

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakologie a toxikologie

Regulace exprese biotransformačních enzymů  
a transportérů placentární bariéry

Disertační práce

**Mgr. Lucie Stejskalová**

Hradec Králové 2011



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, listopad 2011

.....



Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli **Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D.** za vedení mého PGS studia a za jeho podporu a trpělivost.

Poděkování patří i spolupracovníkům **Prof. RNDr. Zdeňku Dvořákovi, Ph.D. a Doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D.** z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, a **Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. a Mgr. Lence Zemánkové** z katedry biologických a lékařských věd.

Děkuji všem pracovníkům a postgraduálním studentům katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi byli v průběhu mého postgraduálního studia nápomocni a vytvářeli zde přátelské pracovní prostředí.

Moje poděkování směřuje také grantovým agenturám Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 170/50/95003), Grantové agentuře České republiky (GAČR 303/07/0128) a Specifickému vysokoškolskému výzkumu (SVV-263-003), které zajišťovaly moji práci po stránce finanční.

Za výborné rodinné zázemí, pohodu a podporu děkuji svým rodičům a za pozitivní energii našim kočkám.

# 1 Obsah

<b>1</b>	<b>OBSAH .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>OBEČNÁ ČÁST - PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Placenta.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Placentární modely .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3</b>	<b>Biotransformační a transportní funkce placenty.....</b>	<b>21</b>
4.3.1	Transportní funkce.....	21
4.3.1.1	ABC efluxní transportéry .....	22
4.3.1.1.1	P-glykoprotein a MRP transportéry .....	23
4.3.1.1.2	Breast cancer resistance protein (BCRP) .....	24
4.3.2	Biotransformační funkce placenty.....	25
4.3.2.1	UDP-glukuronosyltransferázy.....	26
<b>4.4</b>	<b>CYP1 rodina biotransformačních enzymů cytochromu P450.....</b>	<b>27</b>
4.4.1	CYP1A1 versus CYP1A2/CYP1B1 .....	27
4.4.2	CYP1A1 .....	28
4.4.2.1	Indukce a genová regulace CYP1A1 .....	29
4.4.2.2	Biotransformace exogenních látek enzymem CYP1A1 .....	30
4.4.2.3	Aktivace prokarcinogenů .....	30
4.4.2.4	Biotransformace endogenních látek enzymem CYP1A1 .....	32
4.4.2.4.1	Metabolismus estrogenů.....	33
4.4.2.4.2	Metabolismus kyseliny arachidonové .....	33
4.4.2.4.3	Metabolismus retinových kyselin .....	34
4.4.2.5	Inhibice CYP1A1 .....	34
4.4.2.6	Polymorfismus CYP1A1 .....	35
4.4.2.7	Expresce enzymu CYP1A1 v placentě .....	36
4.4.2.8	Vliv kouření na placentární CYP1A1 .....	36
4.4.3	Arylhydrokarbonový receptor (AHR) .....	38
4.4.3.1	Arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor (ARNT) a Arylhydrokarbonový receptorový represor (AHRR) .....	40
4.4.3.2	AHR signální cesta.....	40
4.4.3.3	Aktivace AHR ligandy .....	42
4.4.3.4	AHR polymorfismus .....	46

4.4.3.5	Expres AHR a ARNT v placentě .....	47
4.4.3.6	Cross-talk AHR a GR nukleárních receptorů.....	48
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - POUŽITÉ METODY A CHEMIKÁLIE.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikálie.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Buněčné linie a zvířecí model.....</b>	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>Molekulárně biologické metody .....</b>	<b>52</b>
5.3.1	REAL-TIME RT-PCR.....	52
5.3.2	Western blot.....	54
5.3.3	7-etoxyresorufin-O-deetylázová (EROD) esej .....	56
5.3.4	Imunohistochemie .....	57
5.3.5	Metoda genové reportérové studie (gene reporter assay).....	58
5.3.6	Analýza dat.....	59
<b>6</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>61</b>
<b>7.1</b>	<b>Expres AHR a ARNT v lidské a potkaní placentě a transkripční aktivita AHR v primární kultuře lidského trofoblastu .....</b>	<b>62</b>
<b>7.2</b>	<b>Účinek glukokortikoidů na inducibilitu CYP1A1 a dalších cílových genů AHR receptoru v placentární bariéře .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ ..</b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHY – UVEŘEJNĚNÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S TÉMATIKOU DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>124</b>

## 2 Abstrakt

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Lucie Stejskalová

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název disertační práce: Regulace exprese biotransformačních enzymů a transportérů placentární bariéry

Placenta je jedinečný orgán komunikace mezi matkou a plodem. Je nezbytná pro udržení těhotenství, vývoj plodu, ochranu plodu a zajišťuje řadu funkcí, především pak výměnu látek a plynů mezi matkou a plodem. Významná je také její endokrinní a metabolická funkce. Klíčovou roli v ochraně plodu hraje vrstva syncytiotrofoblastu, která funguje nejen jako fyziologická bariéra, ale také jako metabolická bariéra díky expresi mnoha biotransformačních enzymů a transportérů. Hladina jednotlivých biotransformačních enzymů se v průběhu těhotenství mění. Většina enzymů má velmi nízké množství mRNA a v některých případech nebyla zjištěna ani jejich významná hladina proteinu či enzymová aktivita.

Cytochrom CYP1A1 je jediný placentární enzym metabolizující xenobiotika, jehož exprese a aktivita je signifikantní po celou dobu těhotenství. Navíc se zjistilo, že exprese a aktivita placentárního CYP1A1 je silně indukována u matek kuřaček a v choriokarcinomových buněčných liniích BeWo a JEG-3 při jejich kultivaci s ligandy arylhydrokarbonového receptoru (AHR). AHR receptor je aktivován hydrofobními aromatickými sloučeninami, mezi které patří například polycyklické nebo halogenované aromatické hydrokarbony. Tyto látky se do ovzduší uvolňují během spalování pevných odpadů, spalování kamenouhelného dehtu a dřeva nebo jsou součástí tabákového kouře.

Jak exogenní, tak i endogenní glukokortikoidy se podílejí na transkripční regulaci CYP1A1. Transplacentární podávání glukokortikoidů před 35. týdnem těhotenství je indikováno u žen, u kterých hrozí předčasný porod. Antenatální podání glukokortikoidů



má příznivý vliv na zrání plic a snižuje riziko vzniku syndromu respirační tísně (Respiratory distress syndrome, RDS) u předčasně narozeného dítěte. Kromě prevence RDS chrání podávání glukokortikoidů novorozence také před intraventrikulárním krvácením, nekrotizující enterokolitidou a snižuje riziko systémové infekce v prvních hodinách života novorozence.

V této disertační práci jsme jako první zevrubně popsali expresi AHR a jeho arylhydrokarbonového receptorového nukleárního translokátoru (ARNT) v lidských a potkaních placentách a zaměřili jsme se také na studium transkripční aktivity lidského placentárního AHR při regulaci svých cílových genů CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP, které jsou důležité pro metabolismus a transport endogenních i exogenních látek přes placentu. Výsledky ukázaly, že vlivem modelových AHR ligandů je indukce CYP1A1 mRNA v porovnání s dalšími AHR cílovými geny (CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP) statisticky signifikantní v primárních kulturách lidských trofoblastů. Popsali jsme také placentární lokalizaci AHR a ARNT proteinů v lidské placentě, která se shodně nachází v prvním a třetím trimestru především v syncytiotrofoblastu. Potkaní placentární Ahr a Arnt proteiny jsou hlavně exprimované v placentárním trofoblastu. Jejich exprese na úrovni proteinu je pak maximální v 15. a 21. dni březosti potkana. Na základě tohoto zjištění můžeme usuzovat, že u potkana může docházet k rozdílné indukci Cyp1a1 v průběhu březosti.

V dalším výzkumu jsme se zaměřili na studium účinků glukokortikoidů na indukci CYP1A1 a dalších cílových genů AHR receptoru vyvolanou AHR ligandem 3-metylcholantrenem (3MC) v primárních kulturách lidských trofoblastů. Výsledky ukázaly, že vlivem samotného dexametazonu nedojde k signifikantním změnám v bazální expresi u cílových genů AHR receptoru (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP) ani u genů pro AHR, ARNT a AHRR (arylhydrokarbonový receptorový represor). Samotný dexametazon nezpůsobil změny na proteinové úrovni CYP1A1, ani na úrovni enzymové (Etoxyresorufin-*O*-deetyláza, EROD) CYP1A1 aktivity. Naproti tomu indukce CYP1A1 mRNA vyvolaná 3MC byla signifikantně zvýšená v lidské kultuře trofoblastů vlivem glukokortikoidů. U ostatních AHR cílových genů a AHR, ARNT a AHRR nebyla změna indukce statisticky signifikantní ve všech primárních kulturách lidských trofoblastů. Dexametazon rovněž stimuloval nárůst enzymové aktivity CYP1A1 způsobené 3MC v kulturách lidského trofoblastu.

Celkově mohu shrnout, že mezi nejdůležitější poznatky této doktorské disertační práce patří popis exprese a aktivity AHR receptoru v lidské placentě a zjištění, že glukokortikoidy stimulují genovou regulaci některých cílových genů AHR receptoru v lidských trofoblastových kulturách.

### 3 Abstract

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmacology and toxicology

Candidate: Mgr. Lucie Stejskalová

Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Gene expression regulation of biotransformation enzymes and transporters in placental barrier

Placenta is a unique organ facilitating the communication between mother and fetus. It serves as a respiratory, excretory, endocrine and metabolic organ during intrauterine development of the fetus and is necessary for maintenance of pregnancy and for the fetal protection. Syncytiotrophoblast is a single layer that represents the critical morphological and metabolic component of the placental metabolic and exchange barrier. The placental trophoblast contains multiple drug transporters and metabolizing enzymes that form placental metabolic barrier. The levels of the enzymes are not stable and fluctuate throughout pregnancy. Most of the enzymes are expressed at very low mRNA levels, however, in some cases there is absence of any relevant detectable protein or catalytic activity.

Cytochrome CYP1A1 is the only placental xenobiotic-metabolizing enzyme of the cytochrome P450 superfamily for which significant expression and catalytic activity have been conclusively demonstrated in placental trophoblasts throughout human pregnancy. Many researches reported significant induction of placental CYP1A1 activity in women exposed to cigarette smoke and in choriocarcinoma cell lines BeWo and JEG-3 exposed to Aryl hydrocarbon receptor (AHR) ligands. CYP1A1 is the prototype target gene of AHR receptor, that binds hydrophobic aromatic molecules including a wide variety of environmental contaminants (polycyclic aromatic hydrocarbons, halogenated aromatic hydrocarbons) generated through solid waste incineration, coal tar and wood burning and smoke exhaust.

Both synthetic and endogenous glucocorticoids have been shown to be involved in transcription regulation of CYP1A1. Transplacentally administered glucocorticoid therapy before 35 weeks of pregnancy has been distributed to pregnant women for several years to enhance fetal pulmonary surfactant production and prevent respiratory distress syndrome in premature newborns. Antenatal administration is associated not only with reduction in respiratory distress syndrome, but also with reduction of other pregnancy associated complications, such as intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis, and systematic infection in the first hours of life.

In this dissertation thesis we described AHR and ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) expression in human and rat placentas, and transcription activity of AHR in the human placental trophoblast in regulating its target genes CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 and BCRP. These genes are involved in metabolism and transport of exogenous and endogenous substances. We showed that only CYP1A1 mRNA, but not CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP, AHR, ARNT and AHRR (Aryl hydrocarbon receptor repressor) mRNAs, was significantly induced in human placental trophoblast cultures after exposure to prototype AHR ligands. We also described for the first time placental localization of human AHR and ARNT proteins throughout pregnancy, which were present primarily in first-trimester and term placenta in syncytiotrophoblasts forming the so-called placental morphologic and metabolic barrier. Rat Ahr and Arnt proteins were mainly localized in placental trophoblasts and reached maximum expression during 15 and 21 gestation days, which might indicate a different response to Ahr ligands in placental Cyp1a1 induction during rat gestation.

The next study was focused on the effects of glucocorticoids on 3MC dependent induction of CYP1A1 and other AHR target genes in primary cultures of human trophoblast. We showed that dexamethasone alone had no significant effect on mRNA expression of AHR target genes (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 and BCRP) and AHR, ARNT AHRR mRNA expression. The basal level of CYP1A1 protein and basal CYP1A1 EROD (Ethoxyresorufin-*O*-deethylase) activity were not significantly affected by dexamethasone. In contrast, we reported that 3MC-inducible CYP1A1 mRNA, but not CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP, AHR, ARNT and AHRR mRNAs, was significantly up-regulated by glucocorticoids in human placental trophoblast cultures of the term placentas. EROD activity of the trophoblast

cultures treated with the combination of 3MC (3-methylcholanthrene) and dexamethasone (betamethasone) was higher when compared to the enzyme activity of 3MC-treated trophoblast cultures. Surprisingly, CYP1A1 protein level induced by 3MC was not significantly changed by usage of dexamethasone.

In conclusion, this dissertation thesis describes expression and transcription activity of AHR receptor in human and rat placentas and clearly demonstrates effects of glucocorticoids on gene regulation of AHR target genes in human primary trophoblast cultures.

## Seznam zkratek

1EP	1-etynylpyren
1PP	1-(1-propyl)pyren
2PP	2-(1-propynyl)fenantren
3MC	3-metylcholantren
4Pbi	4-(1-propynyl)bifenyl
7, 12-DMBA	7,12-dimetylbenzantracen
11 $\beta$ -HSD-2	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza-2
AA	Arachidonová kyselina
AHR	Arylhydrokarbonový receptor
AIP	AHR interacting protein
AR	Androstanový receptor
ARNT	Arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor
AHRR	Arylhydrokarbonový receptorový represor
ATP	Adenosin trifosfát
BaP	Benzo[ <i>a</i> ]pyren
BeWo	Lidská choriokarcinomová buněčná linie BeWo
BCRP	Breast cancer resistance protein
BNF	$\beta$ -naftoflavon
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
DHES	Dehydroepiandrosteron sulfát
DMSO	Dimetyl sulfoxid

DRE	Dioxinový responsivní element
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
E <sub>3</sub>	Estriol
EPA	Eikosapentaenová kyselina
ER	Estrogenový receptor (ERα, ERβ)
EROD	Etoxyresorufin- <i>O</i> -deetyláza
E <sub>1</sub> S	Estron 3-sulfát
gd	den březosti
GR	Glukokortikoidní receptor
GST	Glutathion S-transferáza
hCG	Choriový gonadotropin
HIF1β	Hypoxií indukovaný faktor 1β
HLH/PAS	Helix - smyčka - helix/Per – ARNT - Sim
HSP90	Heat shock protein 90
JAR	Lidská choriokarcinomová buněčná linie JAR
JEG-3	Lidská choriokarcinomová buněčná linie JEG-3
LBD	Ligand vázající doména
MDR	Multidrug resistance phenomenon
mRNA	messangerová ribonukleová kyselina
MRP	Multidrug resistance protein
NLS	Nukleární lokalizační signál
NET	Transportér pro norepinefrin

OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
OH-AA	Hydroxy derivát kyseliny arachidonové
OH-E <sub>2</sub>	Hydroxy deriváty 17β-estradiolu
P-gp	P-glykoprotein
PAH	Polycyklické aromatické hydrokarbony
PCB	Polychlorované bifenyly
PhIP	2-Amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridin
PR	Progesteronový receptor
Rb	Retinoblastomový protein
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SAR	Structure - activity relationship (vztah účinku a struktury)
SER	Transportér pro serotonin
SULT	Sulfotransferáza
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TR-H	Trofoblast od zdravé matky
TR-S	Trofoblast od matky kuřačky
UGT	UDP - glukuronosyltransferáza
XAP2	Hepatitis B virus X-associated protein 2
XRE	Xenobiotický responsivní element

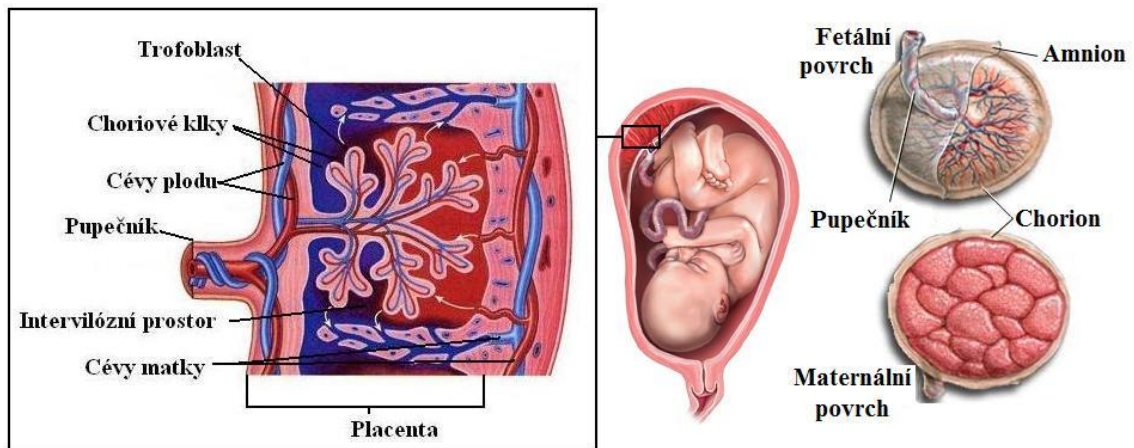


## 4 Obecná část - přehled současného stavu řešené problematiky

### 4.1 Placenta

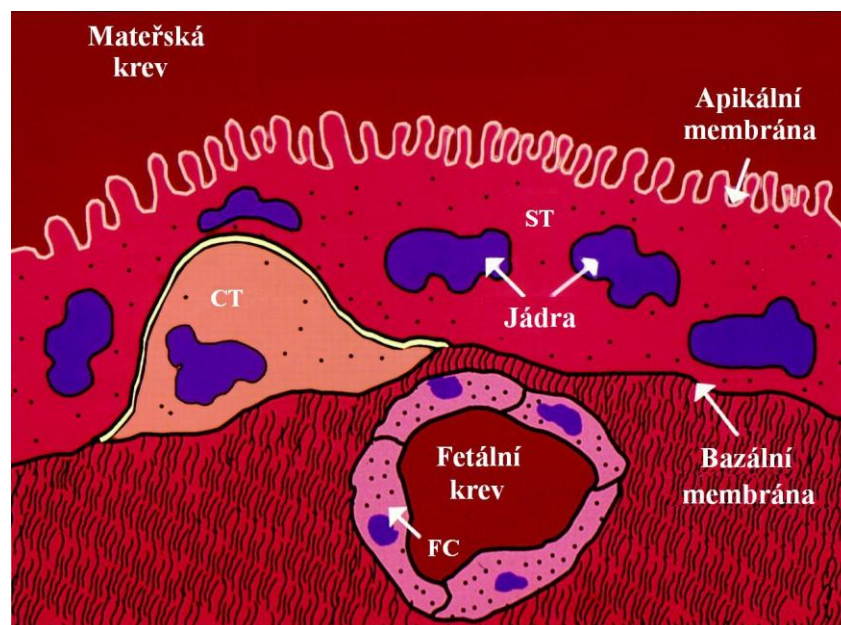
Placenta představuje specifický orgán komunikace mezi matkou a plodem. Je významná řadou funkcí, které jsou nezbytné pro udržení těhotenství a vývoj plodu. Zajišťuje výměnu plynů, kdy kyslík přechází z matky do plodu a oxid uhličitý je vylučován z plodu do matky. Kromě zásobování plodu kyslíkem dodává placenta do plodu také výživné látky (glukózu, aminokyseliny, vitamíny atd.) a na druhé straně eliminuje odpadní látky a metabolity z plodu do cirkulace matky. Významná je také jako zdroj hormonů (hCG, estrogeny, progesteron atd.). Jedním z významných hormonů tvořených placentou je choriový gonadotropin (hCG). Je tvořen syncytiotrofoblastem a jeho přítomnost v krvi a v moči žen je důkazem těhotenství a biomarkerem průběhu těhotenství (Sullivan 2004). U primárních kultur trofoblastů je pak hCG také důležitým ukazatelem životaschopnosti trofoblastů v průběhu kultivace (Kliman *et al.* 1986). Další důležitá funkce placenty je metabolická, kdy svými enzymy metabolizuje hormony, exogenní a endogenní sloučeniny na méně toxické či neaktivní metabolity, které jsou dále eliminovány. V porovnání s jaterní biotransformací matky je však aktivita těchto enzymů výrazně menší (Syme *et al.* 2004).

Placenta je tvořena fetální (choriový plát a choriové klky) a mateřskou (*decidua basalis*) tkání. Fetální část je tvořena choriovou ploténkou (membránou) a choriovými klky. Choriová membrána je tvořena vazivem, ve kterém probíhají větve cév pupečníku. Povrch je kryt amniovým epitelem a vnitřní plocha syncytiotrofoblastem. Na amniové ploše placenty se upíná pupečník. Choriové klky jsou zakotvené v bazální ploténce (*decidua basalis*) nebo bohatě rozvětvené v intervilózních prostorech. Choriové klky jsou složeny ze stromatu obklopeného vrstvou cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu. Část placenty zahrnující oblast klku zakotveného v bazální ploténce se nazývá kotyledon (funkční jednotka placenty). Jednotlivé kotyledony jsou mezi sebou rozděleny přepážkami (*decidua septa*). Lidská placenta obsahuje asi 20 až 40 kotyledonů. Povrch klků je omýván krví, přičemž dochází k intenzivní výměně látek mezi matkou a plodem (Obr. 1) (Enders and Blankenship 1999, Syme *et al.* 2004, van der Aa *et al.* 1998).



**Obr. 1:** Schématická struktura lidské placenty (převzato z <http://health.allrefer.com/health/placenta-abruptio-anatomy-of-a-normal-placenta.html>; <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit8/ovaryplacenta.html>; <http://www.women-health-info.com/445-Pregnancy-late-bleeding.html>).

Lidská placenta je hemochoriálního typu, což znamená, že fétální tkáň je v přímém kontaktu s mateřskou krví. Placentární bariéra je tvořena endotelem fetálních kapilár, vrstvou cytotrofoblastu a syncytiotrofoblastu. Během druhého a třetího trimestru se vrstva cytotrofoblastu stává nesouvislou a syncytiotrofoblast je rozhodující fyziologickou a metabolickou složkou placentární bariéry (Obr. 2) (Syme *et al.* 2004).



**Obr. 2:** Schématická struktura lidské placentární bariéry. FC - endotel fetálních cév; ST - syncytiotrofoblast; CT - cytotrofoblast (převzato z (Ganapathy *et al.* 2000))

Ve strukturách placent existují různé mezidruhové rozdíly. Placenty savců mohou být podle struktury bariéry mezi mateřskou a fetální krví rozděleny na tři typy: 1) hemochoriální typ (člověk, potkan, králík, morče), 2) endoteliochoriální typ (kočka, pes), 3) epiteliochoriální typ (ovce, prase, kůň) (Syme *et al.* 2004). Podle počtu vrstev trofoblastu může být dále hemochoriální typ dělen na hemomonochoriální (člověk, morče), hemodichoriální (králík) a hemotrichoriální (myš, potkan) (Enders and Blankenship 1999).

## 4.2 Placentární modely

Z hlediska studie funkce představuje placenta unikátní orgán, jelikož neexistuje možnost zkoumání funkce placenty na těhotných matkách kvůli etickým důvodům. Pro studium placentárních funkcí a transportu musela být proto vyvinuta řada alternativních metod. Jednou z možností je využití savčích zvířecích modelů, které jsou využívány jednak ke studiu placentárního transportu, funkce, ale i toxicity (teratogenity). Ačkoli u těchto modelů existuje mnoho výhod pro jejich využití, byla vyvinuta i řada *in vitro* alternativních metod, protože lidská placenta se v mnohém liší od placent ostatních živočišných druhů (Syme *et al.* 2004). *In vitro* metody využívají choriokarcinomové buněčné linie, primární kultury buněk izolovaného cytotrofoblastu z lidské placenty nebo i placentární explanty. Ke studiu transportní funkce lze pak využít duálně perfundovanou lidskou placentu, či perfundovaný placentární kotyledon, případně duálně perfundovanou potkaní placentu (Sastry 1999).

Mezi nejčastěji využívané choriokarcinomové buněčné linie patří linie JEG-3, BeWo a JAR (Sullivan 2004).

**JEG-3** placentární linie má mnoho biologických a biochemických vlastností společných se syncytiotrofoblastem. Linie byla vytvořena z BeWo buněčné linie a vytváří multijaderná syncytia, která připomínají syncytia tvořená syncytiotrofoblastem *in vivo*. Tato buněčná linie má zachovanou tvorbu steroidních hormonů, enzymů, hCG či laktogenu (Kohler and Bridson 1971, Sullivan 2004, Vahakangas and Myllynen 2006, Wadsack *et al.* 2003).

**BeWo** buněčná linie je tvořena cytotrofoblastem bez diferenciací na syncytium za normálních podmínek, což je v kontrastu s primární kulturou cytotrofoblastu, který se shlukuje a tvoří syncytium. Při stimulaci forskolinem mají pak buňky schopnost, oproti buněčné linii JEG-3, tvořit syncytium morfologicky podobné syncytiotrofoblastu placenty (Al-Nasiry *et al.* 2006). Buňky mají morfologické vlastnosti a expresi biochemických markerů podobných trofoblastu. Používají se například ke studiu metabolismu buněk a transportních vlastností kvůli jejich růstu v monovrstvě (Vahakangas and Myllynen 2006, Wadsack *et al.* 2003).

**Primární kultura lidského trofoblastu** je odvozena přímo z placentární tkáně a svými vlastnostmi se nejvíce blíží placentárnímu syncytiotrofoblastu. Pro izolaci buněk trofoblastu se využívá mechanická, enzymatická digesce a následně pak dochází k separaci buněk na Percollově gradientu. Během kultivace buněk dochází k vzájemnému splývání a přeměně na syncytiotrofoblast (syncytium) (Kliman *et al.* 1986). Izolace a následně kultivace primárního trofoblastu je velmi náročná metoda. Buňky primárního trofoblastu mají nízkou životaschopnost (asi 1 týden) a kultura může být navíc kontaminována i jinými typy buněk (např. fibroblasty) (Vahakangas and Myllynen 2006). Ve spolupráci s pracovištěm Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Institut für Pharmakologie (Greifswald, Německo) byla tato metoda izolace primárního trofoblastu zavedena i na našem pracovišti. Autorka této disertační práce se podílela na jejím zavedení a využila ji pro klíčové experimenty své disertační práce.

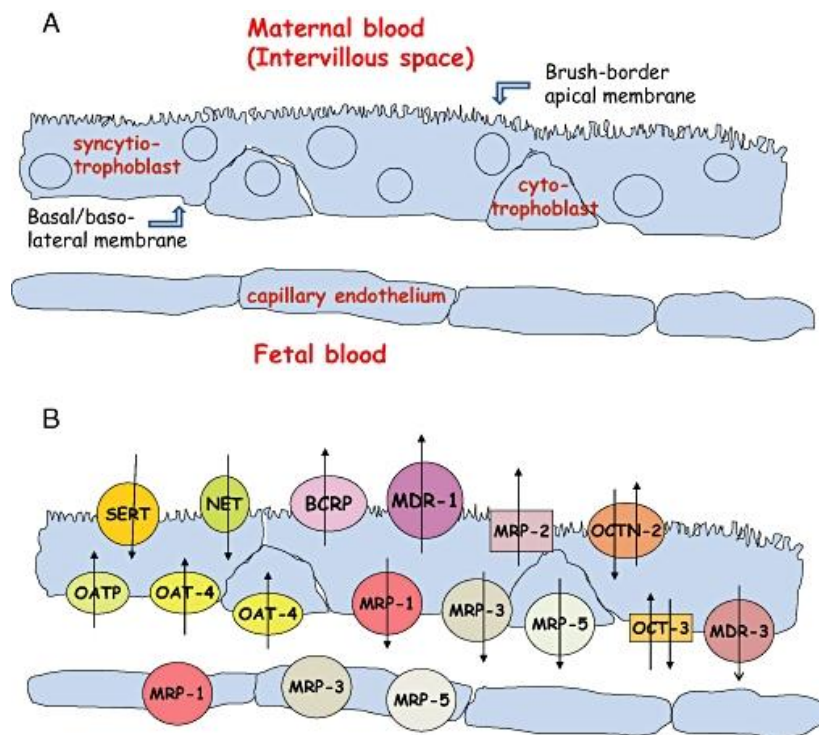
Nejčastěji využívaný zvířecí model placenty představuje **placenta potkana**. Délka březosti potkana trvá 21 dní a placenta je hemotrichoriálního typu (obsahuje tři vrstvy trofoblastu). U vyvinuté placenty potkana lze rozlišit dvě morfologicky odlišné vrstvy - labyrint a spongiotrofoblast. Spongiotrofoblast je tvořen trabekulami naplněnými mateřskou krví, které neobsahují fetální kapiláry. Spongiotrofoblast není tedy místem výměny odpadních a výživných látek. Naproti tomu labyrint obsahuje mateřskou krev, která je oddělena vrstvou trofoblastu od fetální krve a dochází zde tedy k výměně potřebných látek (Enders and Blankenship 1999). Při využití zvířecího modelu je proto potřeba brát ohled na anatomické a funkční odlišnosti placent (Syme *et al.* 2004).

### **4.3 Biotransformační a transportní funkce placenty**

#### **4.3.1 Transportní funkce**

Dříve se předpokládalo, že placenta představuje jedinečnou neproniknutelnou bariéru, která zabrání prostupu cizích látek do plodu. Později se však ukázalo, že tomu tak není a že skoro všechny látky podané v průběhu těhotenství matce mohou v určité míře vstupovat do cirkulace plodu. Látky mohou prostupovat přes placentu pasivní difuzí, aktivními transportéry, facilitovanou difuzí, pinocytózou a fagocytózou. Průchod látky přes placentu je ovlivněn jejími fyzikálně chemickými vlastnostmi - liposolubilitou, molekulární hmotností, stupněm ionizace a popřípadě ještě vazností na bílkoviny krevní plazmy. Většina nízkomolekulárních hydrofobních neionizovaných látek je schopna snadno procházet přes placentu pasivní difuzí (Myllynen *et al.* 2007, Pacifici and Nottoli 1995, St-Pierre *et al.* 2002, Syme *et al.* 2004).

Placentární aktivní transportéry zahrnují dvě skupiny proteinů, a to ATP - binding cassette (ABC efluxní transportéry) a ATP - nezávislé transportéry z rodiny Solute Carrier transportérů - SLC. V placentě jsou pak tyto aktivní transportéry lokalizovány buď na apikální (maternal-facing brush-border membrane) nebo na bazální (fetal-facing basolateral membrane) membráně syncytiotrofoblastu a/nebo v endotelu fetálních kapilár (Obr. 3) (Vahakangas and Myllynen 2009). K ATP - nezávislým transportérům patří třeba transportéry pro přenos aniontů a kationtů (OATP - organic anion-transporting polypeptide, OAT - organic anion-transporter, OCT - organic cation transporter), nukleosidů a monoaminů (SERT - transportér pro serotonin a NET - transportér pro norepinefrin) (Ni and Mao 2011). V ochraně plodu pak sehrávají významnou klíčovou úlohu ABC efluxní transportéry (P-gp, BCRP atd.) (St-Pierre *et al.* 2002, Syme *et al.* 2004).



**Obr. 3:** Transportéry lidské placentární bariéry. (A) Mikrostruktura placentární bariéry. (B) Lokalizace hlavních transportních proteinů. BCRP - Breast cancer resistance protein; MDR - Multidrug resistance protein; MRP - Multidrug resistance-associated protein; NET - noradrenalin transporter; OAT - organic anion transporter; OATP - organic anion-transporting polypeptide; OCTN - organic cation transporter; SER - serotonin transporter (převzato z (Vahakangas and Myllynen 2009)).

#### 4.3.1.1 ABC efluxní transportéry

ABC efluxní transportéry jsou transmembránové proteiny, které za pomoci energie ve formě ATP přenášejí řadu strukturně odlišných léčiv a xenobiotik přes membránu syncytiotrofoblastu, a to i proti koncentračnímu gradientu, a tím tak chrání plod před jejich škodlivým působením (Ni and Mao 2011). ABC transportéry se také podílejí na rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům (Schinkel and Jonker 2003). Rodina ABC transportérů zahrnuje asi 52 proteinů a mezi nejvíce studované patří P-glykoprotein (P-gp/ABCB1/MDR1), transportéry nazývané Multidrug resistance protein (MRP 1-3, ABCC1-3) a poslední objevený člen Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) (Ni and Mao 2011).

#### 4.3.1.1.1 *P-glykoprotein a MRP transportéry*

**P-glykoprotein** (P-gp, MDR1, ABCB1) je glykoprotein o molekulové hmotnosti 170 kDa a patří zřejmě mezi nejvíce prostudované ABC efluxní transportéry. Kromě jeho ochranné funkce v bariérách (lokalizace v endotelových buňkách kapilár mozku, kapilárách varlat a na apikální straně syncytiotrofoblastu placenty) byla jeho přítomnost nalezena i v dalších tkáních, např. v epitelu tenkého a tlustého střeva, v jaterních hepatocytech a v renálních proximálních tubulech (Ceckova-Novotna *et al.* 2006, Vahakangas and Myllynen 2009). K substrátům P-gp patří celá škála chemicky a strukturně různorodých látek, které jsou nejčastěji hydrofobní, bez náboje nebo (lehce) bazické. V souvislosti s P-glykoproteinem byl také nalezen transport látek s kyselou povahou (metotrexát, fenytoin) (Schinkel and Jonker 2003). K substrátům P-gp lze zařadit imunosupresivní léčiva, antibiotika, HIV proteázové inhibitory, cytostatika a také endogenní látky (steroidní hormony) (Schinkel and Jonker 2003).

Pro další informace o P-gp odkazují na přehledové články Ni & Mao 2011 a Vahakangas & Myllynen 2009 (Ni and Mao 2011, Vahakangas and Myllynen 2009).

**Multidrug resistance proteins (MRPs)** podrodina je tvořena nejméně devíti členy MRP. V placentě byla jejich přítomnost nalezena jak na apikální a bazální membráně syncytiotrofoblastu, tak i v endotelu fetálních kapilár. V porovnání s P-gp a BCRP je mnohem méně znám jejich funkční význam. MRP transportéry přenášejí anionty a endogenní látky (konjugáty bilirubinu, prostaglandiny, estrogenery) ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou, s glutathionem a sulfáty. Funkce MRP transportérů spočívá především v jaterní exkreci organických iontů (včetně bilirubinu) (Ni and Mao 2011, Schinkel and Jonker 2003, Vahakangas and Myllynen 2009).

Pro další informace o MRP odkazují na přehledový článek Ni & Mao 2011 (Ni and Mao 2011).

#### 4.3.1.1.2 *Breast cancer resistance protein (BCRP)*

Lidský **BCRP** představuje druhého člena G podrodiny ABC efluxních transportéru (ABCG2). Byl objevený jako transportér schopný způsobit rezistenci nádorových buněk na mitoxantron, doxorubicin a daunorubicin (Doyle *et al.* 1998, Ni *et al.* 2010). Stejně jako P-gp nebo MRP1 představuje BCRP ATP dependentní efluxní transportér pro řadu strukturně i chemicky vzájemně nesouvisejících látek. Mezi substráty BCRP transportéru patří nejen chemoterapeutické látky (mitoxantron, metotrexát, topotekan, irinotekan, daunorubicin, doxorubicin atd.), ale i jiná léčiva jako prazosin, glyburid, nitrofurantoin, dipyridamol, statiny. Výčet diverzity BCRP substrátů může být rozšířen i o neterapeutické látky jako třeba flavonoidy, porfyriny, estron 3-sulfát a karcinogenní PhIP (Ni *et al.* 2010).

Lidský BCRP gen je lokalizován na 4q22 chromozomu a BCRP protein je tvořený 655 aminokyselinami (72 kDa). BCRP transportér může být označen jako „half“ transportér, neboť může tvořit homodimer nebo oligomer (homotetramer) (Staud and Pavek 2005, Vahakangas and Myllynen 2009).

Jeho vysoká exprese byla zjištěna podobně jako u P-gp v tenkém střevě, v játrech, v mozkovém endotelu a v placentě (Ni *et al.* 2010). V lidské i potkaní placentě byl BCRP lokalizován na apikální straně syncytiotrofoblastu (Ceckova *et al.* 2006, Staud *et al.* 2006). V lidské, myší i potkaní placentě se jeho exprese mění v průběhu těhotenství. Lidská placenta ve 28. týdnu vykazuje dvojnásobnou expresi v porovnání s placentou z 39. týdne (Meyer zu Schwabedissen *et al.* 2006). U myší a potkaní placenty má BCRP nejvyšší expresi kolem 14. a 16. dne a pak následně klesá (Yasuda *et al.* 2005). BCRP exprese v průběhu těhotenství může být ovlivněna zejména změnou hladin steroidních hormonů (Ni and Mao 2011).

Několik publikovaných studií naznačuje, že na regulaci BCRP exprese by se mohly také podílet AHR, HIF1 $\alpha$ , ER $\alpha$  a ER $\beta$  (Ebert *et al.* 2005, Ee *et al.* 2004, Krishnamurthy *et al.* 2004, Wang *et al.* 2006). Kromě ochrany plodu před potencionálními toxickými látkami se také zvažují jeho případné další fyziologické funkce v placentě. Tento transportér by se například mohl podílet na regulaci syntézy placentárního estrogenu prostřednictvím dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEAS)



a estron 3-sulfátu (E<sub>1</sub>S) (Grube *et al.* 2007). BCRP by mohl také hrát roli v kontrole diferenciaci cytotrofoblastu prostřednictvím intracelulárního sfingosin-1-fosfátu (Ni and Mao 2011).

Pro další informace o BCRP odkazují na přehledové články Ni *et al.* 2010; Štaud & Pávek 2005 (Ni *et al.* 2010, Staud and Pavek 2005).

### 4.3.2 Biotransformační funkce placenty

K další důležité funkci placenty patří metabolická funkce, kdy svými enzymy metabolizuje endogenní a exogenní sloučeniny a hormony na méně toxické či neaktivní látky, které jsou dále eliminovány (Syme *et al.* 2004). Nicméně za určitých podmínek jsou placentární enzymy schopny aktivovat některá xenobiotika na reaktivní toxické látky, které pak mají nepříznivý vliv na plod (Desforges and Sibley 2010, Myllynen *et al.* 2005, Pasqualini 2005, Syme *et al.* 2004).

Některé enzymy z nadrodiny cytochromu P450, které metabolizují látky v první fázi biotransformace, se nacházejí v buňkách trofoblastu. Enzymy z rodiny CYP1 - CYP3 se podílejí především na metabolizaci xenobiotik a enzymy z rodiny cytochromů CYP4 - CYP27 se podílejí hlavně na syntéze endogenních molekul (Pasqualini 2005).

Hladina jednotlivých enzymů se v průběhu těhotenství mění. Enzymy CYP1A1, CYP1A2, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP4B1 byly na úrovni mRNA detekovány v prvním trimestru a CYP1A1, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5 a CYP4B1 mRNA byly detekovány v placentě na konci třetího trimestru (Hakkola *et al.* 1996a, Hakkola *et al.* 1996b, Myllynen *et al.* 2007, Syme *et al.* 2004). Většina enzymů má velmi nízkou úroveň mRNA a v některých případech nebyla zjištěna ani významná hladina proteinu či jejich katalytická aktivita. Jenom několik izoform enzymů metabolizujících xenobiotika je exprimováno v třetím trimestru v době porodu na úrovni proteinu s detekovatelnou enzymatickou aktivitou. K těmto enzymům patří cytochrom CYP1A1, jehož aktivita je signifikantní po celou dobu těhotenství, ačkoliv exprese tohoto enzymu musí být indukována

arylhydrokarbonovým receptorem AHR (Syme *et al.* 2004) (CYP1A1 viz kapitola 4.4.2 a AHR viz kapitola 4.4.3).

Kromě enzymů, které se podílejí na metabolismu xenobiotik, patří mezi další důležité enzymy placentární bariéry i 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza-2 (11 $\beta$ -HSD-2), která metabolizuje kortisol a kortikosteron na jejich inaktivní 11-keto formy (kortison a 11-dehydrokortikosteron). 11 $\beta$ -HSD-2 tímto způsobem chrání plod před účinky kortisolu od matky (Burton and Waddell 1999).

Z enzymů druhé biotransformační fáze byly v lidské placentě detekovány UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT) a glutathion S-transferázy (GST) (Myllynen *et al.* 2007, Syme *et al.* 2004).

#### 4.3.2.1 UDP-glukuronosyltransferázy

Uridin 5'-difosfát glukuronosyltransferázy jsou enzymy druhé biotransformační fáze, které konjugují xenobiotika s kyselinou glukuronovou. Takto vzniklé produkty jsou hydrofilní, což usnadňuje jejich následnou exkreci (Mackenzie *et al.* 1997). Přítomnost UGT enzymů v placentě přispívá k ochraně plodu během těhotenství a k eliminaci řady látek (Collier *et al.* 2002a). 15 známých izoform enzymu UGT může být rozděleno do dvou podrodin UGT1 a UGT2. Geny UGT1 jsou lokalizovány na lidském chromozomu 2q37 a jsou kódovány 5-ti exony (Mackenzie *et al.* 1997), naproti tomu UGT2 jsou lokalizovány na chromozomu 4 (Collier *et al.* 2002a).

Izoformy UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15 a 2B17 byly detekovány na úrovni mRNA a proteinu v syncytiu placentárního trofoblastu v prvním a v třetím trimestru v době porodu. UGT1A exprese na úrovni mRNA a proteinu byla nalezena také v syncytiu placent v prvním trimestru, ale nebyla již zjištěna v placentách třetího trimestru v době porodu (Collier *et al.* 2002a, Collier *et al.* 2002b).

Bylo zjištěno, že u matek kuřáček, které v průběhu těhotenství kouřily, dochází ke zvýšení aktivit UGT enzymů v porovnání s matkami nekuřáčkami (Collier *et al.* 2002b).

## 4.4 CYP1 rodina biotransformačních enzymů cytochromu P450

### 4.4.1 CYP1A1 versus CYP1A2/CYP1B1

Do rodiny enzymů CYP1 náleží CYP1A1, CYP1B1 a CYP1A2. Ačkoli tyto enzymy patří do stejné rodiny a mají řadu podobných vlastností, a to subcelulární lokalizaci, metabolizaci promutagenů a prokarcinogenů na aktivní metabolity, regulaci prostřednictvím arylhydrokarbonového receptoru, přesto existuje řada rozdílů, kterými se navzájem liší. Tyto rozdíly můžeme najít třeba v tkáňové distribuci, substrátové preferenci a stereospecifické oxidaci (Don *et al.* 2003, Nebert *et al.* 2004, Neve and Ingelman-Sundberg 2008).

CYP1A1 a CYP1A2 jsou totožné v aminokyselinové sekvenci asi z 80% a CYP1A enzymy jsou asi z 40% identické s CYP1B1. Geny pro CYP1A1 a CYP1A2 jsou lokalizovány na 15. chromozomu (15q22-qter) (Ikeya *et al.* 1989). CYP1B1 je jediný známý člen podrodiny CYP1B a je lokalizován na chromozomu 2 (2q22-21) (Doshi *et al.* 2006).

Společnou vlastností cytochromů CYP1A1 a CYP1B1 je metabolismus polycyklických aromatických hydrokarbonů (PAH), zatímco substráty pro CYP1A2 jsou převážně N-heterocykly a arylaminy (Dragin *et al.* 2006).

Všeobecně se předpokládá, že cytochrom **CYP1A2** je výlučně a konstitutivně exprimován v játrech. Nicméně několik studií prokázalo jeho přítomnost i v plicích, v jícnu, v mozku, v prostatě a v gastrointestinálním traktu. Stejně jako CYP1A1 je i CYP1A2 indukovaný přes arylhydrokarbonový receptor. Bylo zjištěno, že v některých případech může dojít k indukci bez aktivace AHR (Wei *et al.* 2002). Expres CYP1A2 mRNA byla zjištěna u placent z prvního trimestru, ale v placentách třetího trimestru již exprese nebyla zaznamenána (Hakkola *et al.* 1996a, Hakkola *et al.* 1996b).

**CYP1B1** je enzym spojovaný s nádory, jelikož jeho značná exprese byla zaznamenána právě u nádorových buněk, ačkoli CYP1B1 mRNA byla nalezena i v normální lidské tkáni (ledviny, plíce, střevo, oko, prostata, děložní hrdlo, děloha, mozek, játra). Přítomnost odpovídajícího proteinu však již v těchto tkáních nebyla

detekována (Doshi *et al.* 2006). Stejně jako u CYP1A1 je exprese tohoto enzymu regulována prostřednictvím arylhydrokarbonového receptoru. Konstitutivní exprese CYP1B1 mRNA byla zaznamenána v placentě na nízké úrovni jak v prvním, tak i ve třetím trimestru a cigaretový kouř u matek kuřáček nezpůsobil indukci placentární CYP1B1 mRNA (Hakkola *et al.* 1996a, Hakkola *et al.* 1997, Hakkola *et al.* 1996b).

Přestože tyto enzymy pocházejí ze stejné rodiny enzymů, byl u těchto izoforem zaznamenán rozdíl v metabolismu estradiolu. Cytochrom CYP1B1 metabolizuje 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) na karcinogenní 4-hydroxyestradiol (4-OH-E<sub>2</sub>), který tvoří adukty s DNA (Cavalieri *et al.* 2000). Předpokládá se, že by metabolická aktivace estrogenu enzymem CYP1B1 mohla hrát roli i ve vzniku prsních nádorů. Ve srovnání s CYP1B1, CYP1A1 a CYP1A2 metabolizují E<sub>2</sub> na nekarzinogenní 2-hydroxyestradiol (2-OH-E<sub>2</sub>) a mohou tak chránit před E<sub>2</sub> indukovanou karcinogenezí. Poměr CYP1A1/CYP1B1 by mohl být tudíž kritický z hlediska vzniku karcinogeneze (Coumoul *et al.* 2001, Husbeck and Powis 2002).

Poslední studie také naznačují, že regulace CYP1A1 a CYP1A2 nemusí probíhat jen přes arylhydrokarbonový receptor. Pokusy na lidských hepatocytech ukázaly, že konstitutivní androstanový receptor (CAR) může transaktivovat lidský CYP1A1 a CYP1A2 prostřednictvím *cis* - elementu ER8. ER8 je bohatě přítomný v proximální sekvenci promotoru CYP1A1 u řady druhů a lze tedy navrhnout, že CAR může hrát základní roli v xenobiotiky indukované expresi CYP1A1 a CYP1A2, která je nezávislá na AHR (Yoshinari *et al.* 2010). Jelikož však není CAR receptor v placentě exprimovaný, je tudíž tento regulační mechanismus nevýznamný pro fetoplacentární jednotku (Pavek and Dvorak 2008).

#### 4.4.2 CYP1A1

Cytochrom CYP1A1, také známý jako arylhydrokarbonhydroxyláza, se podílí na monoxygenázových a oxidoreduktázových reakcích a je lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cyp1a1>). CYP1A1 hraje významnou roli v metabolismu strukturně vzájemně nesouvisejících látek jako třeba mastných kyselin, steroidních látek

a xenobiotik (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001, Guengerich 2007). Významná je také jeho role v iniciaci karcinogeneze prostřednictvím tvorby vysoce reaktivních metabolitů, které mohou způsobit četné mutace (Androutsopoulos *et al.* 2009).

Přestože byla zjištěna jeho exprese v játrech, jsou jeho primárním místem lokalizace extrahepatální orgány, nejčastěji plíce, pokožka, ledviny, tenké střevo a placenta, kde je jeho konstitutivní exprese v podstatě nedetekovatelná, ale enzym je tam vysoce inducibilní (Pavek and Dvorak 2008). Řada sloučenin a látek, které se uvolňují do ovzduší a často jsou i samotnými substráty tohoto enzymu, mohou způsobit indukci transkripce a to vazbou na cytosolický AHR (Androutsopoulos *et al.* 2009, Hankinson 1995, Stevens *et al.* 2009).

Lidský CYP1A1 je lokalizovaný na chromozomu 15 (15q22-15q24) a s CYP1A2 mají vzájemně opačnou orientaci. CYP1A2 se nachází ve vzdálenosti asi 23 kb od CYP1A1 (Corchero *et al.* 2001). CYP1A1 gen je složen z 6 069 bází (72 798 936 bp - 72 805 004 bp) a kóduje protein o velikosti 58 kDa (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cyp1a1>).

#### 4.4.2.1 Indukce a genová regulace CYP1A1

Expresí genu CYP1A1 může být silně indukována polycyklickými aromatickými hydrokarbony (PAH) (benzo[*a*]pyren, (3MC), (BNF)), polychlorovanými bifenyly (PCB), dioxiny (např. TCDD) a jinými látkami (Corchero *et al.* 2001, Stejskalova *et al.* 2011a). Řada látek, které indukují CYP1 enzymy přes vazbu na AHR receptor, tak vlastně mohou indukovat svůj vlastní metabolismus (Westerink *et al.* 2008).

Za nejsilnějšího (nejúčinnějšího) induktora CYP1A1 enzymu je považován TCDD. Spolu s dalšími halogenovanými aromatickými hydrokarbony a polycyklickými aromatickými hydrokarbony indukuje široké spektrum biologických a toxických účinků, např. teratogeneze, imunosuprese, podpora nádorového bujení (Riddick *et al.* 1994).

Mezi další CYP1A1 induktory patří i léčiva jako třeba omeprazol. Přesný molekulární mechanismus jeho indukce není zcela znám, jelikož nepatří mezi tzv. typické AHR ligandy (Tab. 1). Předpokládá se, že omeprazol aktivuje AHR bez přímé vazby na receptor (Yoshinari *et al.* 2008). Stejně jako omeprazol, tak i lansoprazol a primachin jsou schopny indukovat CYP1A1 bez přímé vazby na AHR receptor (Curi-Pedrosa *et al.* 1994, Werlinder *et al.* 2001). K přírodním látkám, které jsou ligandy AHR a mohou vyvolat indukci CYP1A1 a CYP1A2 patří třeba indirubin a indigo (Sugihara *et al.* 2004).

#### 4.4.2.2 Biotransformace exogenních látek enzymem CYP1A1

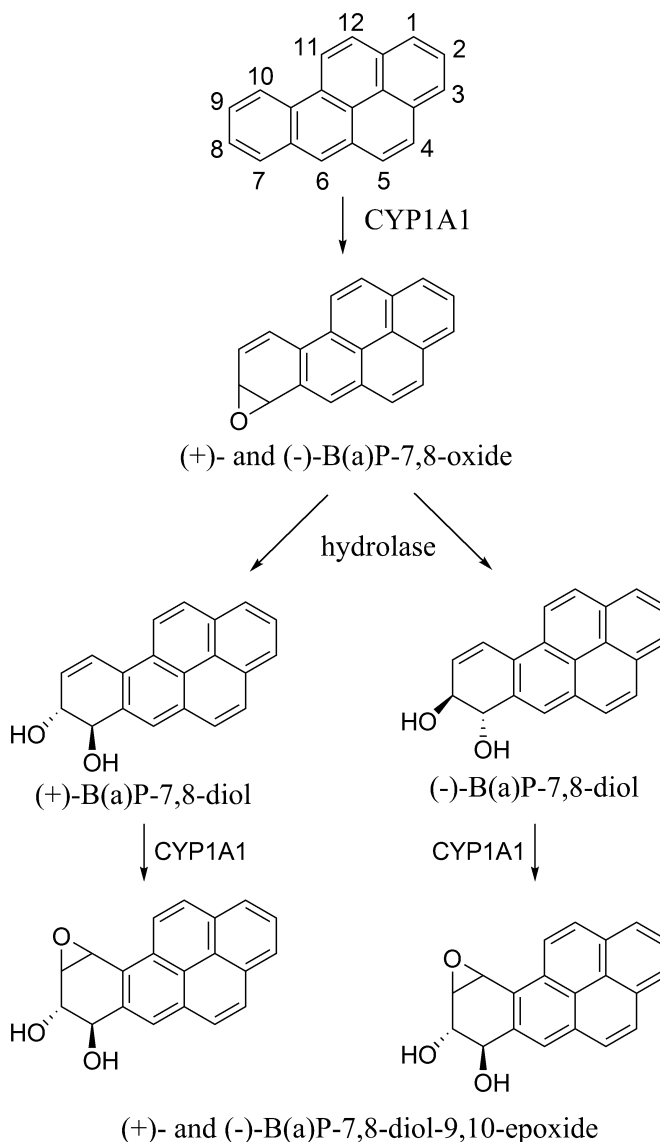
Cytochrom CYP1A1 se podílí na metabolizaci chemických látek využívaných ve farmakoterapii (např. kafein (Balat *et al.* 2003), warfarin (Mehndiratta *et al.* 2010), erlotinib a gefitinib (Li *et al.* 2007), imatinib (Abellar *et al.* 2009), debrisochin (Granvil *et al.* 2002)), dále pak látek, které jsou součástí potravy, a také toxických látek, které jsou přítomny v životním prostředí. CYP1A1 mění tyto substráty na více polární metabolity, čímž umožňuje jejich další exkreci. Oxidací karcinogenů/prokarcinogenů (PAH nebo heterocyklické aminy) vznikají oxidované formy arenů a epoxidů a další elektrofilní reaktivní produkty (konečné karcinogeny), které pak tvoří adukty s DNA a proteiny, a tím tak vedou k iniciaci tvorby nádorů a toxicitě (Ma and Lu 2007).

#### 4.4.2.3 Aktivace prokarcinogenů

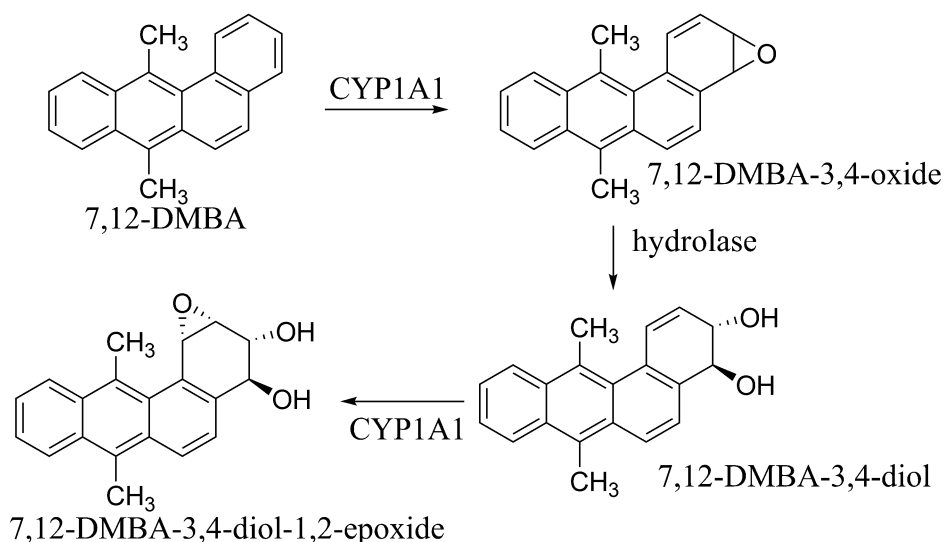
**Benzo[*a*]pyren (BaP)**, který je zároveň ligandem AHR ze skupiny PAH patří mezi nejznámější prokarcinogeny a během metabolizace se aktivuje v konečný karcinogen. Během metabolismu dochází k oxidaci BaP na oxidy, následně jsou tyto oxidy hydrolyzovány epoxidhydrolázou na dva diolové enantiomery, které jsou dále opět pomocí CYP1A1 aktivovány na čtyři konečné karcinogeny BaP-diol-epoxydy (podrobněji Obr. 4). K dalším sloučeninám ze skupiny polycyklických aromatických hydrokarbonů, které jsou metabolizovány tímto enzymem, patří ještě třeba 7,12-dimethylbenzantracen (7,12-DMBA) (Obr. 5), benz[*a*]antracen, benzo[*b*]fluoranten,

benzo[*c*]fenantren, chrysen, benzo[*g*]chrysen a 5,6-dimetylchrysen (Shimada and Fujii-Kuriyama 2004, Schwarz *et al.* 2001, Stejskalova and Pavek 2011).

Polycyklické aromatické hydrokarbonů jsou součástí ropných produktů, uvolňují se do ovzduší během spalování, jsou součástí cigaretového kouře a byly dokonce nalezeny i v grilovaném mase a sýrech. Člověk je tak vystaven jejich působení, aniž by si to často uvědomoval (Jernstrom and Graslund 1994, Stejskalova and Pavek 2011).



**Obr. 4:** Schéma metabolismu benzo[*a*]pyrenu (BaP) enzymem CYP1A1 na jeho reaktivní metabolity (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).



**Obr. 5:** Schéma metabolismu 7,12-dimetyl benzantracenu (7,12-DMBA) na reaktivní metabolity (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).

**PhIP** (2-Amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin) je představitelem skupiny heterocyklických aminů a jeho přítomnost byla zjištěna v pečeném mase a v rybách. Během hydroxylace na atomu N<sup>2</sup>, kterou katalyzuje CYP1A1, dochází k tvorbě hydroxy-PhIP, který je dále acetylován nebo sulfatován na produkt (N<sup>2</sup>-acetoxy-PhIP a N<sup>2</sup>-sulfonyloxy-PhIP), který se může vázat na DNA (Crofts *et al.* 1998, Thomas *et al.* 2006).

K dalším chemickým sloučeninám, které jsou aktivovány pomocí CYP1A1 patří i N-nitrosaminy (Fujita and Kamataki 2001).

#### 4.4.2.4 Biotransformace endogenních látek enzymem CYP1A1

Zatímco metabolismus exogenních látek enzymem CYP1A1 je všeobecně známý, stále často se také diskutuje jeho role v metabolismu endogenních sloučenin, obzvláště když se zjistilo, že některé steroidní látky by mohly patřit k těmto substrátům. Zjistilo se, že CYP1A1 metabolizuje polynenasycené mastné kyseliny (kyselina arachidonová a eikosapentaenová), které jsou nezbytné pro placentární funkci a udržení



těhotenství stejně jako pro samotný porod (Murphy *et al.* 2007, Pasqualini 2005, Schwarz *et al.* 2004).

#### **4.4.2.4.1 *Metabolismus estrogenů***

K základním placentárním hormonům patří také steroidní hormony (estrogeny, progesteron). Estrogeny zahrnují estriol ( $E_3$ ), estron ( $E_1$ ) a  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), který představuje biologicky aktivní formu estrogenů.  $E_2$  hraje významnou roli v placentárním růstu, uhníždění vajíčka v děloze a v embryonálním vývoji (Pasqualini 2005, Rama *et al.* 2004). Jelikož si lidská placenta není schopna sama nasyntetizovat  $E_2$  z cholesterolu kvůli absenci enzymu CYP17 (steroid  $17\alpha$ -monooxygenáza), využívá k tomu tedy dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS). DHEAS je syntetizován plodem a slouží jako prekurzor pro placentární estradiolovou syntézu (Pasqualini 2005, Samson *et al.* 2009).

CYP1A1 a další CYP enzymy metabolizují  $E_2$  a  $E_1$  v různých pozicích, což vede k tvorbě různě hydroxylovaných metabolitů. Placentární CYP1A1 metabolizuje v lidské placentě  $17\beta$ -estradiol na řadu 2-, 4-,  $6\alpha$ - a  $15\alpha$ -hydroxylovaných metabolitů. 2-OH- $E_2$  je hlavním metabolitem, následován pak  $15\alpha$ -,  $6\alpha$ -, 4-hydroxylovanými metabolity. Bylo zjištěno, že u matek kuřáček, které kouřily v průběhu těhotenství, se současně s indukcí CYP1A1 zřetelně stimulovala i hydroxylace  $E_2$  v pozicích  $15\alpha$ -,  $7\alpha$ - a  $4\alpha$ - (Cavalieri *et al.* 2000, Zhu *et al.* 2002, Zhu and Lee 2005).  $15\alpha$ -hydroxylace  $E_2$  byla signifikantně stimulována v placentách těhotných kuřáček, což koreluje s placentární mikrosomální CYP1A1 aktivitou (Zhu *et al.* 2002).

#### **4.4.2.4.2 *Metabolismus kyseliny arachidonové***

Nedávné studie ukazují, že k substrátům enzymu CYP1A1 může patřit i kyselina arachidonová (AA) a kyselina eikosapentaenová (EPA), které jsou tímto enzymem metabolizovány na oxidované metabolity. AA je převážně hydroxylována na 19-OH-AA (hlavní metabolit) a jiné hydroxy metabolity (16-, 17-, a 18-OH-AA). U EPA slouží

CYP1A1 jako epoxygenáza a oxiduje více než 68% na 17(R), 18(S)-epoxyeikosatetraenovou kyselinu (Schwarz *et al.* 2004).

#### 4.4.2.4.3 *Metabolismus retinových kyselin*

Retinová kyselina má významné pleiotropní biologické účinky, mezi které patří třeba klíčová role v embryonálním vývoji nervového systému, v regulaci absorpce vitamínu A, v regulaci proliferace lidských neuroblastomových buněk a další (Zhang *et al.* 2000). Kromě oxidativní biotransformace retinalu na kyselinu retinovou pomocí cytosolické aldehyddehydrogenázy má i lidský CYP1A1, hepatální i extrahepatální, spolu s dalšími CYP izoformami schopnost zapojit se do této přeměny. Fyziologická důležitost tohoto metabolismu je však zatím nejasná (Zhang *et al.* 2000).

#### 4.4.2.5 *Inhibice CYP1A1*

Vzhledem k tomu, že většina karcinogenních polycyklických aromatických hydrokarbonů je převážně metabolizována na reaktivní metabolity enzymy z rodiny CYP1, očekává se, že inhibitory těchto enzymů by mohly mít chemoprotektivní účinky. Bylo zjištěno, že  $\alpha$ -naftoflavon, syntetické organoselenové sloučeniny jako třeba 1,2-, 1,3-, a 1,4-fenylenbis(metylen)selenokyanát, dále pak vinylované a acetylované polycyklické aromatické hydrokarbony jako třeba 1-(1-propyl)pyren (1PP), 2-(1-propynyl)fenantren (2PP), 1-etylnylpyren (1EP) a 4-(1-propynyl)bifenyl (4Pbi) inhibují CYP1A1 aktivitu (Shimada 2006, Shimada and Guengerich 2006). Je zajímavé, že pro aktivaci 1PP, 1EP a 4Pbi je nejdříve nutná metabolická aktivace enzymem CYP1A1, teprve takto vzniklé aktivní metabolity jsou schopny inhibovat samotný CYP1A1. U 2EP tato aktivace není nutná a CYP1A1 je inhibován přímo (Shimada *et al.* 2007).

Některé přírodní látky mohou mít také inhibiční účinky na CYP1A1. K těmto účinným inhibitorům patří resveratrol a rapontigenin. Rapontigenin (3,3',5-trihydroxy-4'-metoxystilben, izolovaný z orientální léčivé rostliny *Rheum undulatum*) představuje účinného a selektivního inhibitora lidské CYP1A1. Selektivní inhibice na CYP1A1 mu

přináší výhodnou pozici v užití jako chemoprotektivního prostředku (Chun *et al.* 2001). Resveratrol (trans 3,4',5-trihydroxystilben) je fytoalexin, který je obsažen v džusech a vínech, které jsou připraveny z červených hroznů. Stejně jako rapontigenin také resveratrol je selektivní lidský inhibitor CYP1A1 a jeho konzumace u lidí je považována za účinné chemoprotektivum proti rakovině (Chun *et al.* 1999). K dalším přírodním látkám s inhibičními vlastnostmi mohou být zařazeny i flavonoidy, např. 7-hydroxyflavon, chrysin nebo apigenin (Lautraite *et al.* 2002, Zhai *et al.* 1998).

Nedávno bylo paradoxně také zjištěno, že samy karcinogeny ze skupiny PAH jako BaP a 5-metylchrysen jsou schopny inhibovat CYP1A1 EROD aktivitu. Pokusy na *Salmonella typhimurium* NM2009 ukázaly, že BaP a 5-metylchrysen inhibovaly CYP1A1 a zabránily tak tvorbě konečných karcinogenních produktů z BaP-7,8-diolu a 5-metylchrysen-1,2-diolu (Shimada 2006, Shimada and Guengerich 2006). Toto je velmi zajímavý fenomén, neboť PAH tak mohou inhibovat svůj vlastní metabolismus a metabolismus jiných karcinogenních PAH, které jsou katalyzovány CYP1A1. Touto vzájemnou inhibicí CYP1A1 se mohou vysvětlit i případy, kdy směs řady látek (PAH) získaná z grilovaného jídla nebo z kamenouhelného dehtu je někdy jako celek méně aktivní v tvorbě nádorů než čistě jeden karcinogen podávaný ve stejné dávce, ve které se nachází v této směsi s dalšími karcinogeny (Shimada and Guengerich 2006).

#### 4.4.2.6 Polymorfismus CYP1A1

Existuje nejméně 11 alel CYP1A1 enzymu. Některé varianty jsou vzácné a s neznámým funkčním významem (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>). Kromě wild-type alely (CYP1A1\*1) dalšími nejvíce běžnými alelami, které vedou k aminokyselinové záměně v pozicích Ile462Val nebo Thr642Asn a nebo k *MspI* restrikci jsou alely CYP1A1\*2B a CYP1A1\*2C, CYP1A1\*4 a CYP1A1\*2A. Četnost výskytu jednotlivých alel není zcela jednotná a mezi různými etniky se liší (Schwarz *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2009).

Pro další informace o CYP1A1 polymorfismu odkazují na článek Stejskalova & Pavek 2011 (Stejskalova and Pavek 2011).

#### 4.4.2.7 Exprese enzymu CYP1A1 v placentě

Jak již bylo jednou zmíněno, CYP1A1 je jediný placentární enzym, který metabolizuje xenobiotika a jehož signifikantní exprese a inducibilita byly nalezeny v lidském placentárním trofoblastu po celou dobu těhotenství. CYP1A1 na úrovni mRNA, proteinu a specifické katalytické aktivity (7-etoxyresorufin-*O*-deetyláza, EROD) byl nalezen u řady placent v prvním trimestru a v některých placentách z třetího trimestru v době termínu porodu (Czekaj *et al.* 2005, Hakkola *et al.* 1996a). EROD aktivita většinou odráží funkci CYP1A1 enzymu v lidské placentě, ačkoliv i jiné enzymy z CYP1 rodiny mohou zprostředkovat EROD aktivitu v jiných tkáních (Hakkola *et al.* 1996a, Hakkola *et al.* 1997, Hakkola *et al.* 1996b). CYP1A1 se nachází v syncytiu placentárního choriového klku na maternofetální straně a nebyl zjištěn ve fetálním endometriu (Collier *et al.* 2002b). Také mikrozomy připravené z kultivovaného lidského trofoblastu izolovaného z placent nekuřáček měly zachovanou nízkou CYP1A1 aktivitu (Avery *et al.* 2003).

Na CYP1A1 aktivitu má vliv věk matky v době těhotenství. V porovnání se staršími matkami vykazují mladé matky vyšší placentární CYP1A1 aktivitu v době prvního trimestru. Větší aktivita CYP1A1 enzymu v placentě mladých matek může také naznačovat, že placentární funkce enzymu se snižuje s věkem matky (Collier *et al.* 2002b). Snižující se funkce placentárních enzymů by mohla mít souvislost i s normálním průběhem těhotenství, které, jak je známo, se s věkem matky komplikuje (Collier *et al.* 2002b).

#### 4.4.2.8 Vliv kouření na placentární CYP1A1

Cigaretový kouř je směs CYP substrátů, CYP induktorů (heterocyklické aminy, polycyklické aromatické hydrokarbony a pyridinový alkaloid nikotin) a CYP inhibitorů (oxid uhelnatý a kadmium) (Czekaj *et al.* 2005).

Epidemiologické studie ukázaly, že cigaretový kouř kromě vlivu na reprodukci a vývojové procesy může ovlivňovat i další komplikace, často intrauterinní růstové retardace (IUGR), předčasné protržení amniových obalů, předčasné narození dítěte,

nízkou porodní váhu dítěte a malou délku dítěte, vrozené anomálie, nevyvinuté plíce, náhlé úmrtí novorozenců, odtržení placenty, ektopické (mimoděložní) těhotenství a spontánní potraty (Okey *et al.* 1997, Sanyal *et al.* 1994, Shiverick and Salafia 1999, Wang *et al.* 2002).

Výzkumy ukazují, že placentární CYP1A1 aktivita u matek kuřáček je inducibilní již v prvním trimestru (již v 8-11 týdnu) (Hakkola *et al.* 1996b, Juchau 1971, Sanyal *et al.* 1993). U placent kuřáček či ex-kuřáček získaných v době porodu byla zjištěna silná indukce na úrovni CYP1A1 mRNA a to metodami Northern blot, RT-PCR (reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce) a microarray (Bruchova *et al.* 2010, Hakkola *et al.* 1996a, Huuskonen *et al.* 2008, Pasanen *et al.* 1990, Whyatt *et al.* 1998). S využitím dalších metod Western blotu nebo EROD eseje byla zjištěna indukce i na úrovni proteinu a CYP1A1 aktivity (Boden *et al.* 1995, Collier *et al.* 2002b, Czekaj *et al.* 2005, Hakkola *et al.* 1997, Kaelin and Cummings 1983, Okey *et al.* 1997). Vliv cigaretového kouře na indukci CYP1A1 už ale nebyl pozorován metodou imunohistochemie (Sanyal and Li 2007).

Zjistilo se, že současné pití alkoholu a kouření během těhotenství má synergistický účinek na lidský CYP1A1 v placentách žen v prvním trimestru. Placentární CYP1A1 u žen, které zároveň kouřily a pily v průběhu těhotenství, vykazoval signifikantně vyšší aktivitu v porovnání s ženami, které nepily ani nekouřily, a nebo s ženami, které buď jen pily, nebo kouřily v průběhu těhotenství (Collier *et al.* 2002b). Vliv AHR ligandů na CYP1A1 byl potvrzen i v placentárních choriokarcinomových buněčných liniích JEG-3 a BeWo, kde CYP1A1 byl také silně indukován ligandy arylhydrokarbonového receptoru (Avery *et al.* 2003, Hakkola *et al.* 1997).

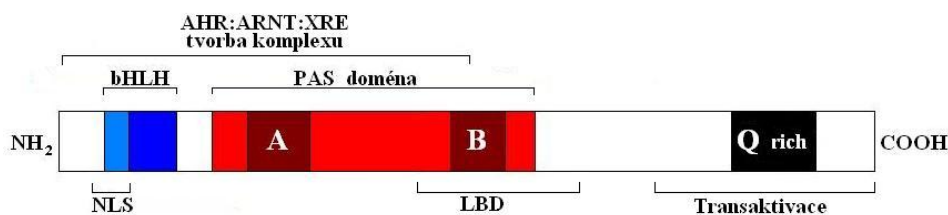
Zajímavým faktem také zůstává, že placentární tkáň ex-kuřáček má zvýšenou CYP1A1 mRNA v porovnání s matkami nekuřáčkami. Množství CYP1A1 mRNA je signifikantně zvýšeno a to jak u ex-kuřáček, které přestaly kouřit v průběhu těhotenství, tak i u těch žen, které přestaly kouřit ještě před začátkem těhotenství (Hakkola *et al.* 1996a, Whyatt *et al.* 1995). Zvýšené množství CYP1A1 mRNA se sice snižuje po skončení kouření, přesto ale neklesne na úroveň, jakou mají matky nekuřáčky (Whyatt *et al.* 1995). Jedno z možných vysvětlení tohoto jevu je, že polycyklické aromatické hydrokarbonové z cigaretového kouře se ukládají během kouření v lidském těle v tucích

a následně jsou během těhotenství uvolňovány do krevního oběhu matky a tím tak způsobují indukci placentárního CYP1A1. Uzené maso, sýry a ryby obsahují také polycyklické aromatické hydrokarbony, které se tam dostávají během procesu uzení. Tedy i konzumace těchto potravin významně ovlivňuje placentární CYP1A1 mRNA (Whyatt *et al.* 1995). Signifikantně zvýšená placentární CYP1A1 aktivita a zvýšená tvorba PAH-DNA aduktů v placentě byly pozorovány i u žen, které v průběhu těhotenství konzumovaly jídlo, které obsahovalo PCB, polychlorované dibenzofurany (PCDF) a chlorované organické látky (Gallagher *et al.* 1994, Lagueux *et al.* 1999, Lucier *et al.* 1990). Naproti tomu Pereg se svými pracovníky nepotvrdil významný vliv PCB z konzumované stravy na placentární CYP1A1 aktivitu a uvádí tak tabákový kouř jako hlavní modulující faktor CYP1A1 aktivity (Pereg *et al.* 2002).

#### 4.4.3 Arylhydrokarbonový receptor (AHR)

Arylhydrokarbonový receptor, známý také jako dioxinový receptor, patří do bHLH/PAS rodiny transkripčních faktorů, které regulují expresi svých cílových genů (Song and Pollenz 2002). Do skupiny proteinů s bHLH/PAS doménami patří proteiny s důležitou rolí ve vývoji orgánů (neurogeneze), v metabolismu toxinů, při kontrole cirkadiálního rytmu a v adaptaci na hypoxii (snížení obsahu kyslíku) (Crews 1998). Proteiny rodiny bHLH/PAS obsahují základní strukturní motiv  $\alpha$ -helix–smyčka– $\alpha$ -helix (basic helix loop helix, bHLH), který je lokalizován na N-konci proteinu a PAS doménu (Per-ARN-Sim), která se nachází v centrální části (Obr. 6). Ta byla původně identifikována u proteinu Per, ARNT a Sim, podle kterých dostala své jméno. Společně pak bHLH a PAS domény umožňují dimerizaci dvou proteinů a následně i vazbu transkripčního komplexu na DNA (Jones 2004). Arylhydrokarbonový receptor dimerizuje s arylhydrokarbonovým receptorovým nukleárním translokátorem (ARNT, HIF 1 $\beta$ ), který je rovněž členem bHLH/PAS rodiny (Fujii-Kuriyama and Kawajiri 2010). PAS doména je tvořena dvěma úseky známými jako PAS-A a PAS-B, které mají délku asi 50-ti aminokyselinových zbytků (Jones 2004). Další důležitou doménou je ligand vázající doména (Ligand binding domain, LBD), která je lokalizována v úseku mezi 230. - 421. aminokyselinou a která také zahrnuje PAS-B úsek. Interakce této domény s heat shock proteinem (HSP90) je nezbytná pro tvorbu funkčního ligand

vázacího komplexu (Coumailleau *et al.* 1995). Řada přirozených mutací v této oblasti snižuje vazebnou afinitu AHR ligandů (Pandini *et al.* 2007).



**Obr. 6:** Schéma domén arylhydrokarbonového receptoru AHR.

Arylhydrokarbonový receptor poprvé identifikoval Poland se svými kolegy v myších játrech v roce 1976 za pomoci radioaktivně značeného TCDD (Safe 2001). Gen pro lidský AHR se nachází na chromozomu 7p15 (Micka *et al.* 1997), naproti tomu jeho heterodimerizační partner ARNT je lokalizován na lidském chromozomu 1q21 (Johnson *et al.* 1993). Gen pro AHR je dlouhý asi 50 kb, obsahuje 11 exonů a kóduje protein o molekulové hmotnosti 96 kDa (Bennett *et al.* 1996, Dolwick *et al.* 1993).

Geny pro AHR a ARNT najdeme ve všech tkáních, jak v tkáni u dospělých jedinců, tak i ve fetálních. Vysoká exprese AHR a ARNT byla nalezena v játrech, plicích, ledvinách a placentě (Dolwick *et al.* 1993, Manchester *et al.* 1987, Yamamoto *et al.* 2004).

Řada studií ukazuje, že arylhydrokarbonový receptor má významnou roli zprostředkovatele toxického účinku u řady xenobiotik (PAH, dioxiny, halogenované bifenyly), které způsobují řadu nepříznivých účinků v organismu - vliv na reprodukci, hormonální poruchy, imunotoxicitu, iniciaci a progresi tumorů, vývojové vady (Dragin *et al.* 2006, Gasiewicz *et al.* 2008). Studie ovšem také ukazují, že kromě receptoru pro xenobiotika má AHR i důležitou roli v základních buněčných procesech, vývoji a fyziologii (Harper *et al.* 2006). Studie na myších s cílovou mutací v genu pro Ahr (Ahr null mice) ukazují, že AHR/Ahr hraje klíčovou roli v normálním vývoji. U Ahr deficientních myší (Ahr null mice) chybí indukce Ahr cílových genů (Fernandez-Salguero *et al.* 1995, Lahvis and Bradfield 1998, Mimura *et al.* 1997, Schmidt *et al.* 1996) a tyto myši vykazují také celou řadu fenotypových abnormalit, ke kterým patří řada abnormalit na úrovni imunitního systému, srdeční hypertrofie s přítomností fibrózy v srdečním svalu, cévní hypertrofie v děloze, žaludeční hyperplazie, kožní fibróza,

hyperproliferační folikulů v srsti a značné jaterní patologické změny (Lahvis *et al.* 2000). Tyto myši mají také nevyvinutou sinusoidální architekturu v játrech a trvalou přítomnost hyaloidních arterií v oku dospělých jedinců (Lahvis *et al.* 2000). AHR receptor má významnou úlohu i v buněčném cyklu (Elizondo *et al.* 2000, Ma and Whitlock 1996, Puga *et al.* 2002).

#### **4.4.3.1 Arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor (ARNT) a Arylhydrokarbonový receptorový represor (AHRR)**

**Arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor**, také nazývaný jako hypoxií indukovaný faktor 1 $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ), je člen bHLH/PAS rodiny. ARNT není významný jen jako dimerizační partner pro AHR signální cestu, ale také jako dimerizační partner pro hypoxií indukovaný faktor HIF-1 $\alpha$ , se kterým tvoří komplex, a který reguluje geny zprostředkovávající odpověď na hypoxii (Nie *et al.* 2001). Kromě toho je ARNT schopný i homodimerizace se sebou samým (Sogawa *et al.* 1995a, Sogawa *et al.* 1995b). ARNT hraje významnou roli v reakci na hypoxii a hypoglykémii, v embryonálním vývoji a angiogenezi (Maltepe *et al.* 1997).

Lidský **arylhydrokarbonový receptorový represor** je lokalizovaný na chromozomu 5p15.3. V buňce je přítomen v jádře a konstitutivně interaguje s ARNT. V porovnání s AHR se neváže s HSP90. Exprese AHRR je indukována komplexem AHR/ARNT prostřednictvím vazby na enhancer sekvenci u XRE a AHR funkce je regulována zpětnovazebnou inhibicí AHRR. AHRR polypeptid potlačuje transkripční aktivitu AHR receptoru díky soupeření s AHR receptorem v tvorbě heterodimeru s ARNT a vazbě s XRE sekvencí (Baba *et al.* 2001, Mimura *et al.* 1999).

#### **4.4.3.2 AHR signální cesta**

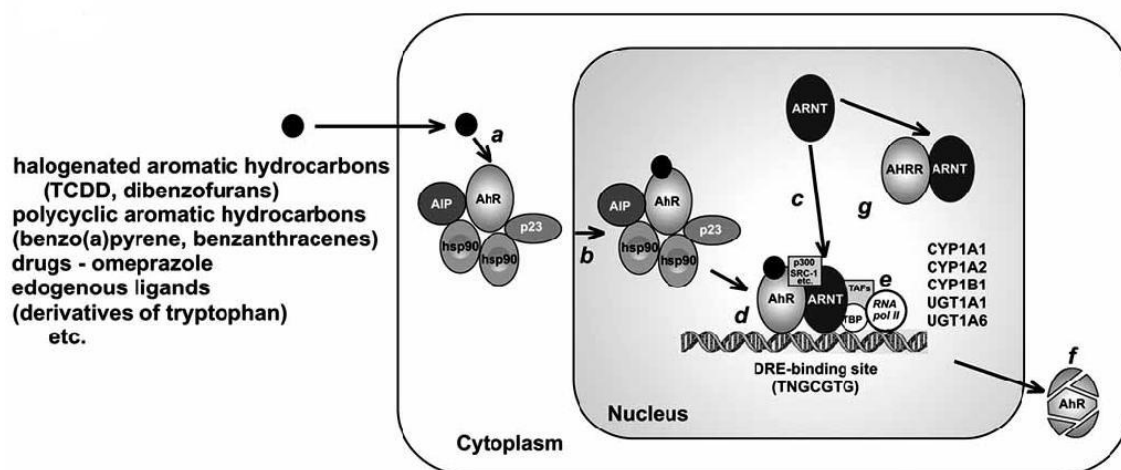
Arylhydrokarbonový receptor se bez navázaného ligandu nachází v cytosolu v komplexu s HSP90, immunophilin-like proteinem XAP2 (AIP) a p23 (Carver *et al.* 1998, Ma and Whitlock 1997, Meyer *et al.* 1998). Heat shock protein interaguje s bHLH oblastí a maskuje tak nukleární lokalizační signál (NLS) AHR receptoru, který



je v N-terminální oblasti receptoru, což vede k udržení receptoru v cytoplasmě. Navázáním ligandu na AHR dojde ke změně konformace AHR/HSP90 komplexu a k odhalení NLS a k nukleární translokaci komplexu do jádra (Lees and Whitelaw 1999).

Na AHR receptor se také váže řada koaktivátorů, např. ERAP140, RIP140, CBP/P300, BRG-1, NcoA (SRC-1), NcoA2 (GRIP-1 a TIF-2) a NcoA3 (AIB-1, p/CIP, a ACTR) (Ishimura *et al.* 2009).

Po navázání ligandu je aktivovaný AHR receptor přenesen do jádra, kde dojde k oddělení HSP90 a k dimerizaci AHR receptoru se svým heterodimerizačním partnerem ARNT. Oproti arylhydrokarbonovému receptoru se ARNT nachází v jádře v přítomnosti i při absenci ligandu (Fujii-Kuriyama and Mimura 2005). Takto vzniklý komplex AHR/ARNT se váže s vysokou afinitou na specifický xenobiotika responsivní elementy (Xenobiotic response element, XRE) nebo na dioxin responsivní elementy (Dioxin response element, DRE) v promotorové oblasti genu a následně dochází k transaktivaci cílových genů (Obr. 7). XRE/DRE oblast je složena z pentanukleotidového jádra 5'-GCGTG-3', které je nezbytné pro AHR/ARNT vazbu (Mimura and Fujii-Kuriyama 2003, Safe 2001).



**Obr. 7:** Molekulární mechanismus AHR dependentní regulace genové exprese. HSP90 - heat shock protein 90; AIP - AHR interacting protein 2; DRE - dioxin responsivní element, ARNT - arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor; AHR –

*arylhydrokarbonový receptor, AHRR - arylhydrokarbonový receptorový represor (převzato z (Pavek and Dvorak 2008)).*

K cílovým genům, které jsou regulovány AHR/ARNT komplexem, patří enzymy první metabolické fáze (cytochrom P450 - CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) a enzymy druhé metabolické fáze jako GST1, UGT (UGT1A1, UGT1A6), NQO1 (NAD(P)H-dependentní chinon oxidoreduktáza 1), ALDH3A1 (aldehyddehydrogenáza) (Puga *et al.* 2009, Tirona and Kim 2005).

AHR receptor je následně degradován prostřednictvím 26S proteosomu a proces degradace probíhá mechanismem ubikvitinace během něhož dochází ke kovalentnímu spojení ubikvitinových peptidů s cílovými proteiny. Subcelulární lokalizace AHR degradace není zcela jasná (jádro versus cytoplazma) (Davarinos and Pollenz 1999, Pollenz 1996, 2002).

#### **4.4.3.3 Aktivace AHR ligandy**

Většina molekul, které se váží na arylhydrokarbonový receptor a následně jej aktivují, jsou hydrofobní molekuly. Mnoho AHR agonistů představuje planární sloučeniny. Nicméně SAR (structure-activity relationship) analýza ukázala, že absolutní planarita není nezbytná pro vazbu polychlorovaných bifenylů. Koplanarita ale ovlivňuje prostorovou vhodnost ligandu pro vazbu na receptor (Stejskalova *et al.* 2011a).

Odhaduje se, že rozměry molekul ligandů, které se vážou na AHR receptor, by měly být v rozmezí  $12 \text{ \AA} \times 12 \text{ \AA} \times 5 \text{ \AA}$ . Elektronegativita, hydrofobní a uhlíková spojení jsou další vlastnosti, které mohou přispět k afinitě ligandů na receptor (Nguyen and Bradfield 2008, Stejskalova *et al.* 2011a).

Ligandy, které se vážou na arylhydrokarbonový receptor mohou být klasifikovány do dvou velkých skupin. Na ligandy, které se tvoří či uvolňují během antropogenních aktivit (jde o syntetické exogenní sloučeniny) a na druhou skupinou - látky, které se tvoří přirozenými procesy v biologických systémech. Tato skupina může být ještě dále rozdělena na podskupinu endogenních fyziologických

ligandů a podskupinu ligandů, které jsou součástí stravy (Denison *et al.* 2002, Fujii-Kuriyama and Kawajiri 2010, Nguyen and Bradfield 2008).

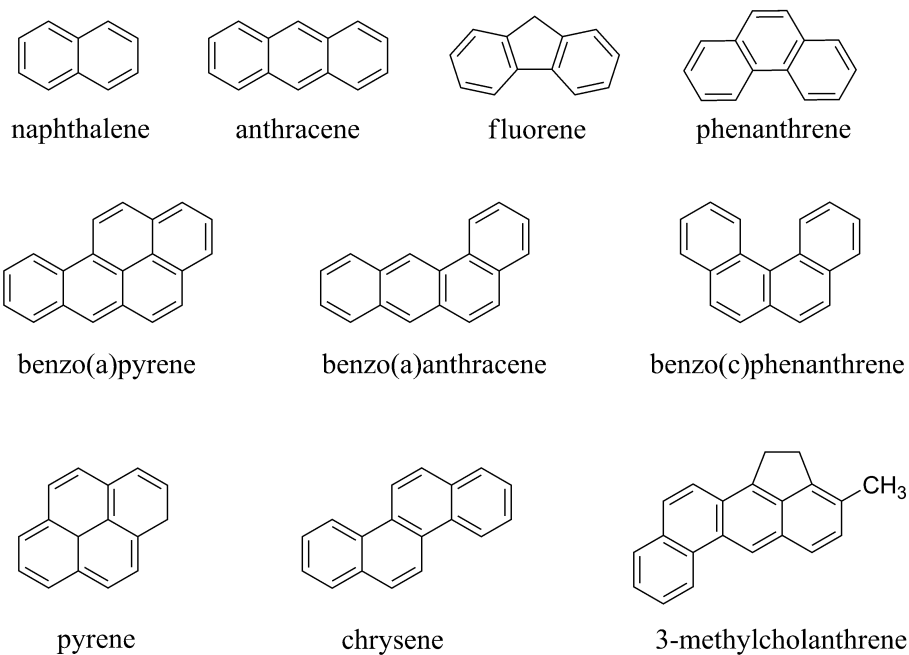
Pro další informace o AHR ligandech odkazují na přehledový článek Stejskalova *et al.* 2011 (Stejskalova *et al.* 2011a).

Přehled základních ligandů v Tab. 1 a chemických struktur v Obr. 8, 9, 10.

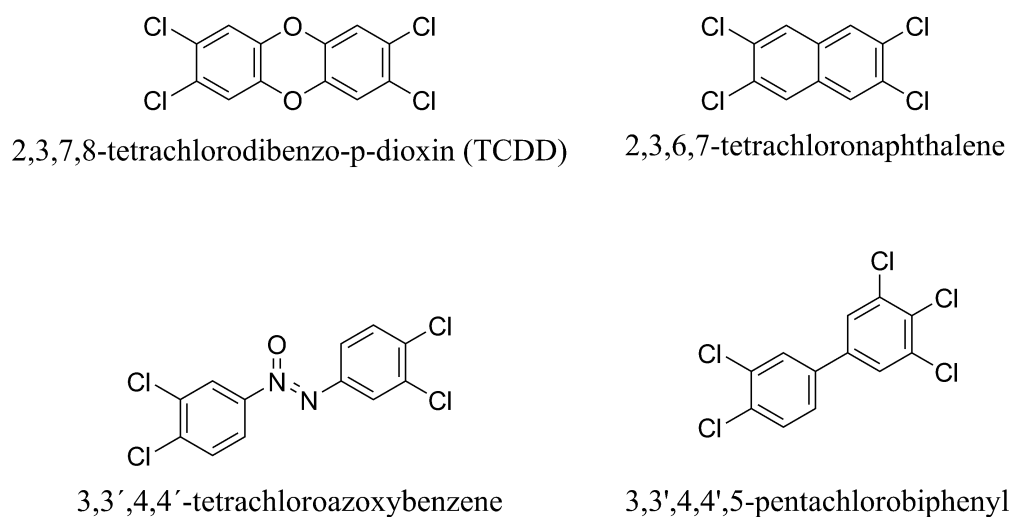
Klasifikace	Typ	Agonista/Antagonista	Zdroj	Reference
Ligandy v jídle	Flavonoidy (např. chrysin, galangin, baicalein, genistein, daidzein, apigenin)	agonista antagonista	Ovoce; zelenina; celé nesemleté obilí; červené víno; čaj	(Amakura <i>et al.</i> 2003, Van der Heiden <i>et al.</i> 2009)
	Indoly (prekurzor indol-3-carbinol (I3C)-aktivní metabolit indolo-[3,2-b] carbazol (ICZ))	agonista	Růžičková kapusta; zelí; květák	(Denison <i>et al.</i> 2002, Wattenberg and Loub 1978)
Endogenní ligandy	Indigové deriváty (indigo a indirubin)	agonista antagonista	Hovězí sérum; lidská moč; fermentace rostlin <i>Polygonum tinctorium</i> , <i>Isatis tinctoria</i> a <i>Indigofera tinctoria</i>	(Adachi <i>et al.</i> 2001, Nishiumi <i>et al.</i> 2008, Peter Guengerich <i>et al.</i> 2004)
	Equilenin	agonista	Moč březích klisen	(Jinno <i>et al.</i> 2006)
	Metabolity hemu (bilirubin, biliverdin, hemin)	agonista	Plazma	(Phelan <i>et al.</i> 1998, Sinal and Bend 1997)
	Lipoxin A4	agonista	Arachidonová kyselina	(Schaldach <i>et al.</i> 1999)
	Prostaglandiny (B <sub>3</sub> , D <sub>3</sub> , F <sub>3α</sub> , G <sub>2</sub> , H <sub>1</sub> a H <sub>2</sub> )	agonista	Arachidonová kyselina	(Seidel <i>et al.</i> 2001)
	Metabolity tryptofanu (tryptamin, indolactová kyselina)	agonista	Plazma	(Heath-Pagliuso <i>et al.</i> 1998, Miller 1997)
	UV foto produkty tryptofanu (6-formylindolo[3,2- <i>b</i> ]carbazol (FICZ) and 6,12-diformylindol[3,2- <i>b</i> ]carbazol (dFICZ) )	agonista	Působení UV-B a působení slunečního světla na tryptofan	(Diani-Moore <i>et al.</i> 2006, Katiyar <i>et al.</i> 2000, Wei <i>et al.</i> 1998)

Exogenní ligandy	Polycyklické aromatické hydrokarbon (PAH)	agonista	Vypalování lesů a půd; únik a prosakování olejů; vulkanické erupce; spalování fosilních paliv, kamenouhelného dehtu, dřeva; mazací oleje; spalování pevných komunálních odpadů; únik ropy; uzené a grilované jídlo; cigaretový kouř	(Haritash and Kaushik 2009)
	Polychlorované bifenyly (PCB)	agonista	Oleje do transformátorů, hydraulické kapaliny, lubrikační (mazací) oleje, plasticizéry	(La Rocca and Mantovani 2006, Nguyen and Bradfield 2008, Safe <i>et al.</i> 1985)
	Halogenované dioxiny a příbuzné sloučeniny (halogenované dibenzo- <i>p</i> -dioxiny, dibenzofurany, azo(xy)benzeny, naftaleny)	agonista	Spalování; bělení celulózy; chlorace fenolů	(Hayes <i>et al.</i> 2007, Vickers <i>et al.</i> 1985)

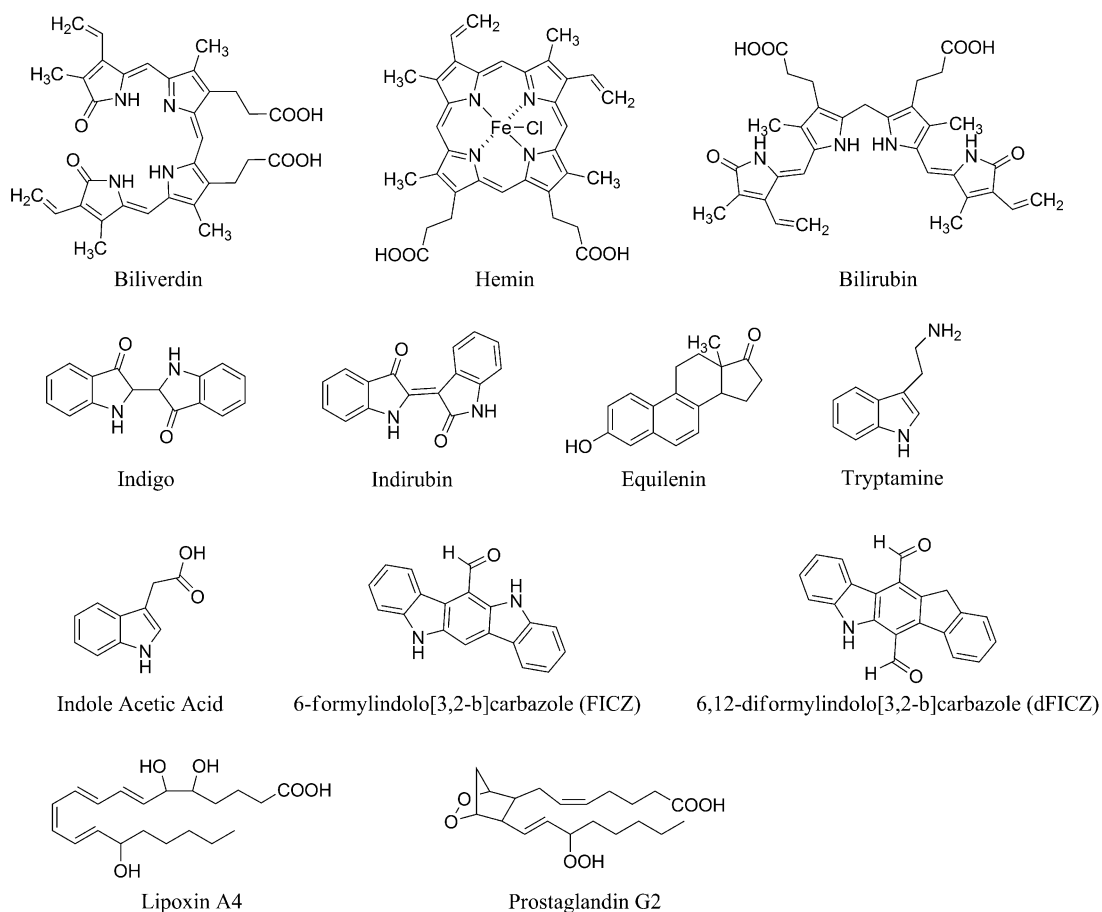
**Tab. 1:** Exogenní a endogenní aktivátoři AHR receptoru (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).



**Obr. 8:** Chemická struktura některých polycyklických aromatických hydrokarbonů (PAH): Naftalen, antracen, fluoren, fenantren, benzo(a)pyren, benzo(a)antracen, pyren, chrysen, 3-metylcholantren (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).



**Obr. 9:** Exogenní halogenovaní agonisté AHR: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), 2,3,6,7-tetrachloronaftalen, 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzen, 3,3',4,4',5-pentachlorobifenyl (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).



**Obr. 10:** Endogenní sloučeniny schopné aktivovat AHR (převzato z (Stejskalova and Pavek 2011)).

#### 4.4.3.4 AHR polymorfismus

Různé genetické odchylky v AHR struktuře jsou následně pak zodpovědné za rozdílnou vnímavost k řadě xenobiotik (Kawajiri et al. 1995). K dnešnímu dni bylo objeveno 8 možných AHR polymorfismů v lidském AHR genu (<http://www.pharmgkb.org/>).

Pro další informace o AHR polymorfismu odkazují na článek Stejskalova & Pavek 2011 (Stejskalova and Pavek 2011).

#### 4.4.3.5 Exprese AHR a ARNT v placentě

V posledním trimestru v době porodu má lidská placenta velké množství AHR proteinu. V porovnání s receptorem u hlodavců má lidský placentární AHR receptor nižší afinitu k AHR ligandům a je méně stabilní (Manchester *et al.* 1987).

Exprese AHR receptoru a jeho dimerizačního partnera ARNT je v lidské placentě nezávisle regulována. Existují také značné interindividuální rozdíly v AHR expresi na rozdíl od ARNT, kde tyto rozdíly nebyly pozorovány. Tento rozdíl v expresi, kdy ARNT je exprimován s mnohem menší variabilitou než AHR vede k předpokladu, že ARNT zaujímá nezbytnou funkci v regulaci vývoje a v homeostáze placentárních buněk. Během těhotenství nedochází ke změnám placentární exprese těchto dvou faktorů u člověka. Naproti tomu u potkaních placent byl pozorován rozdíl exprese Ahr a Arnt proteinů v průběhu březosti (Carver *et al.* 1994, Jetta *et al.* 2006). Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben mezidruhovými rozdíly v regulaci těchto genů (Hakkola *et al.* 1997).

Cigaretový kouř u matek kuřáček nebo *in vitro* kultivace choriokarcinomové linie JEG-3 s AHR ligandem TCDD nemá signifikantní vliv na expresi AHR receptoru a ARNT translokátoru (Hakkola *et al.* 1997). Stejný výsledek ukázaly i pokusy na potkanech a myších. Holzman a Sprague-Dawley potkani byli vystaveni působení TCDD, který neměl na AhR mRNA expresi vliv (Kawakami *et al.* 2006). Také žádné signifikantní rozdíly nebyly rovněž pozorovány na úrovni placentární AhR mRNA u dvou linií myší s rozdílnou citlivostí k TCDD (TCDD citlivé C57BL/6J a méně citlivé DBA/2J) (Li *et al.* 1994).

V myších placentách bylo pozorováno, že AHR mRNA signifikantně koreluje s mRNA hladinou transportéru BCRP, a proto se předpokládá, že Ahr pravděpodobně ovlivňuje regulaci BCRP genu (Wang *et al.* 2006). Vliv AHR receptoru na regulaci BCRP genu byl potvrzen v Caco2 buněčné linii (linie odvozená z nádoru tlustého střeva), kde byla pozorována indukce exprese BCRP na úrovni mRNA a proteinu vlivem různých AHR ligandů (TCDD, BaP, 3MC, oltipraz, ICZ) (Ebert *et al.* 2005). Stejně jako v Caco2 střevní buněčné linii, tak i v další linii odvozené od nádoru tlustého střeva LS174T byla potvrzena indukce BCRP a to AHR dependentním způsobem

(Tompkins *et al.* 2010). Indukci exprese BCRP mRNA vlivem AHR ligandu 3MC jsme mohli také pozorovat v našich experimentech v primárních kulturách lidských trofoblastů (Tab. 3). (Stejskalova *et al.* 2011b). Navíc tato indukce BCRP mRNA byla potenciována vlivem současného působení 3MC a glukokortikoidů (Tab. 3).

#### **4.4.3.6 Cross-talk AHR a GR nukleárních receptorů**

Stejně jako u ostatních receptorů i AHR může ovlivňovat jiné signální dráhy. Může to být signální dráha estrogenového receptoru (ER), glukokortikoidního receptoru (GR), progesteronového receptoru (PR), androgenového receptoru (AR), tyroidálního receptoru (TR), signalizace hypoxie (Gradin *et al.* 1996) nebo faktorů NF- $\kappa$ B (Tian 2009) a Rb (Elferink *et al.* 2001). Snad nejvíce studovaným cross-talkem (český překlad by mohl být spoluovlivnění) s AHR receptorem je pro receptory steroidních hormonů (ER, AR, TR, GR) (Monostory *et al.* 2009, Swedenborg and Pongratz 2009).

Glukokortikoidní hormony jsou steroidní hormony tvořené kůrou nadledvin. Ovlivňují řadu fyziologických funkcí (rozmnožování, imunosupresi, protizánětlivý účinek), metabolismus glukózy, proteinů a lipidů. Hlavním glukokortikoidem u lidí je kortisol (Wang *et al.* 2009). U plodu jsou glukokortikoidy nezbytné pro vývoj a zrání fetálních orgánů (Murphy *et al.* 2007). Transplacentární podávání glukokortikoidů (dexametazon, betametazon) před 35. týdnem těhotenství zaujímá důležité místo v perinatologii. Antenatální podávání glukokortikoidů je indikováno u žen, u kterých hrozí předčasný porod velmi nezralého dítěte. Antenatální podání glukokortikoidů má tak příznivý vliv na zrání plic a snižuje riziko vzniku syndromu respirační tísně (Respiratory distress syndrome, RDS). Kromě prevence RDS chrání podávání glukokortikoidů novorozence také před intraventrikulárním krvácením, nekrotizující enterokolitidou a systémovou infekcí v prvních hodinách života novorozence (Ballard and Ballard 1995, Hallman *et al.* 2010, Paakki *et al.* 2000, Roberts and Dalziel 2006).

Endogenní a exogenní glukokortikoidy se váží na GR, který se nachází v dostatečném množství v syncytiotrofoblastu a cytotrofoblastu lidské placenty (Lee *et al.* 2005, Pavek *et al.* 2007) a v placentách hlodavců (Waddell *et al.* 1998).



Vliv glukokortikoidů na expresi CYP1A1 byl prokázán u řady buněk (lidských i potkaních). Glukokortikoidy snižují/zvyšují indukci CYP1A1 zprostředkovanou AHR ligandem v závislosti na typu buněk a to na úrovni mRNA, proteinu i EROD aktivity (Dvorak *et al.* 2008, Monostory *et al.* 2005, Vrzal *et al.* 2009).

Například v kultuře primárních lidských hepatocytů jsme v našich experimentech pozorovali, že dexametazon neměl signifikantní vliv na indukci CYP1A1 mRNA zprostředkovanou TCDD a 3MC, naproti tomu indukce CYP1A2 mRNA zprostředkovaná TCDD a 3MC byla působením dexametazonu potenciována. Bazální exprese CYP1A1 a CYP1A2 mRNA však nebyla ovlivněna působením samotného dexametazonu (Vrzal *et al.* 2009). Zcela opačný vliv dexametazonu jsme pozorovali na úrovni enzymové aktivity. Dexametazon způsobil značný pokles jak bazální, tak i indukované EROD aktivity. EROD aktivita v primární kultuře lidských hepatocytů odráží CYP1A1 a CYP1A2 enzymovou aktivitu (Vrzal *et al.* 2009). Působení dexametazonu ovlivnilo také expresi samotného AHR receptoru. Dexametazon způsobil signifikantní pokles AHR mRNA, což následně korelovalo i s množstvím AHR proteinu, a také způsobil nesignifikantní změny v expresi ARNT mRNA (Vrzal *et al.* 2009).

Potenciace TCDD dependentní indukce vlivem dexametazonu byla pozorována i u exprese Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1 a Ahr mRNA v potkaní H4IIE buněčné linii. Stejný účinek na expresi těchto genů ale již nebyl pozorován v lidských buněčných liniích HepG2 a T47D (Sonneveld *et al.* 2007). Stejně jako v potkaní H4IIE buněčné linii, tak i v dalších potkaních buňkách bylo pozorováno zvýšení indukce Cyp1a1 vlivem glukokortikoidů (Monostory *et al.* 2005, Sherratt *et al.* 1990, Xiao *et al.* 1995). Další Ahr cílové geny, kde bylo možné pozorovat zvýšení indukce působením glukokortikoidů, byly geny pro Gst (Sherratt *et al.* 1990, Sonneveld *et al.* 2007, Xiao *et al.* 1995) a Ugt (Xiao *et al.* 1995). Naproti tomu negativní regulace glukokortikoidy byla zaznamenána u Qor a Aldh3c genů (Xiao *et al.* 1995).

Posílení účinku AHR ligandu vlivem dexametazonu bylo zaznamenáno také u choriokarcinomové buněčné linie BeWo. U této buněčné linie došlo působením dexametazonu k potenciaci  $\beta$ -naftoflavon dependentní indukce EROD aktivity (Avery *et al.* 2003).

## 5 Experimentální část - použité metody a chemikálie

V následujících kapitolách uvádím stručný popis nejdůležitějších metod používaných při přípravě této disertační práce. Pro detailní informace odkazuji na publikace přiložené k této disertační práci (Přílohy str. 124).

### 5.1 Chemikálie

Dimethyl sulfoxid (DMSO), 3-metylcholantren (3MC), dexametazon (DEX), betametazon (BETA),  $\beta$ -naftoflavon (BNF), omeprazol (OME), lansoprazol, resveratrol a buněčná média byla zakoupena od renomované firmy Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) od firmy Ultra Scientific (North Kingston, USA). Finální koncentrace rozpouštědla DMSO v médiích buněčných kultur ve všech experimentech byla menší než 0,1% (v/v).

### 5.2 Buněčné linie a zvířecí model

Ke studiu exprese a indukce byly využity **placentární choriokarcinomové linie JEG-3 a BeWo**. Buňky JEG-3 byly kultivovány v MEM médiu, ke kterému byly přidány 1% neesenciálních aminokyselin (NEAA), 1 mM sodium pyruvát (Sigma Aldrich) a 10% fetálního hovězího séra (FBS) (PAA, Pasching Austria). BeWo buňky byly kultivovány v Ham's F12 médiu s 10% FBS. Obě buněčné linie byly získány z Evropské kolekce buněčných kultur, byly kultivovány bez přítomnosti antibiotik a nebyly používány déle než do 25. pasáže. Experimenty pak byly prováděny v médiu bez fenolové červeně (Invitrogen/Gibco, Carlsbad, CA, USA) se stripovaným FBS.

Pro samotné experimenty byly subkonfluentní JEG-3 nebo BeWo buňky kultivovány s danou testovanou látkou (např. 3MC, TCDD nebo DEX) a rozpouštědlem DMSO jako kontrolní látkou po dobu 12 nebo 24 hodin v závislosti na zvoleném experimentu. Po skončení kultivace byly buňky omyty roztokem fosfátového pufru (PBS) a opět podle zvoleného experimentu byl k buňkám přidán RIPA pufr (Western blot) nebo Trizol Reagent (RT-PCR) (BioTech, Praha, Česká republika).

Kromě placentárních choriokarcinomových linií JEG-3 a BeWo byly ke studiu exprese a indukce transkripčních faktorů a enzymů použity **primární kultury lidského trofoblastu**. Izolace primárního trofoblastu byla provedena na základě protokolu popsaného Klimanem (Kliman *et al.* 1986) a dále upravena podle Meyer von Schwabedissen (Meyer Zu Schwabedissen *et al.* 2005). Po mechanické a enzymové digesci (DNAsa, Trypsin) placentární tkáně jsou buňky trofoblastu následně separovány na Percollově gradientu. Izolovaný trofoblast lze kultivovat 5 - 7 dní. Ke kultivaci se používá medium M199 obohacené o 20% FBS, 100 U/ml penicilin/streptomycin a 5 ng/ml epidermální růstový faktor (EGF). Primární kultura je kultivována v inkubátoru při 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Cytotrofoblast během kultivace fúzuje v syncytium (syncytiotrofoblast). Životaschopnost se u primární kultury cytotrofoblastu kontroluje měřením sekrece hCG do kultivačního média.

Tato metoda byla zavedena a optimalizována na našem pracovišti autorkou této disertační práce ve spolupráci s Dr. Karen May (Universität Greifswald) a PharmDr. Kateřinou Pospěchovou Ph.D.

Všechny placenty byly získány ihned po porodu od matek, které porodily mezi 37 - 40. týdnem těhotenství, neměly komplikace v průběhu těhotenství, netrpěly vážnou nemocí, nekouřily, nepily, nebraly drogy, neužívaly žádné léky a neporodily císařským řezem. Pro srovnání exprese/indukce byly získány i placenty od matek kuřáček. Odběr a experimenty byly schváleny příslušnou etickou komisí.

Kultivace trofoblastů s testovanými látkami probíhala podobně jako u choriokarcinomových buněčných linií. Kontrolní látka DMSO (rozpuštědlo) a testované látky (3MC, TCDD, BNF, OME, DEX, BETA atd) obsažené v médiu byly s trofoblasty kultivovány po dobu 24 či 48 hodin v závislosti na experimentu a na konci experimentu byly omyty roztokem PBS. Následně byl přidán RIPA pufr či Trizol Reagent podle typu zpracování vzorku. Trofoblasty byly v kultuře ponechávány většinou po dobu 3 - 4 dní a během kultivace bylo odebíráno médium pro stanovení hCG.

Ke studiu exprese v průběhu březosti potkana byly použity placenty **Wistar potkanů**. Březí potkani byli získáni od firmy Biotest Konárovice (Česká republika) a ve viváriu byli udržováni za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma),

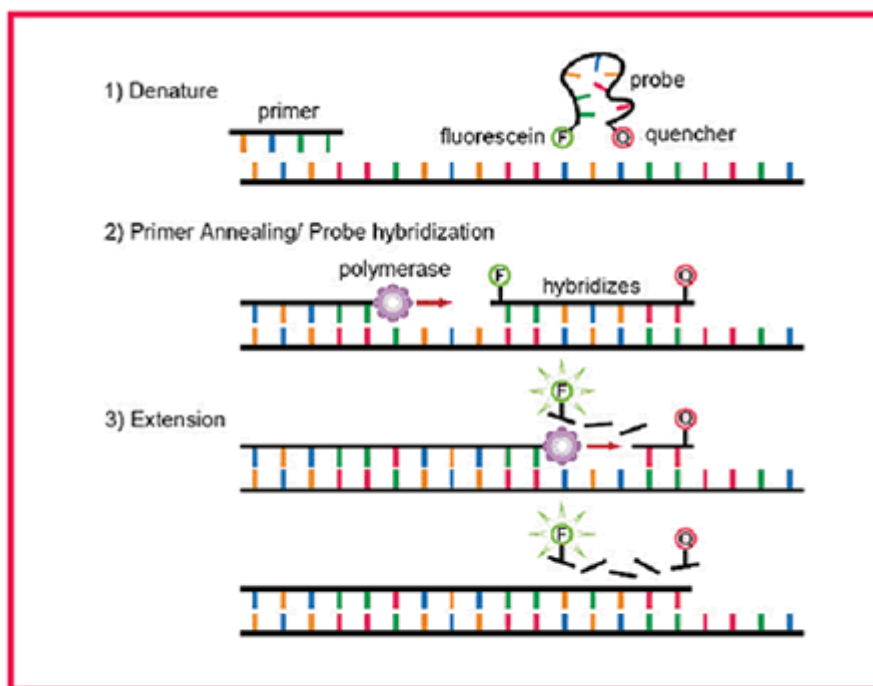
s dostatkem vody a pelet s jídlem. Pro dané experimenty pak byly odebrány placenty ve 12., 15., 18. a 21. dni březosti, popřípadě v 16., 18., a 22. dni březosti. Před odebráním placent byl potkanům aplikován pentobarbital k anestezii a vypreparované placenty pak byly dány do kapalného dusíku. Všechny experimenty byly prováděny se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty UK a v souladu s Evropskou úmluvou na ochranu obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely.

### **5.3 Molekulárně biologické metody**

Základem experimentálních prací byly *in vitro* molekulární biologické metody. Jedná se zejména o real-time RT-PCR, Western blot, 7-etoxyresorufin-*O*-deetylázovou (EROD) esej, imunohistochemii a genovou reportérovou studii. Všechno to jsou metody známé a běžně používané v laboratořích, takže není třeba je detailněji popisovat.

#### **5.3.1 REAL-TIME RT-PCR**

Real time RT-PCR je moderní metoda molekulární biologie, která umožňuje citlivou, rychlou a spolehlivou detekci a kvantifikaci mRNA sledovaného genu a kvantifikaci změny tohoto množství v důsledku přítomnosti léčiva. Kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR) je založena na principu sledování průběhu PCR přímo během reakce (v reálném čase) pomocí fluorescenčních sond nebo barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Pomocí termostabilní DNA polymerázy procesem „cyklení“ dochází v průběhu reakce k opakované replikaci daného úseku DNA. Tento úsek je ohraničený specifickými primery a v každém cyklu se ideálně zdvojí a množství tak exponenciálně roste. Čím dříve pak amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze a zvoleného detekčního prahu (Ct), tím více startovních templátových molekul bylo ve vzorku na počátku reakce. Každý cyklus zahrnuje denaturaci DNA, annealing (připojení primerů) a extenzi (Obr. 11).



**Obr. 11:** Schéma RT-PCR s využitím sond (převzato z <http://www.dnasequencing.com/tag/real-time-pcr-machine/>).

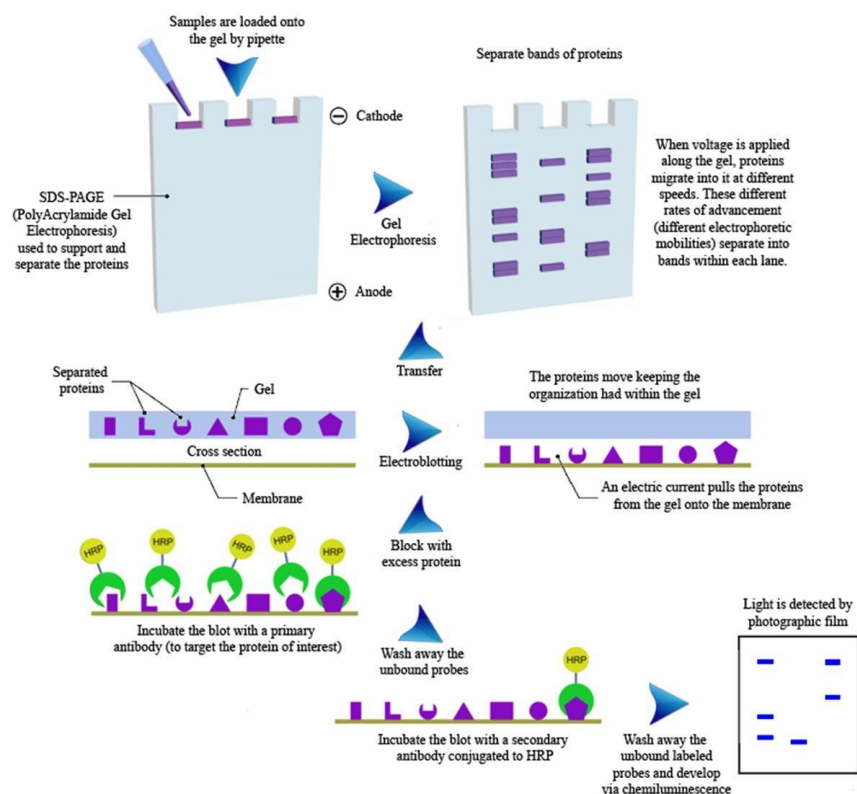
Kvantitativní RT-PCR analýzu u placentárních choriokarcinomových linií a kultury primárního trofoblastu jsme provedli pro cílové geny arylhydrokarbonového receptoru - CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP a také pro AHR, ARNT a AHRR. Jako referenční gen jsme zvolili HPRT, který je exprimován konstitutivně. U potkaních vzorků pak byly zvoleny geny pro Ahr, Arnt a Cyp1a1. Všechny primery (primer - probe mix) byly získány od firmy GENERI Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Exprese každého genu byla provedena v triplikátu současně s negativní kontrolou. Metoda RT-PCR byla provedena v souladu s protokolem publikovaným v článku Pospechova *et al.* (Pospechova *et al.* 2009).

Před samotným provedením qRT-PCR bylo nejdříve potřeba vyizolovat mRNA ze vzorku a tu následně přepsat do cDNA. U primárních kultur lidských trofoblastů nebo u choriokarcinomových linií byly buňky nejdříve omyty PBS roztokem a pak seškrabány. K buňkám byl nakonec přidán Trizol Reagent. U placentární tkáně (lidské i potkaní) jsme nejdřív museli provést dezintegraci tkáně a stejně jako u buněk byl následně přidán Trizol Reagent. Izolace celkové mRNA byla provedena podle

přiloženého protokolu u Trizol Reagentu. mRNA studovaných genů obsažená v celkové izolované RNA byla následně přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce. Takto získaná cDNA byla dále naředěna a použita do qRT-PCR.

### 5.3.2 Western blot

Metoda Western blot (imunoblot) je analytická metoda používaná k detekci specifického proteinu ze směsi proteinů. Skládá se z několika kroků. Proteiny jsou nejdříve rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu). Následně jsou proteiny přeneseny (blotovány) z gelu na povrch nitrocelulózové membrány (nebo PVDF membrána) a na jejím povrchu jsou detekovány pomocí specifické protilátky pro daný protein (Obr. 12).



**Obr. 12:** Schéma metody Western blot (převzato

z [http://www.cyanagen.it/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2&Itemid=144](http://www.cyanagen.it/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=144)).

Metodou Western blot jsme detekovali expresi proteinů Ahr, Arnt v potkaních placentách, AHR a ARNT v choriokarcinomové linii JEG-3 a CYP1A1 u primární kultury lidského trofoblastu. Detekce jednotlivých proteinů byla provedena podle protokolu publikovaného v člancích Vrzal *et al.* a Novotná *et al.* (Novotná *et al.* 2004, Vrzal *et al.* 2009). Před vlastní detekcí proteinů bylo potřeba nejprve připravit vzorky proteinů. Jednotlivé vzorky byly připraveny z lyzátů buněk či tkání.

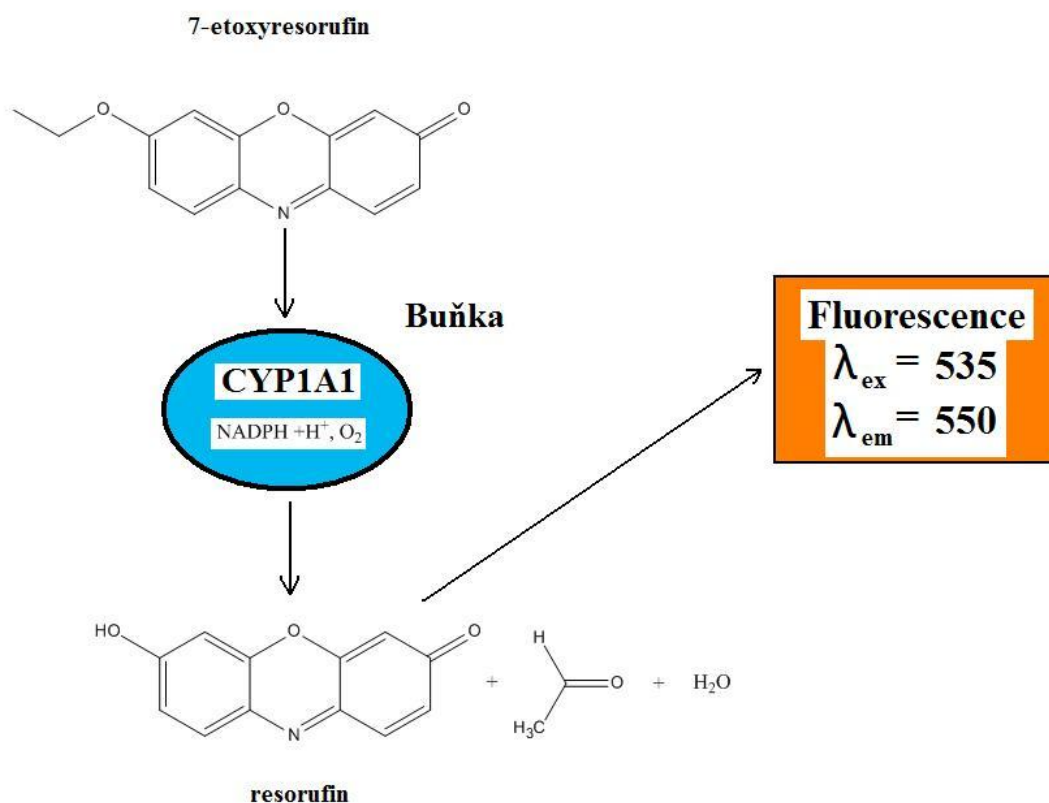
Totální potkaní/trofoblastový lyzát byl připraven v RIPA lyzačním pufru (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholát sodný a 0,1% SDS, pH 7,6) s přidavkem proteázových inhibitorů od firmy Roche (Praha, Česká republika). Buňky primárního lidského trofoblastu byly seškrabány do RIPA pufru a potkaní placenty byly nejdříve dezintegrovány a poté lyzovány v RIPA pufru. Vzorky byly zvortexovány a zcentrifugovány. Supernatant ze vzorků byl přepipetován do nových zkumavek a byla změřena koncentrace proteinů pomocí Bicinchoninic Acid Assay (BCA, Pierce), kde jako standard byla použita koncentrační řada BSA (hovězí sérový albumin). Vzorky byly následně naředěny na stejnou koncentraci.

Pro získání celulárních frakcí u JEG-3 linie byly buňky lyzovány v lyzačním pufru (100 mM HEPES, 15 mM MgCl<sub>2</sub> a 100 mM KCl, pH 7,9) s proteázovými inhibitory a ditiotreitolem. Lyzát byl zcentrifugován a odebraný supernatant sloužil jako cytoplazmatická frakce. Pelety byly dále resuspendovány v extračním pufru (20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,42 M NaCl, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol, pH 7,9) s ditiotreitolem a proteázovými inhibitory. Po centrifugaci byl opět odebrán supernatant, který představoval nukleární frakci. Byla opět zjištěna koncentrace proteinů pomocí BCA a vzorky byly naředěny na stejnou koncentraci. Takto připravené vzorky byly připraveny pro Western blot.

Western blot byl prováděn ve spolupráci s katedrou buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci s pomocí Prof. RNDr. Zdeňka Dvořáka, Ph.D. a Doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D.

### 5.3.3 7-etoxyresorufin-O-deetylázová (EROD) esej

EROD aktivita nám v podstatě odráží funkci CYP1A1 enzymu v placentě. 7-etoxyresorufin slouží jako substrát pro CYP1A1 enzym, který ho metabolizuje na resorufin (Obr. 13). Katalytická aktivita vůči substrátu je indikátorem množství přítomného enzymu a je měřena fluorimetricky jako koncentrace tvořeného resorufinu.



**Obr. 13:** Metabolismus 7-etoxyresorufinu na resorufin.

Pro zjištění aktivity CYP1A1 enzymu v primární kultuře lidského trofoblastu byly buňky nejdříve omyty PBS roztokem a dále kultivovány v mediu Opti-MEM, které obsahovalo 8  $\mu\text{M}$  7-etoxyresorufin (Sigma) a 10  $\mu\text{M}$  dikumarol (Sigma). Po 30 minutách inkubace při 37°C bylo odebráno 75  $\mu\text{l}$  média do jamek nového plata a k tomuto vzorku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  metanolu a proběhla kvantifikace resorufinu změřením fluorescence při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 590 nm.



### 5.3.4 Imunohistochemie

Imunohistochemie je metoda, při níž se ve „vyšetřovaném“ vzorku tkáně prokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek s navázanými chemickými sloučeninami, které umožňují jejich průkaz. Tuto vazbu si můžeme představit jako vztah specifického klíče (protilátky, která je zpravidla volná) k zámku (tkáňovému antigenu, jenž je zpravidla pevně fixován na určité struktuře). Obecné schéma imunohistochemie zahrnuje tyto postupy: odběr a fixace vzorků, krájení a napínání řezů, optimalizace prezentace Ag, blok aktivity endogenních enzymů, blok pozadí, vazbu primární a pak sekundární protilátky, vizualizace.

K imunohistochemické detekci jsme použili parafínové bločky potkaních a lidských placent. Antigeny (AHR, ARNT, CYP1A) byly odmaskovány zahřátím vzorku v sodium citrátovém pufru v mikrovlnné troubě při výkonu 750W. Pro vazbu primárních protilátek byly vzorky inkubovány přes noc s králičími polyklonálními primárními protilátkami pro AHR, s králičími polyklonálními primárními protilátkami pro ARNT a s králičími polyklonálními primárními protilátkami pro CYP1A1. Následně byly vzorky vyvíjeny se sekundární protilátkou. K vizualizaci byl použit diaminobenzidin. Pro přehlednost bylo použito histologické jaderné barvení hematoxylinem.

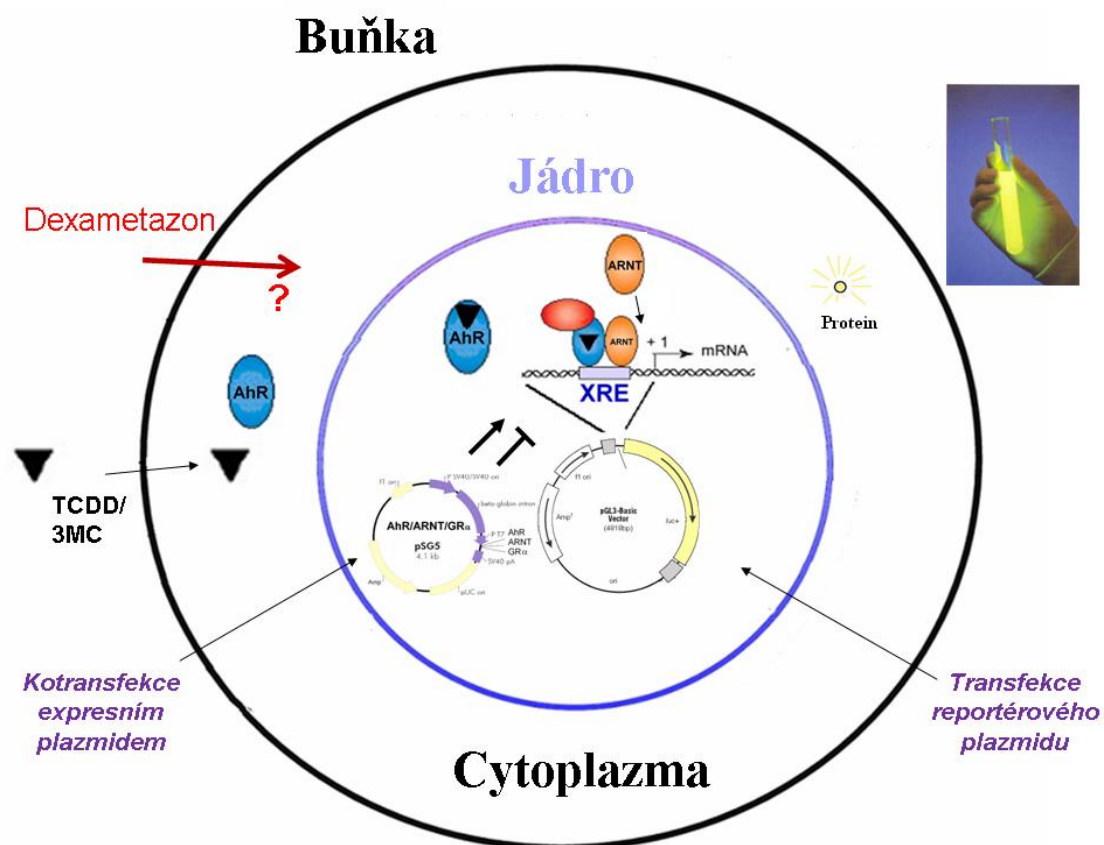
Placenty žen z prvního trimestru byly získány během potratů a placenty z posledního trimestru byly získány po přirozeném porodu. Potkaní placenty byly získány v 16., 18., 22. dni březosti potkana. Metodou imunohistochemie jsme zjišťovali lokalizaci AHR/Ahr a ARNT/Arnt v lidských a potkaních placentách. V lidské placentě jsme navíc ještě lokalizovali CYP1A1.

Imunohistochemické vyšetření prováděla Mgr. Lenka Zemánková ve spolupráci s Doc. PharmDr. Petrem Nachtigalem, Ph.D. z katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

### 5.3.5 Metoda genové reportérové studie (gene reporter assay)

Metoda gene reporter assay, neboli genová reportérová studie, představuje molekulární metodu, která umožňuje studovat schopnost testovaných látek aktivovat daný promotor prostřednictvím sledovaného nukleárního receptoru, případně podíl nukleárních receptorů na tomto procesu aktivace. Metoda je založená na vnesení plazmidové DNA do buňky pomocí lipozomů (při použití transfekční směsi Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) v choriokarcinomové buněčné linii BeWo) nebo pomocí kladně nabitých komplexů, které interagují se záporně nabitými proteoglykany na povrchu buněk (při použití transfekční směsi jetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, Francie) v choriokarcinomové buněčné linii JEG-3).

V našich experimentech byly buňky transfekovány reportérovým plazmidem pXRE-luc, který obsahuje tři DRE sekvence myššího Cyp1a1 genu a také strukturní gen pro luciferázu (*Firefly luciferase*), jehož exprese je dána interakcí AHR s XRE. Buňky byly dále kotransfekovány expresním plazmidem pro nukleární receptor GR (pSG5-hGR) a expresním plazmidem pro jiný typ luciferázi (pRL-TK) (*Renilla luciferase*), který se využívá pro standardizaci účinnosti transfekce. Dalším využívaným reportérovým plazmidem může být také plazmid pCYP1A1-luc, který obsahuje přibližně 2kb promotorové oblasti lidského CYP1A1 s příslušnými DRE elementy. Dalšími expresními plazmidy, kterými mohou být buňky kotransfekovány jsou plazmidy pAHR, pARNT. Takto transfekované buňky byly následně kultivovány s testovanými látkami a po 24 hodinách inkubace byly buňky lyzovány. K lyzátům byl následně přidán substrát pro *Firefly luciferázu* – luciferin, který je luciferázou metabolizován a výsledný produkt jeví luminiscenci, která se přístrojově kvantifikuje. Následně dochází ke zhášení tohoto signálu a k iniciaci přeměny substrátu *Renilla luciferázou* a výsledný produkt, který jeví také luminiscenci, je opět kvantifikován. Podíly těchto hodnot získaných z léčiv ovlivněných vzorků a neolivněné kontroly byly následně porovnávány.



**Obr. 14:** Schéma genové reportérové studie.

TCDD - 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 3MC - 3-metylcholantren; AhR - arylhydrokarbonový receptor; ARNT - Arylhydrokarbonový receptorový nukleární translokátor.

### 5.3.6 Analýza dat

K primárnímu grafickému zpracování dat byl použit program Microsoft Excel. Všechny grafy ukazují průměrné hodnoty se standardními odchylkami (SD). Ke statistické analýze byly použity one-way ANOVA test, Dunnettův test a nepárový Studentův t-test za využití programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## 6 Cíl práce

- 1) zavést na pracovišti metodu izolace a kultivace primárního lidského trofoblastu
- 2) studium indukce nejdůležitějšího biotransformačního enzymu CYP1A1 v primární kultuře lidského trofoblastu a v choriokarcinomových buněčných liniích BeWo a JEG-3 prostřednictvím AHR receptoru
- 3) studium indukce dalších enzymů (CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1) a transportéru BCRP regulovaných prostřednictvím AHR receptoru
- 4) studium exprese AHR, ARNT a AHRR v primárním lidském trofoblastu
- 5) lokalizace AHR/Ahr a ARNT/Arnt v lidské a potkaní placentě
- 6) studium exprese Ahr, Arnt a Cyp1a1 v potkaních placentách v průběhu březosti potkana
- 7) studium cross-talku (spoluovlivnění) AHR a GR receptorů v kultuře primárního lidského trofoblastu a choriokarcinomových liniích JEG-3 a BeWo při transkripční regulaci cílových genů AHR receptoru
- 8) studium molekulární podstaty tohoto cross-talku na choriokarcinomových liniích JEG-3 a BeWo

## 7 Výsledky a diskuze

Na začátku svého doktorského studia jsem spolu s kolegyní PharmDr. Kateřinou Pospěchovou Ph.D. ve spolupráci s Dr. Karen May (Universität Greifswald) zavedla a optimalizovala na našem pracovišti metodu izolace a kultivace primárního lidského trofoblastu. Kultura lidského trofoblastu se pak stala běžně využívaným buněčným modelem pro většinu experimentů, neboť svými vlastnostmi se tento model nejvíce blíží lidskému placentárnímu syncytiotrofoblastu.

V rámci svého doktorského studia jsem se zabývala studiem exprese a indukce cílových genů arylhydrokarbonového receptoru AHR a také studiem exprese samotného receptoru, jeho translokátoru či represoru v placentární bariéře. Původní zájem o indukcí CYP1A1 mRNA v placentární bariéře jsem rozšířila i o transportér BCRP a ostatní enzymy (CYP1A2, CYP1B1 a UGT1A1), které jsou také regulovány prostřednictvím AHR receptoru a jejichž exprese byla v placentě pozorována. O funkci a expresi CYP1A1 enzymu a AHR receptoru v placentární bariéře a o endogenních a exogenních ligandech AHR receptoru jsem napsala přehledové články, ze kterých bylo čerpáno při psaní teoretického úvodu. U obou odborných prací jsem uvedena jako první autorka (viz Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací - P2, P3 str. 96 a Přílohy str. 124).

Kapitola Výsledky a diskuze je rozdělena na dvě hlavní témata. První část se zabývá expresí AHR a ARNT v lidské a potkaní placentě a také jejich transkripční aktivitou v primární kultuře lidského trofoblastu. Druhá část se zabývá vlivem glukokortikoidů na indukcí CYP1A1 a dalších cílových genů regulovaných AHR receptorem v lidském syncytiotrofoblastu. Výsledky z první části již byly publikovány v mezinárodním odborném časopise a u tohoto článku jsem uvedena jako první autorka (viz Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací - P1 str. 96 a Přílohy str. 124). Výsledky z druhé části jsou v době vzniku disertační práce připravovány pro tvorbu článku, kde jsem také první autorkou. Kromě zmíněných dvou přehledových článků (P2, P3) a jednoho experimentálního článku (P1) jsem spoluautorkou dalších čtyř publikací (S1-S4).

Odborná práce Vrzal *et. al* (viz Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací – S4 str. 96 a Přílohy str. 124), kde jsem uvedena jako druhý autor, a která je

v této práci několikrát citována, se zabývá obdobnou problematikou, jakou jsem se zabývala v této disertační práci. Tato práce studuje cross-talk AHR a GR nukleárních receptorů v kultuře primárních lidských hepatocytů a jejich vlivy na genovou regulaci enzymů CYP1A1 a CYP1A2. Další práce (S1-S3) mají blízký vztah k tématu disertační práce. Všechny tyto odborné publikace jsou zaměřeny na genovou expresi biotransformačních enzymů cytochromu P450 prostřednictvím nukleárních receptorů (viz Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací S1-S3 str 96).

### ***7.1 Exprese AHR a ARNT v lidské a potkaní placentě a transkripční aktivita AHR v primární kultuře lidského trofoblastu***

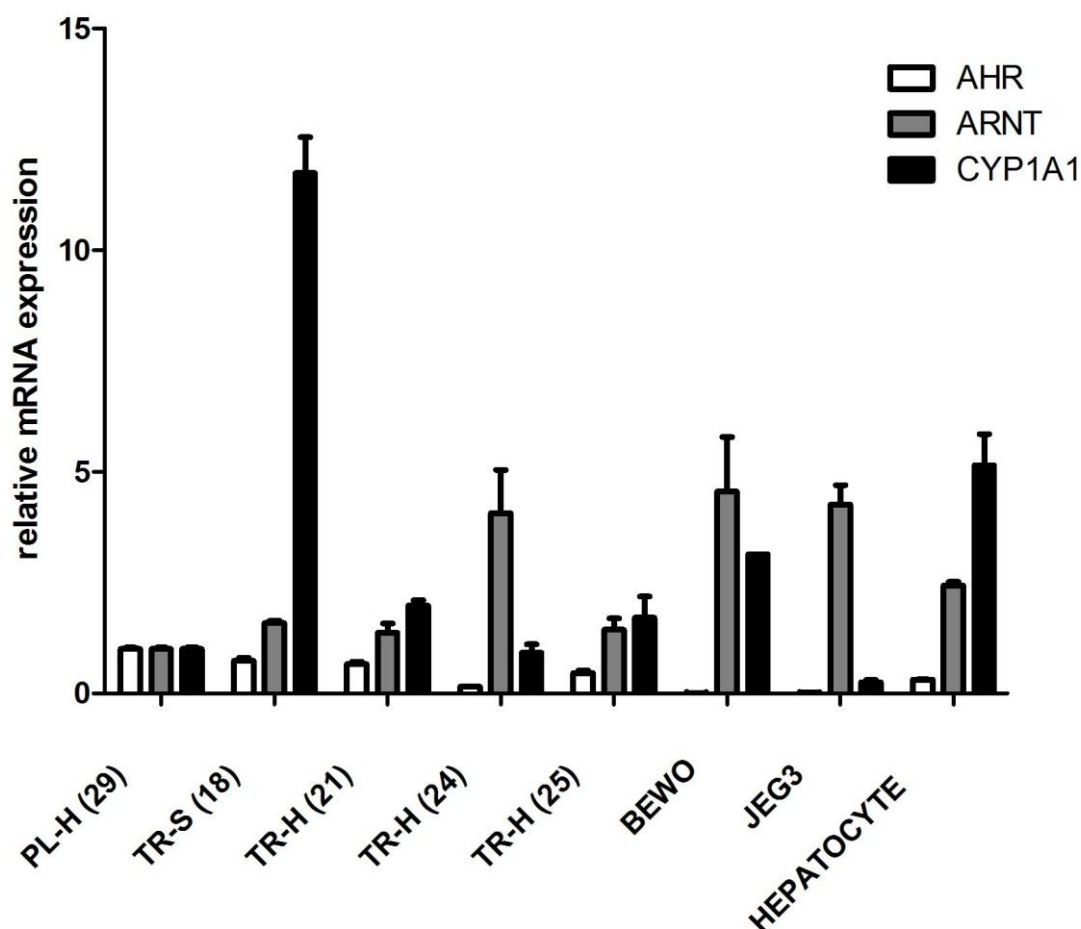
**Exprese AHR, ARNT, AHRR a CYP1A1 mRNA v lidské placentě, primární kultuře lidského trofoblastu, choriokarcinomových liniích JEG-3 a BeWo a v izolovaných lidských primárních hepatocytech.**

V první sérii experimentů jsme se zaměřili na porovnání relativní exprese AHR, ARNT a AHRR mRNA mezi placentou zdravé matky nekuřačky (PL-H (29)), primárními kulturami trofoblastů izolovaných z placent zdravých matek (TR-H (21), (24), (25)) a matky kuřačky (TR-S (18)), nejběžnějšími choriokarcinomovými liniemi BeWo a JEG-3 a nakonec i izolovanými lidskými hepatocyty. Jelikož jsme měli k dispozici kulturu trofoblastu od matky kuřačky, zaměřili jsme se také na možnou indukci genu CYP1A1 na úrovni mRNA vlivem cigaretového kouře. Exprese testovaných mRNA genů byla vztažena k celkovému množství mRNA a hodnota exprese u placenty PL-H (29) byla brána jako referenční s hodnotu 1.

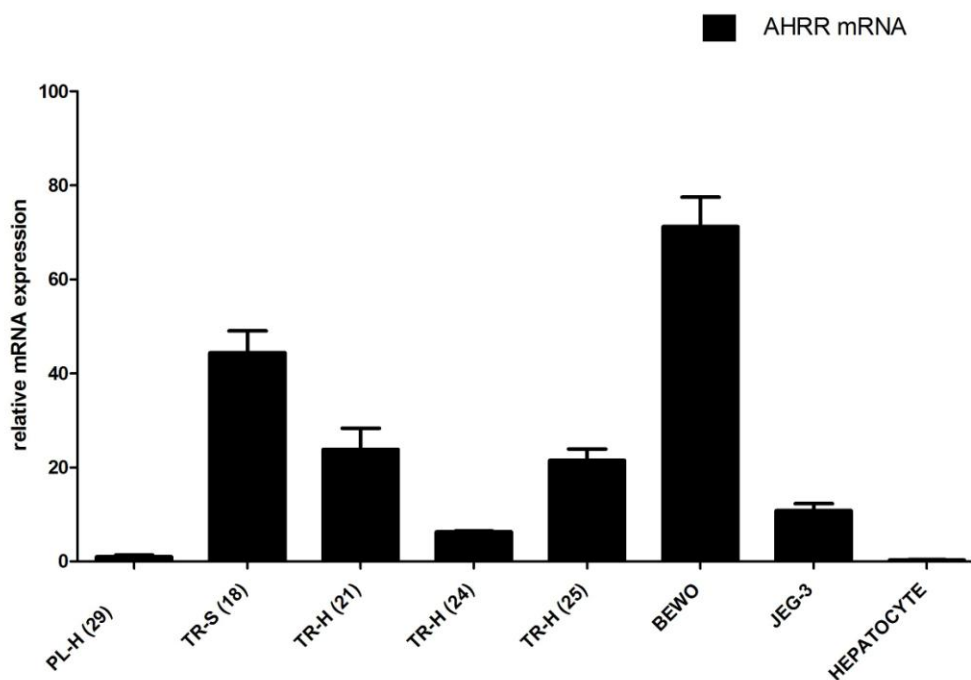
Jak je z grafu patrné (Obr. 15), AHR mRNA byla v izolované trofoblastové kultuře od nekuřaček, kuřačky i v izolovaných hepatocytech nižší než v referenčním vzorku PL-H (29). V choriokarcinomových buněčných liniích JEG-3 a BeWo byla AHR mRNA exprese na velmi nízké úrovni. Naproti tomu u ARNT mRNA (Obr. 15) byla exprese vyšší v izolovaném trofoblastu. V choriokarcinomových buněčných liniích BeWo a JEG-3 pak byla ARNT mRNA exprese skoro pětinašobně vyšší v porovnání s referenčním placentárním vzorkem. Exprese AHRR mRNA byla vyšší v izolovaných

kulturách trofoblastů a v JEG-3 buňkách. Nejvyšší expresi AHRR mRNA jsme ovšem pozorovali u BeWo buněk (Obr. 16).

Cigaretový kouř pak v izolované kultuře trofoblastu kuřačky způsobil indukci CYP1A1 mRNA v porovnání s referenčním vzorkem i v porovnání s ostatními vzorky (Obr. 15).



**Obr. 15:** Relativní exprese AHR, ARNT a CYP1A1 mRNA v lidské placentě od zdravé dárnyně, nekuřačky, bez vážné nemoci a bez medikace PL-H (29); v primární kultuře lidského trofoblastu od kuřačky TR-S (28) a zdravých nekuřaček TR-H (21), TR-H (24) a TR-H (25); v choriokarcinomových liniích BeWo a JEG-3; ve vzorku lidských hepatocytů. AHR, ARNT a CYP1A1 mRNA byly vyhodnoceny qRT-PCR a vztaheny k celkovému množství mRNA. Exprese v placentárním vzorku PL-H (29) byla nastavena na hodnotu 1.



**Obr. 16:** Relativní exprese AHRR mRNA v lidské placentě od zdravé dárkyně, nekuřačky, bez vážné nemoci a bez medikace PL-H (29); v primární kultuře lidského trofoblastu od kuřačky TR-S (28) a zdravých nekuřaček TR-H (21), TR-H (24) a TR-H (25); v choriokarcinomových liniích BeWo a JEG-3; ve vzorku lidských hepatocytů. AHRR mRNA byla vyhodnocena qRT-PCR a vztažena k celkovému množství mRNA. Exprese v referenčním placentárním vzorku PL-H (29) byla nastavena na hodnotu 1.

### Účinek typických AHR ligandů na mRNA expresi cílových genů arylhydrokarbonového receptoru CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP, AHR, ARNT a AHRR v lidské kultuře izolovaných trofoblastů

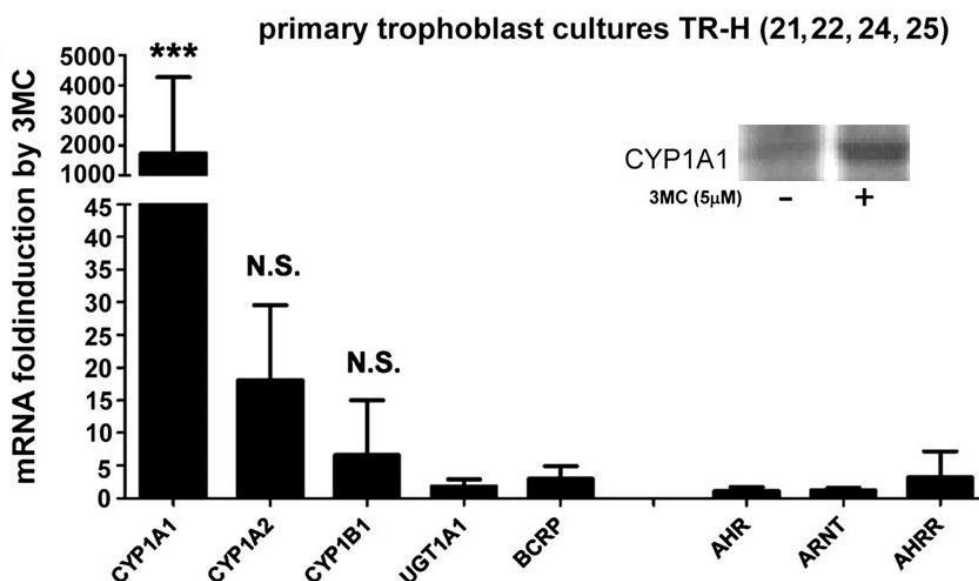
Dále jsme studovali vliv 3MC (5  $\mu$ M, typický ligand AHR receptoru) na expresi cílových genů AHR receptoru (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP) ve čtyřech primárních kulturách trofoblastů (TR-H (21), TR-H (22), TR-H (24), TR-H (25)). Exprese CYP1A1 mRNA byla signifikantně indukována ( $p < 0,001$ ) působením 3MC a indukce byla skoro 2000-krát větší vzhledem ke kontrole (Obr. 17). Při současném studiu exprese CYP1A1 proteinu v kultuře trofoblastu při působení 3MC (5  $\mu$ M) po dobu 24 hodin jsme zjistili indukci CYP1A1 proteinu (Obr. 17; vložený



Western blot). Indukce CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP mRNA nebyly statisticky signifikantní (Obr. 17; n = 4), ačkoliv byla pozorována lehce zvýšená regulace těchto cílových genů. Jelikož byla exprese CYP1A2 mRNA metodou naší qRT-PCR na úrovni detekce, je aktivita indukovaného CYP1A2 pravděpodobně nesignifikantní.

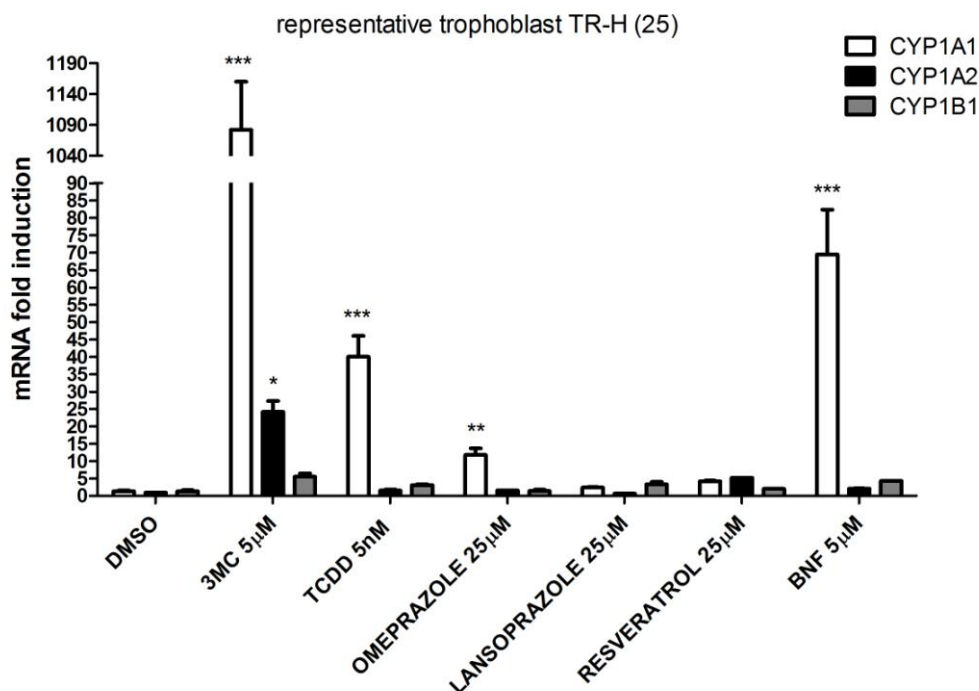
Za stejných podmínek (24 hodin, 3MC 5  $\mu$ M) jsme studovali i účinek 3MC na expresi AHR, ARNT a AHRR mRNA metodou qRT-PCR. Z grafu je patrné, že 3MC neovlivnil signifikantně expresi AHR, ARNT a AHRR mRNA (Obr. 17).

Kromě indukce typickým AHR ligandem 3MC jsme analyzovali i účinek jiných ligandů AHR receptoru v reprezentativní kultuře izolovaného trofoblastu TR-H (25). Z grafu (Obr. 18) lze vyčíst, že všichni aktivátoři AHR receptoru, kromě lansoprazolu a resveratrolu, signifikantně indukovali CYP1A1 mRNA. Navíc v tomto trofoblastovém vzorku byl 3MC schopný signifikantně indukovat ( $p < 0,05$ ) CYP1A2 mRNA (Obr. 18), ačkoliv účinek 3MC nebyl ve všech trofoblastech (n = 4) statisticky signifikantní. Tento výsledek v indukci CYP1A2 může být způsoben interindividuální rozdílností v citlivosti k AHR ligandům. (Obr. 18).



**Obr. 17:** Účinek typického AHR ligandu 3-metylcholantrenu (3MC; 5  $\mu$ M) na mRNA expresi cílových genů AHR receptoru (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP) a na AHR, ARNT a AHRR mRNA expresi v primárních kulturách lidského trofoblastu (TR-H (21), TR-H (22), TR-H (24), TR-H (25)). Trofoblast byl kultivován s 3MC po dobu 24 hodin. Pro zjištění účinku byla využita metoda qRT-PCR a exprese testovaných

genů v kontrolním vzorku (DMSO) byla nastavena na hodnotu 1. Graf vyjadřuje průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami ze 4 nezávislých izolací primárních trofoblastů. Vložené výsledky z Western blotu ukazují výsledek indukce CYP1A1 proteinu po expozici trofoblastu (TR-H (26)) látkou 3MC (5  $\mu$ M). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; N.S. statisticky nesignifikantní rozdíly vzhledem ke kontrole (DMSO).



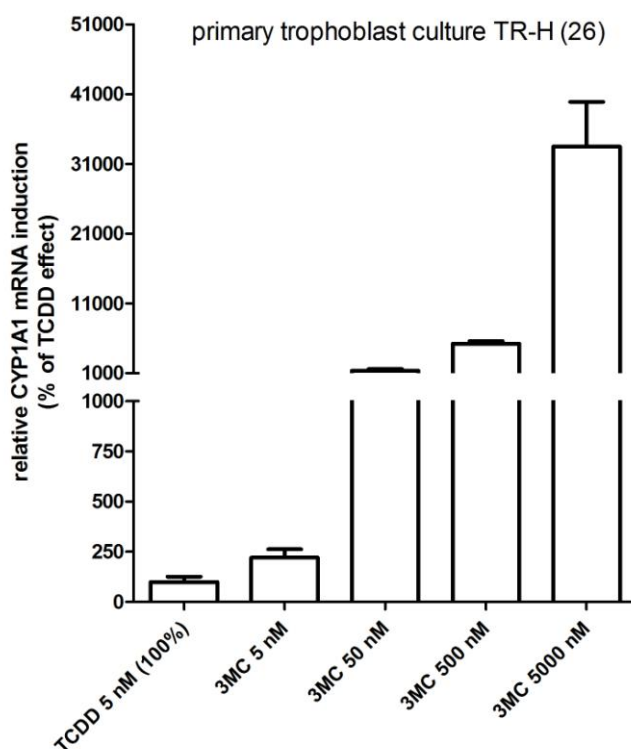
**Obr. 18:** Účinky AHR ligandů 3-metylcholantrenu (3MC; 5  $\mu$ M), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD; 5 nM), omeprazolu (25  $\mu$ M), lansoprazolu (25  $\mu$ M), resveratrolu (25  $\mu$ M) a  $\beta$ -naftoflavonu (BNF; 5  $\mu$ M) na expresi CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 mRNA u reprezentativního vzorku trofoblastu TR-H (25). Trofoblast byl exponován testovaným látkám po dobu 24 hodin a pro zjištění účinku byla využita metoda qRT-PCR. Expres testovaných genů v kontrolním vzorku (DMSO) byla nastavena na hodnotu 1 a data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty třech nezávislých vzorků se směrodatnými odchylkami z reprezentativního trofoblastu. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; N.S. statisticky nesignifikantní rozdíly vzhledem ke kontrole (DMSO).

Z předchozích výsledků zabývajících se indukcí cílových genů je patrné, že vlivem typických AHR ligandů dojde v kulturách izolovaného lidského trofoblastu k signifikantní indukci jenom v případě CYP1A1 mRNA v porovnání s ostatními testovanými geny (Obr. 17 a Obr. 18). Toto zjištění je v souladu i s dřívějšími publikovanými výsledky, které ukazují, že matky kuřačky mají silnou indukci placentárního CYP1A1 (Bruchova *et al.* 2010, Whyatt *et al.* 1998). V případě dalších genů regulovaných přes AHR (CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP) nebyla indukce jejich mRNA po působení 3MC ve všech trofoblastových kulturách statisticky signifikantní (Obr. 18). Přestože je CYP1A2 převážně jaterní enzym byla nalezena jeho mRNA exprese i v prvním trimestru, ale už ne v placentách získaných v době porodu (Hakkola *et al.* 1996a, Hakkola *et al.* 1996b). CYP1A2 mRNA exprese v našich experimentech (metodou qRT-PCR) byla také na hranici detekovatelnosti u všech trofoblastových vzorků. UGT1A mRNA exprese byla v dřívějších studiích nalezena v prvním trimestru, ale ne v placentách v době porodu. Navíc byla také zjištěna signifikantnější placentární UGT aktivita u matek kuřaček (Collier *et al.* 2002a, Collier *et al.* 2002b). V rozporu s těmito výsledky jsme pozorovali v kulturách primárních lidských trofoblastů jen lehkou statisticky nesignifikantní indukci v množství UGT1A1 mRNA vlivem 3MC (Obr. 17). Navíc bazální UGT1A1 mRNA exprese v trofoblastu z placent v době porodu byla na vysoké úrovni detekce.

CYP1B1 mRNA je obecně konstitutivně exprimován v lidské placentě na nízké úrovni jak v prvním trimestru, tak i ve třetím trimestru v době porodu (Hakkola *et al.* 1997). Naše výsledky ukázaly, že CYP1B1 mRNA indukce v přítomnosti 3MC není statisticky významná (Obr. 17 a 18). Tyto výsledky odpovídají i dřívějším studiím, které ukazují, že CYP1B1 mRNA není v placentě indukována cigaretovým kouřem (Hakkola *et al.* 1997). Naproti tomu nedávná studie zjistila, že kouření během těhotenství vyvolává signifikantní (12-ti násobnou) indukci placentární CYP1B1 mRNA (Bruchova *et al.* 2010). Naše výsledky také ukázaly, že exprese AHR, ARNT a AHRR mRNA není v primární kultuře lidského trofoblastu signifikantně ovlivněna působením AHR ligandu 3MC (Obr. 17). Toto zjištění je shodné i s dřívějšími výsledky, které ukázaly, že cigaretový kouř u matek kuřaček neovlivňuje expresi placentární mRNA u AHR a ARNT genů (první trimestr i třetí trimestr v době porodu) a taky, že AHR a ARNT mRNA v choriokarcinomové buněčné linii JEG-3 nebyla ovlivněna působením AHR ligandu TCDD (Hakkola *et al.* 1997). Stejně výsledky bylo možné pozorovat

i u potkaních placent. Působení TCDD u Holtzman a Sprague-Dawley potkanů nemělo žádný vliv na Ahr mRNA expresi a nezpůsobilo signifikantní indukci v Ahrr mRNA (Kawakami *et al.* 2006).

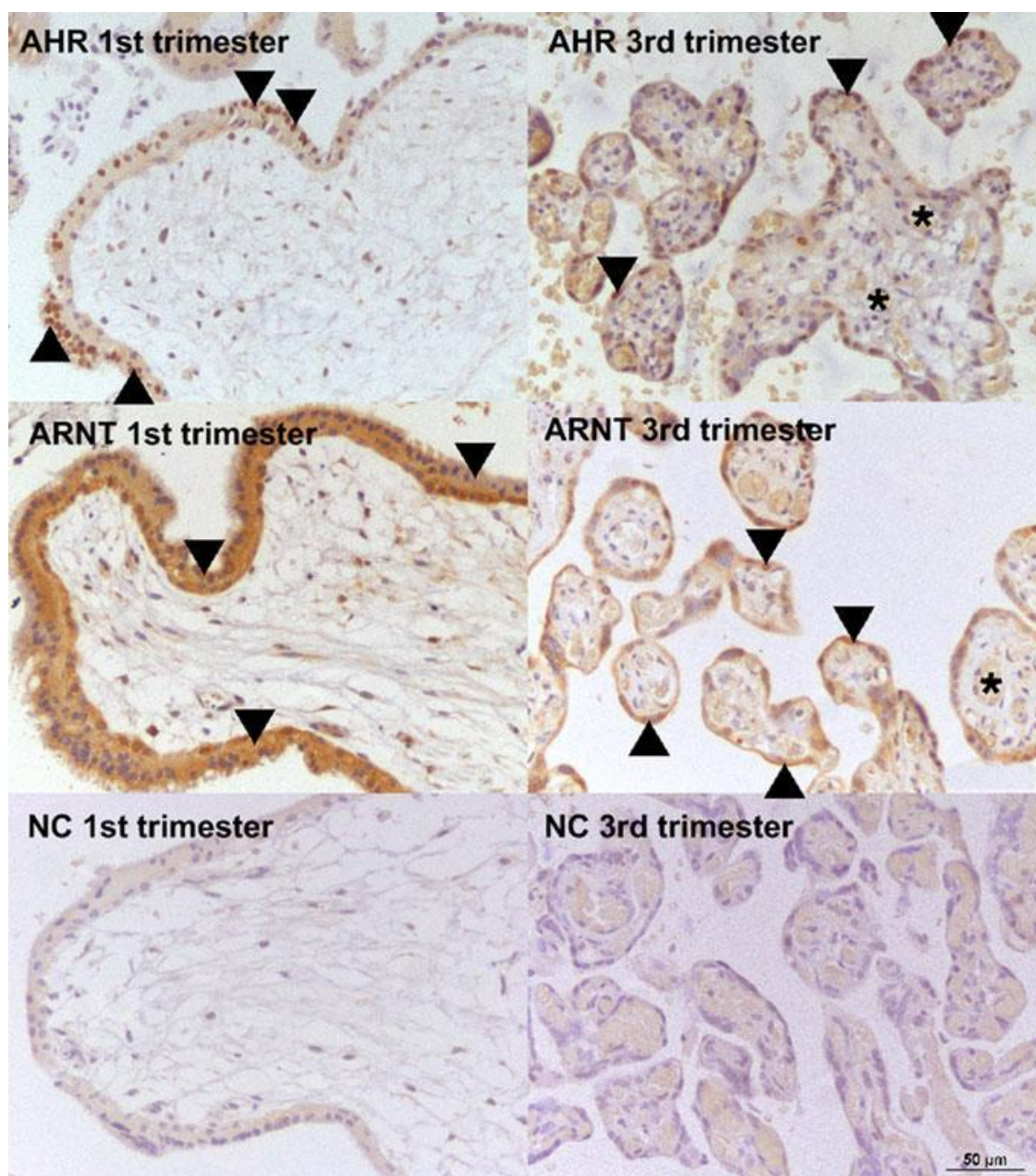
Je také dobré si povšimnout, že TCDD (5 nM) způsobuje v kultuře primárního lidského trofoblastu menší indukci CYP1A1 mRNA v porovnání se stejnou koncentrací 3MC (5 nM) (Obr. 19). V rozporu s těmito výsledky jsou naše předcházející data získaná na primárních kulturách lidských hepatocytů, kde jsme pozorovali silnější účinek TCDD (5 nM) v porovnání s 3MC (5  $\mu$ M) na CYP1A1 mRNA indukci (Vrzal *et al.* 2009). Podle těchto výsledků lze tudíž navrhnout možnou tkáňovou specifitu účinku typických AHR ligandů na CYP1A1 expresi. Můžeme přepokládat, že by to mohlo být způsobeno nízkou afinitou s jakou se [<sup>3</sup>H]TCDD váže k AHR v lidském placentárním cytosolu (Manchester *et al.* 1987).



**Obr. 19:** Relativní exprese CYP1A1 mRNA v lidské placentární kultuře trofoblastu TR-H (26). Buňky byly kultivovány s 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM) a 3-metylcholantrenem (3MC; 5; 50; 500; 5000 nM) a s využitím qRT-PCR jsme kvantifikovali CYP1A1 mRNA. Expresse byla vztahována k HPRT genu (housekeepingový gen). Expresse CYP1A1 mRNA po indukci TCDD byla nastavena na hodnotu 100%.

## **Lokalizace AHR a ARNT v lidské placentě**

S využitím imunohistochemie jsme lokalizovali AHR a ARNT expresi v lidských placentách a to ve dvou placentách z prvního trimestru a ve čtyřech placentách z třetího trimestru v době porodu. V prvním trimestru byla nalezena pozitivní exprese AHR proteinu v trofoblastových buňkách sekundárního choriového klku (Obr. 20). Pozitivní zbarvení bylo spíše pozorováno v jádrech vnější vrstvy (syncytiotrofoblastu) než ve vnitřní vrstvě (cytotrofoblastu). V prvním trimestru byla ARNT exprese zjištěna v buňkách trofoblastu, a to většinou v cytoplazmě (Obr. 20). V placentách třetího trimestru pak AHR a ARNT exprese byla detekována v jádrech syncytiotrofoblastu ve fetálním choriovému klku. Pozitivní exprese pro oba proteiny nebyla pozorována ve fetálních kapilárách.



**Obr. 20:** Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení AHR a ARNT v lidské placentě v prvním trimestru a ve třetím trimestru v době porodu. V prvním trimestru byla nalezena AHR exprese v trofoblastu v sekundárním choriovém klku. Zabarvení bylo pozorováno i v jádře vnější vrstvy buněk (syncytiotrofoblast) (viz šipky). U ARNT byla pozitivita pozorována převážně v cytoplasmě trofoblastů (viz šipky). V třetím trimestru v době porodu byla AHR a ARNT exprese detekována v jádrech syncytiotrofoblastů ve fetálním choriovém klku (šipky), ale ne ve fetálních kapilárách. NC negativní kontrola.

Lze říci, že naše lokalizace lidského placentárního AHR proteinu převážně v syncytiotrofoblastu, a to jak v prvním trimestru, tak i ve třetím trimestru placent, je shodná s nedávnou studií od Jiang *et al.* (Jiang *et al.* 2010), který našel také za pomoci imunohistochemie pozitivní reaktivitu pro lidský placentární AHR v syncytiotrofoblastu u placent získaných v době porodu. Navíc my jsme poprvé popsali placentární lokalizaci ARNT v syncytiotrofoblastu v lidské placentě získané v době porodu a zároveň jsme přesně stanovili i lokalizaci placentárních Ahr a Arnt v potkaních placentách během březosti potkana, která byla pozorována v trofoblastových vrstvách tvořících maternofetální bariéru (viz Lokalizace Ahr a Arnt v potkaních placentách a Obr. 22). Můžeme tedy proto předpokládat, že specifická lokalizace a transkripční aktivita AHR/Ahr a ARNT/Arnt v syncytiotrofoblastových vrstvách, tvořících souvislé rozhraní oddělující mateřskou a fetální cirkulaci, může přispět k fyziologické, metabolické a biotransformační funkci placentární bariéry. Další studie by měly potvrdit tuto hypotézu a zaměřit se na prozkoumání AHR funkce v trofoblastové biologii a CYP1A1 funkce v xenobiotickém a endobiotickém metabolismu a v metabolické aktivaci prokarcinogenů.

### **Indukce CYP1A1 mRNA a EROD aktivity v choriokarcinomové buněčné linii JEG-3**

V další sérii experimentů jsme studovali indukci CYP1A1 mRNA způsobenou vlivem AHR ligandů TCDD (5 nM) a 3MC (5  $\mu$ M) v lidské choriokarcinomové buněčné linii JEG-3, předpokládané alternativy primárních kultur trofoblastu pro studium indukce CYP1A1. Oba AHR ligandy způsobily signifikantní indukci v CYP1A1 mRNA expresi (Obr. 21A).

V přítomnosti 3MC (0,5; 1; 5  $\mu$ M) a TCDD (5 nM) došlo také k signifikantní indukci EROD CYP1A1 aktivity v JEG-3 buňkách, ačkoliv 3MC ve vyšších koncentracích zároveň aktivitu inhiboval (Obr. 21B), což může být v důsledku jeho inhibičního účinku na aktivitu CYP1A1 (Delescluse *et al.* 1997, Shimada and Guengerich 2006).

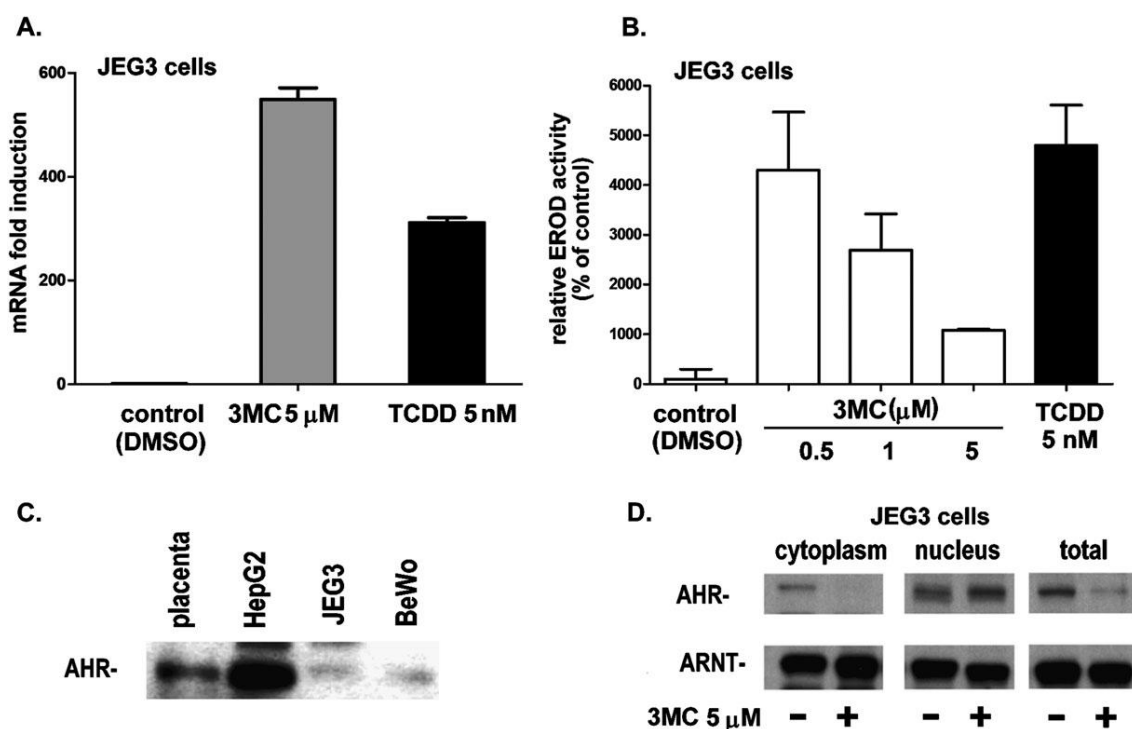
Dále jsme porovnávali expresi AHR proteinu v lyzátu z lidské placenty vzhledem k lyzátům z lidských hepatocelulárních karcinomových buněk HepG2 a choriokarcinomových buněk JEG-3 a BeWo. V souladu s indukčními studii jsme potvrdili AHR expresi v JEG-3 buňkách, která byla nicméně menší než v placentárním vzorku (Obr. 21C).

Při potvrzení exprese AHR proteinu v JEG-3 buňkách, jsme se zaměřili na studium nukleární translokace proteinu v přítomnosti AHR ligandu 3MC (5  $\mu$ M) v JEG-3 buňkách. Po přidání AHR ligandu 3MC jsme pozorovali sníženou regulaci cytosolického AHR a zvýšenou regulaci nukleárního AHR, ale ne ARNT. (Obr. 21D).

Výsledky u další choriokarcinomové linie BeWo ukázaly v porovnání s primární kulturou lidského trofoblastu a JEG-3 buňkami, že indukce CYP1A1 mRNA při užití stejných koncentrací 3MC (5  $\mu$ M) a TCDD (5 nM) jsou řádově nižší (data nejsou přiložena).

Podle výsledků experimentů lze tedy navrhnout, že JEG-3 choriokarcinomová buněčná linie má funkční AHR a CYP1A1, a že napodobuje indukční vlastnosti primárních lidských trofoblastů po expozici buněk typickými AHR ligandy. JEG-3 linie by mohla být tedy vhodným modelem pro další zkoumání placentární AHR funkce.



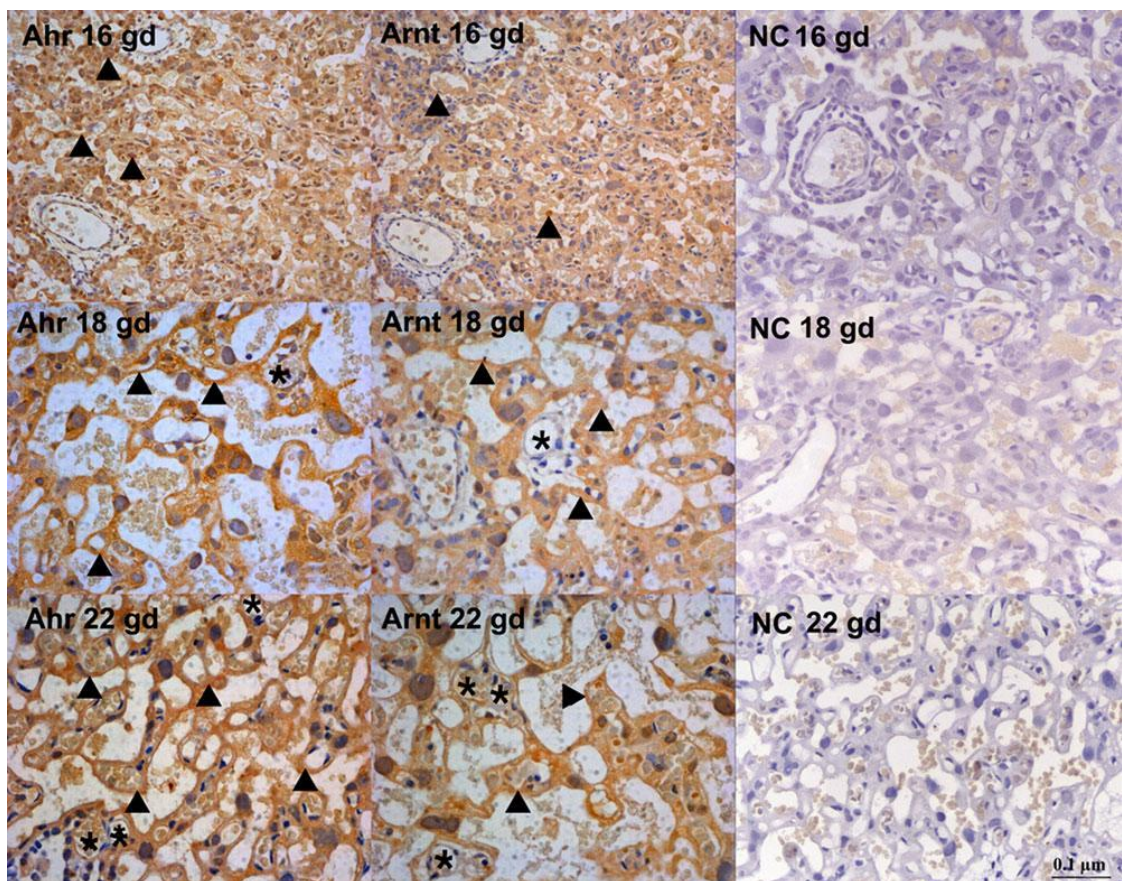


**Obr. 21:** (A) Účinek 3-metylcholantrenu (3MC) a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (TCDD) na CYP1A1 mRNA expresi v choriokarcinomové buněčné linii JEG-3. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin s ligandy AHR - 3MC (5  $\mu$ M), TCDD (5 nM) a DMSO jako kontrolou. K porovnání exprese byla použita metoda qRT-PCR a hodnoty byly vztaženy k housekeepingovému genu HPRT. Graf vyjadřuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky dvou nezávislých experimentů ( $n=2$ ), které byly provedeny v triplikátu s negativní kontrolou. (B) Účinek 3MC a TCDD na EROD CYP1A1 aktivitu. JEG-3 buňky byly vystaveny působení 3MC (0,5; 1 a 5  $\mu$ M), TCDD (5 nM) a DMSO jako kontrolou po dobu 24 h. EROD aktivita byla zmeřena spektrofotometricky. Graf ukazuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky dvou nezávislých experimentů. (C) Expresa AHR proteinů v lidské placentě, v lidských hepatomových buňkách HepG2 a lidských choriokarcinomových liniích JEG-3 a BeWo. Pro detekci AHR proteinu ze vzorků totálních lyzátů byla použita primární králičí polyklonální protilátka proti AHR (H-211 X, Santa Cruz Biotechnology). (D) Expresa AHR a ARNT proteinu v JEG-3 choriokarcinomové linii. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin s 3MC (5  $\mu$ M) a DMSO jako kontrolou. Byla vyizolována cytosolická, nukleární a totální frakce a k detekci AHR a ARNT proteinu metodou Western blot byly použity primární králičí protilátky proti AHR (H-211) a ARNT (H-172) (Santa Cruz Biotechnology).

## Lokalizace Ahr a Arnt v potkaních placentách

Pro detekci lokalizace potkaního Ahr a Arnt proteinu v placentách potkanů jsme měli k dispozici placenty získané v 16., 18. a 22. dni březosti potkana a měli jsme k dispozici vždy tři placenty z každého dne.

U placent v 16. dni březosti jsme zaznamenali expresi pro Ahr i pro Arnt protein jak v jádře, tak i v cytoplasmě buněk, které tvoří labyrintovou zónu (Obr. 22). 18. den březosti potkana se v pozitivní expresi Ahr a Arnt podobal výsledkům z 16. dne. Ahr a Arnt protein měl pozitivní zbarvení v syncytiotrofoblastu, ale nikoliv ve fetálních kapilárách v labyrintové zoně (Obr. 22). Ve 22. dni jsme pak pozorovali expresi Ahr a Arnt proteinu v syncytiotrofoblastu terciálního choriového klku labyrintové zóny (Obr. 22).



**Obr. 22:** Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení Ahr a Arnt exprese v potkaní labyrintové zóně v 16., 18. a 22. dni březosti potkana. Potkaní Ahr a Arnt proteiny byly pozorovány v jádrech labyrintu (šipky). Pozitivita pro Ahr a Arnt byla v 18. dni březosti také detekována v syncytiotrofoblastu (šipky), ale ne ve fetálních

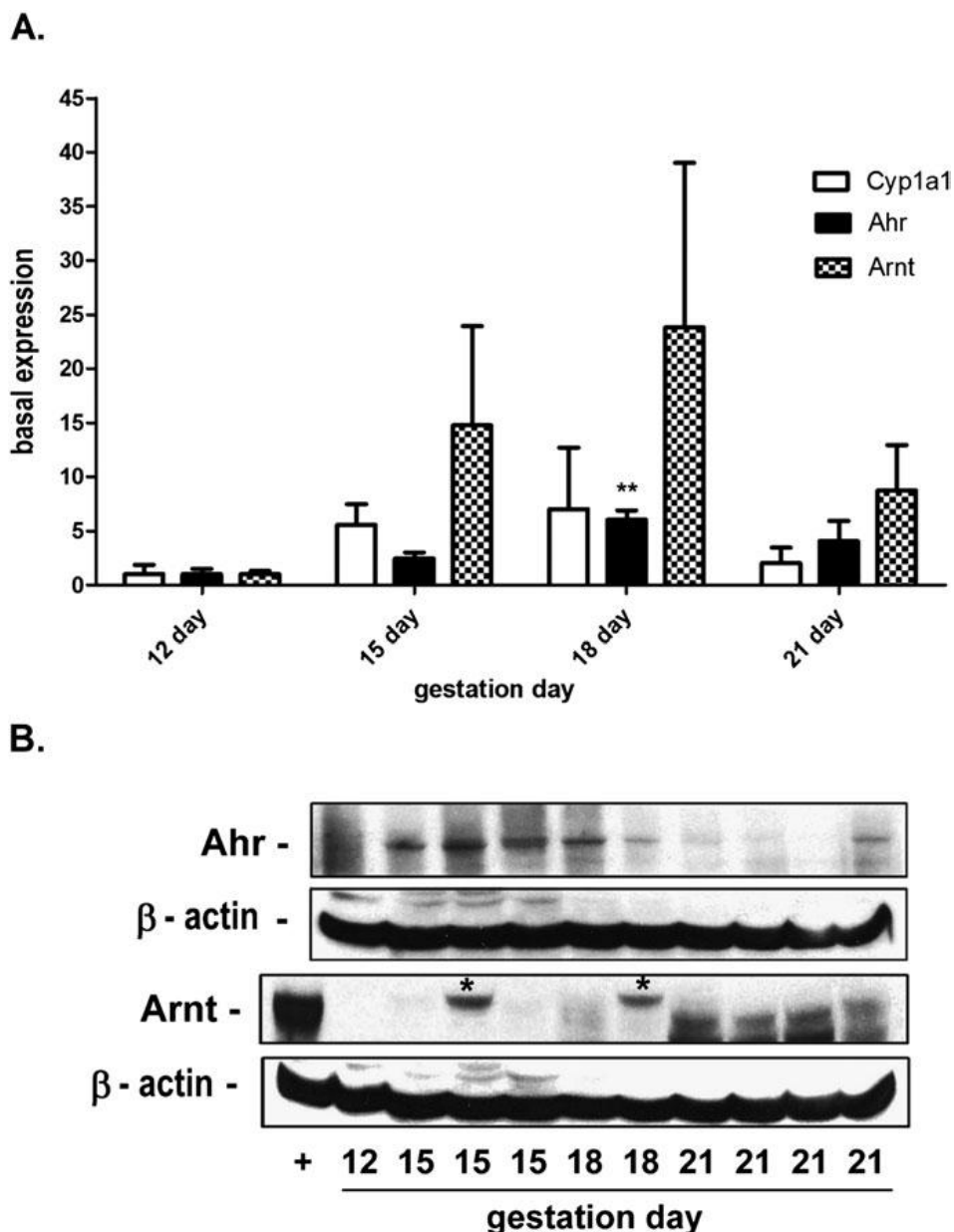
*kapilárách labyrintu. Navíc ve 22. dni byla pozitivita nalezena jak pro Ahr, tak pro Arnt v syncytiotrofoblastu terciálního choriového klku v zóně labyrintu (šipky). Ve fetálních kapilárách nebyla nalezena. NC negativní kontrola.*

### **Expresie Ahr, Arnt a Cyp1a1 na úrovni mRNA a proteinů v potkaních placentách**

S využitím metody qRT-PCR jsme zjišťovali mRNA expresi u Ahr, Arnt a Cyp1a1 genů v potkaních placentách v průběhu březosti potkana a to ve 12., 15., 18. a 21. dni březosti. 21.den březosti potkana byl také dnem vrhu mládých potkanů. mRNA exprese testovaných genů byla vztažena k celkovému množství mRNA v jednotlivých dnech a referenční mRNA exprese testovaného genu ve 12. dni byla nastavená jako hodnota 1.

Jak můžeme vidět v grafu (Obr. 23A), mRNA exprese u potkaního Ahr dosáhla maximálních hodnot v 18. dni březosti a tato exprese byla signifikantně vyšší ( $p < 0,01$ ) v porovnání s 12. dnem (Obr. 23A). U Arnt mRNA jsme mohli také pozorovat maximální expresi v 18. dni březosti, ale v porovnání s Ahr tato exprese nebyla statisticky významná (ANOVA). Profil u Ahr i Arnt mRNA exprese pak dobře koreloval s expresí u Cyp1a1 genu, který měl také nejvyšší míru exprese v 18. dni (Obr. 23A).

Metodou Western blot jsme porovnávali i expresi potkaních Ahr a Arnt proteinů. Expresie Ahr proteinu v potkaních placentách dosáhla maxima v 15. dni březosti potkana. Naproti tomu signifikantní exprese placentárního Arnt proteinu byla zjištěna jen ve 21. dni (Obr. 23B).



**Obr. 23:** *Expresse Ahr, Arnt a Cyp1a1 mRNA a Ahr, Arnt proteinu v potkaních placentách v 12., 15., 18. a 21. dni březosti. (A) K expresi Ahr, Arnt a Cyp1a1 mRNA byla využita metoda qRT-PCR a referenční mRNA exprese testovaného genu ve 12. dni březosti byla daná na hodnotu 1. Graf představuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z pěti až sedmi placent od nejméně 4 samic pro každý den březosti. \*\* $p < 0,01$  statisticky signifikantní rozdíly vzhledem ke 12. dni březosti (B) Western blot proteinová analýza exprese Ahr, Arnt a  $\beta$ -actinu (vnitřní kontrola) v lyzátu potkaních placent během březosti potkana. K expresi byly použity králičí polyklonální protilátky AHR (H-211 X) a ARNT (H-172) (Santa Cruz Biotechnology),  $n=2-6$  placent nejméně od 4 samic pro každý den březosti. „\*“ - znamená nespecifickou imunodetekci; „+“ - znamená Arnt pozitivní kontrolu.*

Jak ukazují výsledky, měl Ahr protein maximální expresi v 15. dni březosti potkana a Arnt exprese byla maximální ve 21. dni. Naproti tomu mRNA u obou genů dosahovala maximální exprese v 18. dni březosti potkana. Lze předpokládat, že vztah stupeň březosti - specifická exprese těchto transkripčních faktorů v průběhu březosti může souviset se změnami na úrovni gestačních hormonů nebo na parakrinní úrovni. Podle rozdílné exprese transkripčních faktorů v lidské a potkaní placentě lze také navrhnout možnost rozdílných reakcí Ahr/AHR ligandů při indukci Cyp1a1/CYP1A1 genu a rozdílnou metabolickou indukci během březosti/těhotenství s významnými důsledky pro metabolismus endogenních (estradiol) a exogenních (PAH prokarcinogeny) látek (Pavek and Dvorak 2008).

Stejně jako my také Carver *et al.* (Carver *et al.* 1994) pozoroval, že placentární Ahr a Arnt genová exprese je v průběhu březosti potkana rozdílná. Carver zjistil, že potkaní placenty v 16. dni březosti vykazují nízkou Ahr a vysokou Arnt expresi. Rozdílnost v expresi potkaní Arnt mRNA a proteinu v průběhu březosti je také v rozporu s lidským ARNT, jelikož jak ARNT mRNA, tak protein se v průběhu těhotenství nemění (Ietta *et al.* 2006). Rozdílnost v AHR/Ahr a ARNT/Arnt expresi je pravděpodobně způsoben mezidruhovou rozdílností v regulaci genů. Navíc rozpor mezi mRNA a proteinovou expresí může být také způsoben třeba i jinými mechanismy genové regulace než je transkripční regulace, často protein a mRNA degradací.

## **7.2 Účinek glukokortikoidů na inducibilitu CYP1A1 a dalších cílových genů AHR receptoru v placentární bariéře**

### **Účinek dexametazonu a betametazonu na CYP1A1 a BCRP mRNA indukci v primární kultuře lidského trofoblastu**

V první sérii experimentů tohoto výzkumného projektu jsme pozorovali vliv glukokortikoidů (DEX; 50 nM a BETA; 100 nM, 200 nM) na expresi CYP1A1 a BCRP mRNA při absenci nebo v přítomnosti typického AHR ligandu 3MC (5 µM) po dobu 24 hodin v primárních kulturách lidských trofoblastů, které byly získány od osmi dárkyň. Trofoblast TR-S (18) byl získán od matky kuřačky a trofoblast TR-S (36) byl

získán od matky kuřačky, která měla *diabetes mellitus*. Trofoblasty TR-H (21), TR-H (22), TR-H (24), TR-E (31), TR-H (34), TR-H (35) byly získány od nekuřaček, přičemž matka u TR-E (31) trpěla epilepsií.

Přítomnost ligandu 3MC způsobila signifikantní indukci CYP1A1 mRNA ( $p < 0,001$ ), která byla navíc ještě potenciována přítomností glukokortikoidů a to jak dexametazonu, tak i betametazonu (Tab. 2). Potenciace CYP1A1 mRNA v přítomnosti glukokortikoidů a 3MC byla asi dvojnásobně vyšší a statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ) vzhledem k indukci způsobené jen 3MC. Změna bazální exprese CYP1A1 mRNA nebyla v přítomnosti betametazonu nebo dexametazonu statisticky signifikantní.

Dále jsme zjišťovali vliv glukokortikoidů spolu s 3MC na expresi transportéru BCRP (Tab. 3). Indukce BCRP mRNA působením samotného 3MC byla statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ). Naproti tomu samotný dexametazon nebo betametazon nezpůsobil signifikantní indukci u BCRP genu. Ačkoliv bylo možné pozorovat lehce zvýšenou indukci BCRP mRNA v přítomnosti DEX a 3MC a nebo v přítomnosti BETA a 3MC, oproti samotnému 3MC nebyla tato indukce statisticky významná.

**Tab. 2:** CYP1A1 mRNA indukce v kultuře primárního lidského trojoblástu ( $n = 8$ ). Buňky trojoblástu byly kultivovány s 3-metylocholanrenem (3MC; 5  $\mu$ M), glukokortikoidy (betametazon (BETA), dexametazon (DEX)) nebo v kombinaci s 3MC a glukokortikoidy po dobu 24 hodin. U každého vzorku byly výsledky vztaheny ke kontrole (DMSO).

Dárkyňé	statistická signifikance	TR-S (18) kuřačka	TR-H (21) nekuřačka	TR-H (22) nekuřačka	TR-H (24) nekuřačka	TR-E (31) nekuřačka epilepsie	TR-H (34) nekuřačka	TR-H (35) nekuřačka	TR-S (36) kuřačka diabetes
glukokortikoidy		DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	BETA 100 nM	BETA 200 nM	DEX 50 nM
	N.S.* $\Delta$	0,5	1,3	2,2	4,4	4,4	4,1	4,0	1,63
3MC 5 $\mu$ M	$p < 0,001^{\Delta}$	47,6	151,1	489,7	5507,4	1048,8	2209,8	2457,1	13642,2
3MC/glukokortikoid	$p < 0,05^* \text{ k } 3\text{MC}$	75,3	380,2	2228,1	5084,5	3895,2	4071,0	4231,7	32518,5

\* statistická analýza pro data s DEX 50 nM u nekuřáček;  $\Delta$  statistická analýza vztahená ke kontrole (DMSO)

**Tab. 3:** BCRP mRNA indukce v kultuře primárního lidského trojoblástu ( $n = 8$ ). Buňky trojoblástu byly kultivovány s 3-metylocholanrenem (3MC; 5  $\mu$ M), glukokortikoidy (betametazon (BETA), dexametazon (DEX)) nebo v kombinaci s 3MC a glukokortikoidy po dobu 24 hodin. U každého vzorku byly výsledky vztaheny ke kontrole (DMSO).

Dárkyňé	statistická signifikance	TR-S (18) kuřačka	TR-H (21) nekuřačka	TR-H (22) nekuřačka	TR-H (24) nekuřačka	TR-E (31) nekuřačka epilepsie	TR-H (34) nekuřačka	TR-H (35) nekuřačka	TR-S (36) kuřačka diabetes
glukokortikoidy		DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	DEX 50 nM	BETA 100 nM	BETA 200 nM	DEX 50 nM
	N.S.* $\Delta$	0,6	1,5	1,9	4,2	5,3	0,8	8,2	3,3
3MC 5 $\mu$ M	$p < 0,05^{\Delta}$	1,3	1,6	2,8	5,7	1,9	1,7	13,6	2,4
3MC/glukokortikoid	N.S. * k 3MC	1,5	0,4	3,7	6,6	8,9	1,8	36,2	12,8

\* statistická analýza pro data s DEX 50 nM u nekuřáček;  $\Delta$  statistická analýza vztahená ke kontrole (DMSO)

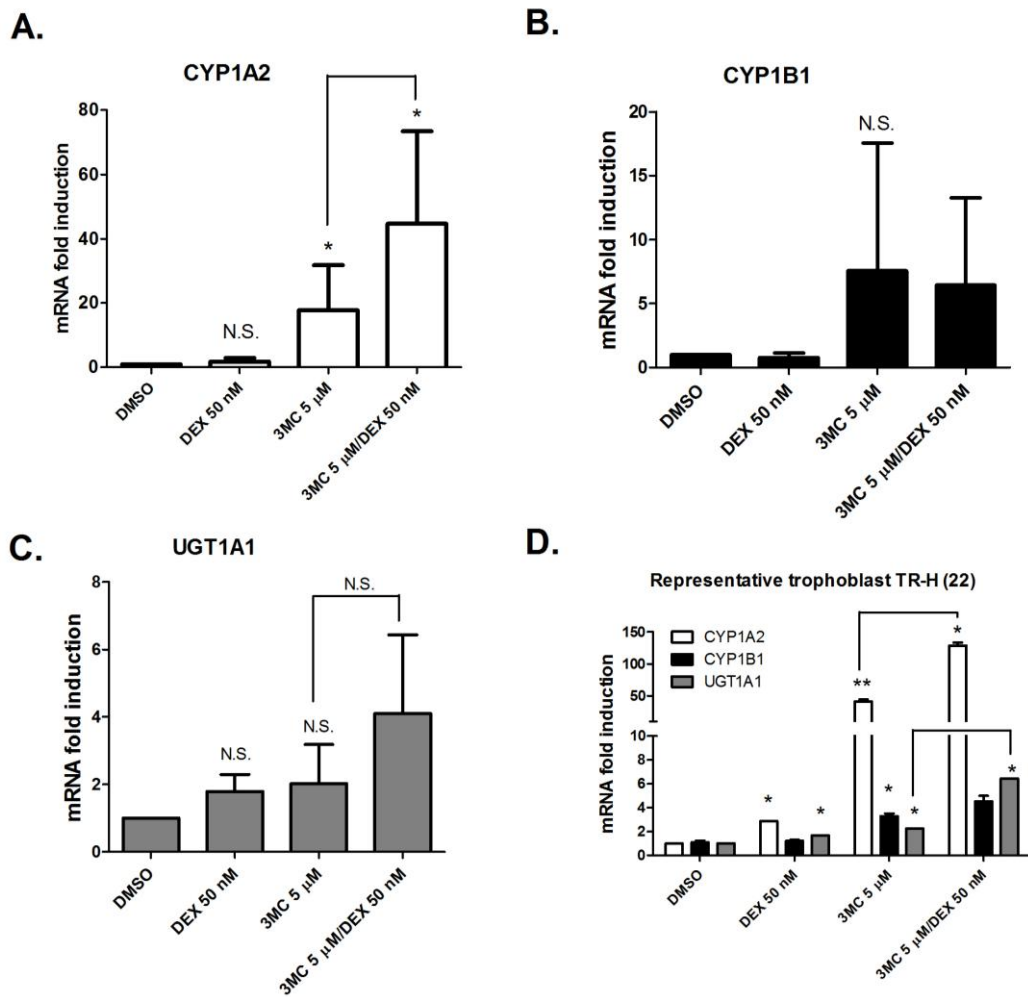
## **Účinek dexametazonu na expresi CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a AHR, ARNT, AHRR mRNA při absenci či v přítomnosti AHR ligandu 3-metylcholantrenu v primární kultuře lidského trofoblastu**

V navazujících experimentech jsme studovali také vliv dexametazonu na expresi ostatních AHR cílových genů (CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1) (Obr. 24A, B, C). Primární kultury lidského trofoblastu byly kultivovány po dobu 24 hodin buď se samotným DEX (50 nM) nebo v přítomnosti 3MC (5  $\mu$ M) a jako kontrola byl zvolen DMSO. Samotný DEX ve čtyřech kulturách primárního lidského trofoblastu ( $n = 4$ ) měl malý vliv na CYP1A2 (Obr. 24A), CYP1B1 (Obr. 24B) a UGT1A1 (Obr. 24C) mRNA expresi a tato změna exprese nebyla statisticky signifikantní. 3MC nezpůsobil signifikantní změnu exprese u CYP1B1 a UGT1A1 mRNA, ačkoliv jsme mohli vidět zvýšenou expresi (Obr. 24B, C). Naproti tomu u CYP1A2 mRNA jsme mohli pozorovat signifikantní ( $p < 0,05$ ) indukci způsobenou 3MC (Obr. 24A). Společné působení DEX a 3MC způsobilo statisticky signifikantní potenciaci indukce u CYP1A2 mRNA ( $p < 0,05$ ) (Obr. 24A) a statisticky nesignifikantní potenciaci UGT1A1 mRNA (Obr. 24C). Jelikož však exprese CYP1A2 mRNA byla na hranici detekce (metodou qRT-PCR) lze tedy aktivitu indukovaného CYP1A2 považovat za nevýznamnou. V kontrastu k těmto výsledkům jsme u CYP1B1 mRNA pozorovali mírný pokles indukce zprostředkovanou 3MC vlivem dexametazonu ve všech kulturách primárních lidských trofoblastů (Obr. 24B). U reprezentativního vzorku primární kultury lidského trofoblastu TR-H (22) (Obr. 24D) jsme však mohli pozorovat zvýšení indukce tohoto genu vlivem přítomnosti DEX a 3MC v porovnání se samotným 3MC. Tento rozdíl v indukci CYP1B1 může být způsoben interindividuálními rozdíly.

Přestože DEX a 3MC nebyly schopny signifikantní indukce UGT1A1 mRNA ve všech čtyřech kulturách primárních trofoblastů ( $n = 4$ ), u reprezentativního vzorku primární kultury lidského trofoblastu TR-H (22) (Obr. 24D) jsme mohli pozorovat, že samotný dexametazon způsobit signifikantní indukci ( $p < 0,05$ ) bazální exprese UGT1A1 mRNA. Samotný DEX také signifikantně indukoval ( $p < 0,05$ ) bazální expresi u CYP1A2 mRNA. U 3MC jsme mohli pozorovat statisticky signifikantní indukci jak u CYP1A2 mRNA ( $p < 0,01$ ), tak u CYP1B1 a UGT1A1 ( $p < 0,05$ ) (Obr. 24D). U indukované CYP1A2 a UGT1A1 mRNA exprese pak dexametazon způsobil

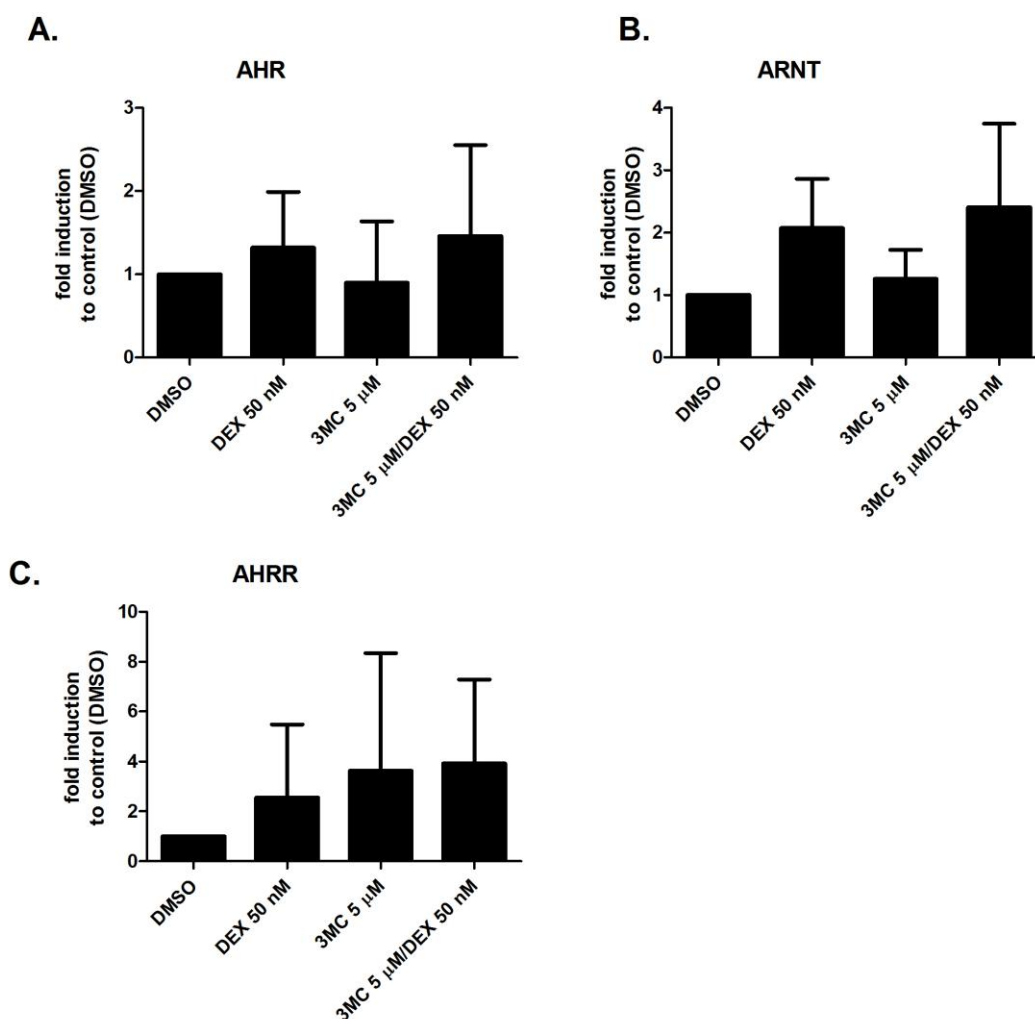


signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ). Tyto rozpory v indukci mohou být způsobené interindividuální rozdílností v citlivosti k AHR a GR ligandům.



**Obr. 24:** Účinek dexametazonu (DEX; 50 nM) a 3-metylcholantrenu (3MC; 5 μM) na CYP1A2 (A), CYP1B1 (B) a UGT1A1 (C) mRNA expresi v kultuře lidských primárních trofoblastů. Trofoblasty byly kultivovány po dobu 24 hodin s látkami a mRNA byla vyhodnocena metodou qRT-PCR. Expze testovaných genů byla vztažena ke kontrolnímu vzorku, který byl nastavený na hodnotu 1. Graf obsahuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky čtyř nezávislých trofoblastových kultur ( $n = 4$ ; TR-H (21), TR-H (22), TR-H (24), TR-H (34)). (D) Účinek DEX a 3MC na CYP1A2, CYP1B1 a UGT1A1 mRNA u reprezentativního vzorku trofoblastu TR-H (22). mRNA byla vyhodnocena metodou qRT-PCR a expze testovaných genů byla vztažena ke kontrolnímu vzorku, který byl nastavený na hodnotu 1. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; N.S. statisticky nesignifikantní vzhledem ke kontrole (DMSO).

Za stejných kultivačních podmínek (DEX 50 nM; 3MC 5  $\mu$ M, 24 hodin kultivace) jsme se zaměřili i na studium vlivu dexametazonu a 3MC na AHR, ARNT a AHRR mRNA expresi. Z experimentů na pěti kulturách primárních lidských trofoblastů jsme pozorovali, že samotný DEX a samotný 3MC nesignifikantně indukovali expresi u AHR, ARNT i AHRR mRNA. Kombinace DEX a 3MC také neměla statisticky signifikantní vliv na AHR, ARNT a AHRR mRNA indukci (Obr. 25A, B, C).



**Obr. 25:** Účinek dexametazonu (DEX; 50 nM) a 3-metylcholantrenu (3MC; 5  $\mu$ M) na AHR (A), ARNT (B) and AHRR (C) mRNA v kulturách primárních lidských trofoblastů. Trofoblasty byly kultivovány po dobu 24 hodin s látkami a mRNA byla vyhodnocena metodou qRT-PCR. Expres testovaných genů byla vztahena ke kontrolnímu vzorku DMSO, který byl nastavený na hodnotu 1. Graf obsahuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pěti nezávislých trofoblastových kultur (n=5; TR-H (21), TR-H (22), TR-H (24), TR-H (34), TR-H (25)).

Z výsledků zabývajících se vlivem glukokortikoidů na expresi/indukci cílových AHR genů v primárních kulturách lidského trofoblastu je patrné, že samotný dexametazon či betametazon nevyvolá statisticky signifikantní indukci CYP1A1 CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 ani BCRP mRNA ve všech trofoblastových kulturách, ačkoliv jsme mohli pozorovat indukci u CYP1A2 a UGT1A1 mRNA v jednom ze vzorků trofoblastu (Obr. 24D). Naproti tomu přítomnost glukokortikoidů spolu s 3MC způsobila signifikantní potenciaci indukce u CYP1A1 mRNA (Tab. 2) a CYP1A2 mRNA (Obr. 24A) prostřednictvím 3MC ve všech trofoblastových kulturách. CYP1A2 mRNA exprese v našich experimentech (metodou qRT-PCR) byla však na hranici detekovatelnosti u všech trofoblastových vzorků. V jednom ze vzorků trofoblastu (Obr. 24D) jsme také mohli pozorovat statisticky signifikantní potenciaci u UGT1A1 genu.

Výsledky pokusů na úrovni mRNA exprese nemáme možnost porovnat s dřívějšími studii, neboť vliv glukokortikoidů na indukci AHR cílových genů na úrovni mRNA nebyl doposud studován v placentární bariéře (choriokarcinomové linie, primární kultura trofoblastu, potkaní placenty). Vliv dexametazonu na indukci CYP1A1 byl zaznamenán jen na úrovni EROD CYP1A1 enzymové aktivity v choriokarcinomové buněčné linii BeWo, kde došlo působením dexametazonu k potenciaci  $\beta$ -naftoflavon dependentní indukce EROD aktivity (Avery *et al.* 2003).

Pro srovnání na úrovni mRNA si musíme zvolit výsledky experimentů prováděných u jiných buněčných či tkáňových modelů. Příkladem mohou být primární kultury lidských hepatocytů, na kterých jsme také studovali vliv dexametazonu na expresi a aktivitu CYP1A1 a CYP1A2. V porovnání se signifikantní potenciací indukce placentární CYP1A1 mRNA prostřednictvím 3MC (Tab. 2) jsme u lidských hepatocytů nezjistili signifikantní vliv dexametazonu na 3MC a TCDD indukovanou expresi CYP1A1 genu. Naproti tomu u hepatocytární exprese CYP1A2 mRNA dexametazon způsobil signifikantní nárůst indukce u TCDD až o 73% a u 3MC až o 110%. Bazální exprese hepatocytární CYP1A1 a CYP1A2 mRNA pak nebyla přítomností samotného DEX signifikantně ovlivněna (Vrzal *et al.* 2009).

Značný synergistický účinek dexametazonu na Ahr ligand dependentní indukci Cyp1a1 mRNA byl pozorován také u primární kultury potkaních hepatocytů (Monostory *et al.* 2005) a v potkaní hepatokarcinomové linii H4IIE, kde tento vliv byl závislý na posttranskripčních procesech (Lai *et al.* 2004, Sonneveld *et al.* 2007).

V potkaních H4IIE buňkách byl pozorován i nárůst TCDD závislé indukce Cyp1a2 a Cyp1b1 mRNA v přítomnosti DEX (Sonneveld *et al.* 2007). Naproti tomu TCDD dependentní indukce Cyp1b1 mRNA u potkaních prsních fibroblastů byla dexametazonem potlačena (Brake *et al.* 1998).

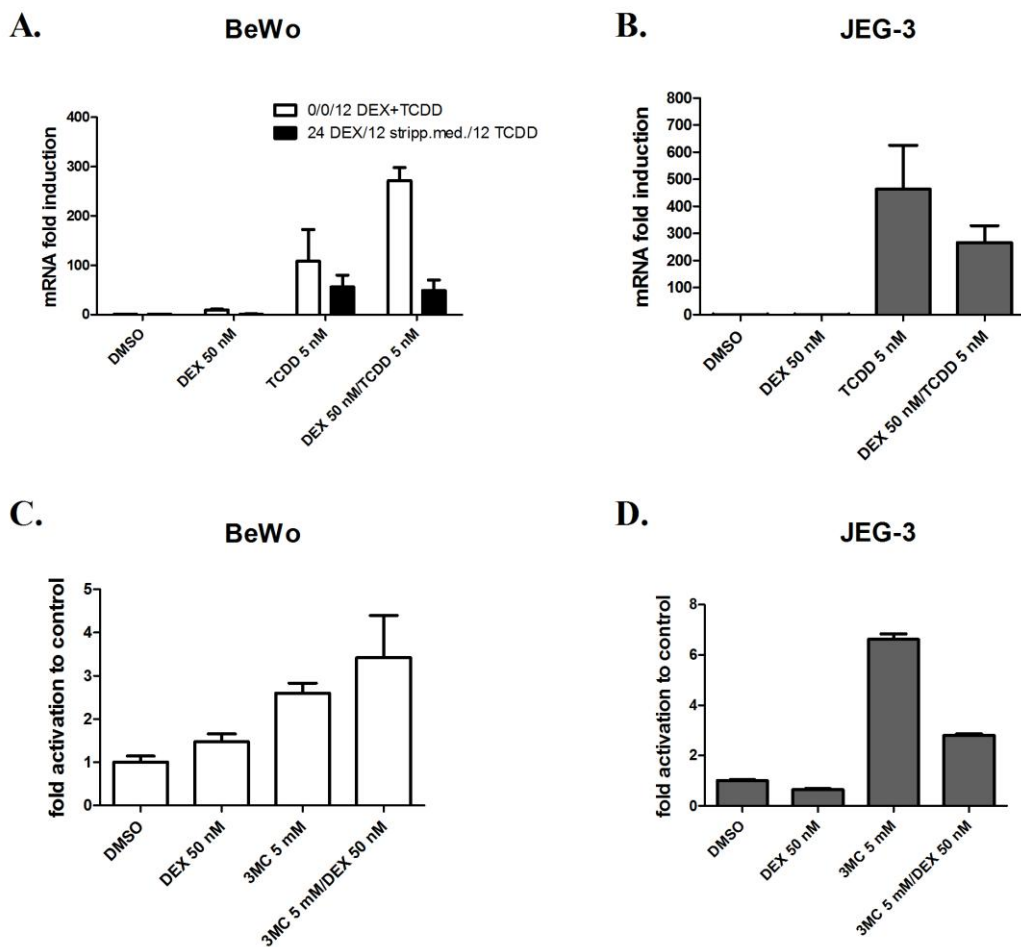
Naše výsledky také ukázaly, že exprese AHR, ARNT a AHRR mRNA není v primární kultuře lidského trofoblastu signifikantně ovlivněna působením samotného dexametazonu nebo v kombinaci s 3MC (Obr. 25A, B, C). Stejně jako primární kultury trofoblastů také množství hepatocytární ARNT mRNA nebylo v našich experimentech přítomností samotného dexametazonu ovlivněno. Naproti tomu samotný DEX způsobil signifikantní pokles AHR exprese v primární kultuře hepatocytů (Vrzal *et al.* 2009). Stejný účinek dexametazonu na bazální AHR mRNA byl zjištěn i v hepatokarcinomové buněčné linii HepG2 (Dvorak *et al.* 2008). Bylo také zjištěno, že v řadě lidských karcinomových buněčných liniích (HO23, 293T, HeLa a HepG2) dochází vlivem dexametazonu k inhibici AHR ligand dependentní indukci mRNA (Dvorak *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009). Naproti tomu u potkaní H4IIE buněčné linie způsobil dexametazon až 6 krát větší nárůst TCDD indukované exprese Ahr mRNA (Sonneveld *et al.* 2007).

Podle výsledků lze předpokládat, že komunikace mezi AHR a GR *in vitro* může být ovlivněna řadou faktorů. Prvním je třeba změna buněčných signalů a komunikace mezi normálními a malformovanými buňkami, kde vlivem nádorové přeměny se mění signální komunikace a regulační mechanismy v porovnání s normálními buňkami. Dále změny stability, transkripční aktivity, fosforylace a ligand vázající schopnosti u AHR a GR receptorů, které kolísají během buněčného cyklu, a které se liší u proliferujících se a neproliferujících se buněk, mohou být faktory ovlivňující tento fenomén (Bonzo *et al.* 2005, Scholler *et al.* 1994). Dalším možným faktorem jsou mezidruhové rozdíly při regulaci cílových genů AHR/Ahr receptorů (Sonneveld *et al.* 2007).

Zajímavé jsou také výsledky získané na pokusech v choriokarcinomové linii JEG-3. Metodou qRT-PCR (Obr. 26B) a genovou reportérovou studií (Obr. 26D) jsme pozorovali potlačení TCDD dependentní indukce CYP1A1 mRNA a transkripční CYP1A1 aktivity v přítomnosti dexametazonu. Tyto výsledky se značně liší od výsledků experimentů provedených v další choriokarcinomové buněčné linii BeWo (Obr. 26A) a primárními kulturami lidských trofoblastů (Tab. 2), kde jsme na mRNA úrovni pozorovali potenciaci CYP1A1 indukce zprostředkovanou TCDD či 3MC vlivem dexametazonu.

Navíc v choriokarcinomové buněčné linii BeWo jsme také tuto potenciaci mohli pozorovat při využití genové reportérové studie (Obr. 26C). U obou genových reportérových studií byly buňky transfekovány reportérovým plazmidem pXRE-luc a expresním plasmidem pro glukokortikoidní receptor pSG5-hGR. Jak už bylo zmíněno, DEX v kombinaci s 3MC způsobil potenciaci účinku v buněčné linii BeWo na rozdíl od buněčné linie JEG3, kde potenciace způsobená 3MC byla přítomností DEX potlačena.

V první experimentální části jsme navrhovali choriokarcinomovou linii JEG-3 jako vhodný model při studiu placentární funkce AHR, neboť svými vlastnostmi napodobuje indukční vlastnosti primárních lidských trofoblastů. Z experimentálních výsledků studia cross-talku však vyplývá, že vhodnější linií pro studium spoluovlivnění AHR a GR nukleárních receptorů je buněčná linie BeWo, která lépe napodobuje profil indukce u primárních lidských trofoblastů. Její nevýhodou však je nízká inducibilita CYP1A1 prostřednictvím AHR ligandů.



**Obr. 26:** (A) Účinek dexametazonu (DEX) a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (TCDD) na CYP1A1 mRNA expresi v choriokarcinomové linii BeWo. Buňky byly kultivovány po dobu 12 hodin s roztoky dexametazonu (50 nM), TCDD (5 nM), DEX a TCDD, DMSO jako kontrolou. Druhý vzorek byl kultivovaný po dobu 24 hodin s roztokem DEX nebo DMSO, následně bylo médium vyměněno za strippované médium. Po 12 hodinách bylo médium vyměněno za roztoky DMSO, DEX, TCDD. CYP1A1 mRNA byla vyhodnocena metodou qRT-PCR. Data byla vztažena k HPRT housekeepingovému genu. Graf vyjadřuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze dvou nezávislých experimentů (n=2). (B) Účinek dexametazonu (DEX; 50 nM) a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu (TCDD; 5 nM) na expresi CYP1A1 mRNA v choriokarcinomové linii JEG-3. JEG-3 buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin v přítomnosti DMSO jako kontroly, DEX, TCDD, DEX a TCDD. Vzorky byly vyhodnoceny metodou qRT-PCR a graf ukazuje průměrné hodnoty a směrodatné odchylky dvou nezávislých experimentů (n=2). (C) Vliv dexametazonu (DEX, 50 nM) a 3-metylcholantrenu (3MC, 5  $\mu$ M) na transkripční aktivitu CYP1A1

v choriokarcinomové buněčné linii BeWo. Buňky byly transfekovány plazmidy *pXRE-luc*, *pRL-TK* a *pSG5-hGR* a kultivovány po dobu 24 hodin s testovanými látkami. (D) Vliv dexametazonu (DEX, 50 nM) a 3-metylcholantrenu (3MC, 5 μM) na transkripční aktivitu *CYP1A1* v choriokarcinomové buněčné linii JEG-3. Buňky byly transfekovány plazmidy *pXRE-luc*, *pRL-TK* a *pSG5-hGR* a kultivovány po dobu 24 hodin s testovanými látkami.

### Potenciace *CYP1A1* indukce dexametazonem v choriokarcinomové linii BeWo

Jak již bylo zmíněno výše, potenciaci indukce způsobené vlivem AHR ligandu TCDD jsme studovali i u choriokarcinomové buněčné linie BeWo, která představuje jednu z možných alternativ primárních kultur trofoblastu pro studium genové *CYP1A1* exprese a v porovnání s linií JEG-3 u ní nedocházelo vlivem DEX a TCDD k inhibičnímu účinku.

Buňky byly kultivovány po dobu 12 hodin v přítomnosti DEX (50 nM), TCDD (5 nM), DEX a TCDD a DMSO jako kontrolou. DEX neměl vliv na *CYP1A1* mRNA expresi, naproti tomu TCDD způsobil 100-násobnou indukci *CYP1A1* mRNA. U vzorku, který byl kultivovaný v přítomnosti DEX a TCDD jsme mohli pozorovat zvýšenou indukci *CYP1A1*. Potenciace indukce byla asi 2,7-krát větší v porovnání s TCDD indukci (Obr. 26A).

Zároveň jsme provedli experiment, kdy jsme buňky nejdříve kultivovali v přítomnosti samotného DEX (50 nM) nebo DMSO. Po 24 hodinách jsme vyměnili médium za médium se strippovaným FBS. Po 12 hodinách kultivace jsme toto médium vyměnili za DMSO, DEX a TCDD (5 nM) a buňky s těmito látkami byly kultivované po dobu 12 hodin (schéma pokusu Obr. 27).



**Obr. 27:** Průběh pokusu na choriokarcinomové buněčné linii BeWo.

Stejně jako v minulém experimentu samotný DEX měl minimální vliv na CYP1A1 mRNA expresi. Ve vzorku s přítomností DMSO v médiu před kultivací TCDD jsme mohli pozorovat asi 50-ti násobnou indukci CYP1A1 mRNA exprese. Expozice buněk DEX a následně TCDD způsobila stejnou indukci (asi 50-ti násobnou) CYP1A1 mRNA jako u vzorku DMSO/TCDD (Obr. 26A).

Lze tedy říci, že k potenciaci AHR dependentní indukce vlivem dexametazonu je potřeba, aby byly v médiu přítomny obě látky současně. Expozice buněk samotnému DEX a následně expozice samotnému TCDD způsobily stejnou indukci jako přítomnost samotného TCDD a lze tedy navrhnout, že samotný dexametazon neovlivňuje expresi/indukci AHR receptoru, jeho kofaktorů či dalších transkripčních faktorů, které by pak následně vedly v přítomnosti AHR ligandů (TCDD, 3MC) k potenciaci tohoto účinku.

### **Vliv dexametazonu a 3-metylcholantrenu na EROD katalytickou aktivitu a expresi CYP1A1 proteinu v primární kultuře lidského trofoblastu**

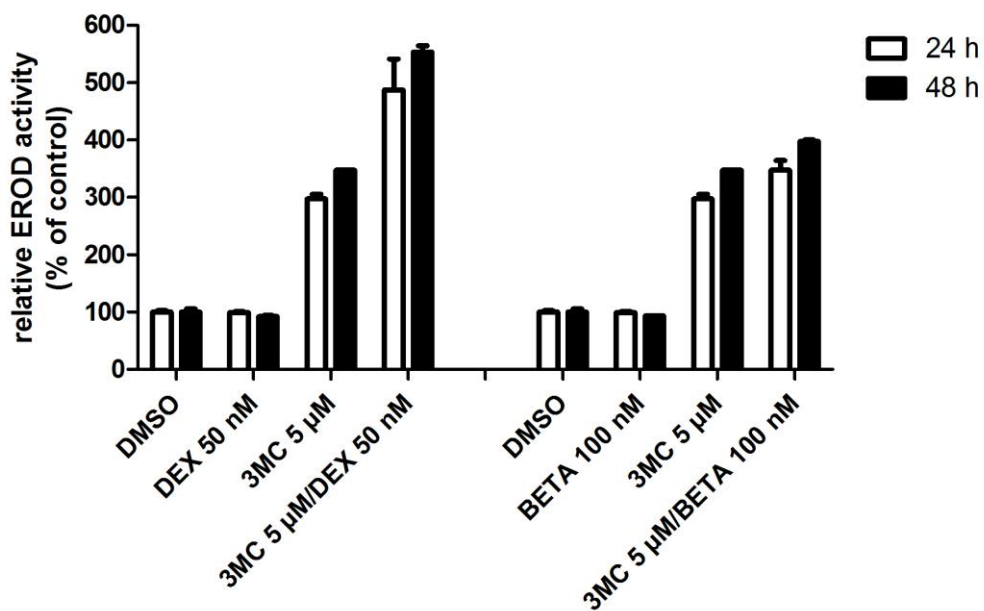
V kombinaci s dexametazonem můžeme pozorovat potenciaci indukce katalytické aktivity CYP1A1 zapříčiněné 3MC. Primární kultura lidského trofoblastu byla kultivována po dobu 24 a 48 hodin v přítomnosti látek DEX (50 nM), 3MC (5  $\mu$ M), DEX a 3MC a DMSO jako kontroly (Obr. 28A). Výsledky u kontrolního vzorku byly nastaveny na hodnotu 100%. Přítomnost 3MC v kultuře způsobila 3-krát (24 hodin) a 3,5-krát (48 hodin) větší EROD aktivitu. Samotný DEX změny aktivity u CYP1A1 enzymu nezpůsobil. Nicméně přítomnost obou látek v médiu vedla k 5-krát (24 hodin) a 5,5-krát (48 hodin) větší indukci enzymové aktivity v porovnání s kontrolou. Synergistický účinek vzhledem k samotnému 3MC byl 1,6-krát větší u obou časových period (Obr. 28A). Podobné výsledky můžeme pozorovat i u druhého glukokortikoidu betametazonu (100 nM), který také způsobil potenciaci 3MC indukované CYP1A1 aktivity (1,2-krát) vzhledem k 3MC indukci jak ve 24, tak ve 48 hodinovém časovém intervalu. Stejně jako samotný DEX také u betametazonu nepozorujeme zvýšenou bazální enzymovou CYP1A1 aktivitu (Obr. 28A).

Metodou Western blot jsme také zkoumali vliv DEX a 3MC na expresi CYP1A1 na proteinové úrovni. Primární kultura lidského trofoblastu byla kultivována po dobu 24 hodin s látkami DEX (50 nM), 3MC (5  $\mu$ M) a DMSO jako kontrolou. Jak je

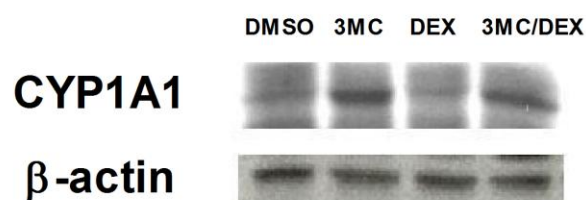


z výsledků patrné (Obr. 28B), exprese CYP1A1 proteinu v kontrolním vzorku (DMSO) byla na velmi nízké úrovni, ale ještě byla dobře stanovitelná a DEX samotný neovlivnil expresi CYP1A1 proteinu. Naproti tomu 3MC indukoval CYP1A1 proteinovou expresi. Přidání DEX k buňkám pak nevedlo k signifikantní změně v expresi CYP1A1 proteinu, jehož exprese byla indukována přítomností 3MC (Obr. 28B).

**A.**



**B.**



**Obr. 28:** (A) Vliv dexametazonu (DEX) a 3-metylcholantrenu (3MC) na EROD aktivitu v kultuře primárního lidského trofoblastu. Primární kultura lidského trofoblastu byla kultivována po dobu 24 a 48 hodin s testovanými látkami DEX (50 nM), 3MC (5 µM) a DMSO jako kontrolou. CYP1A1 aktivita (7-etoxyresorufin-O-deetyláza, EROD) pak byla změřena fluorimetricky. (B) Western blot proteinová analýza CYP1A1 a  $\beta$ -actinu (vnitřní kontrola) z lyzátů primární kultury lidského trofoblastu. Buňky trofoblastu byly kultivovány po dobu 24 hodin s látkami DEX (50 nM), 3MC (5 µM) a DMSO jako kontrolou. K expresi CYP1A1 byla použita primární koží polyklonální protilátka pro CYP1A1 (G-18; Santa Cruz Biotechnology).

Experimenty na CYP1A1 EROD aktivitu ukázaly, že dexametazon je schopný potenciovat aktivitu CYP1A1 enzymu indukovanou AHR ligandem v primární kultuře lidského trofoblastu. Tyto výsledky jsou shodné s dřívější studií na choriokarcinomové buněčné linii BeWo. V této studii byla zaznamenána potenciace  $\beta$ -naftoflavon dependentní indukce EROD aktivity vlivem působení dexametazonu (Avery *et al.* 2003). Zvýšení aktivity v kultuře trofoblastu může být důsledkem vzrůstu CYP1A1 proteinu díky indukci mRNA specifických pro tvorbu tohoto cytochromu. Tato potenciace aktivity glukokortikoidy může mít pak významný vliv na funkci cytochromu *in vivo*, zvláště v projevu toxických reakcí nebo ochraně před toxickými látkami.

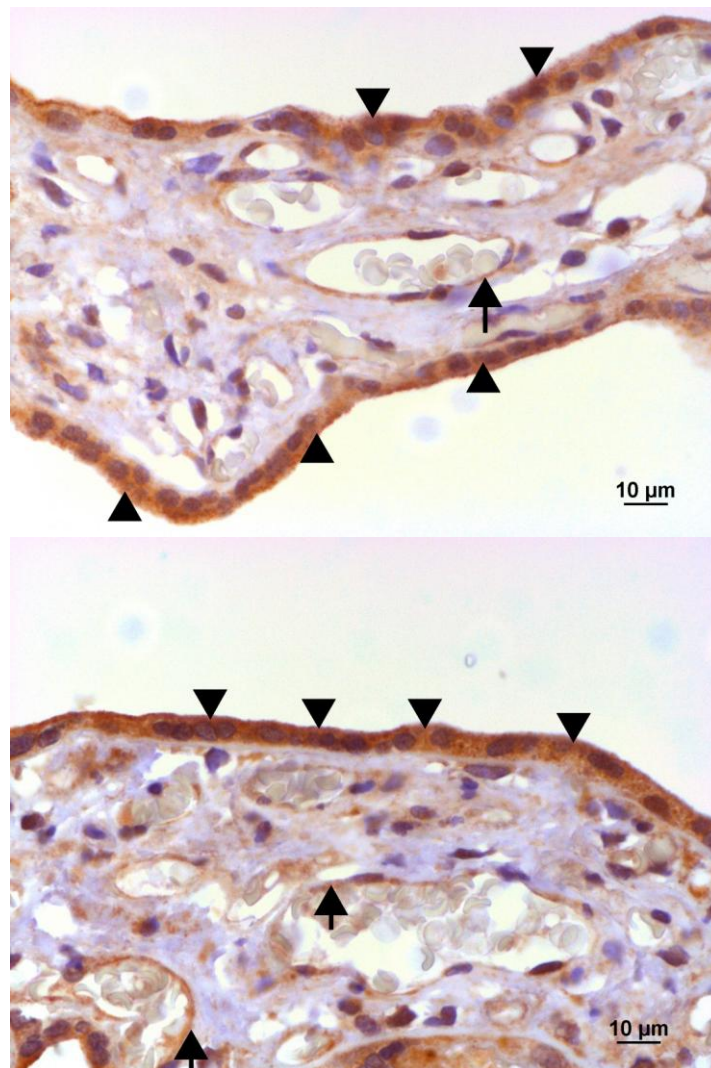
Při studiu EROD aktivity na primární kultuře lidských hepatocytů, která tady odráží aktivitu CYP1A2 a CYP1A1 enzymů, dexametazon způsobil drastické snížení bazální i 3MC závislé indukce EROD aktivity (Vrzal *et al.* 2009). Naproti tomu bazální aktivita u hepatokarcinomové linie HepG2 nebyla dexametazonem ovlivněna. K inhibici zvýšené aktivity vlivem AHR ligandu však dochází i u HepG2 buněk (Dvorak *et al.* 2008, Monostory *et al.* 2005). V potkaních hepatocytech nebo v játrech u potkanů s vyjmutými nadledvinkami došlo vlivem glukokortikoidů (DEX) k potenciaci 3MC/benzantracem dependentní CYP1A1 aktivity (Monostory *et al.* 2005, Prough *et al.* 1989).

Jelikož výsledky EROD aktivity naznačují možnost nárůstu množství CYP1A1 proteinu, metodou Western blot jsme se tedy zaměřili i na proteinovou expresi. Nicméně Western blot analýzou proteinu CYP1A1 jsme zjistili, že výsledek je v nesouladu s aktivitou. 3MC sice indukoval množství CYP1A1 enzymu, ale přítomností dexametazonu nedošlo k jeho potenciaci. Přítomnost dexametazonu neovlivnila expresi indukovaného CYP1A1 proteinu. Rozpor mezi množstvím mRNA, EROD aktivitou a množstvím proteinu může být vysvětlen nejspíš rozdílnými úrovněmi/mechanismy působení dexametazonu, a to třeba na transkripční či posttranslační úrovni.

### **Lokalizace CYP1A1 v lidské placentě**

Kromě studia exprese CYP1A1 na úrovni proteinu a mRNA jsme také zkoumali lokalizaci tohoto proteinu v placentách v době třetího trimestru. Jak můžeme vidět na

obrázku (Obr. 29), CYP1A1 se nachází v placentách třetího trimestru v syncytiotrofoblastu terciálních choriových klků. Navíc pozitivní zbarvení jsme detekovali také v endotelu fetálních kapilár.



**Obr. 29:** Reprezentativní obrázek exprese CYP1A1 v terminální placentě. Exprese CYP1A1 byla detekována v syncytiotrofoblastu terciálních choriových klků (konce šipek) a také v některých fetálních kapilárách (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 400x.

Námi zjištěná lokalizace CYP1A1 proteinu v syncytiotrofoblastu je shodná s dřívější imunohistochemickou studií, ve které Collier se svými kolegy pozoroval pozitivní zbarvení CYP1A proteinu v syncytiu choriových klků v placentách získaných z prvního trimestru. Dále v těchto placentách nepozorovali signifikantní pozitivní zbarvení ve fetálním endotelu a mezenchymu v choriovém klku (Collier *et al.* 2002b). Sanyal a Li zjistili, že cigaretový kouř signifikantně zvýšil intenzitu zbarvení CYP1A1 proteinu v syncytiotrofoblastu v době třetího trimestru jen v některých placentách. V řadě dalších placent ale nebyl vliv cigaretového kouře na CYP1A1 indukci pozorován (Sanyal and Li 2007). Přítomnost CYP1A1 v syncytiu placenty, který představuje fyziologickou a metabolickou bariéru, ukazuje na jeho významnou roli v metabolismu látek, kterým je matka vystavena v době těhotenství.

## 8 Závěr

Tato disertační práce shrnuje v teoretické části současný stav studované problematiky. Je zde popsána funkce placenty, možné placentární modely, placentární transportéry a xenobiotické enzymy placenty, charakteristika CYP1 rodiny enzymů. Jedna kapitola je věnována cytochromu CYP1A1 a další arylhydrokarbonovému receptoru. Část výsledky a diskuze je pak rozdělena na dvě hlavní témata. První část se zabývá expresí AHR a ARNT v lidské a potkaní placentě a také jejich transkripční aktivitou v primární kultuře lidského trofoblastu. Druhá část se zabývá vlivem glukokortikoidů na indukci CYP1A1 enzymu a dalších cílových genů regulovaných AHR receptorem v placentární bariéře.

Placenta je nejdůležitější společný orgán mezi matkou a plodem. Během těhotenství zajišťuje nejen výměnu dýchacích plynů, ale také výměnu potřebných živin, vitamínů, cukrů, aminokyselin, stopových prvků a odpadních látek. Nezanedbatelná je také její role endokrinní, metabolická a ochranná. Významnou roli v ochraně plodu pak hraje vrstva syncytiotrofoblastu, která funguje nejen jako mechanická, ale i jako metabolická bariéra díky expresi biotransformačních enzymů a transportérů. Na regulaci exprese těchto enzymů a transportérů se podílejí některé nukleární receptory a transkripční faktory, které jsou rovněž exprimované v syncytiotrofoblastu. Hladina jednotlivých enzymů kolísá v průběhu těhotenství a většina z nich byla detekována na velmi nízké mRNA úrovni. V některých případech nebyla dokonce zjištěna významná hladina proteinu, ani jejich enzymová aktivita.

K významným placentárním enzymům patří cytochrom CYP1A1, jehož signifikantní aktivita byla zjištěna po celou dobu těhotenství. Na jedné straně tento cytochrom metabolizuje endogenní a exogenní látky na méně aktivní metabolity, na druhé hraje významnou roli v iniciaci karcinogeneze prostřednictvím tvorby vysoce reaktivních metabolitů, které mohou způsobit četné mutace. Řada látek (polycyklické aromatické hydrokarbony, halogenované aromatické hydrokarbony) přítomných v cigaretovém kouři a v životním prostředí představuje často substráty tohoto cytochromu, ale hlavně jsou to látky, které vazbou na arylhydrokarbonový receptor indukují transkripční aktivitu tohoto enzymu. Navíc se zjistilo, že právě exprese a aktivita placentárního CYP1A1 je silně indukována u matek kuřáček.

Tato disertační práce je zaměřená na arylhydrokarbonový receptor a vliv ligandů tohoto receptoru na cytochrom CYP1A1 a možný cross-talk s glukokortikoidním receptorem. První část disertační práce se komplexně věnuje transkripční aktivitě AHR v lidském primárním trofoblastu v regulaci svých cílových genů CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP, které se podílejí na metabolismu a transportu mnoha exogenních a endogenních látek. Ukázali jsme, že jenom CYP1A1 mRNA, ale ne CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP, AHR, ARNT a AHRR mRNA je signifikantně indukována v lidské primární kultuře trofoblastu, izolovaného z placent získaných v době porodu při působení modelových AHR ligandů. Také jsme poprvé popsali placentární lokalizaci lidského AHR a ARNT v prvním trimestru a v třetím trimestru v době porodu, které jsou přítomny především v prvním a třetím trimestru v syncytiotrofoblastu, který tvoří tzv. placentární bariéru. Potkaní Ahr a Arnt proteiny byly také převážně lokalizovány v placentárním trofoblastu a dosahovaly maximální exprese během 15. a 21. dne březosti potkana, což může mít vliv na rozdílnou indukci placentárního Cyp1a1 při působení Ahr ligandů během potkaní březosti.

Druhá část disertační práce se věnuje účinkům glukokortikoidů na expresi a indukci CYP1A1 a dalších AHR cílových genů zprostředkovanou ligandem 3MC v primární kultuře lidského trofoblastu. Glukokortikoidy jsou steroidní hormony nezbytné pro vývoj a zrání fetálních orgánů a transplacentární podávání glukokortikoidů před 35. týdnem těhotenství zaujímá významné místo v perinatologii. Podávají se ženám, kterým hrozí předčasný porod dítěte s nevyvinutými plícemi a s rizikem syndromu respirační tísně. Jejich včasné podání pak dokáže vývoj plic urychlit a zvýšit tak novorozenci šanci na přežití. Glukokortikoidy jsou navíc také součástí farmakoterapie v léčbě ekzémů (topické podání), léčbě astmatu (inhalace) a autoimunních onemocnění (systémové podání). V této části disertační práce jsme ukázali, že samotné glukokortikoidy nezpůsobily signifikantní změny v expresi mRNA jak u CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 a BCRP, tak u AHR, ARNT a AHRR. Samotný dexametazon také neovlivnil proteinovou expresi CYP1A1, ani EROD CYP1A1 aktivitu. Ukázali jsme, že jenom indukce CYP1A1 mRNA závislá na 3MC, ale nikoli indukce CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP, AHR, ARNT a AHRR mRNA je signifikantně potenciována vlivem glukokortikoidů v primární kultuře lidských trofoblastů izolovaných z placent získaných v době porodu. Mohli jsme také pozorovat, že enzymová CYP1A1 aktivita indukovaná vlivem 3MC byla působením

glukokortikoidů zvýšená. Překvapivě, exprese CYP1A1 indukovaného proteinu nebyla ovlivněna přítomností dexametazonu. Také jsme popsali placentární lokalizaci lidského CYP1A1 proteinu, který je přítomen v době porodu v placentárním syncytiu, který tvoří placentární bariéru.

Závěrem lze říci, že jsme poprvé popsali expresi, lokalizaci, funkci AHR/Ahr a ARNT/Arnt a systematicky charakterizovali indukci hlavních placentárních AHR cílových genů (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, BCRP) v lidském placentárním trofoblastu, který tvoří maternofetální bariéru. Výsledky tak podporují představu, že placentární bariéra není jenom fyziologická bariéra, ale také místo metabolismu mezi plodem a matkou jak u lidí, tak u potkanů. Navíc jsme i popsali glukokortikoidy zprostředkovanou potenciaci indukovaného CYP1A1. Při relativně častém podávání glukokortikoidů v těhotenství a také intenzivní expozici těhotných žen cigaretovému kouři a environmentálním kontaminantům mohou naše data poskytnout nové důležité náhlednutí (porozumění) do farmakoterapie glukokortikoidy u těhotných žen.

## 9 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

### PRVNÍ AUTOR

- P1) **Stejskalova L**, Vecerova L, Perez L. M., Vrzal R., Dvorak Z., Nachtigal P., and Pavek P. (2011). Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicol. Sci.*, 2011, vol. 123, p. 26-36. **(IF 5,093)**
- P2) **Stejskalova L.**, Dvorak Z., and Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr. Drug Metab.*, 2011, vol. 12, no. 2, p. 198-212. **(IF 3,896)**
- P3) **Stejskalova L.**, and Pavek P. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, vol. 12, no. 5, p. 715-730. **(IF 3,455)**

### SPOLUAUTOR

- S1) Krausova L, **Stejskalova L**, Wang H, Vrzal R, Dvorak Z, Mani S, Pavek P. Metformin suppresses pregnane X receptor (PXR)-regulated transactivation of CYP3A4 gene. *Biochem. Pharmacol.*, 2011, vol. 2, p. 1771-1780. **(IF 4,889)**
- S2) Pavek P, Pospeschova K, Svecova L, Syrova Z, **Stejskalova L**, Blazkova J, Dvorak Z, Blahos J. Intestinal cell-specific vitamin D receptor (VDR)-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 gene. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, vol. 79, p. 277-287. **(IF 4,889)**



- S3) Pospeschova K, Rozehnal V, **Stejskalova L**, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmund W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V, Pavek P. Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2009, vol. 299, p. 178-187. (IF 4,119)
- S4) Vrzal R, **Stejskalova L**, Monostory K, Maurel P, Bachleda P, Pavek P, Dvorak Z. Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 2009, vol. 179, p. 288-296. (IF 2,457)

#### POSTEROVÉ PREZENTACE A ABSTRAKTY PUBLIKOVANÉ VE SBORNÍCÍCH

- 1) **Stejskalova L**, Vecerova L., Vrzal R., Dvorak Z., Nachtigal P., Pavek P. *AHR and ARNT expression in the human and rat placentas and their transcription activity in human trophoblast cultures in transactivation AHR battery genes.* EUROTOX 2011 (47th Congress of the European Societies of Toxicology), 28.-31. srpen 2011, Francie, Paříž
- 2) Bitman M., Dvorak Z., Vrzal R., **Stejskalova L.**, Pavek P. *The cross-talk of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and pregnane X receptor (PXR) and its effect on expression of CYP3A4 and MDR1 genes in primary human hepatocytes and hepatoma cell lines,* EUROTOX 2011(47th Congress of the European Societies of Toxicology), 28.-31. srpen 2011, Francie, Paříž
- 3) **Stejskalova L.**, Pavek P. *AHR transcription activity in induction of its target genes by prototype AHR ligands in human placental trophoblast culture,* 61. Farmakologické dny a EPHAR symposium, 14.-16. září 2011, Brno
- 4) Bitman M., **Stejskalova L.**, Dvorak Z., Vrzal R., Pavek P. *The cross-talk of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and pregnane X receptor (PXR) and their effect on expression of CYP3A4 and MDR1 genes in primary*

*human hepatocytes and hepatoma cell lines*, 61. Farmakologické dny a EPHAR symposium, 14.-16. září 2011, Brno

- 5) **Stejskalova L**, Vecerova L., Perez L.M., Hahnova L., Nachtigal P., Vrzal R., Dvorak Z., Pavek P. *Activity of Aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the placental trophoblast and expression of AHR and its translocator ARNT expression in rat and human placentas during pregnancy*, 9th International ISSX Meeting, 4.-8. září 2010, Turecko, Istanbul
- 6) Bitman M., Vrzal R., Dvorak Z., **Stejskalova L.**, Pavek P. *The influence of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) on pregnane X receptor (PXR)-mediated expression of CYP3A4 and MDR1 genes in hepatocellular carcinoma cell lines and in primary human hepatocytes*, 9th International ISSX Meeting, 4.-8. září 2010, Turecko, Istanbul
- 7) **Stejskalova L**, Vecerova L., Perez L.M., Hahnova L., Nachtigal P., Vrzal R., Dvorak Z., Pavek P. *Expression of placental aryl hydrocarbon receptor Ahr and its translocator Arnt during rat gestation*, 60. Farmakologické dny, 15.-17. září 2010, Hradec Králové
- 8) **Stejskalova L**, Pospeschova K., Svecova L., Vrzal R., Dvorak Z., Pavek P. *Glucocorticoids repress induction of CYP1A1 gene mediated by aryl hydrocarbon receptor (AHR) ligands 3-methylcholanthrene (3MC) or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in placental JEG-3 cell line*, IFPA Meeting, 6.-9. října 2009, Austrálie, Adelaide
- 9) Bitman M, Vrzal R, Pospeschova K, Svecova L, **Stejskalova L**, Dvorak Z, Pavek P. *Effect of valproic acid on extracellular mitogen-activated protein kinases (ERK) pathway and major transcriptional factors in hepatoma cell lines and primary human hepatocytes*. ISSX Meeting, 17.-20. květen 2009, Portugalsko, Lisabon
- 10) Bitman M, **Stejskalova L**, Pospeschova K, Svecova L, Vrzal R, Cerveny L, Dvorak Z, Pavek P. *Role of extracellular-signal regulated kinase (ERK) pathway in PXR-mediated valproic acid-induced activation of CYP3A4 expression*. 58. Farmakologické dny, 3.-5. září 2008, Praha.

- 11) Pavek P, Pospachova 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.* RNA Club ÚMG AV ČR, 28. listopadu 2008, Praha
- 12) **Stejskalova L**, Pospachova K, Svecova L, Bitman M, Dvorak Z, Pavek P. *Evidence of cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor in placental trophoblast JEG-3 cells.* 58. Farmakologické dny, 3.-5. září 2008, Praha

## **10 Seznam použité literatury**

- ABELLAR R. G., PEPPERELL J. R., GRECO D., GUNDOGAN F., KOSTADINOV S., SCHWARTZ J., TANTRAVAHU U., DE PAEPE M. E. Effects of chemotherapy during pregnancy on the placenta. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2009, vol. 12, no. 1, p. 35-41.
- ADACHI J., MORI Y., MATSUI S., TAKIGAMI H., FUJINO J., KITAGAWA H., MILLER C. A., 3RD, KATO T., SAEKI K., MATSUDA T. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 34, p. 31475-31478.
- AL-NASIRY S., SPITZ B., HANSSSENS M., LUYTEN C., PIJNENBORG R. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.*, 2006, vol. 21, no. 1, p. 193-201.
- ALL REFER. COM HEALTH [online]. Poslední revize 2011-11-23 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://health.allrefer.com/health/placenta-abruptio-anatomy-of-a-normal-placenta.html>
- AMAKURA Y., TSUTSUMI T., NAKAMURA M., KITAGAWA H., FUJINO J., SASAKI K., TOYODA M., YOSHIDA T., MAITANI T. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, vol. 26, no. 4, p. 532-539.
- ANDROUTSOPOULOS V. P., TSATSAKIS A. M., SPANDIDOS D. A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 2009, vol. 9, p. 187.
- ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVA E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, vol. 58, no. 5-6, p. 737-747.
- AVERY M. L., MEEK C. E., AUDUS K. L. The presence of inducible cytochrome P450 types 1A1 and 1A2 in the BeWo cell line. *Placenta*, 2003, vol. 24, no. 1, p. 45-52.
- BABA T., MIMURA J., GRADIN K., KUROIWA A., WATANABE T., MATSUDA Y., INAZAWA J., SOGAWA K., FUJII-KURIYAMA Y. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 35, p. 33101-33110.
- BALAT O., BALAT A., UGUR M. G., PENCE S. The effect of smoking and caffeine on the fetus and placenta in pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2003, vol. 30, no. 1, p. 57-59.

- BALLARD P. L., BALLARD R. A. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1995, vol. 173, no. 1, p. 254-262.
- BENNETT P., RAMSDEN D. B., WILLIAMS A. C. Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Clin. Mol. Pathol.*, 1996, vol. 49, no. 1, p. M12-M16.
- BODEN A. G., BUSH P. G., BURKE M. D., ABRAMOVICH D. R., AGGETT P., MAYHEW T. M., PAGE K. R. Human placental cytochrome P450 and quinone reductase enzyme induction in relation to maternal smoking. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, vol. 7, no. 6, p. 1521-1524.
- BONZO J. A., CHEN S., GALIJATOVIC A., TUKEY R. H. Arsenite inhibition of CYP1A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is independent of cell cycle arrest. *Mol. Pharmacol.*, 2005, vol. 67, no. 4, p. 1247-1256.
- BRAKE P. B., ZHANG L., JEFCOATE C. R. Aryl hydrocarbon receptor regulation of cytochrome P4501B1 in rat mammary fibroblasts: evidence for transcriptional repression by glucocorticoids. *Mol. Pharmacol.*, 1998, vol. 54, no. 5, p. 825-833.
- BRUCHOVA H., VASIKOVA A., MERKEROVA M., MILCOVA A., TOPINKA J., BALASCAK I., PASTORKOVA A., SRAM R. J., BRDICKA R. Effect of maternal tobacco smoke exposure on the placental transcriptome. *Placenta*, 2010, vol. 31, no. 3, p. 186-191.
- BURTON P. J., WADDELL B. J. Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol. Reprod.*, 1999, vol. 60, no. 2, p. 234-240.
- CARVER L. A., HOGENESCH J. B., BRADFIELD C. A. Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 1994, vol. 22, no. 15, p. 3038-3044.
- CARVER L. A., LAPRES J. J., JAIN S., DUNHAM E. E., BRADFIELD C. A. Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 50, p. 33580-33587.
- CAVALIERI E., FRENKEL K., LIEHR J. G., ROGAN E., ROY D. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs*, 2000, no. 27, p. 75-93.

- CECKOVA-NOVOTNA M., PAVEK P., STAUD F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod. Toxicol.*, 2006, vol. 22, no. 3, p. 400-410.
- CECKOVA M., LIBRA A., PAVEK P., NACHTIGAL P., BRABEC M., FUCHS R., STAUD F. Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2006, vol. 33, no. 1-2, p. 58-65.
- COLLIER A. C., GANLEY N. A., TINGLE M. D., BLUMENSTEIN M., MARVIN K. W., PAXTON J. W., MITCHELL M. D., KEELAN J. A. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem. Pharmacol.*, 2002a, vol. 63, no. 3, p. 409-419.
- COLLIER A. C., TINGLE M. D., PAXTON J. W., MITCHELL M. D., KEELAN J. A. Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Hum. Reprod.*, 2002b, vol. 17, no. 10, p. 2564-2572.
- CORCHERO J., PIMPRALE S., KIMURA S., GONZALEZ F. J. Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*, 2001, vol. 11, no. 1, p. 1-6.
- CORNELL UNIVERSITY, BIOG 1105-1106 [online]. Poslední revize 2011 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit8/ovaryplacenta.html>
- COUMAILLEAU P., POELLINGER L., GUSTAFSSON J. A., WHITELAW M. L. Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, no. 42, p. 25291-25300.
- COUMOUL X., DIRY M., ROBILLOT C., BAROUKI R. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 10, p. 3942-3948.
- CREWS S. T. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.*, 1998, vol. 12, no. 5, p. 607-620.
- CROFTS F. G., SUTTER T. R., STRICKLAND P. T. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis*, 1998, vol. 19, no. 11, p. 1969-1973.

- CURI-PEDROSA R., DAUJAT M., PICHARD L., OURLIN J. C., CLAIR P., GERVOT L., LESCA P., DOMERGUE J., JOYEUX H., FOURTANIER G., ET AL. Omeprazole and lansoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994, vol. 269, no. 1, p. 384-392.
- CZEKAJ P., WIADERKIEWICZ A., FLOREK E., WIADERKIEWICZ R. Tobacco smoke-dependent changes in cytochrome P450 1A1, 1A2, and 2E1 protein expressions in fetuses, newborns, pregnant rats, and human placenta. *Arch. Toxicol.*, 2005, vol. 79, no. 1, p. 13-24.
- CYANANGEN [online]. Poslední revize 2011 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z [http://www.cyanagen.it/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2&Itemid=144](http://www.cyanagen.it/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=144)
- DAVARINOS N. A., POLLENZ R. S. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 40, p. 28708-28715.
- DELESCLUSE C., LEDIRAC N., DE SOUSA G., PRALAVORIO M., BOTTA-FRIDLUND D., LETREUT Y., RAHMANI R. Comparative study of CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene in various human hepatic and epidermal cell types. *Toxicol In Vitro*, 1997, vol. 11, no. 5, p. 443-450.
- DENISON M. S., PANDINI A., NAGY S. R., BALDWIN E. P., BONATI L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.*, 2002, vol. 141, no. 1-2, p. 3-24.
- DESCORNET D.G., WOMEN HEALTH INFO [online]. Poslední revize 2011 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.women-health-info.com/445-Pregnancy-late-bleeding.html>
- DESFORGES M., SIBLEY C. P. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, vol. 54, no. 2-3, p. 377-390.
- DIANI-MOORE S., LABITZKE E., BROWN R., GARVIN A., WONG L., RIFKIND A. B. Sunlight generates multiple tryptophan photoproducts eliciting high efficacy CYP1A induction in chick hepatocytes and in vivo. *Toxicol. Sci.*, 2006, vol. 90, no. 1, p. 96-110.
- DNA SEQUENCING [online]. Poslední revize 2010-09-25 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.dnassequencing.com/tag/real-time-pcr-machine/>



- DOLWICK K. M., SCHMIDT J. V., CARVER L. A., SWANSON H. I., BRADFIELD C. A. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.*, 1993, vol. 44, no. 5, p. 911-917.
- DON M. J., LEWIS D. F., WANG S. Y., TSAI M. W., UENG Y. F. Effect of structural modification on the inhibitory selectivity of rutaecarpine derivatives on human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, vol. 13, no. 15, p. 2535-2538.
- DOSHI M., MARCUS C., BEJJANI B. A., EDWARD D. P. Immunolocalization of CYP1B1 in normal, human, fetal and adult eyes. *Exp. Eye Res.*, 2006, vol. 82, no. 1, p. 24-32.
- DOYLE L. A., YANG W., ABRUZZO L. V., KROGMANN T., GAO Y., RISHI A. K., ROSS D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, vol. 95, no. 26, p. 15665-15670.
- DRAGIN N., DALTON T. P., MILLER M. L., SHERTZER H. G., NEBERT D. W. For dioxin-induced birth defects, mouse or human CYP1A2 in maternal liver protects whereas mouse CYP1A1 and CYP1B1 are inconsequential. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 27, p. 18591-18600.
- DVORAK Z., VRZAL R., PAVEK P., ULRICHOVA J. An evidence for regulatory cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor in HepG2 cells. *Physiol Res*, 2008, vol. 57, no. 3, p. 427-435.
- EBERT B., SEIDEL A., LAMPEN A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, no. 10, p. 1754-1763.
- EE P. L., KAMALAKARAN S., TONETTI D., HE X., ROSS D. D., BECK W. T. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, no. 4, p. 1247-1251.
- ELFERINK C. J., GE N. L., LEVINE A. Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. *Mol. Pharmacol.*, 2001, vol. 59, no. 4, p. 664-673.
- ELIZONDO G., FERNANDEZ-SALGUERO P., SHEIKH M. S., KIM G. Y., FORNACE A. J., LEE K. S., GONZALEZ F. J. Altered cell cycle control at the

- G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol. Pharmacol.*, 2000, vol. 57, no. 5, p. 1056-1063.
- ENDERS A. C., BLANKENSHIP T. N. Comparative placental structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 38, no. 1, p. 3-15.
- FERNANDEZ-SALGUERO P., PINEAU T., HILBERT D. M., MCPHAIL T., LEE S. S., KIMURA S., NEBERT D. W., RUDIKOFF S., WARD J. M., GONZALEZ F. J. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, 1995, vol. 268, no. 5211, p. 722-726.
- FUJII-KURIYAMA Y., KAWAJIRI K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, 2010, vol. 86, no. 1, p. 40-53.
- FUJII-KURIYAMA Y., MIMURA J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 338, no. 1, p. 311-317.
- FUJITA K., KAMATAKI T. Predicting the mutagenicity of tobacco-related N-nitrosamines in humans using 11 strains of *Salmonella typhimurium* YG7108, each coexpressing a form of human cytochrome P450 along with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2001, vol. 38, no. 4, p. 339-346.
- GALLAGHER J. E., EVERSON R. B., LEWTAS J., GEORGE M., LUCIER G. W. Comparison of DNA adduct levels in human placenta from polychlorinated biphenyl exposed women and smokers in which CYP 1A1 levels are similarly elevated. *Teratog., Carcinog. Mutagen.*, 1994, vol. 14, no. 4, p. 183-192.
- GANAPATHY V., PRASAD P. D., GANAPATHY M. E., LEIBACH F. H. Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, vol 294, p 413-420.
- GASIEWICZ T. A., HENRY E. C., COLLINS L. L. Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2008, vol. 18, no. 4, p. 279-321.
- GENE CARDS [online]. Poslední revize 2011-09-15 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=cyp1a1>
- GRADIN K., MCGUIRE J., WENGER R. H., KVIETIKOVA I., FHITELAW M. L., TOFTGARD R., TORA L., GASSMANN M., POELLINGER L. Functional

- interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, no. 10, p. 5221-5231.
- GRANVIL C. P., KRAUSZ K. W., GELBOIN H. V., IDLE J. R., GONZALEZ F. J. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, vol. 301, no. 3, p. 1025-1032.
- GRUBE M., REUTHER S., MEYER ZU SCHWABEDISSEN H., KOCK K., DRABER K., RITTER C. A., FUSCH C., JEDLITSCHKY G., KROEMER H. K. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab. Dispos.*, 2007, vol. 35, no. 1, p. 30-35.
- GUENGERICH F. P. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2007, vol. 21, no. 4, p. 163-168.
- HAKKOLA J., PASANEN M., HUKKANEN J., PELKONEN O., MAENPAA J., EDWARDS R. J., BOOBIS A. R., RAUNIO H. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem. Pharmacol.*, 1996a, vol. 51, no. 4, p. 403-411.
- HAKKOLA J., PASANEN M., PELKONEN O., HUKKANEN J., EVISALMI S., ANTTILA S., RANE A., MANTYLA M., PURKUNEN R., SAARIKOSKI S., TOOMING M., RAUNIO H. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, no. 2, p. 391-397.
- HAKKOLA J., RAUNIO H., PURKUNEN R., PELKONEN O., SAARIKOSKI S., CRESTEIL T., PASANEN M. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem. Pharmacol.*, 1996b, vol. 52, no. 2, p. 379-383.
- HALLMAN M., PELTONIEMI O., KARI M. A. Enhancing functional maturity before preterm birth. *Neonatology*, 2010, vol. 97, no. 4, p. 373-378.
- HANKINSON O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1995, vol. 35, no., p. 307-340.

- HARITASH A. K., KAUSHIK C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.*, 2009, vol. 169, no. 1-3, p 1-15.
- HARPER P. A., RIDDICK D. S., OKEY A. B. Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, vol. 72, no. 3, p. 267-279.
- HAYES K. R., ZASTROW G. M., NUKAYA M., PANDE K., GLOVER E., MAUFORT J. P., LISS A. L., LIU Y., MORAN S. M., VOLLRATH A. L., BRADFIELD C. A. Hepatic transcriptional networks induced by exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, vol. 20, no. 11, p. 1573-1581.
- HEATH-PAGLIUSO S., ROGERS W. J., TULLIS K., SEIDEL S. D., CENIJN P. H., BROUWER A., DENISON M. S. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, no. 33, p. 11508-11515.
- HUSBECK B., POWIS G. The redox protein thioredoxin-1 regulates the constitutive and inducible expression of the estrogen metabolizing cytochromes P450 1B1 and 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23, no. 10, p. 1625-1630.
- HUUSKONEN P., STORVIK M., REINISALO M., HONKAKOSKI P., RYSA J., HAKKOLA J., PASANEN M. Microarray analysis of the global alterations in the gene expression in the placentas from cigarette-smoking mothers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2008, vol. 83, no. 4, p. 542-550.
- CHUN Y. J., KIM M. Y., GUENGERICH F. P. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 262, no. 1, p. 20-24.
- CHUN Y. J., RYU S. Y., JEONG T. C., KIM M. Y. Mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A1 by rhapontigenin. *Drug Metab. Dispos.*, 2001, vol. 29, no. 4 Pt 1, p. 389-393.
- IETTA F., WU Y., WINTER J., XU J., WANG J., POST M., CANIGGIA I. Dynamic HIF1A regulation during human placental development. *Biol. Reprod.*, 2006, vol. 75, no. 1, p. 112-121.
- IKEYA K., JAISWAL A. K., OWENS R. A., JONES J. E., NEBERT D. W., KIMURA S. Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and

- rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol. Endocrinol.*, 1989, vol. 3, no. 9, p. 1399-1408.
- ISHIMURA R., KAWAKAMI T., OHSAKO S., TOHYAMA C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, vol. 77, no. 4, p. 660-669.
- JERNSTROM B., GRASLUND A. Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys. Chem.*, 1994, vol. 49, no. 3, p. 185-199.
- JIANG Y. Z., WANG K., FANG R., ZHENG J. Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 2010, vol. 58, no. 8, p. 679-685.
- JINNO A., MARUYAMA Y., ISHIZUKA M., KAZUSAKA A., NAKAMURA A., FUJITA S. Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2006, vol. 98, no. 1, p. 48-55.
- JOHNSON B., BROOKS B. A., HEINZMANN C., DIEP A., MOHANDAS T., SPARKES R. S., REYES H., HOFFMAN E., LANGE E., GATTI R. A., ET AL. The Ah receptor nuclear translocator gene (ARNT) is located on q21 of human chromosome 1 and on mouse chromosome 3 near Cf-3. *Genomics*, 1993, vol. 17, no. 3, p. 592-598.
- JONES S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.*, 2004, vol. 5, no. 6, p. 226.
- JUCHAU M. R. Human placental hydroxylation of 3,4-benzpyrene during early gestation and at term. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1971, vol. 18, no. 3, p. 665-675.
- KAELIN A. C., CUMMINGS A. J. A survey of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human placental homogenates. *Placenta*, 1983, vol. 4 Spec No, p. 471-478.
- KATIYAR S. K., MATSUI M. S., MUKHTAR H. Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, vol. 114, no. 2, p. 328-333.
- KAWAJIRI K., WATANABE J., EGUCHI H., NAKACHI K., KIYOHARA C., HAYASHI S. Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. *Pharmacogenetics*, 1995, vol. 5, no. 3, p. 151-158.

- KAWAKAMI T., ISHIMURA R., NOHARA K., TAKEDA K., TOHYAMA C., OHSAKO S. Differential susceptibilities of Holtzman and Sprague-Dawley rats to fetal death and placental dysfunction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) despite the identical primary structure of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006, vol. 212, no. 3, p. 224-236.
- KLIMAN H. J., NESTLER J. E., SERMASI E., SANGER J. M., STRAUSS J. F., 3RD. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 1986, vol. 118, no. 4, p. 1567-1582.
- KOHLER P. O., BRIDSON W. E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, vol. 32, no. 5, p. 683-687.
- KRISHNAMURTHY P., ROSS D. D., NAKANISHI T., BAILEY-DELL K., ZHOU S., MERCER K. E., SARKADI B., SORRENTINO B. P., SCHUETZ J. D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 23, p. 24218-24225.
- LA ROCCA C., MANTOVANI A. From environment to food: the case of PCB. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 2006, vol. 42, no. 4, p. 410-416.
- LAGUEUX J., PEREG D., AYOTTE P., DEWAILLY E., POIRIER G. G. Cytochrome P450 CYP1A1 enzyme activity and DNA adducts in placenta of women environmentally exposed to organochlorines. *Environ. Res.*, 1999, vol. 80, no. 4, p. 369-382.
- LAHVIS G. P., BRADFIELD C. A. Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem. Pharmacol.*, 1998, vol. 56, no. 7, p. 781-787.
- LAHVIS G. P., LINDELL S. L., THOMAS R. S., MCCUSKEY R. S., MURPHY C., GLOVER E., BENTZ M., SOUTHARD J., BRADFIELD C. A. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, vol. 97, no. 19, p. 10442-10447.
- LAI K. P., WONG M. H., WONG C. K. Modulation of AhR-mediated CYP1A1 mRNA and EROD activities by 17beta-estradiol and dexamethasone in TCDD-induced H411E cells. *Toxicol. Sci.*, 2004, vol. 78, no. 1, p. 41-49.
- LAUTRAITE S., MUSONDA A. C., DOEHMER J., EDWARDS G. O., CHIPMAN J. K. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 2002, vol. 17, no. 1, p. 45-53.

- LEE M. J., WANG Z., YEE H., MA Y., SWENSON N., YANG L., KADNER S. S., BAERGEN R. N., LOGAN S. K., GARABEDIAN M. J., GULLER S. Expression and regulation of glucocorticoid receptor in human placental villous fibroblasts. *Endocrinology*, 2005, vol. 146, no. 11, p. 4619-4626.
- LEES M. J., WHITELAW M. L. Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, vol. 19, no. 8, p. 5811-5822.
- LI J., ZHAO M., HE P., HIDALGO M., BAKER S. D. Differential metabolism of gefitinib and erlotinib by human cytochrome P450 enzymes. *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, no. 12, p. 3731-3737.
- LI W., DONAT S., DOHR O., UNFRIED K., ABEL J. Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, vol. 315, no. 2, p. 279-284.
- LUCIER G. W., SUNAHARA G. I., WONG T. K. Placental markers of human exposure to polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls: implications for risk assessment. *IARC Sci Publ*, 1990, no. 104, p. 55-62.
- MA Q., LU A. Y. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab. Dispos.*, 2007, vol. 35, no. 7, p. 1009-1016.
- MA Q., WHITLOCK J. P., JR. The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, no. 5, p. 2144-2150.
- MA Q., WHITLOCK J. P., JR. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 14, p. 8878-8884.
- MACKENZIE P. I., OWENS I. S., BURCHELL B., BOCK K. W., BAIROCH A., BELANGER A., FOURNEL-GIGLEUX S., GREEN M., HUM D. W., IYANAGI T., LANCET D., LOUISOT P., MAGDALOU J., CHOWDHURY J. R., RITTER J. K., SCHACHTER H., TEPHLY T. R., TIPTON K. F., NEBERT D. W. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended

- nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 1997, vol. 7, no. 4, p. 255-269.
- MALTEPE E., SCHMIDT J. V., BAUNOCH D., BRADFIELD C. A., SIMON M. C. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 1997, vol. 386, no. 6623, p. 403-407.
- MANCHESTER D. K., GORDON S. K., GOLAS C. L., ROBERTS E. A., OKEY A. B. Ah receptor in human placenta: stabilization by molybdate and characterization of binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3-methylcholanthrene, and benzo(a)pyrene. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, no. 18, p. 4861-4868.
- MEHNDIRATTA S., SUNEJA A., GUPTA B., BHATT S. Fetotoxicity of warfarin anticoagulation. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2010, vol. 282, p. 335-337.
- MEYER B. K., PRAY-GRANT M. G., VANDEN HEUVEL J. P., PERDEW G. H. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, vol. 18, no. 2, p. 978-988.
- MEYER ZU SCHWABEDISSEN H. E., GRUBE M., DREISBACH A., JEDLITSCHKY G., MEISSNER K., LINNEMANN K., FUSCH C., RITTER C. A., VOLKER U., KROEMER H. K. Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). *Drug Metab. Dispos.*, 2006, vol. 34, no. 4, p. 524-533.
- MEYER ZU SCHWABEDISSEN H. E., GRUBE M., HEYDRICH B., LINNEMANN K., FUSCH C., KROEMER H. K., JEDLITSCHKY G. 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.*, 2005, vol. 166, no. 1, p. 39-48.
- MICKA J., MILATOVICH A., MENON A., GRABOWSKI G. A., PUGA A., NEBERT D. W. Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics*, 1997, vol. 7, no. 2, p. 95-101.
- MILLER C. A., 3RD. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 52, p. 32824-32829.



- MIMURA J., EMA M., SOGAWA K., FUJII-KURIYAMA Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.*, 1999, vol. 13, no. 1, p. 20-25.
- MIMURA J., FUJII-KURIYAMA Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1619, no. 3, p. 263-268.
- MIMURA J., YAMASHITA K., NAKAMURA K., MORITA M., TAKAGI T. N., NAKAO K., EMA M., SOGAWA K., YASUDA M., KATSUKI M., FUJII-KURIYAMA Y. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells*, 1997, vol. 2, no. 10, p. 645-654.
- MONOSTORY K., KOHALMY K., PROUGH R. A., KOBORI L., VERECZKEY L. The effect of synthetic glucocorticoid, dexamethasone on CYP1A1 inducibility in adult rat and human hepatocytes. *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579, no. 1, p. 229-235.
- MONOSTORY K., PASCUSI J. M., KOBORI L., DVORAK Z. Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab. Rev.*, 2009, vol. 41, no. 4, p. 547-572.
- MURPHY V. E., FITTOCK R. J., ZARZYCKI P. K., DELAHUNTY M. M., SMITH R., CLIFTON V. L. Metabolism of synthetic steroids by the human placenta. *Placenta*, 2007, vol. 28, no. 1, p. 39-46.
- MYLLYNEN P., PASANEN M., PELKONEN O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*, 2005, vol. 26, no. 5, p. 361-371.
- MYLLYNEN P., PASANEN M., VAHAKANGAS K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007, vol. 3, no. 3, p. 331-346.
- NEBERT D. W., DALTON T. P., OKEY A. B., GONZALEZ F. J. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 23, p. 23847-23850.
- NEVE E. P., INGELMAN-SUNDBERG M. Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Anal Bioanal Chem*, 2008, vol. 392, no. 6, p. 1075-1084.
- NGUYEN L. P., BRADFIELD C. A. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, vol. 21, no. 1, p. 102-116.

- NI Z., BIKADI Z., ROSENBERG M. F., MAO Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab.*, 2010, vol. 11, no. 7, p. 603-617.
- NI Z., MAO Q. ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, vol. 12, no. 4, p. 674-685.
- NIE M., BLANKENSHIP A. L., GIESY J. P. Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2001, vol. 10, no. 1-2, p. 17-27.
- NISHIUMI S., YAMAMOTO N., KODOI R., FUKUDA I., YOSHIDA K., ASHIDA H. Antagonistic and agonistic effects of indigoids on the transformation of an aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, vol. 470, no. 2, p. 187-199.
- NOVOTNA M., LIBRA A., KOPECKY M., PAVEK P., FENDRICH Z., SEMECKY V., STAUD F. P-glycoprotein expression and distribution in the rat placenta during pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 2004, vol. 18, no. 6, p. 785-792.
- OKEY A. B., GIANNONE J. V., SMART W., WONG J. M., MANCHESTER D. K., PARKER N. B., FEELEY M. M., GRANT D. L., GILMAN A. Binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to AH receptor in placentas from normal versus abnormal pregnancy outcomes. *Chemosphere*, 1997, vol. 34, no. 5-7, p. 1535-1547.
- PAAKKI P., KIRKINEN P., HELIN H., PELKONEN O., RAUNIO H., PASANEN M. Antepartum glucocorticoid therapy suppresses human placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes. *Placenta*, 2000, vol. 21, no. 2-3, p. 241-246.
- PACIFICI G. M., NOTTOLI R. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet*, 1995, vol. 28, no. 3, p. 235-269.
- PANDINI A., DENISON M. S., SONG Y., SOSHILOV A. A., BONATI L. Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain by homology modeling and mutational analysis. *Biochemistry*, 2007, vol. 46, no. 3, p. 696-708.
- PASANEN M., HAAPARANTA T., SUNDIN M., SIVONEN P., VAKAKANGAS K., RAUNIO H., HINES R., GUSTAFSSON J. A., PELKONEN O. Immunochemical and molecular biological studies on human placental cigarette smoke-inducible cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities. *Toxicology*, 1990, vol. 62, no. 2, p. 175-187.

- PASQUALINI J. R. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005, vol. 97, no. 5, p. 401-415.
- PAVEK P., CERVENY L., SVECOVA L., BRYSCH M., LIBRA A., VRZAL R., NACHTIGAL P., STAUD F., ULRICHOVA J., FENDRICH Z., DVORAK Z. Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta*, 2007, vol. 28, no. 10, p. 1004-1011.
- PAVEK P., DVORAK Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug Metab.*, 2008, vol. 9, no. 2, p. 129-143.
- PEREG D., DEWAILLY E., POIRIER G. G., AYOTTE P. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and placental CYP1A1 activity in Inuit women from northern Quebec. *Environ. Health Perspect.*, 2002, vol. 110, no. 6, p. 607-612.
- PETER GUENGERICH F., MARTIN M. V., MCCORMICK W. A., NGUYEN L. P., GLOVER E., BRADFIELD C. A. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, vol. 423, no. 2, p. 309-316.
- PHARMGKB [online]. Poslední revize 2011-11-21 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.pharmgkb.org/>
- PHELAN D., WINTER G. M., ROGERS W. J., LAM J. C., DENISON M. S. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, vol. 357, no. 1, p. 155-163.
- POLLENZ R. S. The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol. Pharmacol.*, 1996, vol. 49, no. 3, p. 391-398.
- POLLENZ R. S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem. Biol. Interact.*, 2002, vol. 141, no. 1-2, p. 41-61.
- POSPECHOVA K., ROZEHNAL V., STEJSKALOVA L., VRZAL R., POSPISILOVA N., JAMBOROVA G., MAY K., SIEGMUND W., DVORAK Z., NACHTIGAL P., SEMECKY V., PAVEK P. Expression and activity of vitamin D receptor in

- the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2009, vol. 299, no. 2, p. 178-187.
- PROUGH R. A., SHERRATT A. J., BANET D. E., LINDER M. W., MATHIS J. M., SIMPSON E. R. Modulation of the polycyclic aromatic hydrocarbon-dependent induction of cytochrome P450IA1 by glucocorticoids. *Drug Metab. Rev.*, 1989, vol. 20, no. 2-4, p. 585-599.
- PUGA A., MA C., MARLOWE J. L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, vol. 77, no. 4, p. 713-722.
- PUGA A., MARLOWE J., BARNES S., CHANG C. Y., MAIER A., TAN Z., KERZEE J. K., CHANG X., STROBECK M., KNUDSEN E. S. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology*, 2002, vol. 181-182, p. 171-177.
- RAMA S., PETRUSZ P., RAO A. J. Hormonal regulation of human trophoblast differentiation: a possible role for 17beta-estradiol and GnRH. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, vol. 218, no. 1-2, p. 79-94.
- RIDDICK D. S., HUANG Y., HARPER P. A., OKEY A. B. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, no. 16, p. 12118-12128.
- ROBERTS D., DALZIEL S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006, vol. 3, p. CD004454.
- SAFE S. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 2001, vol. 120, no. 1-3, p. 1-7.
- SAFE S., BANDIERA S., SAWYER T., ROBERTSON L., SAFE L., PARKINSON A., THOMAS P. E., RYAN D. E., REIK L. M., LEVIN W., ET AL. PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ. Health Perspect.*, 1985, vol. 60, p. 47-56.
- SAMSON M., LABRIE F., LUU-THE V. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2009, vol. 116, no. 3-5, p. 154-159.

- SANYAL M. K., LI Y. L. Differential metabolism of benzo[alpha]pyrene in vitro by human placental tissues exposed to active maternal cigarette smoke. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 2007, vol. 80, no. 1, p. 49-56.
- SANYAL M. K., LI Y. L., BELANGER K. Metabolism of polynuclear aromatic hydrocarbon in human term placenta influenced by cigarette smoke exposure. *Reprod. Toxicol.*, 1994, vol. 8, no. 5, p. 411-418.
- SANYAL M. K., LI Y. L., BIGGERS W. J., SATISH J., BARNEA E. R. Augmentation of polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism of human placental tissues of first-trimester pregnancy by cigarette smoke exposure. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993, vol. 168, no. 5, p. 1587-1597.
- SARAH C. SIM [online]. Poslední revize 2009-12-09 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>
- SASTRY B. V. Techniques to study human placental transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, vol. 38, no. 1, p. 17-39.
- SEIDEL S. D., WINTERS G. M., ROGERS W. J., ZICCARDI M. H., LI V., KESER B., DENISON M. S. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2001, vol. 15, no. 4, p. 187-196.
- SHERRATT A. J., BANET D. E., PROUGH R. A. Glucocorticoid regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon induction of cytochrome P450IA1, glutathione S-transferases, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured fetal rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.*, 1990, vol. 37, no. 2, p. 198-205.
- SHIMADA T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2006, vol. 21, no. 4, p. 257-276.
- SHIMADA T., FUJII-KURIYAMA Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.*, 2004, vol. 95, no. 1, p. 1-6.
- SHIMADA T., GUENGERICH F. P. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, vol. 19, no. 2, p. 288-294.
- SHIMADA T., MURAYAMA N., OKADA K., FUNAE Y., YAMAZAKI H., GUENGERICH F. P. Different mechanisms for inhibition of human

- cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, vol. 20, no. 3, p. 489-496.
- SHIVERICK K. T., SALAFIA C. Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta*, 1999, vol. 20, no. 4, p. 265-272.
- SCHALDACH C. M., RIBY J., BJELDANES L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 23, p. 7594-7600.
- SCHINKEL A. H., JONKER J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, vol. 55, no. 1, p. 3-29.
- SCHMIDT J. V., SU G. H., REDDY J. K., SIMON M. C., BRADFIELD C. A. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, vol. 93, no. 13, p. 6731-6736.
- SCHOLLER A., HONG N. J., BISCHER P., REINERS J. J., JR. Short and long term effects of cytoskeleton-disrupting drugs on cytochrome P450 Cyp1a-1 induction in murine hepatoma 1c1c7 cells: suppression by the microtubule inhibitor nocodazole. *Mol. Pharmacol.*, 1994, vol. 45, no. 5, p. 944-954.
- SCHWARZ D., KISSELEV P., CASCORBI I., SCHUNCK W. H., ROOTS I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis*, 2001, vol. 22, no. 3, p. 453-459.
- SCHWARZ D., KISSELEV P., ERICKSEN S. S., SZKLARZ G. D., CHERNOGOLOV A., HONECK H., SCHUNCK W. H., ROOTS I. Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, vol. 67, no. 8, p. 1445-1457.
- SCHWARZ D., KISSELEV P., CHERNOGOLOV A., SCHUNCK W. H., ROOTS I. Human CYP1A1 variants lead to differential eicosapentaenoic acid metabolite patterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 336, no. 3, p. 779-783.
- SINAL C. J., BEND J. R. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol. Pharmacol.*, 1997, vol. 52, no. 4, p. 590-599.
- SOGAWA K., IWABUCHI K., ABE H., FUJII-KURIYAMA Y. Transcriptional activation domains of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1995a, vol. 121, no. 9-10, p. 612-620.

- SOGAWA K., NAKANO R., KOBAYASHI A., KIKUCHI Y., OHE N., MATSUSHITA N., FUJII-KURIYAMA Y. Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995b, vol. 92, no. 6, p. 1936-1940.
- SONG Z., POLLENZ R. S. Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol. Pharmacol.*, 2002, vol. 62, no. 4, p. 806-816.
- SONNEVELD E., JONAS A., MEIJER O. C., BROUWER A., VAN DER BURG B. Glucocorticoid-enhanced expression of dioxin target genes through regulation of the rat aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.*, 2007, vol. 99, no. 2, p. 455-469.
- ST-PIERRE M. V., UGELE B., GAMBLING L., SHIVERICK K. T. Mechanisms of drug transfer across the human placenta-a workshop report. *Placenta*, 2002, vol. 23 Suppl A, p. S159-164.
- STAUD F., PAVEK P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, vol. 37, no. 4, p. 720-725.
- STAUD F., VACKOVA Z., POSPECHOVA K., PAVEK P., CECKOVA M., LIBRA A., CYGALOVA 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, vol. 319, no. 1, p. 53-62.
- STEJSKALOVA L., DVORAK Z., PAVEK P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr. Drug Metab.*, 2011a, vol. 12, no. 2, p. 198-212.
- STEJSKALOVA L., PAVEK P. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, vol. 12, no. 5, p. 715-730.
- STEJSKALOVA L., VECEROVA L., PEREZ L. M., VRZAL R., DVORAK Z., NACHTIGAL P., PAVEK P. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicol. Sci.*, 2011b, vol. 123, p. 26-36.
- STEVENS E. A., MEZRICH J. D., BRADFIELD C. A. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 2009, vol. 127, no. 3, p. 299-311.

- SUGIHARA K., KITAMURA S., YAMADA T., OKAYAMA T., OHTA S., YAMASHITA K., YASUDA M., FUJII-KURIYAMA Y., SAEKI K., MATSUI S., MATSUDA T. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 318, no. 2, p. 571-578.
- SULLIVAN M. H. Endocrine cell lines from the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, vol. 228, no. 1-2, p. 103-119.
- SWEDENBORG E., PONGRATZ I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology*, 2010, vol. 268, p. 132-138
- SYME M. R., PAXTON J. W., KEELAN J. A. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet*, 2004, vol. 43, no. 8, p. 487-514.
- THOMAS R. D., GREEN M. R., WILSON C., WECKLE A. L., DUANMU Z., KOCAREK T. A., RUNGE-MORRIS M. Cytochrome P450 expression and metabolic activation of cooked food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in MCF10A breast epithelial cells. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, vol. 160, no. 3, p. 204-216.
- TIAN Y. Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, vol. 77, no. 4, p. 670-680.
- TIRONA R. G., KIM R. B. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J. Pharm. Sci.*, 2005, vol. 94, no. 6, p. 1169-1186.
- TOMPKINS L. M., LI H., LI L., LYNCH C., XIE Y., NAKANISHI T., ROSS D. D., WANG H. A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, vol. 80, no. 11, p. 1754-1761.
- VAHAKANGAS K., MYLLYNEN P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, vol. 158, no. 3, p. 665-678.
- VAHAKANGAS K., MYLLYNEN P. Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. *Mutat. Res.*, 2006, vol. 608, no. 2, p. 129-135.
- VAN DER AA E. M., PEEREBOOM-STEGEMAN J. H., NOORDHOEK J., GRIBNAU F. W., RUSSEL F. G. Mechanisms of drug transfer across the human placenta. *Pharm World Sci*, 1998, vol. 20, no. 4, p. 139-148.
- VAN DER HEIDEN E., BECHOUX N., MULLER M., SERGENT T., SCHNEIDER Y. J., LARONDELLE Y., MAGHUIN-ROGISTER G., SCIPPO M. L. Food



- flavonoid aryl hydrocarbon receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays. *Anal. Chim. Acta*, 2009, vol. 637, no. 1-2, p. 337-345.
- VICKERS A. E., SLOOP T. C., LUCIER G. W. Mechanism of action of toxic halogenated aromatics. *Environ. Health Perspect.*, 1985, vol. 59, p. 121-128.
- VRZAL R., STEJSKALOVA L., MONOSTORY K., MAUREL P., BACHLEDA P., PAVEK P., DVORAK Z. Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 2009, vol. 179, no. 2-3, p. 288-296.
- WADDELL B. J., BENEDIKTSSON R., BROWN R. W., SECKL J. R. Tissue-specific messenger ribonucleic acid expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor within rat placenta suggests exquisite local control of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 1998, vol. 139, no. 4, p. 1517-1523.
- WADSACK C., HRZENJAK A., HAMMER A., HIRSCHMUGL B., LEVAK-FRANK S., DESOYE G., SATTLER W., MALLE E. Trophoblast-like human choriocarcinoma cells serve as a suitable in vitro model for selective cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.*, 2003, vol. 270, no. 3, p. 451-462.
- WANG H., WU X., HUDKINS K., MIKHEEV A., ZHANG H., GUPTA A., UNADKAT J. D., MAO Q. Expression of the breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in tissues from pregnant mice: effects of pregnancy and correlations with nuclear receptors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006, vol. 291, no. 6, p. E1295-1304.
- WANG S. H., LIANG C. T., LIU Y. W., HUANG M. C., HUANG S. C., HONG W. F., SU J. G. Crosstalk between activated forms of the aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor. *Toxicology*, 2009, vol. 262, no. 2, p. 87-97.
- WANG X., ZUCKERMAN B., PEARSON C., KAUFMAN G., CHEN C., WANG G., NIU T., WISE P. H., BAUCHNER H., XU X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *Jama*, 2002, vol. 287, no. 2, p. 195-202.

- WATTENBERG L. W., LOUB W. D. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res.*, 1978, vol. 38, no. 5, p. 1410-1413.
- WEI C., CACCAVALE R. J., WEYAND E. H., CHEN S., IBA M. M. Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer Lett.*, 2002, vol. 178, no. 1, p. 25-36.
- WEI Y. D., HELLEBERG H., RANNUG U., RANNUG A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem. Biol. Interact.*, 1998, vol. 110, no. 1-2, p. 39-55.
- WERLINDER V., BACKLUND M., ZHUKOV A., INGELMAN-SUNDBERG M. Transcriptional and post-translational regulation of CYP1A1 by primaquine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, vol. 297, no. 1, p. 206-214.
- WESTERINK W. M., STEVENSON J. C., SCHOONEN W. G. Pharmacologic profiling of human and rat cytochrome P450 1A1 and 1A2 induction and competition. *Arch. Toxicol.*, 2008, vol. 82, no. 12, p. 909-921.
- WHYATT R. M., BELL D. A., JEDRYCHOWSKI W., SANTELLA R. M., GARTE S. J., COSMA G., MANCHESTER D. K., YOUNG T. L., COOPER T. B., OTTMAN R., PERERA F. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. *Carcinogenesis*, 1998, vol. 19, no. 8, p. 1389-1392.
- WHYATT R. M., GARTE S. J., COSMA G., BELL D. A., JEDRYCHOWSKI W., WAHRENDORF J., RANDALL M. C., COOPER T. B., OTTMAN R., TANG D., ET AL. CYP1A1 messenger RNA levels in placental tissue as a biomarker of environmental exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1995, vol. 4, no. 2, p. 147-153.
- XIAO G. H., PINAIRE J. A., RODRIGUES A. D., PROUGH R. A. Regulation of the Ah gene battery via Ah receptor-dependent and independent processes in cultured adult rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 1995, vol. 23, no. 6, p. 642-650.
- YAMAMOTO J., IHARA K., NAKAYAMA H., HIKINO S., SATOH K., KUBO N., IIDA T., FUJII Y., HARA T. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and

- variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.*, 2004, vol. 74, no. 8, p. 1039-1049.
- YASUDA S., ITAGAKI S., HIRANO T., ISEKI K. Expression level of ABCG2 in the placenta decreases from the mid stage to the end of gestation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, vol. 69, no. 10, p. 1871-1876.
- YOSHINARI K., UEDA R., KUSANO K., YOSHIMURA T., NAGATA K., YAMAZOE Y. Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem. Pharmacol.*, 2008, vol. 76, no. 1, p. 139-145.
- YOSHINARI K., YODA N., TORIYABE T., YAMAZOE Y. Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, vol. 79, no. 2, p. 261-269.
- ZHAI S., DAI R., FRIEDMAN F. K., VESTAL R. E. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab. Dispos.*, 1998, vol. 26, no. 10, p. 989-992.
- ZHANG Q. Y., DUNBAR D., KAMINSKY L. Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos.*, 2000, vol. 28, no. 3, p. 292-297.
- ZHOU S. F., LIU J. P., CHOWBAY B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab. Rev.*, 2009, vol. 41, no. 2, p. 89-295.
- ZHU B. T., CAI M. X., SPINK D. C., HUSSAIN M. M., BUSCH C. M., RANZINI A. C., LAI Y. L., LAMBERT G. H., THOMAS P. E., CONNEY A. H. Stimulatory effect of cigarette smoking on the 15 alpha-hydroxylation of estradiol by human term placenta. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2002, vol. 71, no. 5, p. 311-324.
- ZHU B. T., LEE A. J. NADPH-dependent metabolism of 17beta-estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids*, 2005, vol. 70, no. 4, p. 225-244.

## **11 Přílohy – uveřejněné odborné publikace s tématikou disertační práce**