tohoto typu. Imunohistochemické barvení prokázalo snížení exprese sEH v málo diferencovaných nádorech oproti zdravé tkáni.

Dalo by se tedy uvažovat o lokální aplikaci sEH do málo diferencovaných nádorů, které jsou agresivnější, a tím pádem nebezpečnější pro pacienty. Tento způsob by bylo ale možné kontraindikovat, kvůli možným komplikacím, které působí sEH na kardiovaskulární systém. Díky studiu dalších účinků těchto enzymů, jako je sEH, se mohou propojovat různorodé funkce, které tyto enzymy v organismu mají. V propojení se snahou o zlepšení léčby onkologických onemocnění se pak může jednat o naprosto nové přístupy, které mohou zlepšit prognózu pacientů.

8 LITERATURA

Al-Maghrabi J., Gomaa W., Buhmeida A., Al-Quahtani M., Al-Ahwal M. (2013): Loss of Villin Immunoexpression in Colorectal Carcinoma Is Associated with Poor Differentiation and Survival. *ISRN Gastroenterology* 2013, ID 679724, 1–7.

Arango D., Al-Obaidi S., Williams D. S., Dopeso H., Mazzolini R., Corner G., Byun D.-S., Carr A. A., Murone C., Tögel L., Zeps N., Aaltonen L. A., Iacopetta B., Mariadason J. M. (2012): Villin Expression Is Frequently Lost in Poorly Differentiated Colon Cancer. *The American Journal of Pathology* 180:4, 1509–1521.

Bailón E., Cueto-Sola M., Utrilla P., Rodríguez-Cabezas M. E., Garrido-Mesa N., Zarzuelo A., Xaus J., Gálvez J., Comalada M. (2010): Butyrate *in vitro* immunomodulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology* 215, 863–873.

Bhonchal S., Nain Ch. K., Prasad K. K., Nada R., Sharma A. K., Sinha S. K., Singh K. (2008): Functional and morphological alterations in small intestine mucosa of chronic alcoholics. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23, e43–e48.

BMJ. [online] [7.3.2019] Dostupné z <https://www.bmj.com/content/354/bmj.i3590>

Butov G. M., Burmistrov V. V., Danilov D. V., Averin A. D., Morisseau C., Kodani S., Hammock B. D. (2016): Synthesis of epoxide hydrolase sEH inhibitors and study of its inhibitory properties. *Russian Chemical Bulletin* 65:9, 2299–2305.

Čížková K., Birke P., Malohlava J., Hušková Z., Ehrmann J. (2019): HT-29 and Caco2 cell lines are suitable models for studying a role of arachidonic acid-metabolizing enzymes in intestinal cell differentiation [v tisku].

Čížková K., Konieczná A., Erdšová B., Ehrmann J. (2014): Time-dependent expression of cytochrome p450 epoxygenases during human prenatal development. *Organogenesis* 10:1, 1–9.

Čížková K., Konieczná A., Erdšová B., Lichnovská R., Ehrmann J. (2012): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulation of Cytochromes P450: New Way to Overcome Multidrug Resistance? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, ID 656428, 1–10.

Čížková K., Rajdová A., Ehrmann J. (2015): Spatio-Temporal Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α During Human Prenatal Development. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 116, 361–366.

Čížková K., Rajdová A., Ehrmann J. (2016): Soluble Epoxide Hydrolase as a Potential Key Factor for Human Prenatal Development. *Cells Tissues Organs* 16:201, 277–286.

Čížková K., Steigerová J., Gurský J., Ehrmann J. (2016): Stimulating effect of normal-dosing of fibrates on cell proliferation: word of warning. *Lipids in Health and Disease* 15:164, 1–11.

DictBridgat. [online] [1.2.2019] Dostupné z <http://dict.bridgat.com/es/english-word/lacteals.html>

Droualb Faculty. [online] [7.2.2019] Dostupné z <http://droualb.faculty.mjc.edu/lecture%20notes/unit%206/spring%2006%20digestive%20system%20with%20figures.htm>

Enayetallah A. E., French R. A., Grant D. F. (2006): Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *Journal of Molecular Histology* 37, 133–141.

Enayetallah A. E., French R. A., Thibodeau M. S., Grant D. F. (2004): Distribution of Soluble Epoxide Hydrolase and of Cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52:4, 447–454.

Ferraretto A., Bottani M., De Luca P., Cornaghi L., Arnaboldi F., Maggioni M., Fiorilli A., Donetti E. (2018): Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an *in vitro* model of human intestinal epithelium. *Bioscience Reports* 38(2), 1–16.

Fleming I. (2006): Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 82, 60–67.

GetRevising. [online] [28.1.2019] Dostupné z <https://getrevising.co.uk/revision-notes/the-human-digestive-system>

Guo Z., Johnson V., Barrera J., Porrás M., Hinojosa D., Hernández I., McGarrah P., Potter D. A. (2018): Targeting cytochrome P450-dependent cancer cell mitochondria:

cancer associated CYPs and where to find them. *Cancer and Metastasis Reviews* 37, 409–423.

Harris T. R., Hammock B. D. (2013): Soluble epoxide hydrolase: Gene structure, expression and deletion. *Gene* 526, 61–74.

Hodin R. A., Meng S., Archer S., Tang R. (1996): Cellular Growth State Differentially Regulates Enterocyte Gene Expression in Butyrate-treated HT-29 Cells. *Cell Growth & Differentiation* 7, 647–653.

Holubec L. a kolektiv (2004): *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Grada, Praha.

Huang H., Weng J., Wang M.-H. (2016): EETs/sEH in diabetes and obesity-induced cardiovascular diseases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 125, 80–89.

Jablonská M. a kolektiv (2000): *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. Grada, Praha.

Kim D. H., Vanella L., Inoue K., Burgess A., Gotlinger K., Manthathi V. L., Koduru S. R., Zeldin D. C., Falck J. R., Schwartzman M. L., Abraham N. G. (2010): Epoxyeicosatrienoic Acid Agonist Regulates Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Adipocytes Through Activation of HO-1-pAKT Signaling and a Decrease in PPAR γ . *Stem Cells and Development* 19:12, 1863–1873.

Kovaříková M., Pacherník J., Hofmanová J., Zadák Z., Kozubík A. (2000): TNF- α modulates the differentiation induced by butyrate in the HT-29 human colon adenocarcinoma cell line. *European Journal of Cancer* 36, 1844–1852.

Lipská L., Visokai V. a kolektiv (2009): *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. Grada, Praha.

Lüllmann-Rauch R. (2012): *Histologie*. Grada, Praha.

Macmillan. [online] [7.3.2019] Dostupné z <https://www.macmillan.org.uk/information-and-support/bowel-cancer/colon/treating/treatment-decisions/understanding-your-diagnosis/staging-and-grading.html#10315>

Martínek J., Vacek Z. (2009): *Histologický atlas*. Grada, Praha.

Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. (2015): HT29 Cell Line. In: Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H. (eds.): *The Impact of Food Bioactives on Health*, pp 113–124, Springer, Cham.

Mescher A. L. (2010): *Junqueira's basic histology: text and atlas*, 12th edition. McGraw Hill Medical, New York.

Mescher A. L. (2018): *Junqueirovy základy histologie*, 14. vydání, 1. české. Galén, Praha.

Owlcation. [online] [5.2.2019] Dostupné z <https://owlcation.com/stem/epithelial-tissue>

Park S.-Y., Kim J.-Y., Lee S.-M., Chung J. O., Seo J.-H., Kim S. M., Kim D. H., Park Ch.-H., Ju J.-K., Joo Y.-E., Lee J.-H., Kim H.-S., Choi S.-K., Rew J.-S. (2018): Lower expression of endogenous intestinal alkaline phosphatase may predict worse prognosis in patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterology* 18:188, 1–6.

Qiu Y., Ma X., Yang X., Wang L., Jiang Z. (2017): Effect of sodium butyrate on cell proliferation and cell cycle in porcine intestine epithelial (IPEC-J2) cells. *The Society for In Vitro Biology* 53, 304–311.

Sato T., Vries R. G., Snippert H. J., van de Wetering M., Barker N., Stange D. E., van Es J. H., Abo A., Kujala P., Peters P. J., Clevers H. (2009): Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244), 262–265.

Shen G.-F., Jiang J.-G., Fu X.-N., Wang D.-W. (2008): Promotive effects of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on the proliferation of tumor cells. *Chinese Journal of Cancer* 27:11, 390–395.

Schimpel Ch., Werzer O., Fröhlich E., Leitinger G., Absenger-Novak M., Teubl B., Zimmer A., Roblegg E. (2015): Atomic force microscopy as analytical tool to study physico-mechanical properties of intestinal cells. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6, 1457–1466.

- Simon-Assmann P., Turck N., Sidhoum-Jenny M., Gradwohl G., Kedinger M. (2006): *In vitro* models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biology and Toxicology* 23, 241–256.
- Sirish P., Li N., Liu J.-Y., Lee K. S. S., Hwang S. H., Qiu H., Zhao C., Ma S. M., López J. E., Hammock B. D., Chiamvimonvat N. (2013): Unique mechanistic insights into the beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in the prevention of cardiac fibrosis. *PNAS* 110:14, 5618–5623.
- Tripathi N., Paliwal S., Sharma S., Verma K., Gururani G., Tiwari A., Verma A., Chauhan M., Singh A., Kumar D., Pant A. (2018): Discovery of Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors as Potent Vasodilators. *Scientific Reports* 8:14604, 1–11.
- Wei X., Zhang D., Dou X., Niu N., Huang W., Bai J., Zhang G. (2014): Elevated 14,15-epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer* 14:841, 1–9.
- Yamane M., Yamane S. (2007): The induction of colonocyte differentiation in CaCo-2 cells by sodium butyrate causes an increase in glucosylceramide synthesis in order to avoid apoptosis based on ceramide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 459, 159–168.
- Young B., Lowe J. S., Stevens A., Heath J. W. (2006): Wheater's functional histology, 5th edition. Elsevier, London.
- Zeng H., Taussig D. P., Cheng W.-H., Johnson L. K., Hakkak R. (2017): Butyrate Inhibits Cancerous HCT116 Colon Cell Proliferation but to a Lesser Extent in Noncancerous NCM460 Colon Cells. *Nutrients* 9:25, 1–13.
- Zhang Q.-Y., Dunbar D., Ostrowska A., Zeisloft S., Yang J., Kaminsky L. S. (1999): Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27:7, 804–809.
- Zhuang Y.-Q., Li J.-Y., Chen Z.-X., Wang X.-Z. (2008): Effects of sodium butyrate on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma cell line AGS. *Chinese Journal of Cancer* 27:8, 135–139.