

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIZERTAČNÍ PRÁCE

STUDIUM FUNKCE REPRODUKČNÍCH BARIÉR ZA POUŽITÍ
***IN VIVO* A *IN VITRO* MODELŮ**

Mgr. Kateřina Pospěchová

2009

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a řádně citovány.

V Hradci Králové dne 25.4.2009

Mgr. Kateřina Pospěchová

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala panu **doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc.** za odborné vedení v průběhu mého postgraduálního studia. Můj velký dík patří **doc. PharmDr. Petru Pávkovi, PhD.** za veškerou pomoc, podporu a nadšení, kterou do vědy a svých postgraduátů vkládá. Děkuji také **PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD.** za podporu, odborné vedení v oblasti fluorescenční i světelné mikroskopie a utváření neopakovatelné atmosféry na pracovišti. **PharmDr. Martinu Kopeckému, PhD.** bych ráda poděkovala za jeho rady a odbornou spolupráci zejména při mých prvních experimentech. Děkuji **Pavlině Jabůrkové** za pomoc při použití histologických technik, vždy otevřenou náruč a za její neutuchající pozitivní energii.

Děkuji všem pracovníkům a postgraduálním studentům Katedry biologických a lékařských věd a katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi byli v průběhu mého postgraduálního studia nápomocni a vytvářeli zde přátelské pracovní prostředí. Ráda bych také poděkovala své rodině a přátelům za podporu.

Tato disertační práce vznikla zejména za finanční podpory grantů GAUK 99/2005C FaF a GAUK 90507/2007 FaF. Ostatní zdroje jsou citovány u jednotlivých prací.

Kateřina Pospěchová

OBSAH

1. Úvod	
2. Obecná část a cíle práce	
2.1. Studium exprese a funkce transportérů a nukleárních receptorů na placentárních modelech	
2.1.1. Placenta, placentární bariéra	
2.1.2. Modely studia placentární bariéry.....	
2.1.3. Metabolická a detoxifikační funkce placenty.....	
2.1.3.1. ABC transportéry	
2.1.3.2. Biotransformační enzymy	
2.1.4. Regulace genové exprese	
2.1.4.1. Nukleární receptory	
2.1.4.2. Receptor pro vitamin D	
2.1.4.3. Pregnanový X receptor.....	
2.1.4.4. Cross talk VDR a PXR.....	
2.1.5. Použité metody	
2.2. Morfologické a funkční změny v potkaním varleti - vliv poškození busulfanem a kryptorchismem	
2.2.1. Varle, hematotestikulární bariéra	
2.2.2. Modely výzkumu hematotestikulární bariéry	
2.2.3. Mezibuněčné spoje	
2.2.3.1. Těsné spoje	
2.2.3.2. Adhezivní spoje	
Kadheriny	
2.2.3.3. Nexy	
2.2.4. Použité metody	
2.3. Cíle disertační práce	
2.4. Podíl doktoradky na předkládaných pracích	
2.4. Literatura	
3. Souhrn/summary	
4. Seznam publikovaných prací	

- 4.1.** Pospeschova K, Rozehnal V, Stejskalova L, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmud W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V, Pavek P. Expression and activity of VDR in the human placenta, trophoblast and choriocarcinoma BeWo and JEG3 cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009 Feb 27;299(2):178-87.
- 4.2.** Staud, F., Vackova, Z., Pospeschova, K., Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., Cygalová, L., Nachtigal, P., Fendrich, Z. Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, vol. 319, no. 1, p. 53-62.
- 4.3.** Pospeschova K, Kopecky M, Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Semecky V. Changes in the expression of P-cadherin in the normal, cryptorchid and busulphan-treated rat testis. *International Journal of Andrology*. 2007 Oct;30(5):430-8.

5. Další aktivity.....

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1 α ,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25dihydroxyvitamin D ₃
ABC transportéry	ATP-binding cassette transportéry
AJ	adherens junctions, adherentní spoje
β -hCG	lidský choriogonadotropní hormon
BCRP	breast cancer resistance protein
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CYP3A4	cytochrom P450, izoforma 3A4
DBD	DNA vážící doména
ER	estrogenní receptor
FSH	folikulostimulující hormon
FXR	farnesoidní X receptor
GJ	gap junctions, komunikační spoje, nexy
HTB	hematotestikulární bariéra
IP ₃	inositol trifosfát
LBD	ligand vážící doména
LCA	kyselina lithocholová
LH	luteinizační hormon
LXR	jaterní X receptor
MRP	multidrug resistance protein
P-gp	P- glykoprotein
PPAR	peroxisom proliferating activating faktor
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor pro kyselinu retinovou
Real-time RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RXR α	receptor α pro 9- <i>cis</i> -retinovou kyselinu
TJ	tight junctions, těsné spoje
TR	thyroidní receptor
VDR	receptor vitamínu D

VDRE
ZO

vitamín D receptor responzivní element
zonula occludens

1. ÚVOD

Po aplikaci léčiva do těla dochází k interakci léčivo-organismus, která určuje výsledný kvantitativní i kvalitativní terapeutický efekt farmaka, případně i rozsah nežádoucích účinků. Pohyb léčiva je značně ovlivňován a limitován přítomností tělesných bariér, díky nimž jsou od sebe separovány dva různé fyziologické kompartmenty. Příkladem takovýchto bariér jsou např. hematocerebrální (oddělující nervovou tkáň mozku a krev v mozkových kapilárách), hematotestikulární (odděluje krev od zárodečného epitelu) nebo placentární bariéra (odděluje krev matky a plodu).

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na studium bariéry placentární a hematotestikulární. Společným rysem obou těchto systémů je jejich podíl na „ochraně reprodukce“. V placentě se jedná o ochranu plodu, ve varleti o ochranu zárodečných buněk před působením toxických látek z okolí. Pro metabolickou a detoxifikační funkci placentární bariéry je důležitá zejména přítomnost transportérů a biotransformačních enzymů v trofoblastu. Odhalení aspektů týkajících se metabolické a ochranné funkce placentárního trofoblastu a znalost transplacentární kinetiky látek by mohlo být přínosem pro volbu vhodné terapie těhotných žen s ohledem na potenciální rizika pro plod. Ve varleti je ochrana zárodečných buněk zaručena zejména přítomností těsných a adherentních spojení mezi Sertoliho buňkami. Jejich funkce je důležitá zejména pro zachování zdárného vývoje spermií. Studium poškození zárodečného epitelu a jeho regenerace na molekulární úrovni nám může pomoci odhalit toxický účinek léčiv či jiných látek na průběh spermatogeneze a může pomoci také odhalit příčiny mužské neplodnosti.

V rámci disertační práce prezentuji výsledky týkající se studia exprese a funkce transportérů a nukleárních receptorů na placentárních modelech. Prezentuji zde výsledky týkající se studia exprese a aktivity receptoru pro vitamin D v placentě, izolovaném trofoblastu a v choriokarcinomových buněčných liniích BeWo a JEG3. Dále se zabývám studiem exprese a funkce Breast cancer resistance proteinu v potkaní placentě. V další části předkládám výsledky týkající se studia hematotestikulární bariéry, resp. vlivu poškození busulfanem a kryptorchismem na integritu adherentních spojení.

Práce je koncipována jako soubor publikovaných vědeckých prací doplněný úvodem, obecnou částí a komentářem. Všechny publikace již byly vydány v odborných recenzovaných impaktovaných časopisech. Předkládané výsledky jsou součástí

základního výzkumu, byly získány *in vitro* nebo na experimentálním zvířecím modelu. Experimenty byly navrhovány s ohledem na případnou klinickou aplikaci získaných dat.

2. OBECNÁ ČÁST A CÍLE PRÁCE

1.1. STUDIUM EXPRESE A FUNKCE TRANSPORTÉRŮ A NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ NA PLACENTÁRNÍCH MODELECH

1.1.1. PLACENTA, PLACENTÁRNÍ BARIÉRA

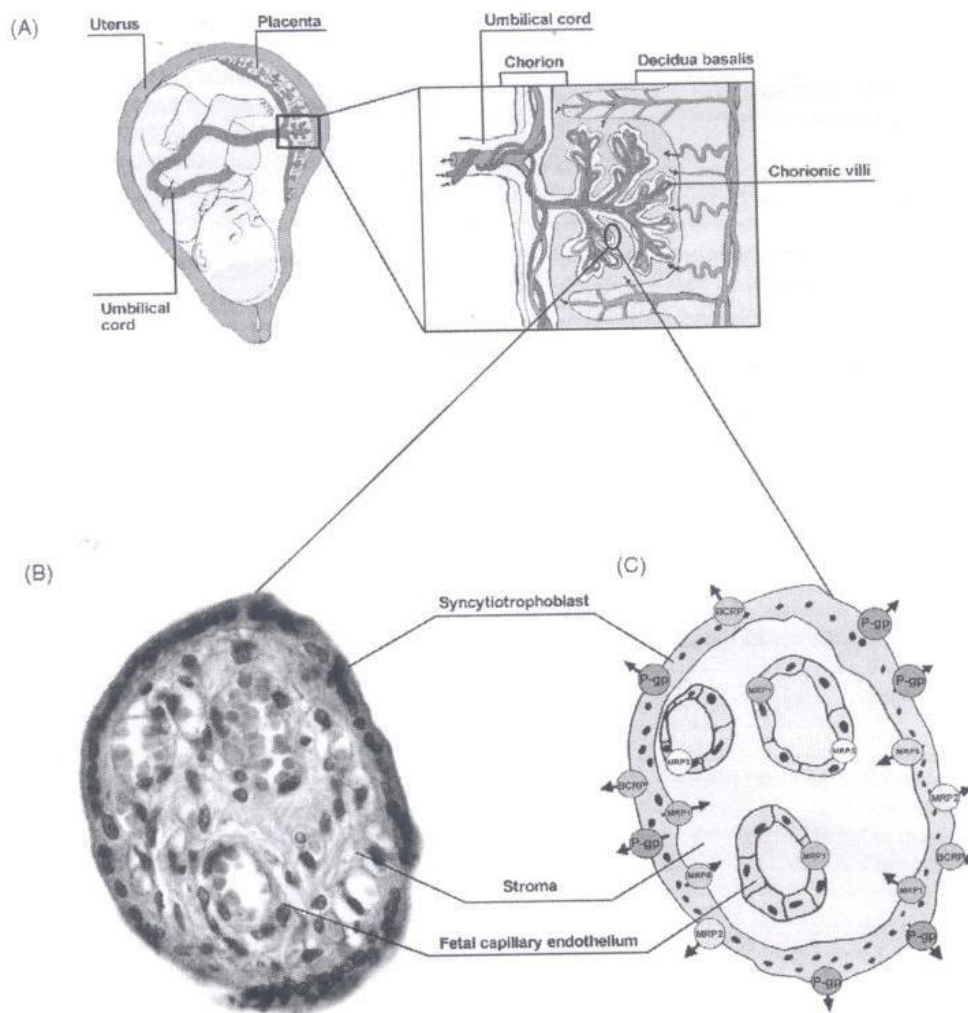
Placenta je specializovaný orgán vytvářející oboustranné funkční propojení mezi matkou a plodem. Zajišťuje imunologickou ochranu plodu během těhotenství, transfer živin do plodu, výměnu respiračních plynů mezi matkou a plodem a odvádí zplodiny metabolismu.

Placenta představuje prakticky kompletní hormonální jednotku. Funguje jako orgán endokrinní produkující hormony steroidní a peptidové povahy, je také zdrojem růstových faktorů a cytokinů (včetně acetylcholinu, tachykininu, destičky aktivujícího faktoru a prostaglandinů) ovlivňujících zachování a průběh těhotenství. Nejdůležitější endokrinologicky aktivní buňky jsou buňky trofoblastu (Sullivan 2004). Jedním z nejdůležitějších hormonů produkovaných plodem je choriogonadotropní hormon (β -hCG). Je produkován syncytiotrofoblastem a využívá se k diagnostice těhotenství a monitorování trofoblastové nemoci, a také jako marker životaschopnosti primárního trofoblastu v průběhu kultivace (Kliman et al. 1986). Mezi steroidní hormony produkované placentou patří progesteron a estriol, v menším množství pak estron a 17β -estradiol (Sullivan 2004).

Strukturální a funkční rysy placenty závisí na stupni jejího vývoje. Placentu tvoří jak fetální (choriový plát a choriové klky), tak mateřská tkáň (decidua basalis). Decidua basalis vytváří septa, jež rozdělují placentu na několik funkčních jednotek – kotyledonů. Každý kotyledon je tvořen rozvětveným stromem choriových klků, omývaných mateřskou krví, jež vystřikuje z maternálních arterií do intervilózního prostoru (van der Aa et al. 1998; Enders & Blankenship 1999). Fetální část (chorion) vytváří choriovou plotnu (membránu - v případě choriové plotny se jedná o vazivo, ve kterém vedou pupečnickové cévy), ze které vyrůstají choriové klky. Tyto klky se skládají z vazivového jádra, tvořeného extraembryonálním mesenchymem, obklopeného vrstvou cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu. Choriové klky jsou buď volné, nebo jsou zakotveny v decidua basalis. Povrch klků je omýván krví z deciduálních lakun, čímž

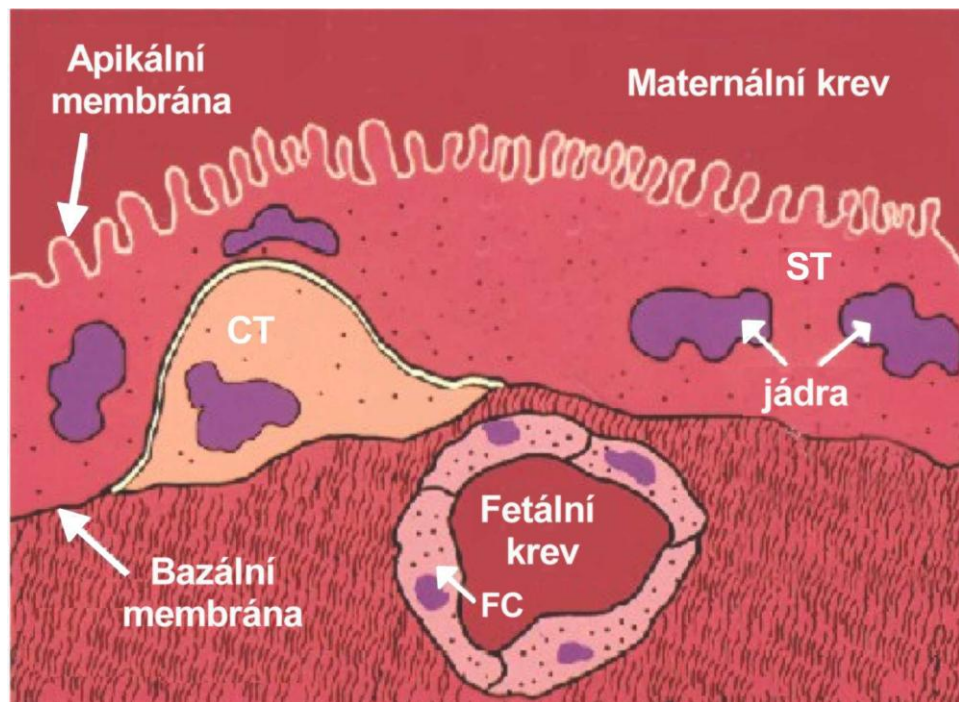
dochází k intenzivní výměně látek mezi matkou a plodem (Syme et al. 2004). Kyslík a živiny z mateřské krve přestupují trofoblastovou vrstvou choriových klků, vstupují do fetální krve a do plodu jsou přenášeny umbilikální žílou. Odkysličená krev je z plodu odváděna dvěma umbilikálními artériemi (obr.1) (Ceckova-Novotna et al. 2006).

Obrázek č. 1: OBRÁZEK pod OBRAZEK !!Schématická struktura lidské placenty: (A) Příčný řez dělohou na konci těhotenství ukazující spojení plodu a placenty. V detailním schématu je znázorněna struktura kotyledonu, funkční jednotky placenty. Chorion, fetální část placenty, se skládá z choriového plátu a choriových klků, které jsou omývány mateřskou krví. Ta vstupuje do intervilózního prostoru z arterií v decidua basalis. (B) Řez terminálním klkem placenty ve třetím trimestru. (C) Schématické znázornění terminálního klku (Ceckova-Novotna et al. 2006).



V lidské placentě je bariéra tvořena trofoblastem, pojivovou tkání a endotelem kapilár (všechny tkáně jsou fetálního původu). Trofoblast je tvořen mnohobuněčnou vrstvou syncytiotrofoblastu, která vzniká fúzí původních kmenových buněk cytotrofoblastu. Vrstva syncytiotrofoblastu představuje bariéru limitující množství většiny látek transportovaných přes placentu. Toto soubuní má povahu polarizované vrstvy, ohraničené na jedné straně mikrovilózně zvláňnou apikální membránou, která je v přímém kontaktu s mateřskou krví a bazální membránou, obrácenou směrem ke krevnímu oběhu plodu (obr. 2) (Ganapathy et al. 2000).

Obrázek č. 2: Schéma placentární bariéry. ST – syncytiotrofoblast; CT – cytotrofoblast; FC – fetální cévy (Ganapathy et al. 2000)



Ve struktuře placenty existují výrazné mezidruhové rozdíly. Lidská placenta je tzv. hemochoriální typu - mateřská krev přímo omývá trofoblast. Placenty savců jsou podle struktury tkáňové bariéry mezi mateřskou a fetální krví řazeny do tří základních typů: (i) hemochoriální (člověk, potkan, myš, králík); (ii) endoteliochoriální (kočka, pes) a (iii) epiteliochoriální (ovce, prase, kůň). Hemochoriální typ placenty, kdy je mateřská krev v přímém kontaktu s trofoblastem, se pak dále rozděluje podle počtu vrstev

trofoblastu na hemomonochoriální (člověk), hemodichoriální (králík) a hemotrichoriální (potkan, myš) (van der Aa et al. 1998; Enders & Blankenship 1999).

Nejčastěji využívaným zvířecím modelem je placenta potkaní. Doba březosti u potkana je cca 21 dní. Na zralé potkaní placentě rozlišujeme 2 morfologicky odlišné části, spongiotrofoblast a takzvaný labyrint. Spongiotrophoblast (neboli také junkční zóna) je zóna obsahující mateřskou krev oddělenou trabekulami, které neobsahují fetální kapiláry. Její úloha spočívá zejména v produkci hormonů. Oproti tomu labyrint je vlastním místem výměny nutrientů a odpadních látek. Mateřská krev je zde od fetálních kapilár oddělena trofoblastem, který má u potkana 3 vrstvy (Enders & Blankenship 1999). Při využívání zvířecích modelů je potřeba brát v úvahu rozdíly ve stavbě placenty, které mohou mít vliv na transplacentární transport látek (Ceckova-Novotna et al. 2006).

1.1.2. PLACENTÁRNÍ MODELY

Z pohledu možnosti studia funkce je placenta jedinečná, neboť z etických důvodů neexistuje možnost zkoumání na těhotných matkách. Protože se lidská placenta v mnohém liší od placent ostatních živočišných druhů, pro studium placentárních funkcí byla vyvinuta řada alternativních *in vitro* metod zahrnujících choriokarcinomové buněčné linie, primární kultury buněk izolovaného cytotrofoblastu z lidské placenty, popřípadě využití placentárních explantů (Sastry 1999). V ideálním případě by tyto modely měly mít vysokou životnost a stabilní fenotyp konzistentní s parentními buňkami placentárního syncytiotrofoblastu nebo cytotrofoblastu. Ve skutečnosti ovšem metody používané na prodloužení životnosti buněk mohou pozměnit funkce i expresi určitých genů. Použití jak buněčných linií, tak primárních kultur má proto své přednosti i svá omezení (Syme et al. 2004). Existují mnohé buněčné linie pro studium placentární funkce *in vitro*. K nejčastěji používaným placentárním buněčným liniím v posledních 30 letech patří choriokarcinomové linie BeWo, JAR a JEG-3 (Sullivan 2004; Syme et al. 2004). Pro studium transportních vlastností zde existuje také možnost využít duálně perfundovanou lidskou či potkaní placentu, popřípadě perfundovaný izolovaný kotyledon (Sastry 1999).

JEG-3 buňky mají mnoho biologických a biochemických charakteristik společných se syncytiotrofoblastem. Je u nich například zachována schopnost syntézy steroidních hormonů, enzymů a β -hCG (Sullivan 2004). Kromě těchto exprimují také např. retinoidní receptory (RAR, RXR α), a proto mohou být využity při studiu regulace jejich exprese. Dále je lze také využít při studiu proliferace a diferenciaci placentárních buněk (Blanchon et al. 2002).

Také **BeWo** buňky vykazují morfologické vlastnosti a expresi biochemických markerů podobné trofoblastu. Používají se hojně např. ke studiu metabolismu buněk a transportních vlastností, neboť rostou v monovrstvě (Sastry 1999; Ceckova et al. 2006; Vahakangas & Myllynen 2006). Navíc buňky této linie mají po stimulaci forskolinem (aktivátor cAMP) schopnost tvořit syncytium morfologicky velmi podobné syncytiotrofoblastu placenty (Borges et al. 2003; Al-Nasiry et al. 2006). BeWo exprimují mnohé transportéry např. BCRP. P-glykoprotein zde ovšem nenajdeme (Ceckova et al. 2006).

Z potkaních placentárních buněčných linií je možno použít například **HRP-1**, jež se získává z labyrintu potkaní placenty (Soares et al. 1987). Tato linie neexprimuje P-glykoprotein, nicméně byla prokázána exprese Bcrp1 jak na úrovni mRNA, tak i proteinu (Staud et al. 2006).

Primární kultury trofoblastu jsou kultury odvozené přímo ze separovaného vzorku tkáně. Metoda izolace trofoblastu je založena na enzymatické digesci a centrifugaci na Percollově gradientu. Mononukleární trofoblasty v průběhu kultivace *in vitro* splývají a přeměňují se na funkční syncytiotrofoblast (Kliman et al. 1986). Kultivace primárního trofoblastu je metoda velice náročná. Nevýhoda spočívá také v nízké životnosti a postupné apoptóze buněk. Tyto kultury lze kultivovat řádově pouze několik dní. Hrozí zde také kontaminace kultur jinými typy buněk, například fibroblasty (Vahakangas & Myllynen 2006). Nicméně, jejich izolací a kultivací získáme model vlastnostmi placentě nejbližší. Metoda izolace primárního trofoblastu byla ve spolupráci s pracovištěm Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Institut für Pharmakologie, Greifswald, Německo, zavedena na pracovišti autorkou disertační práce a využita pro řadu experimentů.

1.1.3. METABOLICKÁ A DETOXIFIKAČNÍ ÚLOHA PLACENTY

Placentární bariéra je prostupná pro celou řadu látek; z krevního oběhu matky do plodu je normálně přenášén kyslík, voda, elektrolyty, cukry, lipidy, vitamíny, hormony, některé protilátky a léčiva. Opačným směrem prochází CO₂, voda, hormony a produkty metabolismu plodu. Všechny látky jsou do určité míry schopny proniknout do placenty v závislosti na jejich liposolubilitě, molekulární hmotnosti, stupni ionizace, popřípadě vazebnosti na bílkoviny krevní plazmy (Ceckova-Novotna et al. 2006). Neionizované a lipofilní látky o molekulové hmotnosti do 600 kDa procházejí placentární bariérou prostřednictvím pasivní difuze. Léky a xenobiotika strukturálně podobné endogenním látkám mohou být přenášeny např. prostřednictvím transportérů pro monoaminy, karnitin, nukleotidy. Placentární permeabilitu ovlivňuje přítomnost přenašečů pro facilitovaný a aktivní transport, rozdíl v elektrickém potenciálu na obou stranách bariéry, stupeň prokrvení placenty apod. (van der Aa et al. 1998; Ganapathy et al. 2000; Ceckova-Novotna et al. 2006).

Placentární bariéra reprezentovaná kontinuální vrstvou syncytiotrofoblastu a neúplnou vrstvou cytotrofoblastu je vybavena množstvím transportních proteinů a biotransformačních enzymů (Syme et al. 2004; Myllynen et al. 2007). Tento fakt je důsledkem nutnosti intenzivní výměny látek, živin, hormonů a iontů mezi matkou a vyvíjejícím se plodem. Klíčovou úlohu v ochraně plodu sehrávají právě efluxní transportéry náležející do skupiny ABC (ATP binding cassette) (Pavek et al. 2002; Ceckova et al. 2006; Myllynen et al. 2007).

1.1.3.1. ABC TRANSPORTÉRY

Efluxní lékové ABC transportéry jsou transmembránové proteiny schopné aktivně, za spotřeby ATP, transportovat strukturálně odlišná léčiva a další xenobiotika přes buněčnou membránu i proti výraznému koncentračnímu gradientu a tím je ochránit před jejich toxickým působením (Schinkel & Jonker 2003). Nápadnou charakteristikou ABC transportérů je rozmanitost substrátů, které mohou transportovat. Na druhou stranu se mohou podílet na rezistenci buněk vůči žádoucímu působení léků, což je velkou komplikací např. při léčbě nádorových onemocnění (Schinkel & Jonker 2003; Staud & Pavek 2005).

Rodina efluxních lékových ABC transportérů zahrnuje P-glykoprotein (P-gp, MDR1; ABCB1), devět transportních proteinů nazývaných „multidrug resistance-associated proteins“ (MRP 1-9; ABC1-6, ABC10-12), relativně nedávno objevený „breast cancer resistance protein“ (BCRP; ABCG2) a dalších přibližně 40 dosud identifikovaných proteinů. Z pohledu funkce ABC transportérů lokalizovaných v placentě je v dnešní době pozornost zaměřena především na P-gp a BCRP.

P-GLYKOPROTEIN

Nejvíce prostudovaným proteinem této skupiny je především **P-glykoprotein (P-gp)**. Skládá se ze dvou homologních symetrických částí, každá z nich obsahuje šest transmembránových domén a ATP hydrolyzující doménu. P-gp (170kDa) je schopen transportovat širokou škálu strukturně odlišných léčiv nejrozličnějších farmakoterapeutických skupin (antineoplastika, inhibitory HIV proteáz, imunosupresiva apod.) a také látky endogenního původu (interleukiny, steroidní hormony). P-gp ovlivňuje osud řady léčiv v organismu tím, že omezuje jejich střevní absorpci, brání distribuci do některých tkání a urychluje exkreci těchto léčiv z organismu; viz. přehledové články (Pavek et al. 2002; Lin & Yamazaki 2003; Ceckova-Novotna et al. 2006).

P-gp byl lokalizován ve tkáních důležitých pro dispozici léčiv např. ve střevě, játrech, ledvinách. Význam P-gp pro ochranu nervového systému, gonád a plodu dokládá jeho přítomnost v endotelových buňkách kapilár mozku, kapilárách varlat a na apikální straně syncytiotrofoblastu placenty (Pavek et al. 2002; Ceckova-Novotna et al. 2006). Exprese P-gp pravděpodobně podléhá transkripční regulaci zprostředkované nukleárními receptory (pregnanový X receptor - PXR, konstitutivní androstanový receptor - CAR, receptor pro vitamín D - VDR) (Thummel et al. 2001; Urquhart et al. 2007).

MULTIDRUG RESISTANCE PROTEINY (MRPs)

Dalšími objevenými transportéry jsou **MRPs**, jejichž rodina zahrnuje minimálně 9 členů. MRP transportéry jsou schopny transportovat organické anionty, především ve

formě konjugátů s glutathionem, glukuronovou kyselinou či sulfáty. Dále MRPs transportují endogenní látky jako leukotrien C4, konjugáty bilirubinu, prostaglandiny, a nukleosidové analogy. Funkce jednotlivých MRP transportérů spočívá především v jaterní exkreci organických iontů (včetně bilirubinu). V posledních letech je pozornost zaměřena zejména na souvislost jejich exprese s rezistencí nádorů na cytostatickou léčbu (Borst et al. 1999; Schinkel & Jonker 2003; Zhou et al. 2008).

BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN (BCRP)

BCRP je posledním z objevených ABC transportérů. Byl popsán jako transportér schopný způsobovat rezistenci nádorových buněk vůči mitoxantronu, doxorubicinu a daunorubicinu (Doyle et al. 1998). Kromě cytotoxických chemoterapeutik zahrnuje spektrum substrátů BCRP transportéru i léčiva z dalších farmakoterapeutických skupin. Podobně jako P-gp i BCRP transportér má širokou substrátovou specifitu k strukturálně odlišným látkám, jako jsou organické anionty i kationty a amfipatické sloučeniny a sulfátové konjugáty (obr. 3) (Schinkel & Jonker 2003; Staud & Pavek 2005).

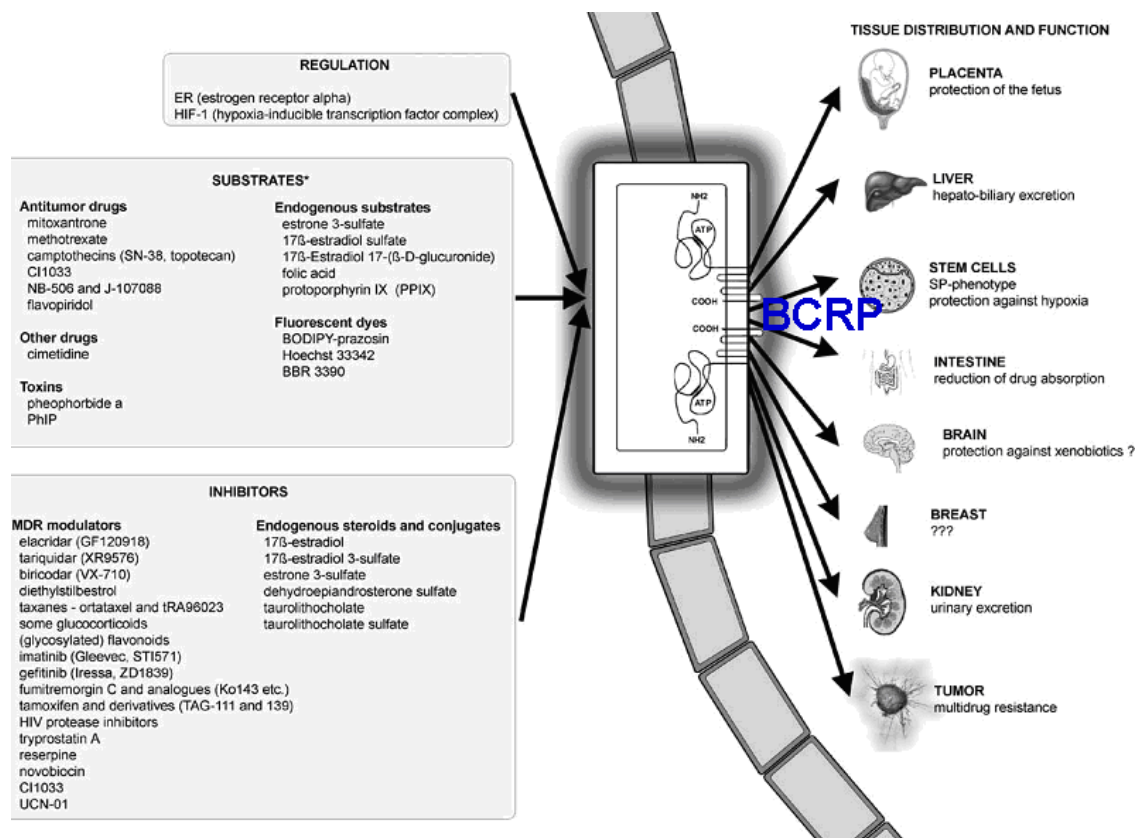
BCRP protein je tvořen 655 aminokyselinami (72 kDa) tvořícími šest transmembránových domén a jednou hydrolytickou doménou pro ATP. Protože BCRP transportér obsahuje pouze 6 transmembránových domén (na rozdíl od např. P-glykoproteinu, který jich má 12) a jelikož dvě molekuly BCRP tvoří funkční homodimer, je tento transportér označován jako „half“ transportér a řazen do podrodiny ABCG ABC transportérů (Staud & Pavek 2005).

BCRP, podobně jako P-gp, je přítomen ve tkáních důležitých pro dispozici léčiv (viz obr. 3), především v játrech, ve střevě, v placentě a hematoencefalické bariéře (Staud & Pavek 2005). V lidské i potkaní placentě byl BCRP lokalizován na apikální straně syncytiotrophoblastu (Ceckova et al. 2006; Staud et al. 2006). Experimenty s *Bcrp1*^{-/-} knockoutovanými myšimi kmeny a experimenty na duálně perfundované potkaní placentě ukázaly, že *Bcrp1* transportér chrání plod před transplacentárním přestupem jeho substrátů (Jonker et al. 2002; Staud et al. 2006).

Přestože se substráty, tkáňová lokalizace i předpokládaná fyziologická a farmakotoxikologická funkce transportérů značně překrývají, BCRP se v několika ohledech liší od P-glykoproteinu. Především byla objevena důležitá funkce BCRP a jeho myšího ortologu *Bcrp1* při vývoji krevních kmenových buněk, která pravděpodobně souvisí s ochrannou funkcí tohoto transportéru před dietetickými rozkladnými produkty porfyrinů i jinými xenobiotiky (Jonker et al. 2007).

BCRP transportér je rovněž regulován na transkripční úrovni jinými mechanismy než P-gp. Významnou roli při tom hraje estrogenní receptor (odtud rozdíly v expresi závislé na pohlaví) a HIF1 transkripční faktor indukující BCRP za hypoxických podmínek (Staud & Pavek 2005). Studie z posledních let ukazují možnou transkripční regulaci prostřednictvím PPAR γ /RXR α (Szatmari et al. 2006). Pro další informace o BCRP odkazují na přehledový článek Štaud & Pávek 2005 (Staud & Pavek 2005).

Obrázek 3. Tkáňová distribuce, genová regulace a substráty a inhibitory BCRP transportéru. Převzato z práce (Staud & Pavek 2005).



1.1.3.2. BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY

Hlavní detoxikační systém pro metabolizaci lipofilních substrátů rozličných struktur v játrech představují enzymy cytochromu P450 (CYP 450). Spolu s dehydrogenázami, reduktázami a oxidázami patří CYP450 ke skupině jaterních detoxifikačních enzymů, které jsou zodpovědné za první modifikace lipofilních sloučenin (fáze I biotransformace). Také ostatní tkáně (gastrointestinální systém, ledviny, plíce, kůže, mozek, placenta) exprimují enzymy podílející se na metabolizaci léčiv (Pavek & Dvorak 2008).

V placentě jsou na materno-fetálním rozhraní zakotveny metabolické enzymy I. a II. fáze biotransformačních reakcí, které limitují přístup léčiv a xenobiotik do plodu (Pasanen 1999). mRNA několika typů CYP enzymů byla detekována v lidském placentárním trofoblastu, pouze některé z nich vykazují enzymatickou aktivitu (Pavek & Dvorak 2008). V placentě byly nalezeny aktivní izoformy cytochromu P450 (CYP1A a CYP2E1), a aktivní enzymy fáze II (např. sulfotransferázy, glutathion-S-transferázy, uridindifosfát-glukuronosyltransferázy nebo N-acetyltransferázy) (Syme et al. 2004).

CYP3A4, nejrozšířenější izoforma cytochromu P450 v játrech, metabolizuje více než 50% léčiv a ostatních xenobiotik. Exprese CYP3A4 byla v lidské placentě detekována na úrovni mRNA i proteinu, nicméně aktivita zatím prokázána nebyla (Pavek & Dvorak 2008). Bazální i indukovaná exprese CYP3A4 vykazuje velmi širokou interindividuální variabilitu a je regulována prostřednictvím nukleárních receptorů, zejména VDR, PXR a CAR (Tirona & Kim 2005; Urquhart et al. 2007).

1.1.4 REGULACE GENOVÉ EXPRESE

1.1.4.1 NUKLEÁRNÍ RECEPTORY A TRANSKRIPČNÍ FAKTORY

Genová exprese (tj. přepis genetické informace uložené v sekvenci DNA na funkční protein) je regulována na několika úrovních. Mezi nejdůležitější regulační mechanismy patří transkripční regulace zprostředkovaná nukleárními receptory a transkripčními faktory, epigenetická regulace, regulace na úrovni stabilizace/degradace mRNA, regulace na úrovni degradace proteinu atd (Perdew 2006).

Dominantním mechanismem genové regulace enzymů I. a II. fáze biotransformace a významných lékových transportérů je transkripční regulace prostřednictvím

nukleárních receptorů (tzv. *trans* faktorů) a odpovídajících responzivních *cis* elementů (z *angl.* response element) v promotorových regulačních sekvencích genů. Jako nukleární receptory se označují transkripční faktory, které se po navázání specifického ligandu váží na regulační místo v promotorové oblasti cílového genu (na responzivní element) a zahajují transkripční aktivaci a přepis genetické informace do mRNA. Součástí procesu je uvolnění korepresorových proteinů a navázání koaktivátorů na ligandem obsazený nukleární receptor a rozvolnění struktury histony/DNA (Tirona & Kim 2005; Nakata et al. 2006; Urquhart et al. 2007).

Protein nukleárního receptoru je složen z pěti funkčních domén: z N-terminální aktivační funkční domény (**AF-1**), modulátorové domény interagující s modulačními proteiny (koaktivátory), domény (**A/B**), domény rozpoznávající specifické sekvence promotorové DNA (**DBD** – DNA binding domain), spojovací struktury („**hinge**“ závěsný region) a domény vázající ligand (**LBD** – ligand binding domain), jejíž C-konec má také aktivační účinky (AF-2). DBD svojí specifitou k promotorové sekvenci určují škálu genů, které jsou regulovány. LBD tvoří kapsu, kde ligandy nekovalentně interagují s aminokyselinovými skupinami LBD domény na základě jejich chemické struktury (obr. 4) (Pávek 2005).

Ligandy nukleárních receptorů jsou většinou malé, lipofilní sloučeniny, což jim umožňuje difundovat do buněk. Je známo asi 49 členů nadrodiny nukleárních receptorů (Urquhart et al. 2007). V závislosti na charakteru ligandu můžeme zjednodušeně nukleární receptory rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje receptory pro klasické hormony, včetně glukokortikoidů, mineralokortikoidů, adrogenů, estrogenů, progesteronu, hormonů štítné žlázy, vitamínu D. Druhá skupina receptorů se obecně nazývá „orphan“ (sirotčí) receptory, neboť jejich ligandy byly zpočátku neznámé. Z 36 orphan receptorů lidského genomu byly odhaleny ligandy pro 14 z nich. Orphan receptory zahrnují receptory pro mastné kyseliny (PPAR – receptory aktivované peroxisomovými proliferátory, typ α , β a γ), žlučové kyseliny (FXR - farnesoidní X receptor), metabolity cholesterolu (LXR – jaterní X receptor α a β) a lipofilní látky (PXR - pregnanový X receptor) (Nakata et al. 2006).

Proces aktivace nukleárních receptorů je velice komplikovaný a vyžaduje přítomnost mnoha koaktivátorů a proteinů s enzymovou aktivitou ovlivňující chromatinovou strukturu DNA (Pávek 2005). Aktivace nukleárního receptoru probíhá většinou v cytoplazmě, kde se jeho volná forma nachází v komplexu s korepresory a histon deacetylázami. Po navázání ligandu dojde disociaci toho komplexu a vcestování do jádra, kde dojde k asociaci s koaktivátory (popř. RXR α) a navázání na responzivní element v regulační oblasti promoteru cílového genu (Urquhart et al. 2007).

1.1.4.2. RECEPTOR PRO VITAMIN D

Receptor pro vitamin D (VDR, NR1I1) je steroidní receptor příbuzný PXR (NR1I2) a CAR (NR1I3 a NR1I4). Na úrovni transkripční regulace genové exprese ovlivňuje expresi mnoha genů regulujících kostní metabolismus, minerální homeostázu (zejména Ca²⁺), autokrinních/parakrinní funkce, buněčnou proliferaci a diferenciaci (Christakos et al. 2003; Nezbedova & Brtko 2004; Dusso et al. 2005). Jisté práce hovoří o VDR také jako o spouštěči inducibilní exprese genů cytochromu P450 (např. CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9), případně P-glykoproteinu v játrech a tenkém střevě (Thummel et al. 2001; Drocourt et al. 2002). Podobná funkce v placentě dosud nebyla popsána.

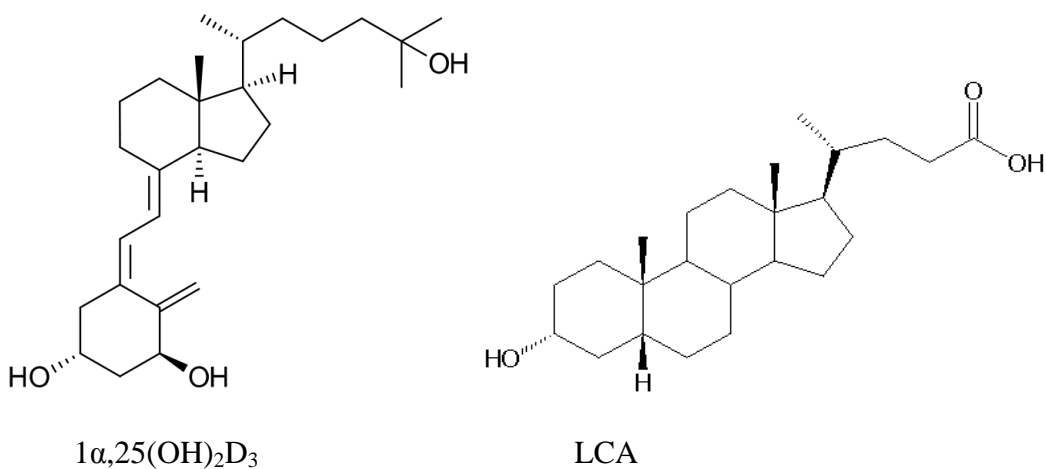
Lidský VDR je vysokoafinitní receptorový protein (427 aminokyselin DeLuca 2004) o molekulové hmotnosti 48-55kD, primárně lokalizovaný v jádře. Byla prokázána i přítomnost cytoplazmatického receptoru (Nezbedova & Brtko 2004).

Ligandem VDR je biologicky aktivní metabolit vitamínu D, **1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃** (1 α ,25(OH)₂D₃). Ten aktivuje VDR řádově již v subnanomolárních koncentracích (Reschly & Krasowski 2006). 90 – 100% vitamínu D vzniká ze 7-dehydrocholesterolu působením ultrafialového záření v kůži, jeho následnou aktivací v játrech a ledvinách 1 α -hydroxylasou dochází ke vzniku aktivní formy 1 α ,25(OH)₂D₃. Koncentrace aktivní formy vitamínu D v plazmě se pohybuje v rozmezí 0,05-0,15 nmol/l (odpovídá 20-60 pg/ml). V těhotenství se sérové hladiny 1 α ,25(OH)₂D₃ v prvním trimestru zdvojnásobují, přetrvávají do porodu, kdy dochází k návratu na původní hodnoty (Kovacs & Kronenberg 1997). Také exprese VDR a 1 α -hydroxylasy

v placentě je nejvyšší v prvním a druhém trimestru (Evans et al. 2004). V dnešní době známe více než 2000 syntetických analogů $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Carlberg & Molnar 2006).

Dalším přirozeným identifikovaným ligandem VDR je „sekundární“ žlučová kyselina, **kyselina lithocholová (LCA)** a její metabolity (např. 3-ketolithocholová kyselina), jejímž prostřednictvím se VDR podílí na metabolismu žlučových kyselin (Makishima et al. 2002; Reschly & Krasowski 2006). Afinita VDR k LCA je řádově nižší než k $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, k aktivaci dochází až v koncentracích LCA pohybujících v mikromolech (Reschly & Krasowski 2006). Bylo prokázáno, že aktivace VDR prostřednictvím LCA ovlivňuje také transkripční regulaci exprese CYP3A4 např. v buněčných liniích jaterních HepG2 a střevních LS174T (Makishima et al. 2002; Matsubara et al. 2008).

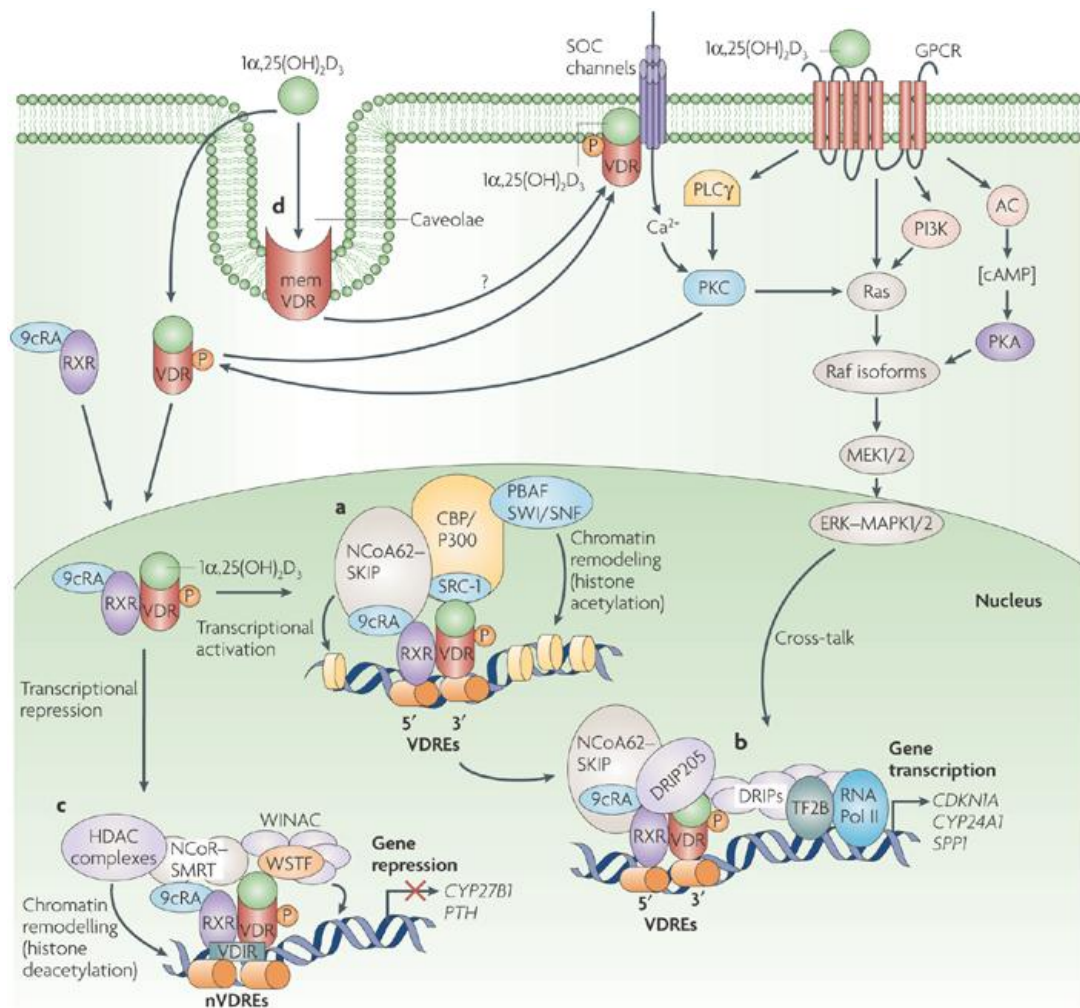
Obrázek č. 4. Ligandy VDR – $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a LCA.



Ligandem aktivovaná forma VDR vytváří ve většině případů heterodimer s receptorem pro 9-*cis*-retinovou kyselinu (RXR α), který se následně váže k responzivnímu elementu v promotorové oblasti cíleného genu a spouští jeho transkripci (Christakos et al. 2003; Hewison et al. 2004). Mimo genomický efekt může mít ovšem vitamin D také negenomové účinky na VDR nezávislé (Inoue et al. 2008). Existuje totiž také membránový receptor pro vitamin D (1,25D3-MARRS), jehož prostřednictvím dochází k aktivaci mitogeny aktivovaných proteinových kináz

(MAPKs) a tím k regulaci genové exprese (Khanal & Nemere 2007). Podrobněji je mechanismus účinku VDR popsán na obrázku 5.

Obrázek 5. **A)** Klasický účinek $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ je zprostředkován vazbou heterodimeru VDR s $\text{RXR}\alpha$ na vitamin D responzivní element (VDRE). Transkripční aktivace zahrnuje řadu koaktivátorů a faktorů pro acetylaci histonů pro rozvolnění chromatinu. **B)** OPRAVIT VĚTU Napojení VDR interagujícího proteinu 205 (DRIP205) s aktivační doménou VDR a $\text{RXR}\alpha$, tím aktivuje DRIPs přemostující mediatorový komplex VDR-RXR-NcoA62-SKIP-DRIP205 s transkripčním faktorem 2B (TF2B) a RNA polymerázu II (RNA poly II), tím se aktivuje transkripce. Přítomnost multiproteinového komplexu zvyšuje transkripci genů jako např. *CYP24A1* (kóduje 24-hydroxylázu), *CDKN1A* (kóduje cyklin-dependentní kinázový inhibitor p21) a *SPP1* (kóduje osteopontin). **C)** $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - zprostředkovaná transkripční represe zahrnuje asociaci VDR-RXR heterodimeru s VDIR (VDR interagující represor) a dalšími proteiny např. histon deacetylazovými koprepresory (HDAC). Celá tato kaskáda vede k represí genů jako např. *CYP27B1* (kóduje 1α -hydroxylázu) a *PTH* (kóduje parathormon). **D)** Negenomická rychlá akce $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – navázání na membránový (memVDR) popřípadě cytosolický (VDR) receptor pravděpodobně aktivuje mitogeny aktivované proteinkinázové kaskády (MAPK), např. extracelulárními signály regulovanou kaskádu (ERK) a tím reguluje transkripci genů (Deeb et al. 2007)



Nature Reviews | Cancer

VDR je masivně exprimován v ledvinách, játrech a tenkém střevě, méně v ostatních tkáních. V lidské placentě byl VDR detekován na úrovni mRNA (Nishimura et al. 2004; Pavek & Dvorak 2008) i proteinu (Barrera et al. 2008; Pospeschova et al. 2009). Placenta je mimo jiné zdrojem aktivní formy vitamínu D $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Diaz et al. 2000). VDR mRNA exprese byla detekována také v primárních kulturách izolovaného trofoblastu v průběhu diferenciaci (formování syncytia) (Avila et al. 2004; Pospeschova et al. 2009). Předpokládá se podíl VDR na regulaci produkce placentárního laktogenu, lidského choriogonadotropního hormonu trofoblastem, calbindinu-D28k regulaci decidualizace endometria a regulaci metabolismu vápníku v placentě (Tuan et al. 1991; Stephanou et al. 1994; Belkacemi et al. 2005; Pospeschova et al. 2009). Dále bylo prokázáno, že $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se v placentě podílí na regulaci exprese 1α -

hydroxylasy a 24-hydroxylasy, klíčových enzymů podílejících se na syntéze a inaktivaci vitamínu D (Avila et al. 2007). Uvažuje se také o imunopresivních účincích vitamínu D a jeho úloze v regulaci syntézy některých cytokinů (Brown & Slatopolsky 1999), čímž by se mohl podílet na utváření a udržení fetoplacentární jednotky (Avila et al. 2004). Nicméně, úloha VDR v placentě zůstává stále zahalena tajemstvím.

Expres VDR v choriokarcinomových liniích BeWo a JEG-3 je stále sporná, což limituje využití tohoto buněčného modelu pro studium molekulárně biologických vlastností VDR. Belkacemi se spolupracovníky popsal regulaci exprese kalbindinu-D28K prostřednictvím VDR, detekoval také přítomnost VDR za použití Western blottingu (Belkacemi et al. 2005). Nicméně v dalších studiích bylo nutné provést transfekci JEG-3 expresním EBV-episomálním plasmidem pMEP4-VDR za účelem získání klonu exprimujícího VDR (Pedigo et al. 2003). Za použití Western blotu, real-time RT-PCR a genových reportérových studií bylo u BeWo a JEG3 choriokarcinomových linií zjištěno, že exprese a aktivita VDR (mRNA i proteinu) je velmi nízká ve srovnání s placentou a izolovaným trofoblastem (Pospechova et al. 2009).

1.1.4.3. PREGNANOVÝ X RECEPTOR

Pregnanový X receptor (PXR, NR1I2) náleží také do rodiny ligandem aktivovaných nukleárních receptorů, ovlivňuje genovou expresi rovněž prostřednictvím heterodimeru s RXR α (Kliewer et al. 2002). K ligandům PXR náleží farmaka z řady terapeutických skupin, některé toxiny i endogenní steroidy. Ligandy mají velice různorodou chemickou strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti molekul. Tím se PXR odlišuje od ostatních nukleárních receptorů, např. estrogenního receptoru nebo VDR. Díky této široké specifitě ligandů i množství regulovaných biotransformačních enzymů a lékových transportérů je PXR považován za jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících farmakokinetiku mnoha léčiv (Pascussi et al. 2001). Ligandy PXR jsou často známými induktory CYP3A4, jedná se například o rifampicin, taxol, hyperforin, LCA (Kliewer et al. 2002).

PXR je exprimován nejvíce v játrech a ve střevě. Tato lokalizace významně koreluje s expresí cytochromu CYP3A4 a P-glykoproteinového transportéru (Pávek 2005). Existuje mnoho studií potvrzujících úlohu PXR v regulaci exprese CYP3A4 právě v těchto tkáních (LeCluyse 2001; Kliewer et al. 2002; Kliewer 2003).

1.1.4.4. CROSS-TALK VDR A PXR

Studie z posledních let ukazují, že VDR a PXR mají společný původ a že se ve svých účincích často překrývají (Reschly & Krasowski 2006). U lidí se PXR v placentě neexprimeje. Oproti tomu VDR je v placentě exprimován ve velké míře (Tab.1) (Nishimura et al. 2004; Pavek & Dvorak 2008). Jak již bylo zmíněno výše, PXR se podílí na transkripční regulaci CYP3A4 a P-gp v játrech a ve střevě (LeCluyse 2001; Kliewer et al. 2002; Kliewer 2003; Reschly & Krasowski 2006). Nabízí se otázka, zda by v placentě jejich úlohu mohl převzít právě VDR. VDR a PXR mají navíc společný ligand, a to kyselinu lithocholovou, čímž jsou zapojeny do regulace metabolismu žlučových kyselin a ochrany organismu před jejich toxickým působením, a to zejména ve střevě (Reschly & Krasowski 2006). Jak je to v placentě, není dosud známo.

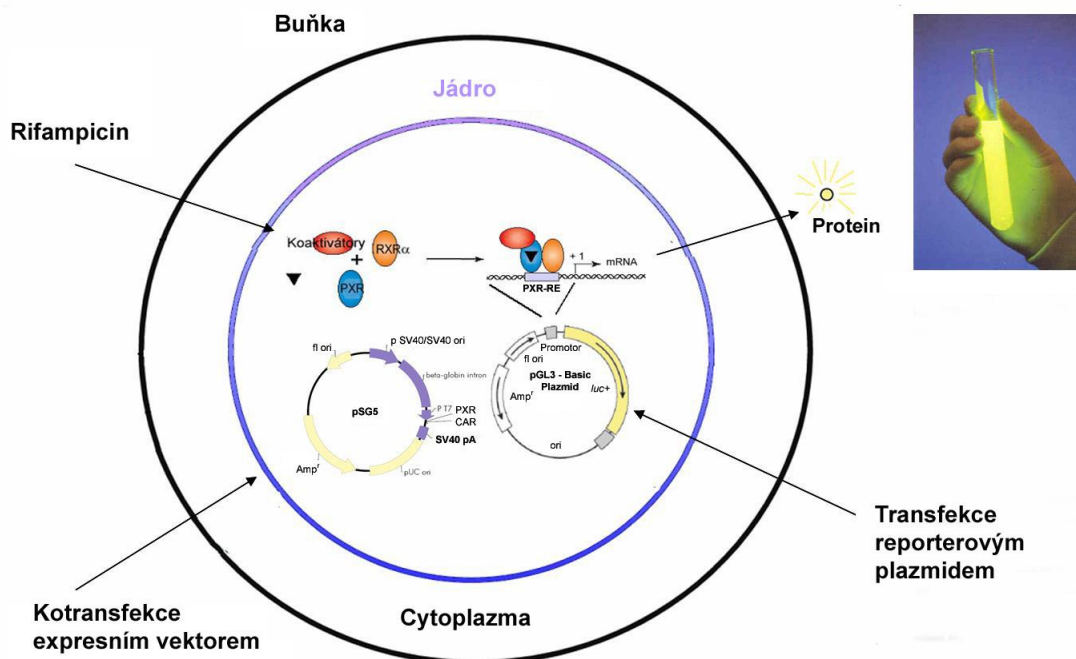
Tabulka 1 Relativní exprese VDR, PXR a RXR α v placentě, játrech a tenkém střevě, na úrovni mRNA. +++>++>+ enzym exprimován, - mRNA nedetekována; exprese porovnána s játry nebo s jiným orgánem, který exprimuje nejvíce daný gen (+++). Převzato z (Nishimura et al. 2004).

Nukleární receptor (gen)	Placenta	Játra	Tenké střevo
VDR (NR1I1)	++	+	+++
PXR (NR1I2)	-	+++	++
RXR α (NR2B1)	++	+++	++

1.1.5. METODY VYUŽITÉ PRO STUDIUM EXPRESE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ, TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY A INTERAKCE LIGANDU S RECIPIENTNÍ STRUKTUROU

Pro studium exprese transportérů a nukleárních receptorů v placentě, primárním trofoblastu a choriokarcinomových liniích BeWo a JEG3 byla využita reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real time RT-PCR), Western blot a imunohistochemické metody. Pro studium transkripční aktivity VDR v choriokarcinomových liniích BeWo a JEG3 byly využity moderní metody molekulární farmakologie. Jednalo se především o genové reporterové studie. Jako reporterový plasmid pro VDR byl v našem případě použit pDR3-luc obsahující regulační elementy promotorové oblasti genu pro lidský kalbindin, o němž je známo, že jeho exprese je indukována prostřednictvím VDR. Model genového reporterového experimentu pro testování VDR zprostředkované aktivace genů je popsán na obrázku 6 (*předělat s VDR*).

Obrázek č. 6. Schéma reporterového genového experimentu (gene reporter assay), který byl použit například pro studium interakce $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ s VDR. Celý systém byl založen na současné inkorporaci dvou plazmidů do buňky. Jednalo se o reporterový plazmid nesoucí důležité responzivní elementy specifické pro VDR (v našem případě DR3 sekvenci genu pro lidský kalbindin) a dále strukturní gen pro luciferázu, jehož exprese byla řízena interakcí VDR s DR3 sekvencí. Druhým plazmidem byl expresní vektor, který nesl virový promotor (např. SV-40) řídící silnou expresi genu studovaného nukleárního receptoru (v tomto případě VDR). Takto připravené buňky byly posléze vystaveny působení testované látky ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, resp. LCA). Po 24 hodinách byly buňky lyzovány a k lyzátu byl přidán luciferin - substrát luciferázy. Luciferin je luciferázou biotransformován a výsledný produkt jeví luminescenci, která je přístrojově kvantifikovatelná (např. multifunkčním luminometrem Genios Plus)

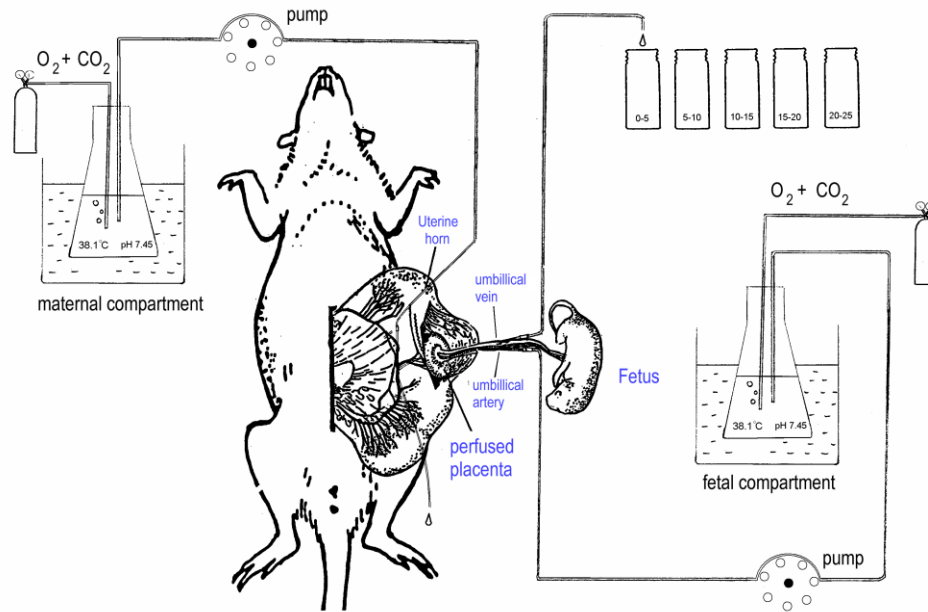


Kromě choriokarcinomových linií BeWo a JEG3 byly ke studiu exprese nukleárních receptorů použity také primární kultury lidského trofoblastu. Izolace primárního trofoblastu byla provedena na základě protokolu popsaného Klimanem (Kliman et al. 1986), dále modifikovaném dle Meyer von Schwabedissen (Meyer Zu Schwabedissen et al. 2005). Metoda je založena na enzymatické digesci placentární tkáně (trypsin, DNAsa) a následné centrifugaci na Percollově gradientu. Izolovaný trofoblast je možno kultivovat cca 5-7 dní. Tato metoda byla zavedena a optimalizována na našem pracovišti autorkou této disertační práce ve spolupráci s Dr. Karen May (Universität Greifswald) a Mgr. Lucíí Stejskalovou.

Studium transportních vlastností Bcrp v placentární bariéře potkaní placenty bylo prováděno za použití metody duálně perfundované placenty (Pavek et al. 2003; Staud et al. 2006). Pracoviště Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK je v současnosti jediným pracovištěm na světě, které rutinně tuto metodu provádí. U duálně perfundované placenty jsou vytvořeny dvě umělé cirkulace, maternální a fetální. Tento přístup proto umožňuje studovat nejen maternofetální, ale také fetomaternální přestup léčiv v různých časových intervalech, za různých koncentrací substrátů (studovaných léčiv nebo modelových látek) a inhibitorů sledovaných

transportérů. Schéma metody duálně perfundované placenty potkana je na obrázku 7. Pro stanovení exprese Bcrp byly použity metody real-time RT-PCR, Western blotting a imunohistochemie.

Obrázek č .7. Schematické znázornění metody duálně perfundované placenty potkana.



2.2. VLIV BUSULFANOVÉHO A KRYPTORCHICKÉHO POŠKOZENÍ NA MORFOLOGII VARLETE POTKANA

2.2.1. VARLE, SERTOLIHO BUŇKA, HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRA

Dvě základní funkce varlat, **spermatogeneze** a **steroidogeneze**, se odehrávají ve dvou různých kompartmentech, které jsou od sebe morfologicky i funkčně odlišné, ve své činnosti však na sebe úzce navazují. Spermatogeneze probíhá v tubulárním kompartmentu – v zárodečném epitelu semenotvorných kanálků, steroidogeneze převážně v intersticiální tkáni mezi kanálky (Junqueira 1999; Čihák 2002).

Podstatou endokrinní aktivity mužského reprodukčního systému je tvorba testosteronu a dihydrotestosteronu Leydigovými buňkami intersticia a řízení jejich tvorby luteinizačním hormonem (LH) hypofýzy. Folikulostimulující hormon (FSH) adenohipofýzy stimuluje Sertoliho buňky k sekreci vazebného proteinu pro androgeny a slouží k dosahování nezbytných koncentrací testosteronu v tubuli seminiferi contorti. Sertoliho buňky dále vylučují peptid inhibin, který omezuje syntézu i uvolňování FSH v předním laloku hypofýzy.

Spermatogeneze se objevuje s nástupem pohlavní zralosti a je nezbytným předpokladem plodnosti muže. Je řízena převážně prostřednictvím FSH a testosteronu (Lee & Cheng 2004). Proces má několik etap, při nichž se buňky přesouvají od báze semenotvorných kanálků do lumen. Jednotlivé buněčné fáze zahrnují spermatogonie, spermatocyty, spermatidy a spermie. Tyto buňky jsou seskupeny v 4 – 8 řadách, které zaujímají prostor mezi bazální laminou a průsvitem tubulu. Spermie se uvolňují ze zárodečných kanálků a shromažďují se v nadvarleti, kde dále dozrávají. Celý proces spermatogeneze trvá u člověka cca 64 dní. Spermatogeneze neprobíhá u všech semenotvorných kanálků synchronizovaně, nýbrž ve vlnách. To vysvětluje nesourodý vzhled kanálků, v nichž každá část reprezentuje jinou fázi spermatogeneze. Tuto sekvenci maturačních změn, které se odehrávají v dané oblasti zárodečného epitelu, označujeme jako cyklus semenotvorného epitelu. Semenotvorný cyklus je zcela evidentní u hlodavců, kde bylo popsáno 14 vývojových stadií (Leblond & Clermont 1952). U člověka existuje takovýchto stadií 6 (Junqueira 1999).

Sertoliho buňky semenotvorných kanálků zastávají roli především v podpoře, ochraně a regulaci výživy vyvíjejících se spermií. Jsou to podlouhlé elementy, které obklopují buňky semenotvorné linie. Jejich báze přisedají k bazální lamině semenotvorného kanálku, volné apikální konce vyčnívají do lumen semenotvorného kanálku. Jsou nepravidelného tvaru a u potkana zaujímají kolem 17-19% lumen semenotvorného tubulu, zbytek je tvořen buňkami spermatogenní řady (Mruk & Cheng 2004). Sertoliho buňky člověka a ostatních savců se během reprodukčního období nedělí. Jsou neobyčejně odolné vůči nepříznivým podmínkám, jako je infekce, malnutrice, radiace a přežívají insulty daleko snáze než buňky spermatogenní linie. K udržení tvaru, ukotvení, transportu organel a stabilizaci membrány v místě mezibuněčných kontaktů slouží cytoskelet Sertoliho buněk. Cytoskelet umožňuje také posun zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze a konečně uvolnění zralých spermií do lumen stočeného kanálku (Mruk & Cheng 2004). Cytoskelet je tvořen aktinem, intermediárními filamenti a mikrotubuly. **Aktin** je zásadní pro zachování struktury, je také součástí tubulobulbárních komplexů a ektoplazmatických specializací (speciální typ adhezivních spojení typický pro varle), a tím se podílí na pohybu zárodečných buněk epitelem. **Intermediární filamenta** se nacházejí mezi desmosomy a hemidesmosomy (mezi Sertoliho buňkami, mezi Sertoliho buňkami a spermatocyty/spermatidami), pravděpodobně se také podílí na zachování integrity semenotvorného epitelu. Mikrotubuly jsou tvořeny **tubulinem**. Jsou součástí ektoplazmatických specializací. Přisuzuje se jim funkce zachování válcovitého tvaru Sertoliho buněk, transport a fixace organel, translokace zárodečných buněk, stabilizace membrány Sertoliho buňky a ukotvení spermatid (Mruk & Cheng 2004).

Hematotestikulární bariéra je tvořena zejména systémem těsných spojení (tight junctions, TJ) vytvořeným mezi Sertoliho buňkami (u potkana se vytváří kolem 15-17 dne života zvířete). Těsná spojení ve varleti jsou soustředěna při bázi Sertoliho buněk, narozdíl od ostatních tkání (v apikální části epitelu). Dle lokalizace těsných spojení můžeme v kanálku rozlišit kompartment bazální, obsahující spermatogonie, preleptotenní a leptotenní spermatocyty, a adluminální, obsahující meiotické spermatocyty a spermatidy. Spermatogonie ležící v bazálním kompartmentu mají volný přístup k látkám obsaženým v krvi. V průběhu spermatogeneze potomstvo

spermatogonií prostupuje tímto systémem mezibuněčných kontaktů a ocitá se v kompartmentu adluminálním. V něm jsou pokročilejší stadia buněk spermatogenní linie chráněny před produkty přinášenými krví (Junqueira 1999). Vzhledem k tomu, že spermatocyty, spermatidy a spermie jsou izolovány od krevního zásobení hematotestikulární bariérou, výživa těchto elementů závisí zcela na schopnosti Sertolihových buněk zprostředkovat výměnu nutričních látek a metabolitů (Mruk & Cheng 2004).

Hematotestikulární bariéra patří mezi nejtěsnější bariéry v těle savců. Tvoří mechanickou ochranu, reguluje vstup molekul do nitra tubulu, tvoří také imunologickou bariéru. Spermatozoa mají totiž na svém povrchu exprimovány antigenní struktury, které se nevyskytují v jiných tkáních. Fyziologicky však nedochází k indukci imunologické reaktivity, namířené proti pohlavním buňkám. Mezi ochranné faktory dozrávajících spermií patří chybějící znaky HLA I. a velmi nízké koncentrace HLA II exprimované na jejich povrchu (Krejsek et al., rok). Nesporná je i úloha exprese Apo/FasL na povrchu zárodečných buněk (počínaje spermatidami) (Riccioli et al. 2003).

Na funkci hematotestikulární bariéry se podílejí také efluxní transportéry jako např. P-gp, MRP-1 (multidrug resistance protein) (Bart et al. 2002), jejichž funkcí je odstraňovat z buněk cizorodé molekuly, které se do buněk dostávají prostou difúzí (Schinkel 2001). Nicméně, zásadními strukturami zajišťujícími bariérovou funkci jsou mezibuněčná spojení, a to především spoje těsné a adherentní.

2.2.2. MODELÝ VÝZKUMU HEMATOTESTIKULÁRNÍ BARIÉRY

Pro studium regulačních mechanismů dynamiky těsných a adherentních spojení v průběhu spermatogeneze i za patologických stavů byla vyvinuta celá řada experimentálních modelů. Často používanými experimentálními zvířaty jsou hlodavci, zejména laboratorní potkani. Existují zde ovšem určité rozdíly, které je nutno brát v potaz při extrapolaci výsledků. U člověka například trvá proces spermatogeneze přibližně 64 dní, kdežto u potkana kmene Wistar přibližně 42 dní. Leblond & Clermond (1952) rozlišili u potkana 14 stádií (charakteristických konfigurací jednotlivých generací zárodečných buněk) semenotvorného epitelu (Leblond & Clermont 1952), zatímco u člověka se těchto stádií rozlišuje šest (Junqueira 1999).

Operativně navozený kryptorchismus a expozice vůči toxickým látkám umožňují studium adhezních markerů za podmínek porušené spermatogeneze. **Busulfan** je cytotoxická alkylační látka, používá se k léčbě myeloidní leukémie, polycythemia vera a primární trombocytózy. U experimentálních zvířat brání busulfan spermatogenezi. Vysoké dávky busulfanu zcela eliminují kmenové zárodečné buňky, čímž navodí u pokusných zvířat trvalou sterilitu. Podání dávek nízkých (10mg/kg) redukuje pouze část spermatogonií a po odeznění expozice vůči toxickému agens, dojde k obnově spermatogeneze z přeživších spermatogonií (Jiang 1998; Choi et al. 2006). Tento model je vhodný pro studium procesů vyskytujících se v průběhu poškození a znovuobnovení spermatogeneze v semenotvorném kanálku. Využívá se také často pro výzkum degenerativních změn v semenotvorném epitelu a při studiu funkce kmenových zárodečných buněk (Kanatsu-Shinohara et al. 2003).

Dalším vhodným modelem se jeví operativně navozený **kryptorchismus**. Vrozený kryptorchismus je vývojová abnormalita způsobená nesestoupením testes do skrota. Může být jednou z příčin mužské neplodnosti. Vede k poruše spermatogeneze, spojené s defekty v proliferaci a diferenciaci Sertoliho a Leydigových buněk. Dochází k redukci počtu diferencovaných Sertoliho buněk a tím k porušenému vývoji hematotestikulární bariéry (Lui et al. 2003). Poškození hematotestikulární bariéry je v tomto případě nevratné. Chirurgicky navozený kryptorchismus u experimentálních zvířat způsobuje rychlou degeneraci zárodečných buněk a infertilitu (Ishikawa et al. 2005; Rossi et al. 2005), proto je používán jako model pro sledování mechanismů vedoucích k poškození spermatogeneze. Příčinou poškození zárodečného epitelu je vliv různých faktorů v kombinaci s vyšší teplotou v břišní dutině. Mechanismy vedoucí k poškození nejsou dosud plně osvětleny, svou roli zde sehrává pravděpodobně apoptóza zárodečných buněk (Yin et al. 2002).

Tyto dva modely se od sebe liší v charakteru a také délce trvání poškození. U modelu busulfanového dochází k toxickému působení dané látky zejména na spermatogonie a po odeznění účinků xenobiotika k opětovné regeneraci zárodečného epitelu z přeživších spermatogonií (Jiang 1998). U modelu kryptorchického je degenerace způsobena spíše teplotním stresem a apoptotickým mechanismem a

k opětovné regeneraci zárodečného epitelu nedochází (Yin et al. 2002; Rossi et al. 2005).

Nejvýraznějším morfoloickým znakem poškození zárodečného epitelu je odtržení zárodečných buněk z epitelu do lumen kanálku. Předpokládá se, že oddělení zárodečných buněk od Sertoliho buněk je důsledkem poškození proteinů specializovaných adherentních mezibuněčných spojení (zonula adherens) a/nebo jejich pozměněné interakce se strukturami cytoskeletu buněk (Wang et al. 1998; Johnson & Boekelheide 2002). Zároveň dochází k poškození i dalších typů mezibuněčných spojení – nexů (Defamie et al. 2001), a zejména těsných spojení mezi sousedními Sertoliho buňkami, které jsou součástí hematotestikulární bariéry (Cheng & Mruk 2002).

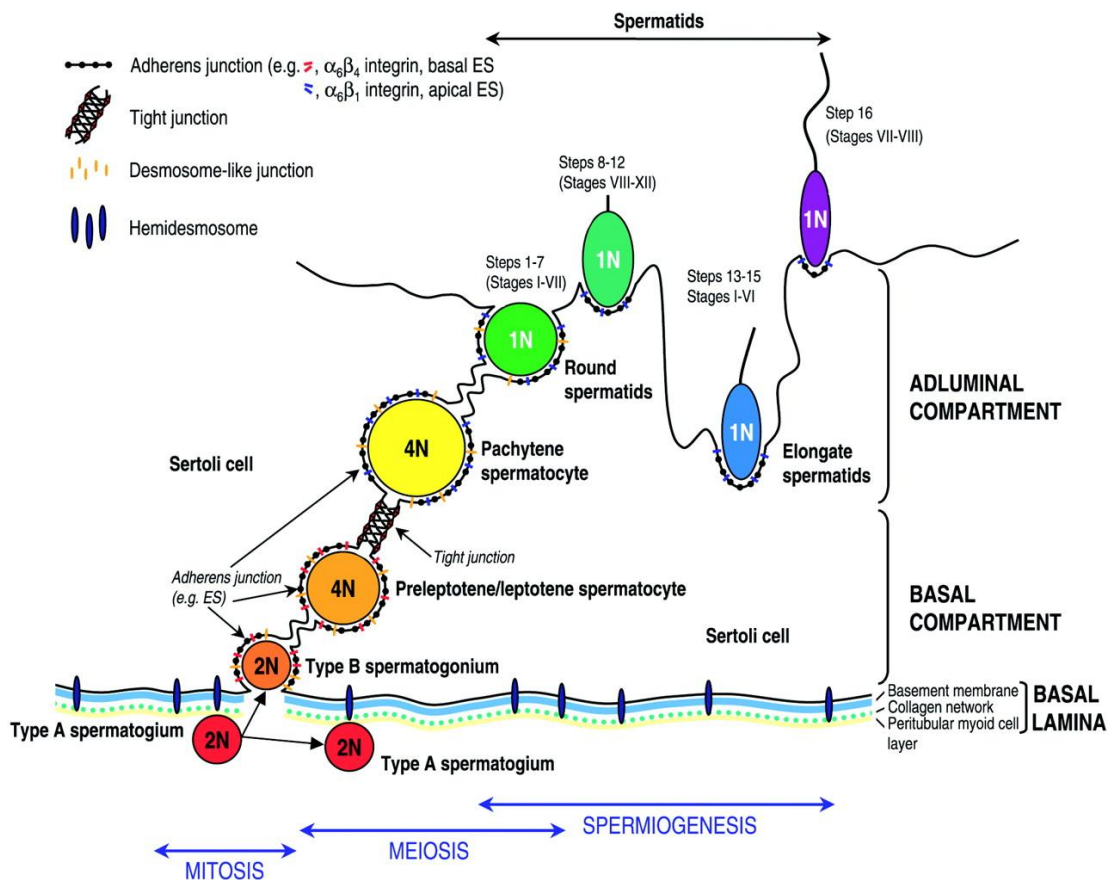
2.2.3. MEZIBUNĚČNÉ SPOJE VE VARLETI

Mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a extracelulární matrix existují různé typy mezibuněčných spojení. Rozlišují se tři morfoloicky a funkčně odlišné mezibuněčné epiteliální spojení, jedná se o:

- 1) těsné spoje (tight junctions, TJ)
- 2) adherentní spoje (adherens junctions, AJ)
- 3) nexy (spojení komunikační, gap junctions, GJ).

Ve varleti nacházíme všechny tyto typy (obr. 8) (Cheng & Mruk 2002).

Obr.8. Schematické znázornění mezibuněčných spojení v průběhu spermatogeneze a spermiogeneze (Cheng & Mruk 2002).



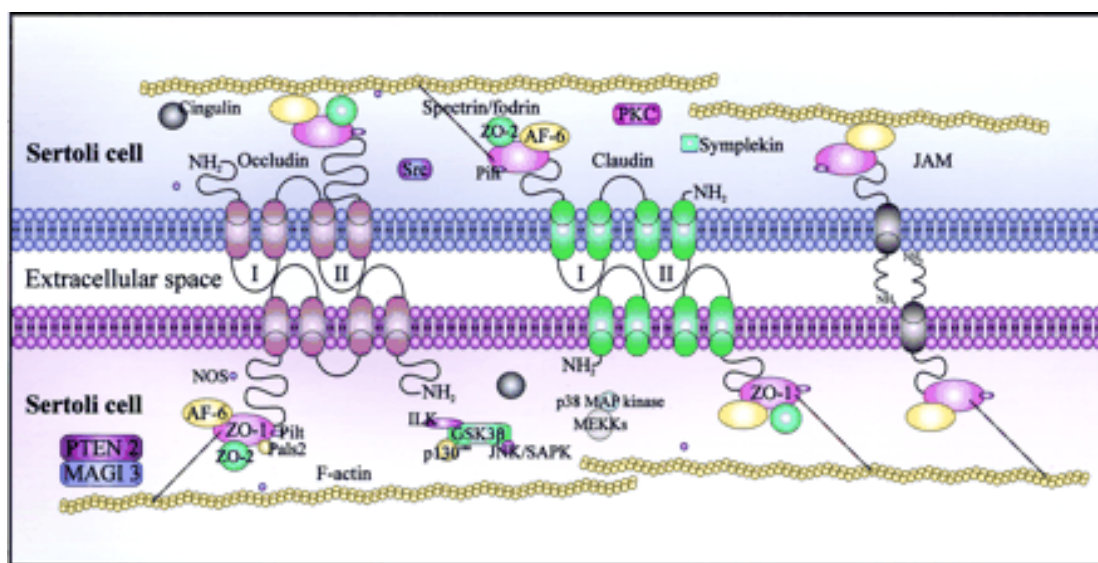
2.2.3.1 TĚSNÉ SPOJE

Těsné spoje (tight junctions, TJ) ve varleti zaujímají oblast těsného kontaktu mezi plazmatickou membránou sousedních buněk, kompletně obkružují bazální část Sertoliho buněk. Tím se také těsné spoje liší od ostatních epitelů, kde zaujímají své místo v apikální části epitelu. TJ tvoří hematotestikulární bariéru a rozdělují semenotvorný kanálek na kompartment bazální a adluminální. Pasáž molekul do adluminálního kompartmentu závisí hlavně na molekulové hmotnosti a chemické povaze látky, může být regulována také různými faktory a změnami fyziologických podmínek. K proteinům tvořícím TJ řadíme ZO-1, ZO-2, ZO-3, occludin, claudiny, junkční adhezní molekuly (JAMs) (Cheng & Mruk 2002).

Pro těsná spojení ve varleti je specifické, že v určitém stadiu vývoje zárodečných buněk dochází k jejich restrukturalizaci, a tím dovolují vstup zárodečných buněk (preleptotenní/leptotenní spermatocyty ve stadiu VII-IX) z kompartmentu bazálního do

adluminálního. Celý tento proces se děje spolu s restrukturalizací adherentních spojů v průběhu spermatogeneze (Cheng & Mruk 2002; Mruk & Cheng 2004).

Obr.9. Schematické zobrazení molekulární struktury tří multiproteinových komplexů přítomných v mezibuněčných těsných spojeních tvořících hematotestikulární bariéru. Zobrazeny jsou tři hlavní multiproteinové komplexy: 1) okludin – ZO-1/ZO-2; 2) kladin – ZO-1/ZO-2; 3) JAM – ZO-1 (Mruk & Cheng 2004).



2.2.3.2 ADHERENTNÍ SPOJE

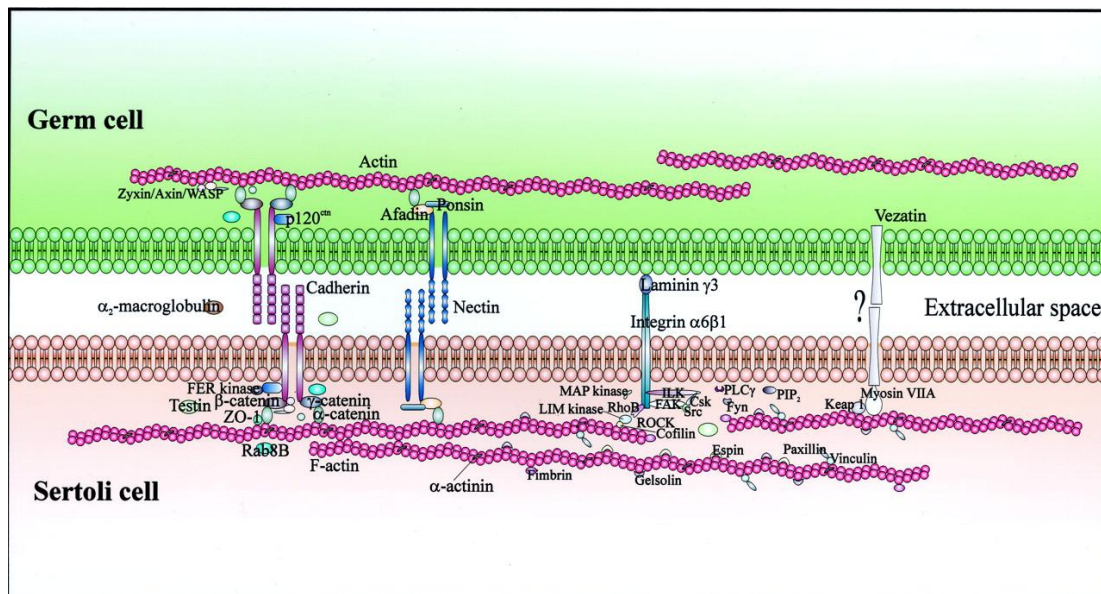
Adherentní spoje tvoří spojení mezi sousedními buňkami a jsou zodpovědné za udržení integrity tkání. Ve varleti se spolu s těsnými spoji také podílí na tvorbě hematotestikulární bariéry. Dynamický charakter adherentních spojů ve varleti umožňuje posun zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze z kompartmentu bazálního do adluminálního (Mruk & Cheng 2004).

Existují čtyři typy adherentních spojení, jedná se o 1) zonula adherens (adherentní spoje); 2) fokální spoje; 3) desmosomy a 4) hemidesmosomy. Adherentní a fokální spoje se váží na aktinová filamenta, zatímco desmosomy a hemidesmosomy využívají intermediárních filament. Ve varleti existují navíc dva modifikované typy adherentních spojů a to ektoplazmatické specializace a tubulobulbární komplexy (Mruk & Cheng 2004).

Adhezivní spoje (anchoring junctions, AJ) propojují cytoskeletární struktury mezi buňkami navzájem, resp. s extracelulární matrix a tím vytvářejí síť zachovávající integritu systému (Junqueira 1999). Mohou fungovat také jako signáltransdukční kaskády regulující základní buněčné procesy, jako proliferaci a diferenciaci (Vleminckx & Kemler 1999).

Dosud byly identifikovány 4 typy na aktin napojených jednotek adherentních spojení a to: 1) kadherin – catenin; 2) nektin – afadin – ponsin; 3) integrin – laminin; 4) vezatin – myosin. Ve varleti však byly detekovány pouze první tři typy (Mruk & Cheng 2004).

Obrázek č. 10. Schematické zobrazení molekulární struktury čtyř multiproteinových komplexů přítomných v adherentních spojení mezi Sertoliho buňkami a zárodečnými buňkami. Zobrazeny jsou čtyři hlavní multiproteinové komplexy: 1) kadherin – katenin; 2) nektin – afadin – ponsin; 3) integrin – laminin; 4) vezatin – myosin. Stále není úplně známo, zda vezatin (partner myosinu) je ve varleti exprimován (Mruk & Cheng 2004).



Speciálním typem adherentních spojení jsou **ektoplazmatické specializace** a **tubulobulbární komplexy**. Jedná se o modifikované na aktin vázané adherentní spojení

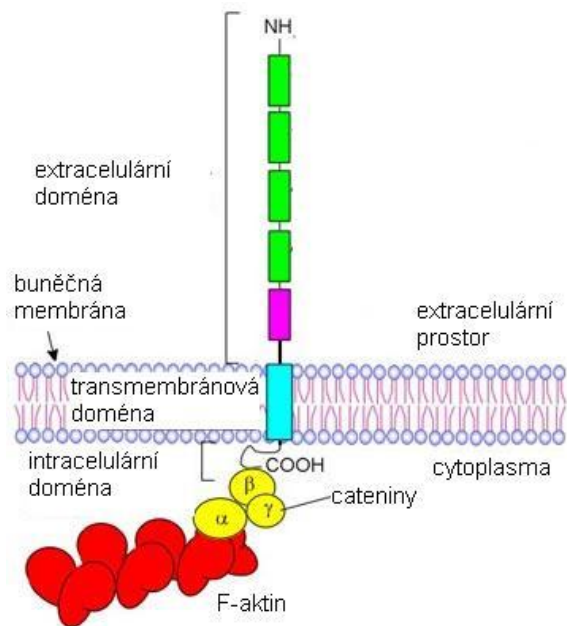
přítomné pouze ve varleti (Vogl et al. 2000; Mruk & Cheng 2004). Od klasických adherentních spojů se liší tím, že se jedná o dynamické struktury měnící se v průběhu spermatogenního cyklu. Ektoplazmatické specializace se nacházejí při bazi semenotvorného epitelu, jejich hlavním úkolem je zprostředkování soudržnosti mezi Sertoliho buňkami a regulace průchodu buněk spermatogenní řady z departmentu bazálního do adluminálního skrz hematotestikulární bariéru. Tubulobulbární komplexy najdeme v apikální části epitelu, zprostředkovávají ukotvení spermatid k Sertoliho buňkám a podílejí se na regulaci uvolňování spermatozoí do lumen tubulu (Vogl et al. 2000).

Vyvíjející se zárodečné buňky musí migrovat z departmentu bazálního do adluminálního tak, aby „zralé“ spermie mohly být uvolněny do lumen a transportovány dále. Bez tohoto časově závislého procesu není možná spermatogeneze a narušení průběhu může vést až k infertilitě (Lee & Cheng 2004). V průběhu dochází k průchodu spermatocytů skrz HTB a restrukturalizaci jak adherentních tak těsných spojů. Důležitou roli v tomto procesu hrají molekuly kadherinů.

KADHERINY

Kadheriny jsou Ca^{2+} -dependentní transmembránové adhezni proteiny (115-140kDa) zprostředkovávající mezibuněčnou interakci. Většina kadherinů se skládá z několika domén: 1) intracelulární, 2) transmembránové, 3) pět kalcium vázících domén (EC1-5). Kalcium stabilizuje multidomérovou strukturu kadherinů, při jeho nedostatku jsou kadheriny nefunkční a podléhají proteolýze (Cheng & Mruk 2002). Cytoplazmatická doména (-COOH konec) interaguje s cytoplazmatickými proteiny z „armadillo“ rodiny nazývanými cateniny, konkrétně s β -cateninem a χ -cateninem (Rowlands et al. 2000; Lee et al. 2003). Tento komplex se váže s α -cateninem, který zprostředkovává vazbu s aktinovými vlákny. I tento proces vyžaduje přítomnost Ca^{2+} a je regulován GTPázami (Nachtigal et al. 2001; Cheng & Mruk 2002).

Obrázek č. 11. Molekula klasických kadherinů se svou a) intracelulární doménou, b) transmembránovou doménou a c) extracelulární doménou tvořenou pěti kalcium vázícími doménami.



Kromě tvorby mezibuněčných spojení, mají kadheriny také funkci signalizační, přenášejí signály do nitra buněk (Vleminckx & Kemler 1999). Kadheriny tvoří nadrodinu o 6 podrodinách, které se rozlišují na základě složení proteinové domény, genomické struktury a fylogenetické analýzy sekvence proteinu. Tyto podrodiny zahrnují klasické kadheriny (typ I - E-, N-, R-, P-kadherin), atypické kadheriny (typ II - Kadherin-6, -7, -8, -10), desmozomální kadheriny (desmokoliny, desmogleiny), protokadheriny (Protokadherin-1, -2, OL-protokadherin, CNR protokadheriny), a Flamingo kadheriny (Nachtigal et al. 2001). Nejvíce prozkoumanou skupinou jsou kadheriny klasické (E-, P- a N-kadherin). Ve varleti bylo detekováno 24 různých kadherinů na úrovni mRNA, včetně P-, N- a E-kadherinu (Johnson & Boekelheide 2002).

P-kadherin (placentární kadherin) je 118 kD protein. Jeho struktura je podobná ostatním klasickým kadherinům, ale od E- a N-kadherinu se liší imunologickou specifitou a molekulovou hmotností. Jeho exprese byla poprvé popsána v myší placentární tkáni (Nose & Takeichi 1986). Navzdory svému názvu není přítomen

v lidské placentě (Shimoyama et al. 1989). Exprese P-kadherinu je typická pro buňky s proliferační aktivitou, jeho exprese klesá s diferenciací buněk (Shimoyama et al. 1989). Exprese P-cadherinkadherinu se dává do souvislosti se špatnou prognózou při rakovině prsu (Paredes et al. 2007).

Ve varleti byl P-kadherin detekován u myši do 8. dne postnatálně v peritubulární myoidní tkáni (Lin & DePhilip 1996). Za použití PCR a Western blotu byl P-kadherin detekován také v potkaním varleti (Cyr et al. 1992; Johnson et al. 2000). P- a N-kadheriny jsou ve varleti potkana různě exprimovány v průběhu postnatálního vývoje. Zatímco mRNA P-kadherinu je nejvyšší v době tvorby hematotestikulární bariéry a poté dochází k poklesu hladin na méně než poloviční úroveň, hladina mRNA N-kadherinu stoupá až do 42. dne po narození (uvolnění prvních spermatid z epitelu do lumen kanálu), poté dochází k mírnému poklesu a hladina se již drží na konstantní úrovni (Cyr et al. 1992). Exprese P-kadherinu v potkaním varleti na úrovni proteinu byla imunohistochemicky potvrzena v semenotvorném kanálku varlete, exprese byla závislá na stadiu semenotvorného epitelu (Pospěchova et al. 2007). V lidském varleti nebyl P-kadherin detekován (Andersson et al. 1994).

N-kadherin (neuronální kadherin) je 130kDa velký protein masivně exprimován v embryu, v dospělosti je jeho exprese omezena na nervovou tkáň, retinu, endotelové buňky, fibroblasty, osteoblasty, myocyty, chrupavku, oocyty, spermatidy a Sertoliho buňky (Derycke & Bracke 2004). Jeho zvýšená exprese je spojována s vyšší motilitou a metastatickou aktivitou nádorových buněk (Suyama et al. 2002). Ve varleti je N-kadherin exprimován Sertoliho i zárodečnými buňkami (spermatocyty a spermatidy) a vytváří zde komplex s β -cateninem u potkanů i u lidí (Andersson et al. 1994; Chung et al. 1998). Podílí se na ukotvení zárodečných buněk v epitelu a na jejich transportu epitelem (Newton et al. 1993; Chung et al. 1998). V intersticiu nebyl N-kadherin prokázán v Leydigových ani v peritubulárních myoidních buňkách (pouze v endotelu testikulárních kapilár) (Byers et al. 1994).

E-kadherin (epiteliální kadherin) zprostředkovává mezibuněčné interakce zejména mezi epitelovými buňkami, je zásadní pro diferenciaci buněk, jeho exprese klesá se zvyšující se motilitou a invazivitou buněk (Wheelock & Johnson 2003). Jeho exprese byla potvrzena v řadě epitelů, mimo jiné také v placentárním cytotrofoblastu

(Getsios et al. 2000). V našich studiích placentárního trofoblastu jsme ho používali jako marker diferenciac primárních kultur trofoblastu. U lidí není E-kadherin ve varleti vůbec exprimován (Andersson et al. 1994). Ve varleti potkana se E-kadherin v zárodečném epitelu nevyskytuje (v průběhu vývoje varlete ani v dospělosti), ale je přítomen v intersticiální tkáni jak ve fetálních Leydigových buňkách, tak i v dospělosti (Byers et al. 1994; Chung et al. 1998).

Kateniny jsou proteiny interagující s kadheriny a zprostředkovávající jejich spojení s cytoskeletem buněk. β - a χ -catenin se váží s cytoplazmatickou doménou kadherinů, α -catenin zajišťuje spojení buď přímo nebo přes aktin-vázající proteiny (např. α -actinin, vinculin, ZO-1) (Watabe-Uchida et al. 1998; Cheng & Mruk 2002). Kadheriny, cateniny a komplex kadherin/catenin mají dvě hlavní funkce. Jsou zodpovědné za mezibuněčnou adhezi a podílejí se na přenosu signálu v buňce. Adhezí a signalizační vlastnosti těchto molekul nemohou být odděleny. Variabilita interakcí kadherinů a cateninů umožňuje vytvoření různých signalizačních systémů v odlišných tkáních (Nachtigal et al. 2001; Cheng & Mruk 2002). Ve varlatech jsou cateniny exprimovány v Sertoliho i v zárodečných buňkách v komplexu s kadheriny např. jako součást ektoplazmatických specializací (Lee et al. 2003).

DALŠÍ TYPY ADHERENTNÍCH SPOJŮ

Kromě klasických adherentních spojů nacházíme ve varleti také spoje fokální, desmosomy a hemidesmosomy.

Fokální spoje existují mezi buňkami a extracelulární matrix, jsou napojena na aktinová filamenta. V těchto spojích se nacházejí především integriny, vinkulin, padolin (Mruk & Cheng 2004), podílejí se na něm také proteiny bazální membrány jako laminin, fibronectin atd. (Segretain & Falk 2004).

Desmosomy (neboli macula adherens) jsou složité diskoidní struktury na povrchu buněk, vytvářející mezibuněčné kontakty napojené na intermediární filamenta. Nejlépe prostudovány jsou v epidermis, kde vytvářejí jediný typ spojení v plochém vícevrstevném epitelu a zajišťují zde obzvláště pevnou mechanickou souržnost buněk

(Junqueira 1999). Desmosomy jsou tvořeny kadheriny (desmokoliny, desmogleiny), armadillo proteiny a plakiny (Mruk & Cheng 2004).

Hemidesmosomy jsou v testes soustředěny v bazální části, kde zprostředkovávají spojení Sertoliho buněk a bazální membrány. Jsou napojeny na intermediární filamenta a tvořeny integriny a dalšími dosud neidentifikovanými proteiny (Mruk & Cheng 2004).

2.2.3.3. NEXY

Nexus (angl. gap junction, komunikační spoje, GJ) se vyskytuje prakticky kdekoliv podél bočních membrán většiny epitelových buněk. Nexy jsou charakterizované těsným přimknutím (2 nm) sousedních buněčných membrán. Proteiny nexů (konexiny) vytvářejí hexamery s hydrofilním pórem o průměru kolem 1,6 – 2,0 nm, umístěným ve středu, tato jednotka se nazývá konexon. Jedná se o intracelulární kanály, které dovolují výměnu iontů i větších molekul do hmotnosti cca 1 kDa - ionty, aminokyseliny, malé peptidy, druzí poslové (cAMP, IP₃, Ca²⁺) a další metabolity (Shibata et al. 2001; Lampe & Lau 2004).

Například v srdci dovolují nexy rychlý mezibuněčný transfer akčních potenciálů, zajišťují koordinovanou kontrakci kardiomyocytů. Jsou také odpovědné za neurotransmisi ve specializovaných „elektrických“ synapsích. V nevzrušivých tkáních, jako jsou např. játra nebo cévní stěna, je jejich funkce méně probádána. Předpokládá se, že přechodem druhých poslů přes nexy dochází ke koordinaci funkce buněk v těchto tkáních (Willecke et al. 2002; Lampe & Lau 2004). Ve varleti zprostředkovávají přenos signálů mezi Sertoliho buňkami a buňkami zárodečnými, čímž se podílejí na koordinaci pohybu zárodečných buněk semenotvorným epitelem. Nejčastěji se vyskytujícím proteinem ve varleti je **connexin 43**. Je exprimován jak v Leydigových buňkách intersticia, tak v bazálním kompartmentu semenotvorných tubulů mezi Sertoliho buňkami a spermatogoniemi i spermatocyty a mezi sousedními Sertoliho buňkami (Batias et al. 1999).

2.2.4. Metody využití pro studium exprese P-kadherinu

Ke studiu vlivu kryptorchismu a busulfanového poškození na morfologický obraz tkáně varlete potkana (stav zárodečného epitelu i intersticiální tkáně mezi semenotvornými kanálky) a na spermatogenezi byly použity základní histologické techniky (barvení hematoxylin eosin). Pro studium exprese P-kadherinu ve zdravém, busulfanové a kryptorchickém varleti byly použity imunohistochemické metody na parafinových řezech.

CÍLE SEPARÁTNĚ NA STRANKU

2.3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- 1) zavést na pracovišti metodu izolace a kultivace primárního trofoblastu
- 2) odhalit úlohu VDR v lidské placentě za použití placentárních modelů, odhalit příčinu nízké exprese VDR v choriokarcinomových liniích BeWo a JEG-3
- 3) studovat expresi a transportní aktivitu Bcrp v potkaní placentě a na potkaních buněčných placentárních modelech
- 4) posoudit vliv modelového xenobiotika - busulfanu a vliv operativně navozeného jednostranného kryptorchismu na morfologický obraz tkáně varlete potkana a na spermatogenezi
- 5) za pomoci imunohistochemických metod zhodnotit změny v expresi proteinů adhezních mezibuněčných spojů (P-kadherin) mezi jednotlivými populacemi testikulárních buněk po kryptorchickém a busulfanovém poškození.

2.4. PODÍL DOKTORANDKY NA PŘEDKLÁDANÝCH PUBLIKACÍCH:

U kapitoly **4.1.** a **4.3.** je předkladatelka této disertační práce první autorkou, v případě **4.2.** kapitoly pak spoluautorkou. Autorka disertace sepsala rukopisy, u nichž je první autorkou. U práce, kde je spoluautorkou (4.2), se podílela na části týkající se imunohistochemické detekce Bcrp v potkaní placentě.

Ve studii uvedené v části **4.1.** prováděla veškeré genové reporterové studie, real time RT-PCR analýzy vzorků a imunohistochemické studie. Také izolace a kultivace primárního lidského trofoblastu byly provedeny autorkou disertační práce, a to ve

spolupráci s Mgr. Lucií Stejskalovou a Dr. Karen May (University of Greifswald). Western blot analýza byla provedena Mgr. Radimem Vrzalem z Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Téma tohoto projektu bylo zadáno Doc. PharmDr. Petrem Pávkem, Ph.D., který mi byl zároveň ve všech směrech nápomocný i při vlastní realizaci studií.

Ve studii uvedené v části **4.2.** této práce autorka prováděla odběry potkaních placent v průběhu březosti potkana a analýzu exprese Bcrp v těchto vzorcích pomocí imunohistochemie. Transportní studie za použití duálně perfundované placenty potkana a studie s buněčnými liniemi byly realizovány Doc. PharmDr. F. Štaudem, Ph.D. a ostatními spoluautory. Toto téma bylo zadáno autorem projektu Doc. PharmDr. Františkem Štaudem PhD.

Ve studii uvedené v části **4.3.** se autorka disertační práce podílela na přípravě vzorků a prováděla imunohistochemickou detekci P-kadherinu. Práce se zvířaty byla provedena PharmDr. Martinem Kopeckým, Ph.D a Doc. RNDr. Vladimírem Semeckým, CSc. Téma tohoto projektu bylo zadáno Doc. RNDr. Vladimírem Semeckým, CSc.

2.5. LITERATURA

- Al-Nasiry, S., B. Spitz, et al. (2006). "Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells." Hum Reprod **21**(1): 193-201.
- Andersson, A. M., K. Edvardsen, et al. (1994). "Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis." Int J Androl **17**(4): 174-80.
- Avila, E., L. Diaz, et al. (2007). "Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(1): 90-6.
- Avila, E., L. Diaz, et al. (2004). "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase, 1,25-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression by 8-bromo cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblast cells." J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 115-9.
- Barrera, D., E. Avila, et al. (2008). "Calcitriol affects hCG gene transcription in cultured human syncytiotrophoblasts." Reprod Biol Endocrinol **6**: 3.
- Bart, J., H. J. Groen, et al. (2002). "An oncological view on the blood-testis barrier." Lancet Oncol **3**(6): 357-63.
- Batias, C., N. Defamie, et al. (1999). "Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis." Cell Tissue Res **298**(1): 113-21.
- Belkacemi, L., U. Zuegel, et al. (2005). "Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human choriocarcinoma cell line JEG-3." Mol Cell Endocrinol **236**(1-2): 31-41.
- Blanchon, L., P. Sauvant, et al. (2002). "Human choriocarcinoma cell line JEG-3 produces and secretes active retinoids from retinol." Mol Hum Reprod **8**(5): 485-93.
- Borges, M., P. Bose, et al. (2003). "A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines." Placenta **24**(10): 959-64.
- Borst, P., R. Evers, et al. (1999). "The multidrug resistance protein family." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 347-57.
- Brown, A. J. and E. Slatopolsky (1999). "Vitamin D analogs: perspectives for treatment." Miner Electrolyte Metab **25**(4-6): 337-41.
- Byers, S. W., S. Sujarit, et al. (1994). "Cadherins and Cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis." Endocrinology **134**(2): 630-9.
- Carlberg, C. and F. Molnar (2006). "Detailed molecular understanding of agonistic and antagonistic vitamin D receptor ligands." Curr Top Med Chem **6**(12): 1243-53.
- Ceckova-Novotna, M., P. Pavsek, et al. (2006). "P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function." Reprod Toxicol **22**(3): 400-10.
- Ceckova, M., A. Libra, et al. (2006). "Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo." Clin Exp Pharmacol Physiol **33**(1-2): 58-65.
- Cyr, D. G., O. W. Blaschuk, et al. (1992). "Identification and developmental regulation of Cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis." Endocrinology **131**(1): 139-45.
- Čihák, R. (2002). Anatomie II, doplněné a upravené vydání. Praha, Grada Publishing: 298-305.

- Deeb, K. K., D. L. Trump, et al. (2007). "Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics." Nat Rev Cancer **7**(9): 684-700.
- Defamie, N., B. Mograbi, et al. (2001). "Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells." Carcinogenesis **22**(9): 1537-42.
- Derycke, L. D. and M. E. Bracke (2004). "N-Cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling." Int J Dev Biol **48**(5-6): 463-76.
- Diaz, L., I. Sanchez, et al. (2000). "Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2543-9.
- Doyle, L. A., W. Yang, et al. (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-70.
- Drocourt, L., J. C. Ourlin, et al. (2002). "Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes." J Biol Chem **277**(28): 25125-32.
- Dusso, A. S., A. J. Brown, et al. (2005). "Vitamin D." Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F8-28.
- Enders, A. C. and T. N. Blankenship (1999). "Comparative placental structure." Adv Drug Deliv Rev **38**(1): 3-15.
- Evans, K. N., J. N. Bulmer, et al. (2004). "Vitamin D and placental-decidual function." J Soc Gynecol Investig **11**(5): 263-71.
- Ganapathy, V., P. D. Prasad, et al. (2000). "Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface." J Pharmacol Exp Ther **294**(2): 413-20.
- Getsios, S., G. T. Chen, et al. (2000). "Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-Cadherin expression." J Reprod Fertil **119**(1): 59-68.
- Hewison, M., D. Zehnder, et al. (2004). "Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 alpha-hydroxylase." Mol Cell Endocrinol **215**(1-2): 31-8.
- Cheng, C. Y. and D. D. Mruk (2002). "Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development." Physiol Rev **82**(4): 825-74.
- Choi, Y. J., H. Song, et al. (2006). "Significant IgG-immunoreactivity of the spermatogonia of the germ cell-depleted testis after busulfan treatment." Anim Reprod Sci **91**(3-4): 317-35.
- Christakos, S., F. Barletta, et al. (2003). "Vitamin D target proteins: function and regulation." J Cell Biochem **88**(2): 238-44.
- Chung, S. S., M. Y. Mo, et al. (1998). "Rat testicular N-Cadherin: its complementary deoxyribonucleic acid cloning and regulation." Endocrinology **139**(4): 1853-62.
- Inoue, E., Y. Ishimi, et al. (2008). "Differential regulation of extracellular signal-related kinase phosphorylation by vitamin D3 analogs." Biosci Biotechnol Biochem **72**(1): 246-9.

- Ishikawa, T., Y. Kondo, et al. (2005). "Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in transgenic mice accelerates testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism." J Androl **26**(2): 281-8.
- Jiang, F. X. (1998). "Behaviour of spermatogonia following recovery from busulfan treatment in the rat." Anat Embryol (Berl) **198**(1): 53-61.
- Johnson, K. J. and K. Boekelheide (2002). "Dynamic testicular adhesion junctions are immunologically unique. II. Localization of classic Cadherins in rat testis." Biol Reprod **66**(4): 992-1000.
- Johnson, K. J., S. R. Patel, et al. (2000). "Multiple Cadherin superfamily members with unique expression profiles are produced in rat testis." Endocrinology **141**(2): 675-83.
- Jonker, J. W., M. Buitelaar, et al. (2002). "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15649-54.
- Jonker, J. W., S. Musters, et al. (2007). "Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) is expressed in the harderian gland and mediates transport of conjugated protoporphyrin IX." Am J Physiol Cell Physiol **292**(6): C2204-12.
- Junqueira, C., Carneiro, J., Kelley, R (1999). Základy histologie. Jinočany, H&H: 63-68, 402-417.
- Kanatsu-Shinohara, M., S. Toyokuni, et al. (2003). "Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation." Biol Reprod **68**(5): 1801-7.
- Khanal, R. and I. Nemere (2007). "Membrane receptors for vitamin D metabolites." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **17**(1): 31-47.
- Kliwer, S. A. (2003). "The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification." J Nutr **133**(7 Suppl): 2444S-2447S.
- Kliwer, S. A., B. Goodwin, et al. (2002). "The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism." Endocr Rev **23**(5): 687-702.
- Kliman, H. J., J. E. Nestler, et al. (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." Endocrinology **118**(4): 1567-82.
- Kovacs, C. S. and H. M. Kronenberg (1997). "Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation." Endocr Rev **18**(6): 832-72.
- Lampe, P. D. and A. F. Lau (2004). "The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication." Int J Biochem Cell Biol **36**(7): 1171-86.
- Leblond, C. P. and Y. Clermont (1952). "Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." Ann N Y Acad Sci **55**(4): 548-73.
- LeCluyse, E. L. (2001). "Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation." Eur J Pharm Sci **13**(4): 343-68.
- Lee, N. P. and C. Y. Cheng (2004). "Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development?" Hum Reprod Update **10**(4): 349-69.
- Lee, N. P., D. Mruk, et al. (2003). "Is the Cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis?" Biol Reprod **68**(2): 489-508.

- Lin, J. H. and M. Yamazaki (2003). "Clinical relevance of P-glycoprotein in drug therapy." Drug Metab Rev **35**(4): 417-54.
- Lin, L. H. and R. M. DePhilip (1996). "Differential expression of placental (P)-Cadherin in sertoli cells and peritubular myoid cells during postnatal development of the mouse testis." Anat Rec **244**(2): 155-64.
- Lui, W. Y., D. Mruk, et al. (2003). "Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis." Biol Reprod **68**(4): 1087-97.
- Makishima, M., T. T. Lu, et al. (2002). "Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor." Science **296**(5571): 1313-6.
- Matsubara, T., K. Yoshinari, et al. (2008). "Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction in vitro and in vivo." Drug Metab Dispos **36**(10): 2058-63.
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E., M. Grube, et al. (2005). "Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation." Am J Pathol **166**(1): 39-48.
- Mruk, D. D. and C. Y. Cheng (2004). "Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis." Endocr Rev **25**(5): 747-806.
- Myllynen, P., M. Pasanen, et al. (2007). "The fate and effects of xenobiotics in human placenta." Expert Opin Drug Metab Toxicol **3**(3): 331-46.
- Nachtigal, P., A. Gojova, et al. (2001). "The role of epithelial and vascular-endothelial Cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity." Acta Medica (Hradec Kralove) **44**(3): 83-7.
- Nakata, K., Y. Tanaka, et al. (2006). "Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems." Drug Metab Pharmacokinet **21**(6): 437-57.
- Newton, S. C., O. W. Blaschuk, et al. (1993). "N-Cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion." Dev Dyn **197**(1): 1-13.
- Nezbedova, P. and J. Brtko (2004). "1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inducible transcription factor and its role in the vitamin D action." Endocr Regul **38**(1): 29-38.
- Nishimura, M., S. Naito, et al. (2004). "Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies." Drug Metab Pharmacokinet **19**(2): 135-49.
- Nose, A. and M. Takeichi (1986). "A novel Cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2649-58.
- Paredes, J., A. L. Correia, et al. (2007). "P-Cadherin expression in breast cancer: a review." Breast Cancer Res **9**(5): 214.
- Pasanen, M. (1999). "The expression and regulation of drug metabolism in human placenta." Adv Drug Deliv Rev **38**(1): 81-97.
- Pascussi, J. M., L. Drocourt, et al. (2001). "Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor." Eur J Biochem **268**(24): 6346-58.
- Pávek, P., Červený, L., Mičuda, S., Štaud, F., Novotná-Čečková, M., Fendrich, Z (2005). "Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na

- xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. Pregnanový nukleární receptor X (PXR) a kontitativní androstanový receptor (CAR)." Remedia **15**(4-5): 380-383.
- Pavek, P. and Z. Dvorak (2008). "Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues." Curr Drug Metab **9**(2): 129-43.
- Pavek, P., Z. Fendrich, et al. (2002). "[Physiologic function of P-glycoprotein]." Cesk Fysiol **51**(3): 99-107.
- Pavek, P., F. Staud, et al. (2003). "Examination of the functional activity of P-glycoprotein in the rat placental barrier using rhodamine 123." J Pharmacol Exp Ther **305**(3): 1239-50.
- Pedigo, N., H. Zhang, et al. (2003). "A 5'-distal element mediates vitamin D-inducibility of PDGF-A gene transcription." Growth Factors **21**(3-4): 151-60.
- Perdew, G., Vanden Neucel, JP, Peters, JM (2006). Regulation of gene Expression. Totowa, New Persey, Humana Press.
- Pospechova, K., M. Kopecky, et al. (2007). "Changes in the expression of P-Cadherin in the normal, cryptorchid and busulphan-treated rat testis." Int J Androl **30**(5): 430-8.
- Pospechova, K., V. Rozehnal, et al. (2009). "Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines." Mol Cell Endocrinol **299**(2): 178-87.
- Reschly, E. J. and M. D. Krasowski (2006). "Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds." Curr Drug Metab **7**(4): 349-65.
- Riccioli, A., L. Salvati, et al. (2003). "The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role." Andrologia **35**(1): 64-70.
- Rossi, L. M., L. A. Pereira, et al. (2005). "Sperm retrieval techniques in rats with suppressed spermatogenesis by experimental cryptorchidism." Hum Reprod **20**(2): 443-7.
- Rowlands, T. M., J. M. Symonds, et al. (2000). "Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues." Rev Reprod **5**(1): 53-61.
- Sastry, B. V. (1999). "Techniques to study human placental transport." Adv Drug Deliv Rev **38**(1): 17-39.
- Segretain, D. and M. M. Falk (2004). "Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 3-21.
- Shibata, Y., M. Kumai, et al. (2001). "Diversity and molecular anatomy of gap junctions." Med Electron Microsc **34**(3): 153-9.
- Shimoyama, Y., T. Yoshida, et al. (1989). "Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1787-94.
- Schinkel, A. H. (2001). "The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers." Adv Exp Med Biol **500**: 365-72.
- Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 3-29.

- Soares, M. J., K. D. Schaberg, et al. (1987). "Establishment of a rat placental cell line expressing characteristics of extraembryonic membranes." Dev Biol **124**(1): 134-44.
- Staud, F. and P. Pavlek (2005). "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 720-5.
- Staud, F., Z. Vackova, et al. (2006). "Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line." J Pharmacol Exp Ther **319**(1): 53-62.
- Stephanou, A., R. Ross, et al. (1994). "Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3." Endocrinology **135**(6): 2651-6.
- Sullivan, M. H. (2004). "Endocrine cell lines from the placenta." Mol Cell Endocrinol **228**(1-2): 103-19.
- Suyama, K., I. Shapiro, et al. (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." Cancer Cell **2**(4): 301-14.
- Syme, M. R., J. W. Paxton, et al. (2004). "Drug transfer and metabolism by the human placenta." Clin Pharmacokinet **43**(8): 487-514.
- Szatmari, I., G. Vamosi, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells." J Biol Chem **281**(33): 23812-23.
- Thummel, K. E., C. Brimer, et al. (2001). "Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3." Mol Pharmacol **60**(6): 1399-406.
- Tirona, R. G. and R. B. Kim (2005). "Nuclear receptors and drug disposition gene regulation." J Pharm Sci **94**(6): 1169-86.
- Tuan, R. S., C. J. Moore, et al. (1991). "In vitro study of placental trophoblast calcium uptake using JEG-3 human choriocarcinoma cells." J Cell Sci **98** (Pt 3): 333-42.
- Urquhart, B. L., R. G. Tirona, et al. (2007). "Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs." J Clin Pharmacol **47**(5): 566-78.
- Vahakangas, K. and P. Myllynen (2006). "Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents." Mutat Res **608**(2): 129-35.
- van der Aa, E. M., J. H. Peereboom-Stegeman, et al. (1998). "Mechanisms of drug transfer across the human placenta." Pharm World Sci **20**(4): 139-48.
- Vleminckx, K. and R. Kemler (1999). "Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling." Bioessays **21**(3): 211-20.
- Vogl, A. W., D. C. Pfeiffer, et al. (2000). "Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations." Arch Histol Cytol **63**(1): 1-15.
- Wang, Z. Q., T. Todani, et al. (1998). "Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis." Pediatr Surg Int **14**(1-2): 9-13.
- Watabe-Uchida, M., N. Uchida, et al. (1998). "alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells." J Cell Biol **142**(3): 847-57.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 207-35.

- Willecke, K., J. Eiberger, et al. (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." Biol Chem **383**(5): 725-37.
- Yin, Y., B. C. Stahl, et al. (2002). "P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis." J Androl **23**(1): 64-70.
- Zhou, S. F., L. L. Wang, et al. (2008). "Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development." Curr Med Chem **15**(20): 1981-2039.

3. SOUHRN/SUMMARY

Souhrn

Hlavním limitujícím faktorem pro distribuci léčiv v těle je přítomnost fyziologických bariér. Placentární a hematotestikulární bariéra k nim bezesporu patří. Placenta je důležitý endokrinní orgán zprostředkovávající kontakt mezi matkou a plodem. Kromě dodávky živin plodu a odvodu zplodin metabolismu z plodu hraje placenta důležitou roli též v ochraně plodu. Klíčovou roli v ochraně plodu hraje vrstva syncytiotrofoblastu, která funguje nejen jako mechanická bariéra, ale také díky expresi biotransformačních enzymů a transportérů jako tzv. metabolická bariéra. Syncytiotrofoblast exprimuje též nukleární receptory, jež regulují transkripci genů podílejících se na výživě, minerálním metabolismu, proliferaci a diferenciaci, nebo mohou regulovat také expresi enzymů a transportérů. Ve varleti se na ochraně zárodečných buněk podílí hematotestikulární bariéra tvořená zejména těsnými a adhezními spoji mezi Sertoliho buňkami. Mezibuněčné spoje mezi Sertoliho buňkami a buňkami zárodečnými jsou zásadní také pro zachování zdárného vývoje spermií.

V rámci disertační práce jsme se zaměřili na studium **VDR** v placentě, placentárním trofoblastu a choriokarcinomových liniích BeWo a JEG3. VDR je exprimován jak v placentě (exprese na úrovni mRNA i proteinu), tak v kulturách primárního trofoblastu. Nicméně, jeho funkce v placentární fyziologii není zcela jasná. U BeWo a JEG3 choriokarcinomových linií jsme zjistili, že exprese VDR je velmi nízká ve srovnání s placentou a izolovaným trofoblastem. Za použití různých přístupů jsme se snažili odhalit příčinu nízké exprese VDR ve studovaných placentárních liniích. BeWo a JEG3 jsme inkubovali s látkami podporujícími diferenciaci buněk (jednalo se o 17β -estradiol a forskolin), dále s inhibitory deacetylas (trichostatin, sodium butyrát) a inhibitory DNA-metylas (3-deoxy-5-azacytidin). Zjistili jsme, že exprese VDR je částečně obnovena po inkubaci placentárních buněčných linií BeWo a JEG-3 s butyrátem sodným a 3-deoxy-5-azacytidinem. Tyto výsledky svým způsobem vysvětlují příčinu nedostatečné exprese VDR v choriokarcinomových liniích (epigenetická regulace). Mimo genomický efekt jsme prokázali, že vitamin D má také nengenomové účinky na VDR nezávislé. Ukázali jsme, že $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuluje fosforylaci ERK1/2 kináz v choriokarcinomové linii JEG-3, což by mohlo mít za

následek ovlivnění genové exprese nezávisle na přítomnosti VDR. Tato práce má zásadní význam pro další studium funkce VDR v placentární fyziologii a metabolismu.

Další publikovaná práce se zabývá expresí a funkcí **BCRP** v placentě potkana. Cílem této studie bylo popsát roli *Bcrp* v placentární farmakokinetice, a to za použití potkaní trofoblastové buněčné linie HRP-1 a duálně perfundované potkaní placenty. Za použití real time RT-PCR a Western blotu byla potvrzena exprese BCRP v HRP-1 a potkaní placentě. Imunohistochemická analýza potvrdila přítomnost placentárního *Bcrp* v trofoblastu labyrintové zóny placenty. Data tak naznačují, že BCRP je přítomen v trofoblastu placenty a může tak plnit svou úlohu v transplacentární farmakokinetice u experimentálního zvířete. Transportní studie za použití duálně perfundované placenty potkana potvrdila, že BCRP, podobně jako P-glykoprotein, brání vstupu modelových substrátů z mateřského kompartmentu do plodu a zároveň se podílí na eliminaci látek transportovaných BCRP/*Bcrp1* z plodu do mateřské cirkulace. Jelikož placentární „bariéra“ potkana je morfologicky i funkčně v mnoha ohledech velmi podobná lidské placentě, výsledky mají velkou prediktivní hodnotu pro transplacentární farmakokinetiku i u člověka.

Další práce je zaměřena na studium exprese **P-kadherinu** ve zdravém varleti potkana. Sleduje rovněž změny týkající se morfologického obrazu varlete a exprese P-kadherinu v průběhu poškození operativně navozeným kryptorchismem a busulfanem. Charakter exprese P-kadherinu v semenotvorném tubulu zdravého varlete se měnil v závislosti na stadiu semenotvorného epitelu. Expozice busulfanem a také kryptorchismus vedly k destruktivním změnám semenotvorných tubulů, spolu se snížením exprese P-kadherinu. Z výše uvedeného vyplývá, že P-kadherin se podílí na struktuře adherentních spojů ve varleti potkana a hraje důležitou roli pro udržení normální spermatogeneze. Jak kryptorchismus tak busulfanové poškození vede k desintegraci adherentních spojů.

Závěrem lze říci, že studie týkající se exprese **VDR** v placentárních buněčných liniích pomůže mnohým dalším badatelům objasnit funkci VDR v placentární fyziologii. Předmětem dalšího studia bude například ověřit, zda se VDR podílí na transkripční regulaci konkrétních biotransformačních enzymů (CYP3A4) či transportérů (P-gp), ať

již v placentě či jiných orgánových systémech. Již v současné době pracujeme na studii transkripční regulace vybraných biotransformačních enzymů a transportérů právě prostřednictvím VDR, PXR a CAR, a to nejen na placentárních, ale také na jaterních a střevních buněčných modelech. Z výsledků další studie vyplývá, že efluxní lékový transportér **BCRP** exprimovaný v placentě je významným faktorem ovlivňujícím vstup léčiv z matky do plodu. Znalost jeho substrátové specifity a funkční aktivity by mohlo být využito v optimalizaci farmakoterapie u těhotných žen. Odhalení úlohy **P-kadherinu** při narušené spermatogenezi nabízí možnost objasnit některé z příčin a mechanismů mužské neplodnosti, a to zejména ve spojení se studiem dalších proteinů podílejících se na tvorbě mezibuněčných spojů (těsných, adhezivních spojů, nexů), cytoskeletu či bazální membrány.

Summary:

The main limiting factor of distribution of the drugs in the body is the presence of physiological barriers. Placental and blood-testis-barrier are two barriers that were studied in this thesis. The placenta is an important endocrine organ bringing maternal and fetal blood into proximity, allowing exchange of nutrients and waste products. In addition, the placenta acts as the barrier between the mother and fetus, and plays an important role in fetal protection. The key rate-limiting layer in the placenta is the single layer of syncytiotrophoblast. The placental trophoblast contains multiple drug transporters and metabolizing enzymes that control maternofetal exchange of nutrients and hormones, or which form placental “metabolic” barrier. Moreover, several members of the nuclear receptor superfamily are expressed in placental trophoblasts. They regulate transcription of the genes involved in nutrient transport, mineral metabolism, proliferation and differentiation. Moreover it was suggested that they control expression of placental drug transporters and xenobiotic metabolizing enzymes. Germ cells in the testis are protected mainly by the presence of blood testis barrier, formed by the tight or adherens junctions between Sertoli cells. Moreover, intercellular junctions between Sertoli and germ cells are pivotal for spermatogenesis.

In this dissertation we focused on the expression and activity of **VDR** in human placenta, isolated trophoblast and in choriocarcinoma cell lines BeWo and JEG3. VDR is expressed (at the mRNA and protein level) in the human placenta and in the cultures of primary trophoblasts as well. However, its function in placental physiology is still unknown. We revealed that BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cell lines express low levels of VDR in comparison with isolated cytotrophoblasts or human placenta. In order to elucidate the mechanism of VDR gene suppression in JEG-3 and BeWo cell lines, we used several approaches to stimulate differentiation of the cytotrophoblast cell lines and to restore expression of VDR in the placental cell lines. We used prototype differentiation agents forskolin and 17β -estradiol, histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and trichostatin A and DNA methylase inhibitor 5-deoxy-3'-azacytidin.

We showed that VDR mRNA expression is restored after treatment of BeWo and JEG3 cells with sodium butyrate and 5-deoxy-3'-azacytidine. It means that VDR

expression is suppressed epigenetically in choriocarcinoma cell lines, which results in low transactivation activity of VDR in the cells. Finally, we observed a non-genomic effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in JEG-3 cells and the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. We revealed that $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulates phosphorylation of ERK1/2 kinases in JEG3 cells, what could affect gene expression independently on VDR expression. These results should be considered in future studies regarding the biological function of VDR and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the normal and tumour placental trophoblast.

The next study was focused on the expression and function of **BCRP** in transplacental pharmacokinetics of rat. Employing real-time RT-PCR and Western blotting established expression of BCRP in rat placenta and in rat placental cell line HRP-1. Immunohistochemical analysis confirmed the presence of BCRP in trophoblast of labyrinth zone of the placenta. Our data thus indicate that BCRP is expressed in the placenta and therefore can play a role in transplacental pharmacokinetics. Using dually perfused rat placenta, we confirmed that BCRP (similarly to P-gp) reduces the passage of its substrates from mother to the fetus and also removes the drug already present in the fetal circulation. The rat placental barrier is morphologically and functionally similar to human placenta, the results obtained here might have a high predictive value for the transplacental pharmacokinetics in humans.

The next study was focused on the expression of **P-cadherin** in normal, busulphan treated and cryptorchid rat testis. The pattern of expression of P-cadherin in the seminiferous epithelium changed with the stage of the seminiferous epithelium. Our experiments revealed that the busulphan treatment and cryptorchism led to destructive changes in the structure of seminiferous tubules, together with the decrease of the P-cadherin expression. We suggest that P-cadherin participates in the architecture of adherens junctions in testis, plays an important role in maintaining normal spermatogenesis and that cryptorchism and busulphan treatment lead to adherens junction disintegration.

In conclusion, the efflux drug transporter **BCRP** expressed in placenta is the important factor affecting penetration of drugs from mother to fetus. Knowledge of its substrate specificity and functional activity could be used in optimization of

pharmacotherapy of pregnant women. The study concerned with the expression of **VDR** in placental cell lines could help to other investigators to elucidate the role of VDR in placental physiology. The aim of next study will be to verify if VDR transcriptionally regulates the expression of biotransformation enzymes (CYP3A4) or transporters (P-gp). Presently we are working on the study of transcriptional regulation of CYP3A4 via VDR, PXR and CAR using placental, hepatic and intestinal cell lines. Elucidation the role of **P-cadherin** in normal and injured spermatogenesis could help us to clarify some of the reasons and mechanisms of man infertility, especially in connection with a study of other proteins participating in forming intercellular junctions (tight, adherens, communicative junctions, cytoskeleton or basement membrane).

4. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

4.1. Pospuchova K, Rozehnal V, Stejskalova L, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmud W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V, Pavek P. Expression and activity of VDR in the human placenta, trophoblast and choriocarcinoma BeWo and JEG3 cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009 Feb 27;299(2):178-87. Epub 2008 Dec 24

4.2. Staud, F., Vackova, Z., **Pospechova, K.**, Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., Cygalová, L., Nachtigal, P., Fendrich, Z. Expression and transport activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in dually perfused rat placenta and HRP-1 cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, vol. 319, no. 1, p. 53-62.

4.3. Pospeschova K, Kopecky M, Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Semecky V. Changes in the expression of P-cadherin in the normal, cryptorchid and busulphan-treated rat testis. *International Journal of Andrology*. 2007 Oct;30(5):430-8. Epub 2007 Feb 12.

5. DALŠÍ AKTIVITY

5.1. PUBLIKACE, JEŽ NEJSOU SOUČÁSTÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Jamborova G, Pospisilova N, Semecky V, Hyspler R, Ticha A, **Pospechova K**, Solichova D, Maxova M, Briestensky J, Real KJ, Nachtigal P. Microdispersed oxidised cellulose as a novel potential substance with hypolipidemic properties. *Nutrition*, 2008, Nov-Dec; 21(11-12):1174-81. Epub 2008 Jul 21

Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, **Pospechova K**, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S, Semecky V. Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in ApoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci*. 2008 Mar 26;82(13-14):708-17. Epub 2008 Jan 26.

Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, **Pospechova K**, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Semecky V. Endothelial expression of endoglin in normocholesterolemic and hypercholesterolemic C57BL/6J mice before and after atorvastatin treatment. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007 Aug;85(8):767-73.

Pospisilova N, Semecky V, Jamborova G, **Pospechova K**, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Nachtigal P. Endoglin expression in hyper-cholesterolemia and after atorvastatin treatment in apoE-deficient mice. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):388-97.

Nachtigal P, Jamborova G, Pospisilova N, **Pospechova K**, Solichova D, Zdansky P, Semecky V. Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(2):222-30.

Nachtigal P, Pospisilova N, **Pospechova K**, Jamborova G, Kopecky M, Jaynes R, Briestensky J, Santar I, Smahelova A, Solichova D, Zdansky P, Semecky V. MDOC and atorvastatin have potential antiinflammatory effects in vascular endothelium of apoE^{-/-} mouse model of atherosclerosis. *Life Sci*. 2006 Mar 20;78(17):1983-9.

Novotny J, **Pospechova K**, Hrabalek A, Cap R, Vavrova K. Skin Penetration of NBD-Ceramides is Chain Length-Dependent; Long-Chain Lipids Do Not Enter Nucleated Human Epidermis. *J Invest Derm*. *submitted*

5.2. PŘEDNÁŠKY NA MEZINÁRODNÍCH SYMPOSIÍCH

IPORSIP 2007 – The 5th International research symposium on pharmaceuticals (September 13 -15, 2007, Istanbul, Turkey)

Pospechova K., Pavek P., Pospisilova N., Nachtigal P., Jamborova G., Semecky V. Expression and Activity of VDR and RXRalpha in the Human Placental JEG-3 Cell Line.

4. Hradecké postgraduální dny (November 29 – December 1, 2007, Hradec kralove, Czech Republic)

Pospechova K., Pavek P., Pospisilova N., Jamborova G., Nachtigal P., Semecky V. Expression and Activity of VDR and RXR α in the Human Placental Choriocarcinoma BeWo and JEG3 Cell Lines.

5.3. ABSTRAKTY Z MEZINÁRODNÍCH KONFERENCÍ

Joint Meeting 2006 (October 4 – 7, 2006, Marburg, Germany)

Pospechova K., Pavek P., Pospisilova N., Nachtigal P., Jamborova G., Semecký V. Detection of VDR and RXR α in human term placenta. *Abstract proceedings*, p.141.

IPORSIP 2007 – The 5th International research symposium on pharmaceutics (September 13 -15, 2007, Istanbul, Turkey)

Pospechova K., Pavek P., Pospisilova N., Nachtigal P., Jamborova G., Semecky V. Expression and Activity of VDR and RXR α in the Human Placental JEG-3 Cell Line. *Acta Pharmaceutica Turcica*, vol 49, p.10, 2007.

4. Hradecké postgraduální dny (November 29 – December 1, 2007, Hradec kralove, Czech Republic)

Pospechova K., Pavek P., Pospisilova N., Jamborova G., Nachtigal P., Semecky V. Expression and Activity of VDR and RXR α in the Human Placental Choriocarcinoma BeWo and JEG3 Cell Lines. *Abstract proceedings*, p.11, 2007.

IFPA Meeting 2008 (International Federation of Placental Associations), 12th EPG Conference (September 10 – 13, 2008, Seggau castle, Austria)

Pospechova K., Nachtigal P., Semecký V., Pavek P. Expression and Activity of VDR and RXR α in the Human Placenta and in Choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cells. *Placenta* 29 (8), p. A.61, 2008

5.4. ABSTRAKTY Z ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH KONFERENCÍ

Konference Mladých – Sigma Aldrich (Devět skal 15. – 18. května 2005)

Ceckova M., Libra A., Pavek P., **Pospechova K.**, Brabec M., Fuchs R., Staud F.: Expression and functional activity of BCRP (ABCG2) in human choriocarcinoma BeWo cell line. *Chemické listy*, 99(4), 173-268, 2005.

55. česko-slovenské farmakologické dny (Hradec Králové 31.srpna - 2.září 2005)

Pospěchová K., Kopecký M., Pospíšilová N., Nachtigal P., Jamborová G., Semecký V. Změny exprese P-a E-kadherinu po indukovaném kryptorchismu a busulfanovém poškození varlete potkana. *Československá fyziologie*, vol. 54, s. 207, 2005.

43. Sjezd České anatomické společnosti a 42. Lojdovo Symposium – Progress in basic, applied and diagnostic histochemistry (Brno 4.-7.září 2005)

Pospěchová K., Kopecký M., Pospíšilová N., Nachtigal P., Jamborová G., Semecký V. Pattern of expression of connexin 43 in the normal and damaged rat testis. *Programme and abstracts*, s. 144, 2005.

56. česko-slovenské farmakologické dny (Bratislava 6.-8. září 2006)

Pospechova K., Kopecky M., Pospisilova N., Nachtigal P., Jamborova G., Semecky V. Prohibitin expression in the rat testes after busulphan treatment. *Zborník prác*, s. 134, 2006.

RNA club (November 29, 2008, Prague, Czech Republic)

Pavěk P., **Pospechova K.**, Svecova L., Syrova Z., Bitman M., Stejskalova L., Blahos J. Cooperation of three distinct promoter regulatory elements of PXR, CAR and VDR nuclear receptors in transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Abstract proceedings*, s. 21, 2008.