

PŘÍRODNÍ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ MEZIBUNĚČNOU KOMUNIKACI

HANA FOREJTŇÍKOVÁ a RENATA KUBÍNOVÁ

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1/3, 612 42 Brno
 haforej@hotmail.com

Došlo 29.10.02, přepracováno 21.8.03, přijato 18.9.03.

Klíčová slova: mezibuněčná komunikace, mezerové spoje, konexiny, přírodní modulátory mezibuněčné komunikace

Obsah

1. Úvod
2. Mezerové spoje
 - 2.1. Struktura mezerového spojení
 - 2.2. Regulace mezerových spojů a endogenní modulátory
 - 2.3. Experimentální metody měření funkčnosti
3. Vnitřní a vnější vlivy na kvalitu mezibuněčné komunikace
4. Exogenní modulátory mezibuněčné komunikace
5. Závěr

1. Úvod

Počet nádorových onemocnění stále stoupá. V současnosti v rozvinutých státech představují druhou hlavní příčinu smrti za kardiovaskulárními onemocněními. Existují předpoklady, že v nejbližší době odsunou kardiovaskulární úmrtí a stanou se hlavní příčinou, neboť preventivní i terapeutické postupy jsou u kardiovaskulárních chorob stále efektivnější. Již nyní onemocní v rozvinutých státech některým typem malignity v průběhu života každý třetí jedinec a u poloviny z postižených je nádorové onemocnění hlavní příčinou smrti.

Dřívější studie kancerogeneze ukázaly, že vznik nádoru probíhá ve třech relativně dobře charakterizovaných etapách: iniciaci, promoci a progresi. Dlouhou dobu se předpokládalo, že kancerogeneze je především výsledkem mutagenního (genotoxického) působení xenobiotik (např. nitrosaminů, onkogenů, UV záření). Později se ukázalo, že vývoj nádoru je podporován i epigenetickými (negenotoxickými) účinky látek. Tato xenobiotika mění expresi genů vedoucí ke změnám parametrů proliferace, diferenciace a programované buněčné smrti – apoptózy. Účinkem cizorodých látek mohou být ovlivněny hladiny hormonů, signálních molekul a přímo regulace transkripce a translace. Expozice negenotoxickým kancerogenem se tak projevují především v promoční fázi kancerogeneze zvýšenou proliferací transformovaných buněk, inhibicí apoptózy a mezibuněčné komunikace, tedy procesů regulujících

buněčný růst¹. Buňky ztrácí svou schopnost udržovat homeostasu a získávají možnost rozvoje kancerogenních procesů. Ukázalo se, že rozvoj kancerogeneze je zřejmě spjat se změnami intercelulárních a intracelulárních cest přenosu signálu a buněčných pohybů v cílových tkáních².

Jedním z biomarkerů promoce kancerogeneze je inhibice mezibuněčné komunikace zprostředkované mezerovými spoji (gap junctional intercellular communication – GJIC). Tyto spoje hrají důležitou integrující roli v udržování homeostasy v organismu. Jde o kanálky zajišťující koordinaci aktivity sousedících buněk; jimi je v dané tkáni řízen růst, vývoj a diferenciace buněk. Vzhledem k důležitému postavení GJIC ve fyziologických procesech není překvapující, že jejich porušení je spojováno s mnoha patologickými procesy, ke kterým patří např. chronická srdeční onemocnění, osteoporóza, epilepsie, artritida, poruchy imunity a také mnoho druhů zhoubných nádorových onemocnění. Inhibice (tzv. down-regulace) mezerových spojů je integrujícím znakem tkáňového poškození³.

V rostlinné říši byla objevena řada látek, které patří mezi významné tumorové inhibitory podílející se na otvírání mezerových spojů. Jsou to zejména sekundární metabolity ze skupiny flavonoidů, resveratrol, některé karotenoidy, retinoidy a ginsenosidy.

2. Mezerové spoje

Aby se mohl mnohobuněčný organismus rychleji přizpůsobovat změnám životního prostředí, byl vytvořen systém, který umožňuje skupinám propojených buněk vzájemnou koordinaci svého chování a buněčnou odpověď na mimobuněčné stimuly. Tuto koordinaci umožňují specializované mezibuněčné kanálky, zvané mezerové spoje (gap junctions). Tyto kanálky jsou přítomny u všech mnohobuněčných organismů, a to téměř ve všech tkáních. Výjimku tvoří buňky kosterních svalů a krevní elementy. Funkčně jde o totožné struktury, liší se na molekulární úrovni strukturních bílkovinných komponent. Mezerové spoje usnadňují přímou výměnu iontů a nízkomolekulárních látek o molekulové hmotnosti menší než 2000 Da (např. Ca²⁺, cAMP, glutathion), ale i některých dalších molekul do velikosti 1,5 nm (např. aminokyselin, cukrů, nukleotidů). Výměna se uskutečňuje z cytoplazmy do cytoplazmy mezi sousedícími buňkami.

Z funkčního hlediska patří mezerové kanálky spolu s chemickými synapsemi mezi komunikační spoje, které zprostředkovávají přenos chemických nebo elektrických signálů mezi interagujícími buňkami.

Mezibuněčné spoje jsou citlivé ke spouštěcím signálům ze životního prostředí (např. polycyklickým aromatickým uhlovodíkům), které mohou zablokovat buněčnou komunikaci uzavřením mezerových kanálků. Toto potlačení GJIC nastane do několika minut po vystavení účinkům xenobiotik a je reverzibilní. Na základě řady *in vitro* a *in vivo* studií bylo zjištěno, že narušení GJIC se pravděpodobně podílí na vzniku nádoru¹.

Funkce mezerových spojů:

- udržování homeostasy v tkáních (rychlá distribuce živin, iontů, tekutin a signálních molekul, podílejících se na modulaci buněčného růstu, apoptózy a diferenciaci);
- elektrické spojení (mezerové spoje slouží jako elektrické synapse u elektricky excitovatelných buněk, např. neuronů, srdečních myocytů, buněk hladkého svalstva);
Tím se podílejí na regulaci;
- tkáňové odpovědi na hormony (GJIC zvyšují schopnost tkáně rychle reagovat na vnější stimuly);
- embryonálního vývoje (mezibuněčná cesta pro chemické a elektrické signály potřebné pro embryonální vývoj).

2.1. Struktura mezerového spojení

Mezibuněčné kanálky obratlovců jsou složeny z bílkovin nazývaných konexiny. Ve tkáních savců bylo dosud identifikováno 15 genů pro konexiny⁴. Šest konexinů se sdružuje do proteinového kanálku zvaného konexon. Jde v podstatě o kanálek v cytoplazmatické membráně buňky, který se těsně přibližuje (na vzdálenost 2–3 nm) ke konexonu sousední buňky, aby společně vytvořily kontinuální průchod pro hydrofilní molekuly. Konexinový protein překlenuje membránu čtyřikrát a vytváří tak strukturu připomínající tvarem písmeno M, přičemž aminové a karboxylové konce proteinu jsou umístěny v cytoplazmě. Domény procházející membránou jsou kritickými determinanty správného umístění konexinu. Asociací třetích transmembránových domén konexinů, které obsahují velké množství hydrofilních aminokyselin, vzniká vnitřní „stěna“ póru.

Struktura čtyř transmembránových domén, dvou mimobuněčných smyček i aminového konce je u všech konexinů do značné míry zachována. Více odlišné jsou v ostatních úsecích, které se nacházejí v cytoplazmě. Tyto úseky se účastní regulace vzniku a permeability kanálku. Skládání konexinu i interakce konexin–konexin a konexon–konexon se uskutečňují disulfidovými vazbami, interakcí hydrofóbních částí proteinů, ale i pomocí dalších, dosud ne zcela objasněných sil¹.

Konexiny (Cx) se liší molekulovou hmotností vyjádřenou v kDa (např. Cx32, Cx43), uspořádáním aminokyselin a rozdílnou délkou karboxylového konce⁵. Expres konexinů je buněčně, tkáňově a vývojově specifická, ve většině tkání dochází k expresi více různých konexinů. Přehled některých hlavních konexinů a jejich lokalizace v organismu je uveden v tabulce I.

Neoplastické buňky mají mezerových kanálků méně nebo menší velikosti, exprimují méně konexinu ve srovnání se zdravými buňkami¹. Defekty GJIC se objevují na různých úrovních. Nádorové buňky mohou buď postrádat funkční (permeabilní) mezerové spoje anebo mají funkční homologní GJIC (pouze v nádorové tkáni), ale nejsou schopny vytvořit fungující kanálek s nenádorovou buňkou (heterologní GJIC). Nádorové buňky jsou tak vyvázány z homeostatické kontroly růstu a nemohou komunikovat s okolními buňkami⁶.

2.2. Regulace mezerových spojů a endogenní modulátory

Počet a velikost mezerových spojů závisí na buněčném cyklu, fyziologickém stavu organismu/tkáně a vlivu faktorů životního prostředí¹.

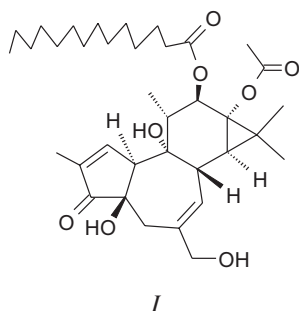
Tabulka I
Přehled nejznámějších savčích konexinů a jejich lokalizace v organismu

Konexin	Tkáň
Cx26	hepatocyty, pankreas, endometrium
Cx30	mozek, kůže
Cx30.3	kůže
Cx31	kůže, placenta
Cx31.1	kůže
Cx32	hepatocyty, ledviny, pankreas
Cx33	varlata
Cx37	plice, vaječníky, endotel
Cx40	endotel, hladké svalstvo, myokard, plíce
Cx43	epitel, srdce, děloha, mozek
Cx45	ledviny, kůže
Cx46	čočka
Cx50	čočka

Transport látek mezerovými spoji se děje pasivní difuzí a je regulován vrátkovým mechanismem. Selektivita a permeabilita kanálku závisí na typu konexinu tvořícího mezerový spoj³. Je známo asi 15 typů konexinů s molekulovou hmotností od 26 do 57 kDa (cit.⁴). Konexiny byly nalezeny nejen u savců a dalších obratlovců, ale také u bezobratlých, jako je např. medúza či nezmar. Podobné struktury, známé jako plazmodesmata, byly nalezeny u rostlin. Mnoho buněk exprimuje více než jeden typ konexinu. První klonovaný konexin 43 byl objeven u buněk srdečního svalstva. Tento typ buněk exprimuje také konexiny 40, 45 a 46. V parenchymatických buňkách jsou exprimovány především konexiny 32 a 26 (cit.¹).

Mechanismy regulace mezerových spojů nejsou doposud plně objasněny. Nejvíce informací o sestavování těchto kanálků je shromážděno pro konexin 43 (cit.⁷). Šest podjednotek konexinu 43 oligomerizuje v Golgiho aparátu a jsou transportovány do plazmatické membrány. V této fázi jsou konexony uzavřeny, aby nedocházelo k úniku buněčných komponent nebo vstupu mimobuněčných složek. V plazmatické membráně jsou pak konexony sousedících buněk přitahovány silami, které nejsou doposud plně objasněny. Koncevé části konexonů se k sobě připojí a vytvoří kompletní mezerový kanálek. Následně kanálky agregují do větších shluků (tzv. plaku), otevrou se a propojí vnitřní prostředí sousedících buněk⁸. Posloupnost těchto dvou posledních stupňů je však diskutabilní. Souhra mezi utvářením otevřených kanálků a agregací částí kanálků do plaku je způsobena fosforylací konexinu 43 nejméně na dvou místech. Kinasou provádějící tuto fosforylaci je s největší pravděpodobností proteinkinasa A (cit.¹). Fosforylace zvyšuje agregaci konexonů, permeabilitu kanálků a stabilitu konexinu 43. Utváření kanálků vyžaduje také patřičnou buněčnou adhezi. Zdá se, že zvláště důležitými molekulami umožňujícími tuto adhezi jsou transmembránové vazebné proteiny kadheriny⁹.

Otvírání a zavírání mezerových kanálků je řízeno několika různými mechanismy. Jde o reverzibilní přechod mezi otevřenou a uzavřenou konformací kanálku, který může být výsledkem nekovalentních (např. elektrostatických nebo van



der Waalových sil) nebo kovalentních (např. fosforylace) modifikací struktury kanálku. Vrátkování může být řízeno i farmakologicky nebo pomocí extra- i intracelulárních mediátorů⁸.

Mechanismy regulace mezerových spojů zahrnují zejména vliv nízké koncentrace vodíkových iontů či vyšší hladinu vápenatých iontů v buňce, rozdíl napětí mezi kanálky¹⁰ nebo působení volných radikálů¹¹. Vysoké buněčné hladiny radikálů snižují permeabilitu mezerových kanálků. Tento mechanismus je pravděpodobně složitý. Radikály mohou přímo ovlivňovat konexiny a další plazmatické komponenty (např. lipidy), aktivovat proteinkinasu C a také mohou regulovat hladinu vápenatých iontů v buňce¹².

Zajímavé poznatky přicházejí především ze studií řízení vrátkování fosforylací. Mnoho proteinkinas má schopnost fosforylovat konexiny a tím měnit jejich terciární strukturu, která podmiňuje otevření nebo uzavření kanálku. Jediný konexin, který nemůže být fosforylován, je Cx26 (cit.⁸). Aktivace proteinkinasy A indukuje fosforylaci konexinu 32 a konexinu 42 na serinových zbytcích karboxylového konce kanálku lokalizovaného v cytoplazmě. Tato fosforylace je spojena se zvýšením počtu mezerových kanálků a jejich průchodnosti¹⁰.

Fosforylace konexinů je však také předpokládaným mechanismem účinku mnoha negenotoxicky působících karcinogenů. Většina nádorových promotorů, které byly dosud prozkoumány (více než 100 sloučenin), má schopnost snižovat permeabilitu nebo zcela uzavírat mezerové spoje v testech *in vitro* i *in vivo*. V mnoha případech jde o buněčně-specifický účinek¹.

Nejlépe je prostudována inhibice mezerových spojů působením forbolesterů, jakým je např. forbol-12-myristát-13-acetát (PMA) (I). PMA uzavírá mezerové spoje v celé řadě buněčných kultur¹³. Inhibiční účinek PMA spočívá v aktivaci proteinkinasy C (PKC), která následně fosforyluje konexin 43. Zvýšení hladiny celkové PKC může citlivost buněk zvýšit. Pomocí specifických inhibitorů různých isoenzymů PKC bylo zjištěno, že za fosforylaci konexinu 43 odpovídá především isoenzym PKC α (kalcium-dependenční proteinkinasa C) (cit.⁴).

Kromě přímé fosforylace konexinu 43 proteinkinásou C (cit.¹⁴) existuje ještě druhá možná dráha regulace konexinu 43 v buňce vystavené PMA. Trosko a Ruch¹⁵ ve své studii popsali nepřímou fosforylaci konexinu 43 proteinkinásou C. Tato fosforylace je zprostředkována kinásami regulovanými mimobuněčnými signály (ERKs), které patří do širší skupiny proteinkinasy aktivovaných mitogeny (MAPKs). ERKs jsou aktivovány mitogeny, stresem a také již zmiňovaným PMA. Podílejí se na buněčném růstu, diferenciaci, odpovědi na stres

a na dalších fyziologických funkcích buňky¹⁶. Cílovými místy ERKs jsou cytosolové proteiny a jaderné transkripční faktory¹⁵.

Příkladem další látky podléjící se na inhibici mezibuněčné komunikace je fenobarbital. Byly prováděny testy *in vivo* a výsledky ukazují, že fenobarbital blokuje konexin 32 lokalizovaný v hepatocytech, ale neovlivňuje konexin 43 nacházející se zejména v epiteliálních buňkách a fibroblastech. Mechanismem inhibice GJIC je snížení hladiny mRNA pro konexin 32 (cit.¹³).

Pesticid DDT [1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan] blokuje GJIC v epiteliálních buňkách i hepatocytech. DDT způsobuje rychlou inhibici permeability mezerových spojů s následnou internalizací a degradací v lysozomech. Internalizace a degradace se však týká pouze epiteliálních buněk exprimujících Cx43, u Cx32 nebyly tyto účinky pozorovány. Z dalších pesticidů působí inhibici GJIC např. dieldrin, heptachlor nebo lindan¹⁷.

Též aktivace některých onkogenů (v-Src nebo v-Ha-Ras) je spojována s inhibicí GJIC. Produkt Src genu je zodpovědný za fosforylaci tyrosinových zbytků konexinu 43, což vede k uzavírání mezerových spojů¹⁸.

Přítomnost řady růstových faktorů např. epidermálního růstového faktoru (EGF) či fibroblastického růstového faktoru, vede k inhibici GJIC. Inhibice souvisí s fosforylací konexinu 43 na serinových zbytcích proteinkinásami aktivovanými mitogeny (MAPKs) (cit.¹⁹). EGF stimuluje MAPKs v závislosti na délce působení a dávce. EGF též stimuluje fosfolipasu C, jejímž působením vznikají druží poslové inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, kteří stimulují uvolnění intracelulárního vápníku a aktivaci PKC (cit.²⁰).

Početnou skupinu inhibitorů mezerových spojů také tvoří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). Nejsilnější inhibici vykazují zejména PAHs s relativně malými molekulami, jako jsou fluoranthen, fenantren, fluoren²¹.

Na druhé straně též existuje celá řada látek podléjících se na stimulaci GJIC. Obnovení permeability mezerových spojů v tumorových buňkách může vést k navrácení regulace růstu, a tak k redukci nádorového bujení. Mechanismus účinku těchto látek není zatím zcela jasný, ale nejčastěji jde, podobně jako u mechanismu inhibice, o ovlivnění konexinů 32 a 43. Je zajímavé, že řada těchto látek patří mezi antioxidanty (např. resveratrol, superoxidodismutasa, polyfenoly zeleného čaje), dále jsou to látky ovlivňující signální přenos a aktivitu některých proteinkinasy (cAMP) (cit.¹). Obnovy GJIC se mohou účastnit též antionkogenní látky, které snižují aktivaci onkogenů podléjících se na inhibici GJIC v nádorově transformovaných buňkách. Příkladem je lovastatin²², thalidomid²³ či 2-fenylethylester kyseliny kávové²⁴. Antionkogenní efekt byl pozorován též u dexamethazonu na potkaních hepatocytech¹⁷.

Prevence inhibice GJIC během promoční fáze karcinogeneze a obnovení mezibuněčné komunikace po nádorové konverzi může být základem chemoprevence.

2.3. Experimentální metody měření funkčnosti

Inhibice GJIC *in vitro* ve vhodné modelové buněčné linii je považována za parametr detekující velmi pravděpodobně tumor-promoční vlastnosti testované látky.

Modulace mezerových spojů může být měřena několika způsoby. Nejčastěji je to sledování transportu barviva kanálky metodou SL/DT (scrape loading/dye transfer)²⁵. Sleduje se průnik nízkomolekulárního fluorescenčního barviva mezerovými kanálky od místa řezu skalpelem. Barvivo je schopno procházet pouze těmito kanálky. Délka jeho transportní dráhy závisí na průchodnosti kanálků, která je ovlivněna expozicí testovaným látkám.

Alternativou k metodě SL/DT je sledování průniku fluorescenčního barviva, které difunduje mezerovými kanálky po mikroinjekci do vybraných buněk²⁶.

Další možností je detekce konexinů. Western blot je technika sloužící k určení typu, množství a velikosti post-translačních změn (např. fosforylace) konexinů. Po elektroforetické separaci konexinů v gelové matici následuje elektroforetický přenos z gelu na membránu. Tato matrice je přístupnější pro metody využívající imunisorbentů s navázaným enzymem. K identifikaci typu konexinu se využívají specifické protilátky²⁷.

Semikvantitativní metoda RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction – reverzně transkripční polymerasová řetězová reakce) je velmi citlivá pro analýzu mRNA. Slouží pro studium regulace transkripce²⁷. Imunofluorescenční technika značení konexinů přímo zobrazuje mezerový kanálek. Fixované buňky jsou značeny králičími polyklonálními protilátkami proti určitému typu konexinu. Následuje lokalizace komplexu antigen–protilátka pomocí IgG proti králičí protilátce; IgG je značeno zeleným fluorescenčním proteinem, který umožní přímou fluorescenční detekci²⁸.

Analýza FRAP (fluorescence redistribution after photobleaching) je vhodná pro studium buněčného individua uvnitř populace. Buňky se obarví karboxyfluorescein diacetátem a po selektivním odbarvení buňky působením laseru se sleduje průnik fluorescenční barvy ze sousedních značených buněk zpět do odbarvené buňky²⁷.

Existují také další méně používané metody, např. sledování průniku radioaktivního metabolitu, metabolická kooperace buněk s enzymatickým deficitem v určitých metabolických drahách nebo měření elektrické vodivosti mezerových kanálků.

3. Vnitřní a vnější vlivy na kvalitu mezibuněčné komunikace

V organismu se mohou vyskytnout různé typy nádorového bujení. I při jejich variabilitě existují určité společné znaky. Kancerogenní buňky nereagují na kontaktní inhibici růstu, vymykají se homeostatické kontrole okolních buněk, nejsou schopny terminální diferenciace, dochází u nich ke zvýšení proliferace a naopak k inhibici apoptických procesů²⁹. V průběhu dalšího růstu tumoru podléhají buňky opětovným genotypovým a fenotypovým změnám. S těmito buněčnými procesy úzce souvisí modulace klíčových buněčných pochodů: signální transdukce, aktivace transkripčních faktorů, modulace komponent buněčného cyklu atd.¹

Promotory kancerogeneze působí na celou řadu klíčových buněčných procesů²:

- modulaci hladin endogenních extracelulárních signálních molekul, indukci nebo inhibici enzymů biosyntézy a metabolismu těchto látek (především cytochromů P450);

- oxidační poškození membránových lipidů, nukleových kyselin a intracelulárních proteinů;
- změnu buněčných signálních drah a genové exprese (modulace cytosolových a jaderných receptorů a aktivity dalších transkripčních faktorů, aktivace proteinkinas);
- epigenetické efekty na DNA (methylace, acetylace apod.).

Modulace buněčných pochodů promotory kancerogeneze může vést jednak ke stimulaci buněčné proliferace, změnám diferenciace a apoptózy buněk anebo k inhibici mezibuněčné komunikace.

4. Exogenní modulatory mezibuněčné komunikace

Látky blokující účinky nádorových promotorů a stimulační mezibuněčnou komunikaci v nádorových buňkách jsou velmi různorodé a zahrnují dietní komponenty, hormony, vitaminy a léčiva. Vzhledem k tomu, že buňky nádoru jsou velmi heterogenní a vytvářejí subpopulace buněk s různými typy poškození, není možné, aby pouze jedna látka účinně modulovala mezibuněčnou komunikaci v celém nádoru. Proto je nutné kombinovat jednotlivé látky stimulující GJIC, případně i s dalšími terapeutickými metodami¹. Vhodné je hledat stimulatory mezibuněčné komunikace mezi látkami biogenního původu, které jsou součástí běžné stravy člověka.

Látky přírodního původu patří v současnosti mezi jedny z nejvíce prozkoumaných inhibitorů promoční fáze nádorového bujení. Efekty těchto látek můžeme rozdělit na dvě skupiny. Jednak jsou to látky, které mohou blokovat inhibiční účinek promotorů na GJIC (tabulka II). Mechanismus působení těchto látek není zatím zcela objasněn, ale často jde o látky se silným antioxidačním účinkem, který by se pravděpodobně mohl podílet na regulaci GJIC. Kromě látek rostlinného původu jsou to např. superoxidodismutasa nebo *N,N'*-difenyln-1,4-fenylendiamin (DPPD) (cit.¹). Druhou skupinu tvoří látky schopné indukovat GJIC v nádorových buňkách (tabulka III). Obnovení mezibuněčné komunikace v nádorových buňkách je poměrně složitá otázka, ale i přesto byli v rostlinné říši nalezeni úspěšní zástupci.

Flavonoidy jsou hojně rozšířenou skupinou přírodních polyfenolů. Řada z nich vykazuje silné antioxidační účinky, je známa též jejich antivirová, antibakteriální, antimutagenní a protizánětlivá aktivita. V současné době se flavonoidním látkám připisuje prominentní role v prevenci nádorových onemocnění⁴⁶.

V experimentech *in vitro* byla testována řada flavonoidů, z nichž nejúčinnějšími stimulatory GJIC byly shledány apigenin (II) nacházející se v celé řadě léčivých rostlin (př. *Achillea millefolium*, *Ginkgo biloba*, *Glycyrrhiza glabra*) a tangeretin (III) přítomný zejména v citrusech. Bylo zjištěno, že oba zabraňují inhibici GJIC v hepatocytech potkanů indukovanou tumorovými promotory PMA a 2-*terc*-butyl-4-methylfenolem (BHT) (cit.³¹). Stimulace GJIC apigeninem je spjatá s ovlivněním množství mRNA pro konexin 43, a to stimulací transkripce konexinu 43 anebo stabilizací mRNA.

Tangeretin neovlivňuje množství mRNA pro konexin 43, stimulace GJIC se pravděpodobně děje translačním nebo post-translačním mechanismem³⁰.

Dalšími flavonoidy testovanými jako možné stimulatory GJIC byly naringenin, myricetin³¹ a chrysin⁴⁷, avšak jejich stimulační účinky se neprokázaly.

Tabulka II

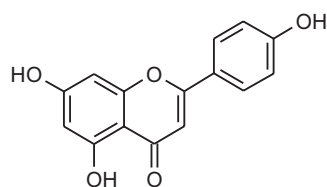
Látky přírodního původu preventivně zabraňující inhibici GJIC způsobené kancerogeny

Kancerogen	Blokující látka	Buněčná tkáň	Konexin	Lit.
BHT	apigenin, tangeretin	jaterní epiteliální buňky potkanů	Cx43	30,31
DDT	resveratrol, α -tokoferol, epikatechin	jaterní epiteliální buňky myši a potkanů	Cx32, Cx43	32,33
H ₂ O ₂	epikatechin, ginsenosid Rb ₂	jaterní epiteliální buňky potkanů	Cx43	34,35
Lindan	α -tokoferol	potkaní myocyty	Cx43	36
Fenobarbital	α -tokoferol	jaterní epiteliální buňky myši	Cx32	37
PMA	apigenin, epikatechin, ginsenosid Rb ₂ , karotenoidy, retinoidy, resveratrol, tangeretin	jaterní epiteliální buňky potkanů, fibroblasty myši a křečků	Cx43	30,31, 32,34, 37
Pentachlorfenol	extrakt ze zeleného čaje	myši játra	Cx26, Cx32	38

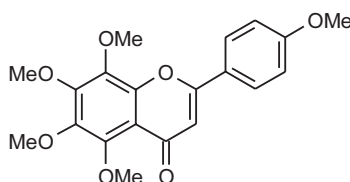
Tabulka III

Látky přírodního původu stimulující GJIC v normálních nebo neoplastických buňkách

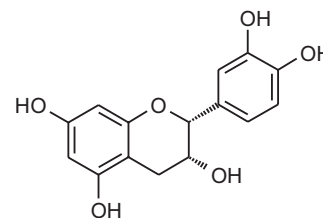
Buněčná tkáň	Látka	Konexin	Lit.
Lidské bronchiální epiteliální buňky	kyselina retinová	Cx32	39
Lidské fetální fibroblasty	lykopen, kyselina retinová	Cx43	40
Lidský neuroblastom	kyselina retinová	Cx43	41
Lidský karcinom prostaty	lykopen	Cx43	42
Myši sarkom, myši fibroblasty	retinoidy, karotenoidy	Cx43	43
Ras-transformované jaterní epiteliální buňky potkanů	2-fenylethylester kyselina kávové	Cx43	24
Jaterní epiteliální buňky potkanů	α - a β -karoten, lykopen	Cx26, Cx32	44
Lidské kožní fibroblasty	vitamin D ₃	Cx43	45



II



III



IV

Bohatým zdrojem polyfenolů tzv. katechinů je zelený čaj (*Camellia sinensis*). Obsahuje celou škálu látek s chemoprotektivní aktivitou působících proti rozvoji řady nádorů. Protektivní efekt je zprostředkován zejména silnou antioxidační aktivitou čajových polyfenolů, které jsou schopny redukovat superoxidový a hydroxylový radikál. Složky čaje jsou schopny, kromě iniciační, ovlivňovat také promoční fázi karcinogenního procesu. Snižují proliferaci buněk, podporují mezibuněčnou komunikaci, inhibují telomerasu, indukují apoptózu a z mnoha dalších účinků byla popsána i inhibice angiogeneze. Také zvyšují hladinu některých enzymů a indukují cytochrom P450, což hraje důležitou roli v buněčné detoxikaci některých kancerogenů⁴⁸.

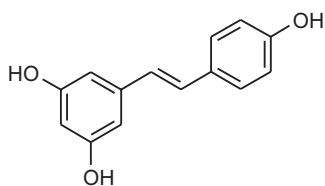
Kang a spol.³⁴ sledovali vliv epikatechinu, epikatechin-gallátu a epigallocatechin-gallátu na uzavření mezerových spojů vyvolané PMA a H₂O₂ v potkaních epiteliálních buň-

kách WB-F344 v modelu *in vitro*. Ačkoliv se již dříve objevilo několik zmínek o antikancerogenních účincích testovaných katechinů, pouze epikatechin (IV) obnovoval permeabilitu GJIC. Silnější účinek se projevil při inhibici GJIC vyvolanou PMA nežli H₂O₂. Epikatechin brání fosforylaci konexinu 43 v buněčné linii WB-F344 s vysokou hladinou mezerových spojů tvořených konexinem 43 (cit.⁴⁹). Jiná studie potvrzuje též preventivní účinek epigallocatechin-gallátu a epikatechin-gallátu na uzavření mezerových spojů indukovaných dalším modelovým inhibitorem DDT v buňkách WB-F344, jehož efekt souvisí s fosforylací konexinu 32 i 43 (cit.³⁵).

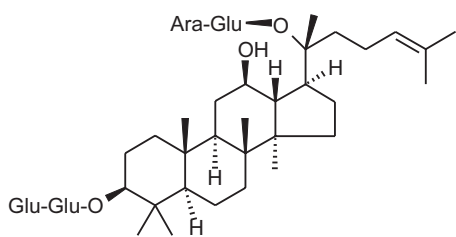
Vliv zeleného čaje na GJIC byl rovněž studován *in vivo*³⁸. Modelovým tumorovým promotorem byl v tomto případě pentachlorfenol (PCP), který byl aplikován myším po dobu 2 týdnů. PCP způsobuje oxidační poškození jaterní DNA spojené s redukcí počtu konexinů 32 v jaterní tkáni. Extrakt ze

zeleného čaje byl myším aplikován v infuzi po dobu 3 týdnů. Současná aplikace PCP a čajového extraktu vykazovala nižší inhibiční mezibuněčné komunikace. Autoři se též domnívají, že inhibice mezerových spojů může být vyvolána oxidačním stresem způsobeným PCP a aplikace antioxidantů tak chrání konexiny před oxidačním poškozením.

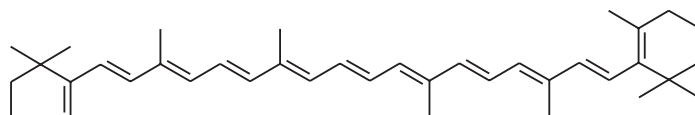
V současnosti je velice diskutovanou látkou *trans*-resveratrol (V). Jde trihydroxystilben patřící mezi rostlinné fytoalexiny. Vyskytuje se ve vysoké koncentraci v oplodí hroznů révy vinné (*Vitis vinifera*), řadě druhů zeleniny a ořechách. Vykazuje silné antioxidační a antimutagenní účinky, působí protizánětlivě, zabráňuje agregaci trombocytů⁵⁰. Antikancerogenní efekt je způsoben inhibicí celé řady markerů účastnících se procesu kancerogeneze⁵¹. Resveratrol blokuje proliferaci promyelomatózní buněčné linie HL-60 a indukuje diferenciaci myelomonocytárního fenotypu. Inhibuje několik biomarkerů indukovaných PMA jako je proteinkinasa C, inhibuje cyklooxygenasu-2 a vyvolává tvorbu volných radikálů v nádorových buňkách HL-60 (cit.⁵²). Resveratrol je silným inhibitorem cytochromu P450 (izoformy 1A1) zodpovědného za oxidativní metabolismus mnoha kancerogenů. Indukuje enzymy II. fáze detoxikace jako jsou NAD(P)H nebo chinonoxidoreduktasa⁵³. Vliv resveratrolu na GJIC byl sledován v nenádorové buněčné linii WB-F344 *in vitro*. Uzavření mezerových spojů bylo vyvoláno dvěma typy promotorů kancerogeneze PMA, jak už bylo zmíněno; jeho účinek souvisí s fosforylací konexinu 43 a DDT, který způsobuje snížení hladiny fosforylované formy konexinu 43. Resveratrol v koncentraci nad 10 μM statisticky významně potlačoval inhibici GJIC vyvolanou oběma typy promotorů³².



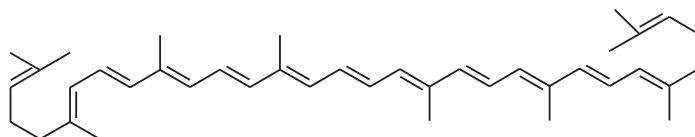
V



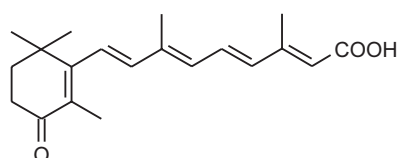
VI



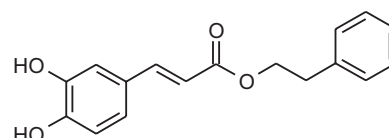
VIII



IX



VII



X

Další látkou přírodního původu, která vykazuje antitumorogenní aktivitu, je ginsenosid Rb₂. Ginsenosidy jsou sekundární metabolity ze skupiny triterpenoidních saponinů, izolované z *Panax ginseng* (Araliaceae). Zejména ginsenosidy Rb₁, Rb₂ či Rc jsou označovány jako antikancerogeny, ale jejich mechanismus účinku nebyl plně objasněn. U celé řady ginsenosidů byl studován vliv na GJIC. Pouze ginsenosid Rb₂ (VI) jevil tumorprotektivní účinek na mezerové spoje inhibované PMA a H₂O₂ v epiteliálních buňkách WB-F344 (cit.³⁴). Naopak řada ginsenosidů např. Rd₂, Rh₂, Ra₁ inhibovala GJIC v lidské endoteliální buněčné linii (HÜVEC)³⁵.

Významné antikancerogenní působení vykazují také karotenoidy. Jde o velkou skupinu přírodních lipofilních pigmentů nacházejících se zejména v ovoci, zelenině, léčivých rostlinách, ale sekundárně se vyskytujících i v živočišné říši⁵⁴. V organismu jsou karotenoidy metabolizovány 15,15'-dioxygenasou na retinoidy, rozštěpením dvojné vazby v poloze 15. Jak karotenoidy, tak retinoidy ovlivňují mezibuněčnou komunikaci skrze mezerové spoje⁵⁵. Strukturálně rozdílné karotenoidy mají rozdílné účinky na GJIC. Karotenoidy s šestičlenným kruhem jsou obvykle dvakrát aktivnější než jejich pětičlenné analogy. Poloha a charakter substituentů na šestičlenném kruhu se zdají mít malý vliv na jejich aktivitu⁵⁶.

Zhang a spol.⁴³ testovali vliv karotenoidů na chemicky indukovanou neoplastickou transformaci v myších fibroblastech 10T1/2. Nejsilnější stimulace GJIC se projevila u α -tokoferolu, ale také u β -karotenu, kanthaxanthinu, luteinu, lykopenu a α -karotenu.

Studie Stahla a Siese³⁷ potvrzuje stimulační účinek β -karotenu, kanthaxanthinu a navíc připojují echinenon, kryptoxanthin a 4-hydroxy- β -karoten jako schopné induktory GJIC v myších fibroblastech. Zejména kanthaxanthin, nacházející se v mořských plodech a některých houbách, a jeho rozkladné produkty (zejména kyselina 4-oxoretinová, VII), stimulují GJIC a expresi konexinu 43 mRNA⁴⁰. Další práce poukazuje zvláště na lykopen obsažený v rajčatech, melounech a rostlinných olejích jako potenciální inhibitor nádorového bujení⁵⁷.

Konzumace rajčat a rajčatových produktů byla epidemiologicky spojována s preventivním účinkem proti rakovině prostaty. Studie *in vitro* potvrzují tento předpoklad, lykopen jednak stimuluje mezerové spoje⁴², dále působí na buněčný růst a v kombinaci s α -tokoferolem inhibuje proliferaci buněk karcinomu prostaty⁴⁰.

Vliv některých karotenoidů na mezerové spoje byl testován i *in vivo*. β -Karoten (*VIII*) a lykopen (*IX*) účinkovaly v závislosti na dávce. V dávce 50 mg.kg⁻¹ tělesné váhy vyvolávaly inhibici GJIC, zatímco dávka 5 mg.kg⁻¹ vedla ke stimulaci GJIC v jaterní tkáni laboratorních potkanů⁴⁴.

Další látkou přírodního původu, u které byl zjištěn stimulační efekt na GJIC, je 2-fenylethylester kyseliny kávové (*X*) (CAPE)²⁴. CAPE je aktivní složkou propolisu vykazujícího protizánětlivé, antivirové a antikancerogenní vlastnosti. Byl zjišťován vliv CAPE na tumorové jaterní GJIC-deficientní buňky transformované ras onkogenem (WB-ras2). Výsledky ukazují, že CAPE regeneruje mezerové spoje na základě fosforylace konexinu 43. Normální lokalizace mezerových spojů v plazmatické membráně WB-ras2 buněk byla sledována třetí den po aplikaci této látky v koncentraci 5 μ g.ml⁻¹.

Mezi další biogenní inhibitory promoce kancerogeneze patří také vitamin D₃ (cholecalciferol) stimulující GJIC v liniích lidských kožních fibroblastů 161BR (cit.⁴⁵). Vitamin E (α -tokoferol) brzdí inhibici GJIC navozenou volnými kyslíkovými radikály, DDT, lindanem i fenobarbitalem v jaterních epitelálních buňkách myši a potkanů a děložních myocytech potkanů¹.

5. Závěr

Vzhledem k tomu, že v dnešní době existuje velké riziko vzniku nádorových onemocnění, rozvíjí se snaha o nalezení nových, bezpečných látek s chemopreventivní aktivitou. Pozornost se také obrací do oblasti přírodních látek, z nichž řada má schopnost modulovat GJIC. Stimulace GJIC v nádorových buňkách má několik užitečných terapeutických účinků zahrnujících snížení buněčné proliferace, vzrůst diferenciaci, zvýšení schopnosti apoptózy a též podporu radiační terapie a chemoterapie. I když je zde stále ještě řada nevyřešených otázek, zdá se, že prevence inhibice GJIC může být jednou z možností racionální preventivní terapie nádorového bujení.

LITERATURA

- Trosko J. E., Ruch R. J.: *Front. Biosci.* 3, 208 (1998).
- Hofmanová J., Machala M., Kozubík A.: *Folia Biol. (Prague)* 46, 165 (2000).
- De Maio A., Vega V. L., Contreras J. E.: *J. Cell. Physiol.* 191, 269 (2002).
- Husoy T., Cruciani V., Sanner T., Mikalsen S.: *Carcinogenesis* 22, 221 (2001).
- Kidder G. M., Winterhager E.: *Front. Biosci.* 6, 53 (2001).
- Yamasaki H., Krutovskikh V., Mesnil M., Tanaka T., Zaidan-Dagli M. L., Omori Y.: *C. R. Acad. Sci., Vie Sci.* 322, 151 (1999).
- Musil L. S., Goodenough D. A.: *Cell* 74, 1065 (1993).
- Bruzzone R., White T. W., Paul D. L.: *Eur. J. Biochem.* 238, 1 (1996).
- Jongen W. M. F., Fitzgerald D. J., Asamoto M., Piccoli C., Slaga T. J., Gros D., Takeichi M., Yamasaki H.: *J. Cell Biol.* 114, 545 (1991).
- Saez J. C., Berthoud V. M., Moreno A. P., Spray D. C.: *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 27, 163 (1993).
- Upham B. L., Kang K. S., Cho H. Y., Trosko J. E.: *Carcinogenesis* 18, 37 (1997).
- Ruch R. J., Klaunig J. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94, 427 (1988).
- Yamasaki H.: *Mutat. Res.* 365, 91 (1996).
- Lampe P. D., Lau A. F.: *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 205 (2000).
- Ruch R. J., Trosko J. E.: *J. Cell Biochem.* 83, 163 (2001).
- Tian W., Zhang Z.: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, 593 (2000).
- Ren P., Mehta P. P., Ruch R. J.: *Carcinogenesis* 19, 169 (1998).
- Combes R. D.: *Toxicol. in Vitro* 14, 387 (2000).
- Warn-Cramer B. J., Cottrell G. T., Burt J. M., Lau A. F.: *J. Biol. Chem.* 273, 9188 (1998).
- Lau A. F., Kanemitsu M. Y., Kurata W. E., Danesh S., Boynton A. L.: *Mol. Biol. Cell* 3, 865 (1992).
- Upham B. L., Weis L. M., Trosko J. E.: *Environ. Health Perspect.* 106, 975 (1998).
- Ruch R. J., Madhukar B. V., Trosko J. E., Klaunig J. E.: *Mol. Carcinog.* 7, 50 (1993).
- Nicolai S., Sies H., Stahl W.: *Biochem. Pharmacol.* 53, 1553 (1997).
- Na H. K., Wilson M. R., Kang K. S., Chang C. C., Grunberger D., Trosko J. E.: *Cancer Lett.* 157, 31 (2000).
- El-Fouly M. H., Trosko J. E., Chang C. C.: *Exp. Cell Res.* 168, 422 (1987).
- Rivedal E., Mikalsen S. O.: *Toxicol. in Vitro* 14, 185 (2000).
- Trosko J. E., Chang C. C.: *Mutat. Res.* 480, 219 (2001).
- Ren P., De Feijter A. W., Paul D. L., Ruch R. J.: *Carcinogenesis* 15, 1807 (1994).
- Trosko J. E., Goodman J. I.: *Mol. Carcinog.* 11, 8 (1994).
- Chaumontet C., Bex V., Gaillard-Sanchez I., Seillan-Heberden C., Suschetet M., Martel P.: *Carcinogenesis* 15, 2325 (1994).
- Chaumontet C., Droumaguet C., Bex V., Heberden C., Gaillard-Sanchez I., Martel P.: *Cancer Lett.* 114, 207 (1997).
- Nielsen M., Ruch R. J., Vang O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 804 (2000).
- Sigler K., Ruch R. J.: *Cancer Lett.* 69, 15 (1993).
- Kang K. S., Kang B. C., Lee B. J., Che J. H., Li G. X., Trosko J. E., Lee Y. S.: *Cancer Lett.* 152, 97 (2000).
- Zhang Y. W., Dou D. Q., Zhang L., Chen Y. J., Yao X. S.: *Planta Med.* 67, 417 (2001).
- Krieger T. R., Loch-Carusio R.: *Biol. Reprod.* 64, 537 (2001).
- Stahl W., Sies H.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 354 (1998).
- Sai K., Kanno J., Hasegawa R., Trosko J. E., Inoue, T.: *Carcinogenesis* 21, 1671 (2000).
- Albright C. D., Grimley P. M., Jones R. T., Resau J. H.: *Exp. Mol. Pathol.* 72, 62 (2002).
- Stahl W., Laar J., Martin H.-D., Emmerich T., Sies H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 271 (2000).

41. Carystinos G. D., Alaoui-Jamali M. A., Phipps J., Yen L., Batist G.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* **47**, 126 (2001).
42. Kucuk O., Sarkar F. H., Sakr W., Djuric Z., Pollak M. N., Khachik F., Li Y. W., Banerjee M., Grignon D., Bertram J. S., Crissman J. D., Pontes E. J., Wood D. P.: *Cancer Epidemiol. Biomar.* **10**, 861 (2001).
43. Zhang L. X., Cooney R., Bertram J. S.: *Carcinogenesis* **12**, 2109 (1991).
44. Krutovskikh V., Asamoto M., Takasuka N., Murakoshi M., Nishino H., Tsuda H.: *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 1121 (1997).
45. Clairmont A., Tessmann D., Stock A., Nicolai S., Stahl W., Sies H.: *Carcinogenesis* **17**, 1389 (1996).
46. Surh Y. J.: *Mutat. Res.* **428**, 305 (1999).
47. Chaumontet C., Suschetet M., Honikman-Leban E., Krutovskikh V. A., Berges R., Le Bon A. M., Heberden C., Shahin M. M., Yamasaki H., Martel P.: *Nutr. Cancer* **26**, 251 (1996).
48. Kuroda Y., Hara Y.: *Mutat. Res.* **436**, 69 (1999).
49. Ale-Agha N., Stahl W., Sies H.: *Biochem. Pharmacol.* **63**, 2145 (2002).
50. Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P. Y., Jameson J. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14138 (1997).
51. Jang M., Pezzuto J. M.: *Drugs Exp. Clin. Res.* **25**, 65 (1999).
52. Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M.: *Science* **275**, 218 (1997).
53. Surh Y. J.: *Mutat. Res.* **428**, 305 (1999).
54. Mangels A. R., Holden J. M., Beecher G. R., Forman M. R., Lanza E.: *J. Am. Diet. Assoc.* **93**, 284 (1993).
55. Teicher V. B., Kucharski N., Martin H.-D., Saag P., Sies H., Stahl W.: *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 150 (1999).
56. Stahl W., Ale-Agha N., Polidori M. C.: *Biol. Chem.* **383**, 553 (2002).
57. Gerster H.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **63**, 93 (1993).

S e z n a m z k r a t e k

Ara	arabinoza
CAPE	2-fenylethylester kyseliny kávové
Cx	konexin

DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorofenyl)ethan
DPPD	<i>N,N'</i> -difenyl-1,4-fenyldiamin
ERKs	kinasy regulované mimobuněčnými signály
FRAP	(fluorescence redistribution after photobleaching)
GJIC	(gap junctional intercellular communication) – mezibuněčná komunikace mezerovými spoji
Glu	glukosa
HUVEC	lidská endoteliální buněčná linie
MAPKs	kinasy aktivované mitogeny
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCP	pentachlorfenol
PKC	proteinkinasa C
PMA	forbol-12-myristát-13-acetát
RT-PCR	reverzně transkripční polymerasová řetězová reakce
SL/DT	(scrape loading/dye transfer)

H. Forejtníková and R. Kubínová (*Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Natural Compounds as Stimulators of Gap-junctional Intercellular Communication**

Both epigenetic and mutagenic events influence the process of carcinogenesis. Any mutagenic event irreversibly alters the genomic information of the cell. Epigenetic activities of compounds do not damage genes directly, but they can alter the gene expression. The most important consequences include alteration of cell proliferation, differentiation, or apoptosis. One of them, which apparently link to the promotion of carcinogenesis is the inhibition of gap-junctional intercellular communication (GJIC) *in vitro*. These gap junctions allow ions and low-molecular-weight molecules to move between coupled cells, thereby facilitating synchronization of electrotonic or metabolic cooperation. Transient down-regulation by endogenous or exogenous chemicals can bring about adaptive or maladaptive consequences depending on circumstances. Tumor promoters (e.g. DDT) and growth factors reduce GJIC, whereas anticarcinogens and growth inhibitors (e.g., flavonoids, resveratrole, carotenoids) enhance GJIC. Prevention of inhibition of GJIC could be an important chemopreventive strategy of cancer therapy.