

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd

The University of Alcalá, Faculty of Medicine, Department of biomedicine and biotechnology

Student: Zuzana Chvojanová

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: María Isabel Arenas Jimenéz

Název diplomové práce: Studie změn v expresi různých adhezivních a cytoskeletálních proteinů podocytů (E-kadherin, Podocin, Vimentin) v důsledku Bisfenolu A

Bisfenol A (BPA) patří mezi nejrozšířenější sloučeniny na světě, jehož produkce činí ročně více než 6 miliard tun. Je široce používán jako součást polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic, z nichž jsou vyráběny znovu použitelné plastové lahve, potravinové boxy a některé lékařské vybavení. Také se používá k potažení vnitřní vrstvy plechovek.

V dříve provedených studiích bylo zjištěno, že BPA v lidském organismu přispívá ke vzniku mnoha chronických onemocnění jako například onemocnění ledvin – diabetická nefropatie. Podocyty – terminálně diferenciované buňky Bowmanova pouzdra glomerulu – jsou nedílnou součástí filtrační bariéry, kde hrají důležitou roli v zabránění průniku plasmatických proteinů do moči. Proto jsme se v této studii zaměřili na efekt BPA právě na tyto buňky a jejich konkrétní proteiny, a to pomocí *in vivo* a *in vitro* metod.

Nejdříve jsme pomocí imunohistochemické metody (IHC), prokázali negativní efekt 100 nM BPA na myší ledviny. To se projevilo zejména rozšířením distálních a proximálních stočených tubulů glomerulu a Bowmanova pouzdra. U vzorků s navozeným diabetem mellitem se mimo zmíněné projevy objevila i výrazná mesangiální expanze. Pomocí IHC jsme pozorovali i sníženou hustotu podocytů v glomerulu, k poklesu došlo i v ohledu na jejich velikost a funkci, což vedlo k hypertrofickému stresu podocytů a ke glomerulárnímu kolapsu.

Díky předešlé studii laboratoře R.Bosch zabývající se toxicitou BPA na myší podocyty, byla prokázána jasná souvislost mezi expozicí BPA a proteinurií u myší.

Proto jsme se v této studii zabývali efektem BPA na lidské podocyty a to formou zkoumání toxicity BPA na jednotlivé proteiny těchto buněk. Zabývali jsme se konkrétně E-kadherinem, což je adhezivní typ proteinu, jehož funkcí je zejména zajištění integrity a polarita renálních epiteliálních buněk. Pokles exprese tohoto proteinu vyvolala expozice BPA ve všech použitých koncentracích (1 nM, 10 nM, 100 nM), které byly použity v metodě Western Blot (WB). Pokles E-kadherinu se projevil i při použití imunocytochemické (ICC) a IHC metody. Nedostatek E-kadherinu je signálem epiteliálního a mezenchymálního přechodu, což je proces, při kterém buňky ztrácejí kontakt buňka-buňka a delaminují z epitelu. V důsledku toho je narušena adheze buněk. Dalším zkoumaným proteinem byl Podocin, což je cytoskeletární typ proteinu, specifický pro zralé podocyty, lokalizovaný ve štěrbinové membráně. Jeho funkcí je regulace glomerulární permeability. I v tomto případě byl trend poklesu exprese proteinů prokázán ve všech již výše zmíněných koncentracích BPA použitých při WB. I v ICC metodě se ukázal výrazný pokles Podocinu díky působení 100 nM BPA na podocyty. Nedostatek tohoto proteinu má za následek sníženou funkci podocytů, což vede ke zvýšené proteinurii. Posledním zkoumaným proteinem byl Vimentin zastupující skupinu cytoskeletárních proteinů vyskytujících se ve všech eukaryotických buňkách s mesenchymálním původem. Funkce tohoto proteinu spočívá zejména v udržení stability a tvaru podocyty. I v tomto případě se toxicita BPA projevila poklesem hladin Vimentinu v buňce. K největšímu poklesu došlo při expozi 100 nM BPA. Nedostatkem tohoto proteinu se narušuje již zmíněná stabilita buněk včetně jejich tvaru.

Všechny naměřené výsledky potvrzují původní předpoklad škodlivého účinku BPA na lidské podocyty. Ne všechny tyto výsledky byly staticky významné, ale trend klesajících hodnot byl u všech proteinů viditelný.