

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLÓGIE A TOXIKOLÓGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**VPLYV STIMULÁCIE PLACENTÁRNYCH BUNIEK IN VITRO A EX VIVO
NA EXPRESIU VYBRANÝCH ABC A OATP TRANSPORTÉROV**

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 14.09.2020

Simona Dudičová

Pod'akovanie:

Nesmierna vd'aka patrí mojej školiteľke doc. PharmDr. Martine Čečkovej, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady, konzultácie, trpezlivosť a za pomoc počas celého spracovania mojej diplomovej práce. Veľká vd'aka patrí aj Mgr. Simone Suchej a PharmDr. Alešovi Šorfovi, Ph.D. za pomoc s experimentálnou časťou mojej diplomovej práce a taktiež so spracovaním a vyhodnotením predbežných výsledkov. V neposlednom rade ďakujem celej svojej rodine, priateľom a blízkym za neustálu podporu počas celého štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Simona Dudičová

Školiteľ: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vplyv stimulácie placentárnych buniek in vitro a ex vivo na expresiu vybraných ABC a OATP transportérov

Placenta je orgánom, ktorý hrá kľúčovú úlohu v priebehu celého tehotenstva pre správny vývin plodu. Jednou z dôležitých funkcií, ktoré placenta poskytuje, je transport látok medzi matkou a plodom. Tento prestup látok umožňujú prevažne membránové transportéry, ktoré sa nachádzajú na apikálnej a bazálnej membráne syncytiotrofoblastu. Počas rôznych fyziologických alebo patologických zmien v ľudskom tele sa ich expresia a množstvo môže meniť. S týmito zmenami súvisia aj zápalové reakcie, ktoré sa môžu v tehotenstve vyskytnúť, a preto sme sa touto problematikou zaoberali a domnievali, že tento stav môže zmeniť expresiu placentárnych transportérov.

Cieľom tejto práce bolo skúmať expresiu zmeny membránových prenášačov pomocou placentárnych buniek na BeWo bunkovej línii a placentárnych vilózných explantoch, ktoré boli stimulované prozápalovými mediátormi. Skúmala sa zmena expresie jednotlivých vybraných placentárnych transportérov zo skupiny ATP-dependentných proteínov, konkrétne *ABCB1* a *ABCG2*, aj z rodiny tzv. SLC transportérov, konkrétne *SLCO1A2*, *SLCO2A1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1*, *SLCO1B3*, *SLCO2B1*.

Na základe našich vyhodnotených dát je pravdepodobné, že prozápalová stimulácia nevedla obecné k štatisticky významnému ovplyvneniu expresie

placentárnych ABC a OATP transportérov. Napriek tomu, výsledky v našej práci naznačujú možný nárast expzie génov pre *ABCG2* a niektoré z OATP transportérov, hlavne tých, ktorí sú zapojení v transporte prostaglandínov, ak je placentárne tkanivo stimulované pomocou prozápalových cytokínov IL-6 či INF γ . Tieto výsledky by si žiadali overenie pomocou ďalšieho placentárneho modelu, a to predovšetkým na úrovni vlastných membránových proteínov a ich funkcií.

Kľúčové slová: placenta, stimulácia, transportér

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Simona Dudičová

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of in vitro and ex vivo placental cells stimulation on expression of selected ABC and OATP transporters

The placenta is an organ that plays a key role throughout pregnancy for proper fetal development. One of the important functions provided by the placenta is the transport of substances between the mother and the fetus. This transfer of substances enabled mainly by membrane transporters, which are located on the apical and basal membranes of the syncytiotrophoblast. During various physiological or pathological changes in the human body, their expression and amount can vary significantly. Inflammatory reactions that may occur during pregnancy are also related to these changes, and therefore we have addressed this issue and believed that this condition may alter the expression of placental transporters.

The aim of this work was to investigate the changes in the expression of membrane transporters using placental cells on BeWo cell lines and placental villous explants that were stimulated by pro-inflammatory mediators. The change in the expression of individual ATP-binding cassettes, namely *ABCBI*, *ABCG2*, and solute carrier transporters *SLCO1A2*, *SLCO2A1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1*, *SLCO1B3*, *SLCO2B1* was examined in the human placenta.

Based on our evaluated data, we can conclude that the pro-inflammatory stimulation did not in general lead to a statistically significant effect on the expression of placental ABC and OATP transporters. Nevertheless, the results of this preliminary

work indicate possible increase in the expression of *ABCG2* and some of the OATP transporters, mainly those involved in transport of prostaglandins, when the placental tissue is exposed to potent pro-inflammatory stimulators such as IL-6 and INF γ . These results would, however, call for verification using another placental model, and verifying the level of the membrane proteins and their functions.

Keywords: placenta, stimulation, transporter

OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK	10
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČASŤ	14
2.1 Placenta.....	14
2.1.1 Štruktúra placenty	14
2.1.2 Funkcie placenty	16
2.1.3 Mechanizmy placentárneho transportu.....	17
2.2 Transportné proteíny v placente	19
2.2.1 ABC transportéry.....	20
2.2.1.1 P-glykoproteín (ABCB1, P-gp, MDR1).....	22
2.2.1.2 Breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)	23
2.2.1.3 Multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2).....	23
2.2.2 SLC transportéry.....	24
2.2.2.1 OATP transportéry	26
2.3 Predčasný pôrod.....	28
2.4 Chorioamnitída	29
2.5 Prehľad prozápalových mediátorov	31
2.6 Modely využívané pri štúdiách placentárneho transportu	34
3 CIEĽ PRÁCE.....	36
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	37
4.1 Materiál a chemikálie.....	37
4.2 Použitý biologický materiál	38

4.3	Metodika	38
4.3.1	Kultivácia bunčových línií BeWo b30	38
4.3.2	Prozápalová stimulácia BeWo b30	39
4.3.3	Kultivácia a prozápalová stimulácia placentárnych explantov	39
4.3.4	Izolácia RNA	40
4.3.5	Reverzná transkripcia	42
4.3.6	qRT – PCR.....	42
4.3.7	Stanovenie hCG (ELISA test).....	45
4.4	Štatistická analýza.....	48
5	VÝSLEDKY	49
5.1	Výsledky expresie transportérov	49
5.1.1	Expresia ABC transportérov po stimulácii prozápalovými cytokínmi v bunčovej línií BeWo.....	49
5.1.2	Výsledky expresie OATP transportérov	50
5.2	Výsledky zmeny produkcie hCG placentárnych explantov.....	53
5.3	Expresia študovaných transportérov na placentárnych explantoch	54
5.3.1	Expresia ABC transportérov v placentárnych explantoch	54
5.3.2	Expresia OATP transportérov v placentárnych explantoch.....	55
6	DISKUSIA	57
7	ZÁVER	61
8	LITERATÚRA	62

ZOZNAM SKRATIEK

ABC	ATP-binding cassette, ATP-dependentný transportný membránový proteín
API	aqua pro injectione, voda pre prípravu injekcií
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1, P-glykoproteín, (P-gp, MDR1)
ABCC2	multidrug resistance protein 2, membránový proteín z C rodiny ABC transportérov (MRP2)
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2, Breast cancer resistance protein, proteín rezistencie na rakovinu prsníka, (BCRP)
ATP	adenozíntrifosfát
Ct	cycle of threshold, cyklus prekročenia prahu fluorescencie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, rastové médium cicavčích bunkových línií
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	teplom inaktivovaný kmeň baktérie <i>Escherichia coli</i>
hCG	human chorionic gonadotropin, ľudský choriový gonadotropín
HMGB1	High-mobility group box 1 protein
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin 6
INF γ	interferon gamma
LPS	lipopolysacharid
PBS	fosfátový pufer

qRT - PCR	quantitative real time polymerase chain reaction, kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RT	reverse transcription, reverzná transkripcia
MDR	multidrug resistance, mnohopočetná lieková rezistencia
MM	TaqMan™ Universal Master Mix II
MRP	multidrug resistance-associated protein, proteíny rodiny ABCC transportérov
NBD	doména viažúca nukleotidy
SLC	solute carrier transporters, transportéry solutov
SLCO	solute carrier organic anion transporter
TMD	transmembránová doména
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

1 ÚVOD

Tehotenstvo je dôležitý stav, počas ktorého sa v tele matky vyvíja plod. Normálna dĺžka tehotenstva trvá 280 dní +/- 14 dní, t.j. 40. týždňov +/- 2. týždne. Za predčasný pôrod sa považuje pôrod pred 37. týždňom tehotenstva. Až 11,4 % zo všetkých tehotenstiev končí predčasným pôrodom. Celosvetovo to je viac ako 1 z 10 tehotenstiev. Predčasný pôrod môže viesť k zvýšenej morbidite a mortalite detí. Existuje aj množstvo iných faktorov, ktoré môžu tehotenstvo ovplyvniť alebo ohroziť. Pre adekvátny a optimálny vývoj plodu je dôležitá správna funkcia a rola placenty a placentárnych membránových transportérov.

Placenta je dočasným orgánom, ktorý sa nachádza a vyvíja v maternici ženy počas tehotenstva. Plní množstvo podstatných funkcií a spája vyvíjajúci sa plod s matkou. Jednou z hlavných funkcií placenty, ktorá hrá kľúčovú úlohu pre zdravie plodu a matky, je transportná funkcia. Pri transporte molekúl medzi matkou a plodom funguje placenta ako absorpčný a vylučovací orgán. Pre plod poskytuje stabilný prísun živín a slúži k odstraňovaniu metabolitov a odpadných produktov. Táto transportná schopnosť je spojená s činnosťou membránových transportérov, ktoré sú v placente lokalizované na apikálnej alebo bazálnej membráne syncytiotrofoblastu (*Staud & Ceckova, 2015*).

ABC transportéry fungujú ako efluxné transportéry, ktoré pre svoje fungovanie využívajú hydrolýzu ATP. Predovšetkým chránia plod, tým že obmedzujú prestup potenciálne škodlivých látok cez placentu smerom k plodu, a taktiež pomáhajú odvádzať metabolity smerom do krvi matky. SLC transportéry sú prevažne sekundárne aktívne transportéry, ktoré sú zväčša no nie výlučne, transportérmi absorpcie. Zaisťujú prestup nutrientov a ďalších esenciálnych látok dôležitých pre rast, vývoj plodu a pri samotnej funkcii placenty (*Staud & Ceckova, 2015; Nigam, 2015; Ceckova-Novotna et al., 2006*).

Rôzne fyziologické alebo patologické zmeny v priebehu tehotenstva so sebou môžu niesť riziko potenciálneho ovplyvnenia expresie a aktivity membránových prenášačov (*Staud & Ceckova, 2015*). Zápal a infekcia patria medzi patofyziologické

stavy, ktoré sa pomerne často v tehotenstve vyskytujú a hrozí v ich dôsledku práve ovplyvnenie transportnej funkcie placenty (*Bloise et al., 2016*).

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu zmeny génovej expresie vybraných placentárnych membránových transportérov pomocou prozápalových mediátorov s využitím placentárnej bunkovej línie BeWo a kultivácií vilózných explantov ľudských placent.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Placenta

Placenta je jedným z najdôležitejších ľudských orgánov nielen pre zdravie plodu a ženy počas tehotenstva, ale aj pre ich celoživotné zdravie. Napriek svojej kľúčovej úlohe v zdraví tehotnej ženy a plodu je bohužiaľ stále najmenej chápaným ľudským orgánom s množstvom nedostatočných informácií nielen v oblasti fyziologickej funkcie, ale predovšetkým v tom, ako sa chová v okamihu vývoja niektorých patofyziologických stavov (*Guttmacher et al., 2014*).

Placenta je prechodným orgánom, ktorý spolu s plodovými membránami a plodovou vodou podporuje normálny rast a vývoj plodu. Rast a funkcia placenty je presne regulovaný a koordinovaný proces. Akékoľvek zmeny pri vývoji placenty alebo pri jej fungovaní majú dramatické až fatálne účinky na plod (*Gude et al., 2004*). Placenta dorastá až do 36. – 38. týždňa tehotenstva, má kruhovitý tvar a hubovitú konzistenciu. Súčasne je poskytovateľom záznamu vnútromaternicového prostredia v ktorom sa plod vyvíja. Po pôrode nám poskytuje možnosť študovať a skúmať ju ako celok (*Čech et al., 2006*).

2.1.1 Štruktúra placenty

Tvar a štruktúra placenty, viažúca sa na maternicovú stenu, sa medzi rôznymi druhmi líšia. Ľudská placenta má diskoidálnu a hemochoriálnu štruktúru a obsahuje fetálnu aj materskú krv (*Zhang et al., 2019*).

Placentárna jednotka sa skladá jednak z fetálneho tkaniva, ktoré pochádza z chorionického vaku a taktiež z materského tkaniva pochádzajúceho z endometria. (*Gude et al., 2004*). Fetálne tkanivo (*pars fetalis placentae*) smeruje k plodu a je tvorené chorionovou platničkou (*chorion frondosum*). Zatiaľ čo materské tkanivo (*pars materna placentae*) je orientované k maternici a je tvorené decíduálnou platničkou (*decidua basalis*). Medzi týmito dvoma oblasťami sa nachádza intervalózný priestor vyplnený materskou krvou. Decíduálne septá, vytvorené decíduálnou

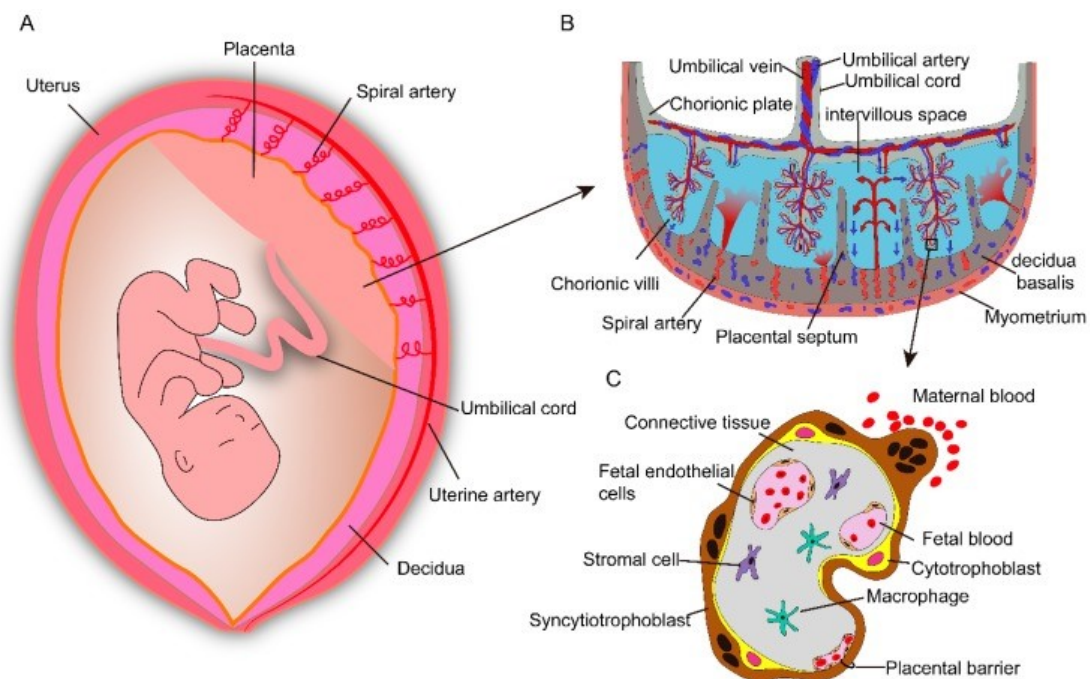
platničkou, rozdeľujú placentu do samostatných funkčných celkov známych ako kotyledóny (Čech et al., 2006).

V každom kotyledóne sa nachádza strom choriových klkov (Ceckova-Novotna et al., 2006), kde je fetálna krv uzavretá vo fetálnych cievach, a tým oddelená od materskej krvi, ktorá je do intervilózneho priestoru vstrekováná z decíduálnych spirálnych artérií a klky obmýva (Obr. 1A,B). Práve na povrchu choriových klkov dochádza k výmene živín a odpadových látok medzi matkou a plodom (Gude et al., 2004).

Fetálne membrány plodu sa skladajú z amnionu, ktorý sa orientuje na plod a choriónu orientovaného na matku. Amnion obsahuje päť rôznych vrstiev kde najvnútornejšou vrstvou je samotný amniotický epitel, ktorý je v priamom kontakte s plodovou vodou. Chorion sa skladá z retikulárnej vrstvy, bazálnej membrány a trofoblastovej bunkovej oblasti. Fetálne membrány nakoniec podliehajú programovanej ruptúre počas poslednej fázy tehotenstva. Taktiež ako placenta aj fetálne membrány hrajú dôležitú úlohu počas tehotenstva a pri vývoji plodu (Gude et al., 2004).

Spočiatku sa placentárna bariéra skladá zo štyroch vrstiev, syncytiotrofoblastu, vrstiev cytotrofoblastových buniek a spojivového tkaniva klkov a endotelu (Obr. 1C). V priebehu tehotenstva placenta prechádza niekoľkými zmenami. Neskôr sa bunková vrstva cytotrofoblastov mnohých choriových klkov zoslabuje, mizne a stáva sa až extrémne tenkou, kde syncytiotrofoblast prichádza do blízkeho kontaktu s endotelom plodu (Gude et al., 2004). Celkovo sa placentárna bariéra časom stáva tenšou (Al-Enazy et al., 2017).

Placenta je jediným miestom kontaktu medzi fetálnym a materským krvným obehom (Huppertz, 2008). Krvný obeh plodu je rozdielny od krvného obehu dospelých jedincov a je prispôsobený tak, aby zaisťoval okysličovanie krvi plodu priamo v placente. Fetálna krv je odvádzaná z tela plodu pomocou dvoch umbilikárnych artérií, ktoré nesú odkysličenú krv a vedú až k placente kde sa rozvetvujú až na kapiláry terciárnych klkov. Kapiláry prechádzajú do venózných ciev, ktoré sa postupne spájajú v jednu umbilikárnu venu nosiacu okysličenú krv (Obr. 1B) (Čech et al., 2006).



Obr. 1: Schematické znázornenie anatomickej stavby ľudskej placenty. **A** – plod spojený pomocou pupočnej šnúry s placentou; **B** – anatomická štruktúra a zloženie ľudskej placenty; **C** – hlavné typy buniek a placentárna bariéra zložené zo syncytiotrofoblastov, cytotrofoblastov a fetálnych endoteliálnych buniek.

Prevzaté z: Zhang et al., 2019.

2.1.2 Funkcie placenty

Placenta je jedinečný orgán, na ktorom je plod počas svojho vnútromaternicového vývinu absolútne závislý. V priebehu svojej existencie vykonáva mnoho funkcií dôležitých pre vývoj a rast plodu (Burton & Fowden, 2015).

Zabezpečuje výmenu živín a odpadových produktov a je jediným zdrojom výživy a kyslíka pre plod. Metabolizuje množstvo produktov, chráni plod pred určitými xenobiotickými molekulami, infekciami a chorobami matky. Okrem iného uvoľňuje aj hormóny do materského alebo fetálneho obehu, čím ovplyvňuje samotné tehotenstvo, metabolizmus, rast plodu, pôrod a ďalšie funkcie. Počas tehotenstva dochádza k mnohým funkčným zmenám placenty (Gude et al., 2004).

Placentárne tkanivo produkuje tiež množstvo hormónov, ktoré regulujú priebeh tehotenstva. Jedným z nich je choriový gonadotropín (hCG), ktorý má množstvo

funkcií, napr. podpora produkcie progesterónu v luteálnych bunkách, fúzia cytotrofoblastových buniek a diferenciacia a výroba syncytiotrofoblastových buniek, podpora rastu maternice súčasne s rastom plodu, potláčanie kontrakcií myometria v priebehu tehotenstva, rast a diferenciacia pupočnej šnúry, podpora rastu fetálnych orgánov počas tehotenstva a mnoho ďalších (Cole, 2010). Medzi ďalšie hormóny produkované placentou patria aj progesteron, estrogén, placentárny laktogén a iné (Čech et al., 2006).

Placenta čiastočne plní funkciu ochrannej bariéry, tým že obmedzuje priechod xenobiotík a metabolitov k plodu, na druhú stranu pre plod zaisťuje tiež prísun výživových a ďalších esenciálnych látok z materskej krvi. Tieto transportné funkcie sú umožnené aj vďaka expresii transportných proteínov v trofoblaste a vo fetálnych endoteliálnych bunkách (Staud & Ceckova, 2015). Placentárny transport je nevyhnutný pre udržanie homeostázy vo fetálnom kompartmente (Schneider, 1991).

2.1.3 Mechanizmy placentárneho transportu

Akokoľvek endogénne zlúčeniny, xenobiotiká alebo lieky prechádzajúce placentárnou bariérou vstupujúce do fetálneho obehu, musia prechádzať vrstvou syncytiotrofoblastov a cytotrofoblastov, bazálnou membránou a fetálnym kapilárnym endotelom. Tieto zlúčeniny prechádzajúce placentou môžu byť dopravené rôznymi transportnými cestami, ktoré sú závislé alebo nezávislé na priamom dodaní energie (Obr. 2) (Al-Enazy et al., 2017).

Medzi základné typy placentárneho transportu patrí:

Pasívna difúzia

Pasívna difúzia je najčastejším spôsobom prechodu látok cez biologické membrány. Je výhodná pre liečivá lipofilnej povahy, ktorá im umožňuje prechádzať cez fosfolipidovú dvojvrstvu. Prestup látok sa uskutočňuje po koncentračnom gradiente, jedná sa o tzv. pasívny transport bez prítomnosti ATP. Endogénne zlúčeniny môžu touto cestou tiež vstupovať do fetálneho obehu (Al-Enazy et al., 2017).

Facilitovaná difúzia

Facilitovaný transport sa od pasívneho líši tým, že prechod určitých zlúčenín cez placentu je sprostredkovaný bez priamej spotreby ATP po koncentračnom gradiente za pomoci membránových transportných proteínov. Umožnený je aj prestup látok hydrofilnejšej povahy (*Al-Enazy et al., 2017*).

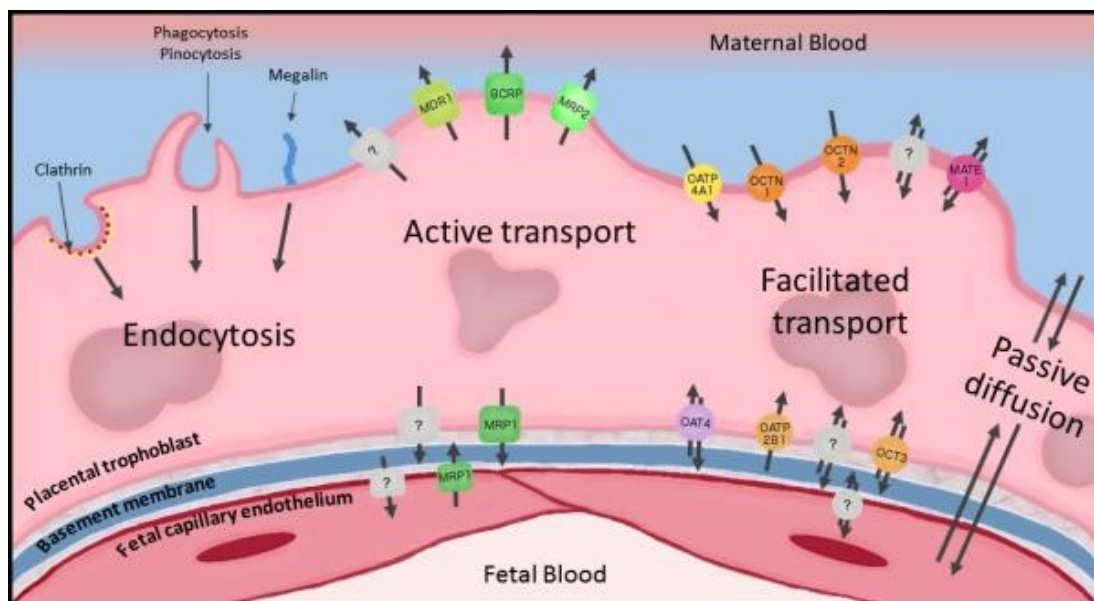
Aktívny transport

Aktívny transport využíva energiu uvoľnenú hydrolýzou ATP proti koncentračnému gradientu. Je sprostredkovaný membránovými prenášačmi, ktoré sú vysoko špecializované pre určitý transport látok. Energeticky závislé liečivá sú do značnej miery riadené hlavne ATP-väzbovými kazetovými proteínmi (ABC transportérm). Transport látok proti koncentračnému gradientu musí byť aktívny, teda spotrebováva energiu, a to buď priamo (primárny aktívny transport) alebo nepriamo (sekundárny aktívny transport) (*Kittnar et al., 2011*).

- *Primárny aktívny transport* – pre svoju prácu potrebuje prítomnú voľnú energiu. Jedná sa o tzv. uniport, zahŕňa spotrebu energie (zvyčajne ATP) na transport látok proti jej elektrochemickému gradientu. Príkladom primárneho aktívneho transportu sú iontové pumpy, napr. Na^+/K^+ pumpa, prítomná prakticky vo všetkých bunkových membránach alebo napríklad ABC (ATP-dependentné) efluxné transportéry, z nich niektorým sa venuje i táto práca (*Stillwell, 2013; Kittnar et al., 2011*).
- *Sekundárny aktívny transport* – samotný transport ATP nespotrebováva, ale pracuje v spojení s iným systémom, pre ktorý je potrebné využitie energie. Ak sa pohyb látok uskutočňuje v rovnakom smere, jedná sa o tzv. symport. Príkladom symportu je transport glukózy. Ak ide o prečerpávanie látok opačným smerom, jedná sa o tzv. antiport. Príkladom je sodíkovo-kalciový výmenník (*Stillwell, 2013; Kittnar et al., 2011*).

Transcelulárny transport

Transcelulárny transport je aktívny proces, ktorý zahŕňa mechanizmus transcytózy závislý na smere transportu látok. Jedná sa buď o transport von z buniek (exocytóza) alebo smerom dovnútra (endocytóza) mechanizmom vychlípenia membrány a tvorbe mechúrka. Endocytózu možno rozdeliť na fagocytózu („bunkové stravovanie“) a pinocytózu („bunkové pitie“) (Al-Enazy et al., 2017; Zang et al., 2019).



Obr. 2: Prehľad hlavných transportných procesov v rámci ľudskej placentárnej bariéry.

Prevzaté: Al-Enazy et al., 2017.

2.2 Transportné proteíny v placente

Placenta je dôležitý orgán, ktorý sprostredkúva výmenu živín a metabolitov medzi plodom a matkou. Dôležitú úlohu pri výmene látok hrajú jednotlivé transportéry, vrátane ATP-viažúcich kazetových transportérov (ABC) a transportérov solutov (SLC), prítomných v bunkových membránach trofoblastu. Niektoré SLC transportéry ako napr. organické aniónové transportéry (OAT) a organické kationové transportéry (OCT) sprostredkujú príjem endogénnych látok. Naopak niektoré ABC transportéry ako napr. P-glykoproteín (P-gp, *ABCB1*), „breast cancer resistance protein“ (BCRP, *ABCG2*) a proteíny spojené s rezistenciou na viaceré lieky (MRP,

ABCC) fungujú ako efluxné transportéry, teda môžu vylučovať svoje substráty zo syncytiotrofoblastov do materského obehu (*Bai et al., 2016*).

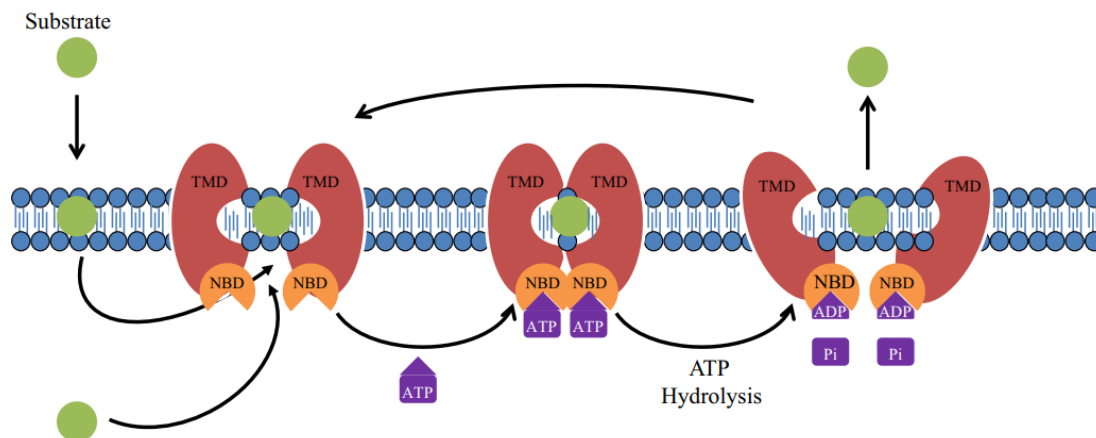
Placentárne transportéry sa nachádzajú jednak v apikálnej membráne trofoblastu, obrátenej smerom k materskej cirkulácii, tak aj na bazálnej membráne obrátenej k fetálnemu obehu a v endoteliálnych bunkách fetálnych ciev placenty. Expresia a aktivita placentárnych transportérov nie sú jednotné počas celej dĺžky tehotenstva. Môžu byť ovplyvnené rôznymi fyziologickými alebo patologickými zmenami v priebehu tehotenstva (*Bai et al., 2016*).

2.2.1 ABC transportéry

Takzvané „ATP-binding cassettes“ sú primárne aktívne transportné proteíny lokalizované v bunkových membránach. Uskutočňujú nevyhnutné bunkové transportné reakcie, a to pri efluxu toxických molekúl ale umožňujú aj transport mnohých ďalších fyziologických substrátov (*Davidson et al., 2008*).

Tieto transportéry tvoria jednu z najväčších rodín membránových proteínov (*Trowitzsch & Tampé, 2018*). Zatiaľ poznáme viac ako 40 ABC proteínov zistených u človeka, ktoré sú rozdelené do 7 podrodín (ABCA až ABCG) (*Wilkens, 2015*). Proteíny ABC, až na pár výnimiek, umožňujú translokáciu rôznych substrátov cez bunkové membrány proti koncentračnému gradientu za spotreby ATP. Túto energiu využívajú na riadenie transportu rôznych molekúl (*Szöllösi et al., 2018*).

Štruktúrne obsahujú všetky transportéry ABC dve transmembránové domény (TMD) a dve nukleotidy viažuce domény (NBD). Sú to tzv. úplné transportéry ale existujú aj polovičné transportéry zložené z jednej TMD a jednej NBD. Tie sa však musia aktivovať vytvorením homodiméru alebo heterodiméru. TMD prebieha konformačnými zmenami aby viazal substrát na jednej strane membrány a uvoľnil ju na druhú. NBD podporuje transport substrátu prostredníctvom väzby a hydrolýzy dvoch molekúl ATP prostredníctvom ATPázy, čím vyvoláva konformačné zmeny v TMD. Účinné spojenie transportu s väzbou ATP vyžaduje prenos substrátu z NBD na TMD (Obr. 3) (*Szöllösi et al., 2018; Chen et al., 2016; Beis, 2015*).



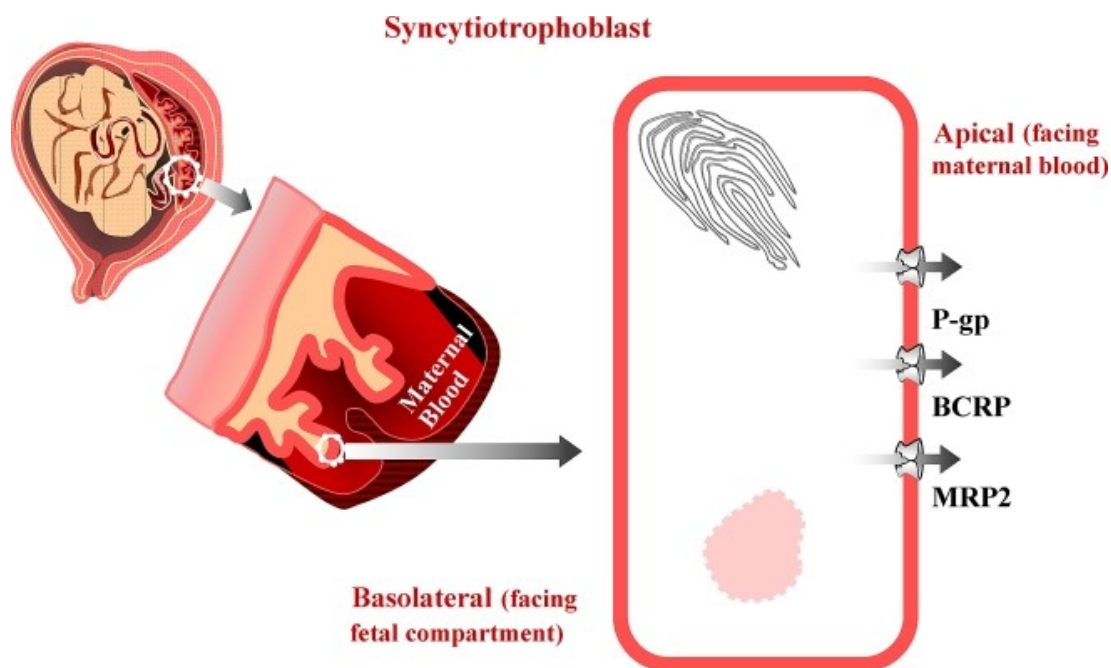
Obr. 3: Mechanizmus aktivácie ABC transportérov. Transportéry ABC sú energeticky závislé transportéry, vykazujú konformačnú zmenu po väzbe na substrát a hydrolyze ATP, ktorá riadi transportný proces substrátu proti koncentračnému gradientu.

Prevzaté z: Chen et al., 2016.

Efluxné membránové transportéry hrajú dôležitú rolu v exporte dôležitých látok vrátane cholesterolu, sterolov, lipidov, žľových kyselín, derivátov kyseliny retínovej, žľovej kyseliny, železa, peptidov, nukleozidov, výživných látok a rôznych liekov (Wilkins, 2015). ABC transportéry sú obecné substrátovo nešpecifické a môžu prenášať širokú škálu štruktúrne a chemicky rozmanitých substrátov (Ween et al., 2015). Nachádzajú sa v rôznych častiach tela ako sú pečeň, obličky, mozog, črevo, hematoencefalická, placentárna a hematotestikulárna bariéra kde hrajú dôležitú úlohu pri absorpcii, distribúcií a vylučovaní liečiv (Obr. 5) (Szakács et al., 2008).

ABC transportéry sú nevyhnutné pre mnoho procesov v bunke a nesprávne fungovanie týchto transportérov spôsobuje alebo prispieva k viacerým ľudským genetickým poruchám vrátane cystickej fibrózy, Tangierovej a Stargardtovej choroby, neurologického ochorenia, degenerácie sietnice, defektov transportu cholesterolu a žľče, anémie a mnoho ďalších (Dean et al., 2001; Wilkins, 2015).

Medzi najznámejšie placentárne transportéry ABC radíme P-glykoproteín (ABCB1, P-gp, MDR1), BCRP (ABCG2) a MRP2 (ABCC2) nachádzajúce sa na apikálnej membráne syncytiotrofoblastu, ktoré plnia tzv. „ochrannú rolu“ voči plodu (Obr. 4).



Obr. 4: Schematické znázornenie lokalizácie hlavných ABC efluxných transportérov, P-gp, BCRP a MRP2 v apikálnej membráne placentárneho syncytiotrofoblastu.

Prevzaté: Mao, 2008.

2.2.1.1 P-glykoproteín (ABCB1, P-gp, MDR1)

P-glykoproteín (*ABCB1*) je prvým objaveným členom B rodiny ABC transportérov. Identifikovaný bol v roku 1976 a jeho veľkosť dosahuje 170 kDa. P-gp je apikálny membránový transportér, ktorý sa exprimuje na črevnej sliznici, epiteli obličkových proximálnych tubulov, pečeni, placentе, nachádza sa aj na hematoencefalickej bariére a hematotestikulárnej bariére, ktoré chráni pred xenobiotikami a rôznymi bunkovými toxínmi. Okrem identifikácie na fyziologických, nenádorových tkanivách sa vyskytuje aj v bunkách nádorov, kde spôsobuje ich rezistenciu voči cytostatickým liekom, a preto ho poznáme aj pod názvom multidrug resistance protein 1 (MDR1). Nachádza sa napríklad u nádorov hrubého čreva, prs, vaječníkov, obličiek, pečene a taktiež u leukémií (Staud *et al.*, 2012; Mao, 2008, Ceckova-Novotna *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

P-gp má veľmi široké substrátové spektrum sprostredkujúce export rôznych liekov. Medzi tieto substráty patria okrem iných aj chemoterapeutiká, imunosupresíva,

inhibítory HIV-proteázy, antiarytmiká, blokátory kalciových kanálov, analgetiká, antihistaminiká, antibiotiká, antiepileptiká, opioidy, antiemetiká a mnoho ďalších vrátane diagnostických farbív. Väčšina substrátov je neutrálna alebo sa môže jednať o kationové hydrofóbne molekuly (Mao, 2008; Staud et al., 2012).

V placente je P-gp lokalizovaný hlavne na apikálnej membráne trofoblastu, kde chráni plod pred xenobiotikami z materského obehu, odstraňuje tiež substráty, ktoré sa dostanú do fetálneho obehu a vracia ich späť do materského obehu (Cečkova-Novotna et al., 2006).

2.2.1.2 Breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2)

BCRP je posledným objaveným membránovým ABC transportérom. Bol identifikovaný v bunkovej línii MCF-7 odvodenej z rezistentnej rakoviny prsníka a to v roku 1998, vďaka čomu získal aj svoj názov. Podobne ako P-gp je aj *ABCG2* efluxným transportérom, ktorý sa nachádza na apikálnej membráne syncytiotrofoblastu. Tento transportér je široko distribuovaný v čreve, pečeni, obličkách, mozgu a hrá nezastupiteľnú úlohu aj v placente. Prispieva k ochrane tkanív pred toxínmi a xenobiotikami bránením ich absorpcie, distribúcie a nakoniec pomáha pri eliminácii liečiv a endogénnych či exogénnych toxických zlúčenín (Čečková, 2017; Staud et al., 2012; Chen et al., 2016; Mao, 2008).

Rovnako ako aj P-gp, BCRP transportuje širokú škálu substrátov, ako napr. antivirotiká, chemoterapeutiká, antibiotiká atď. Okrem svojej efluxnej funkcie reguluje bunkovú homeostázu transportom hemu a porfyrínu. Navyše môže sekretovať riboflavín, biotín a vitamín K (Čečková, 2017; Staud et al., 2012).

2.2.1.3 Multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2)

MRP2, tiež známy ako *ABCC2*, je druhým členom podrodiny MRP (proteíny spojené s rezistenciou na viacero liečiv), ktorý bol prvýkrát objavený v roku 1996. Jeho zastúpenie je prevažne na apikálnej membráne hepatocytov, renálnych proximálnych tubuloch, tenkého čreva ale i v placente. MRP2 je v placente lokalizovaný podobne ako P-gp a BCRP na apikálnej membráne trofoblastov. Na izolovaných trofoblastových

bunkách i v placentе sa pozorovala placentárna expresia aj iných transportných proteínov MRP ako napr. MRP1, MRP3, MRP5 či MRP8. Okrem toho sa exprimuje aj v žlčníku, kde hraje dôležitú úlohu v exkrécii celej rady toxínov a xenobiotík. Podstatným rozdielom od MDR1 a BCRP je fakt, že u MRP2 nebola potvrdená rola v rezistencii nádorových buniek (Čečková, 2017; Chen et al., 2016; Staud et al., 2012).

2.2.2 SLC transportéry

Skupina SLC transportérov, tzv. „solute carriers“, je jednou z dvoch hlavných rodín ľudských génov kódujúcich transportéry endogénnych a exogénnych zlúčenín. Považuje sa za najväčšiu rodinu transportérov zloženú z viac ako 300 membránových transportných proteínov klasifikovaných do 52 podrodín na základe ich štruktúrnej podobnosti sekvencií. Sú široko exprimované v rôznych tkanivách po celom tele, najmä v epiteli hlavných orgánov, ako sú obličky, pečeň, mozog, črevo, placenta, semenníky a zohrávajú dôležitú úlohu pri udržiavaní homeostázy organizmu (Obr. 5) (Staud et al., 2012).

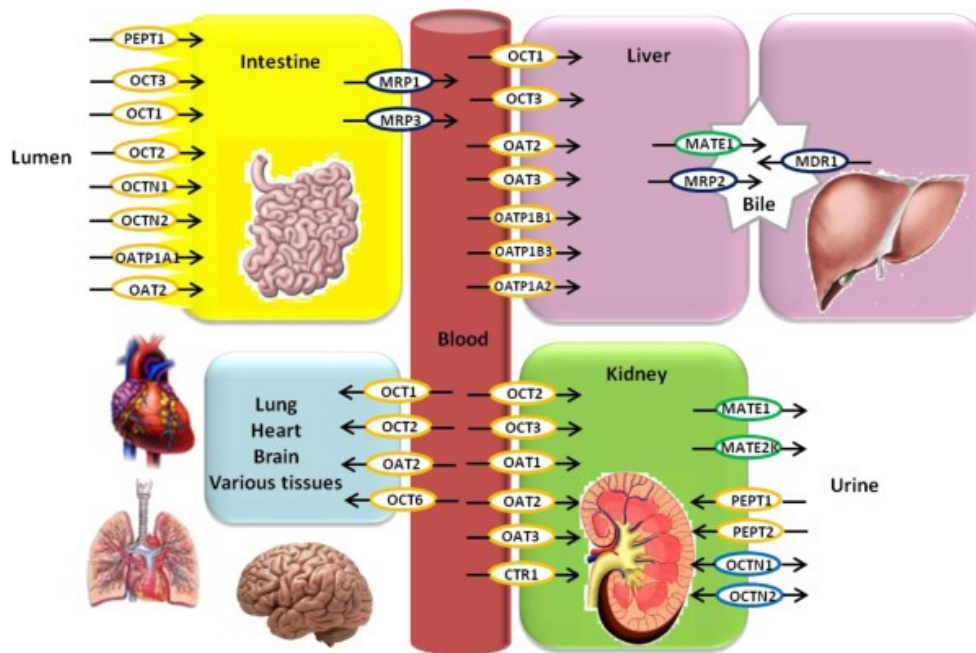
Uľahčujú transport širokého spektra substrátov cez biologické membrány - hrajú zásadnú úlohu vo fyziologických a farmakologických procesoch od bunkového príjmu živín až po absorpciu liekov a iných xenobiotík (Schaller & Lauschke, 2019; Lin et al., 2015). Niektoré z členov sú substrátovo špecifické, pomáhajú tak transportovať endogénne zlúčeniny ako napr. aminokyseliny, cukry, nukleozidy. Iní členovia sú široko substrátovo špecifické, tzv. „polyšpecifické“, čím rozoznávajú široké spektrum rôznych molekúl (Staud et al., 2012).

Medzi SLC transportéry identifikované v placentе patria:

- organické kationové transportéry, tzv. „organic cation transporters“ – OCT;
- organické aniónové transportéry, tzv. „organic anion transporters“ – OAT;
- karnitínové transportéry, tzv. „carnitine transporters“ – OCTN;
- koncentračné nukleozidové transportéry, tzv. „concentrative nucleoside transporters“ - CNT;

- ekvilibračné nukleozidové transportéry, tzv. „equilibrative nucleoside transporters“ – ENT;
- polypeptidy transportujúce organické anióny, tzv. „organic anion-transporting polypeptides“ – OATP;
- proteíny extrudujúce viac liečiv a toxínov, tzv. „multidrug and toxic compound extrusion“ – MATE.

Vcelku SLC transportéry v placente väčšinou využívajú energeticky nezávislý transport buď hydrofilných alebo nabitých molekúl (katióny, anióny). Môže sa jednať o influxný transport (smer transportu z extracelulárneho prostredia do buniek) alebo o efluxný transport (smer transportu z buniek do extracelulárneho priestoru) (Staud *et al.*, 2012).



Obr. 5: Lokalizácia ABC a SLC transportérov v rôznych orgánoch. Influxné SLC transportéry sú označené žltým kruhom a efluxné SLC transportéry sú označené zeleným kruhom. Niektoré SLC transportéry poskytujú obojsmerný transport, sú označené modrým kruhom. Transportéry ABC sú znázornené čiernym kruhom. Smer šípok určuje smer transportu.

Prevzaté z: Li & Shu, 2014.

2.2.2.1 OATP transportéry

OATP sú membránové influxné transportéry, regulujú príjem mnohých endogénnych zlúčenín a dôležitých liečiv. Medzi OATP zistených v ľudskom tele radíme 11 členov: *OATP1A2*, *1B1*, *1B3*, *1C1*, *2A1*, *2B1*, *3A1*, *4A1*, *AC1*, *5A1* a *6A1*. Jednotlivé členy sa nachádzajú v rôznych tkanivách a vyznačujú sa širokou substrátovou špecifickosťou (Obr. 6) (Kalliokoski & Niemi, 2009). V rámci predchádzajúcich štúdií v našom laboratóriu boli nasledujúce transportéry, ktoré sme skúmali aj v tejto diplomovej práci, potvrdené v placentárnych bunkách trofoblastu tak i v endoteliálnych bunkách placentárnych ciev (Tupova et al., 2020).

SLCO1A2 (OATP1A2)

Je prvým objaveným členom OATP transportérov. Je exprimovaný v mozgu, pečeni, obličkách a v črevách. Má širokú substrátovú špecifitu a to vrátane endogénnych substrátov ako sú napr. žľčovú kyselinu, steroidné hormóny a ich konjugáty, hormóny štítnej žľazy, prostaglandíny, neuropeptidy. Jeho substrátmi sú aj niektoré terapeutické liečivá ako napr. antibiotiká, chemoterapeutiká, β -blokátory, inhibítory HIV proteázy a ďalšie (Kalliokoski & Niemi, 2009; Chan et al., 2015).

SLCO2A1 (OATP2A1)

Tento transmembránový proteín je široko exprimovaný v rôznych tkanivách a pôsobí ako transportér prostaglandínov. Podieľa sa na rôznych fyziologických a patofyziologických procesoch v mnohých orgánoch (Nakanishi & Tamai, 2017). Doposiaľ nie je popísané žiadne liečivo, ktoré by bolo jeho významným substrátom.

SLCO3A1 (OATP3A1)

Je zástupcom, ktorý je exprimovaný v srdci, semenníku a mozgu. Transportuje estrogény, prostaglandíny, hormóny štítnej žľazy, vazopresín a je substrátom pre liečivo benzylpenicilín (Huber et al., 2007; Tamai et al., 2000).

SLCO4A1 (OATP4A1)

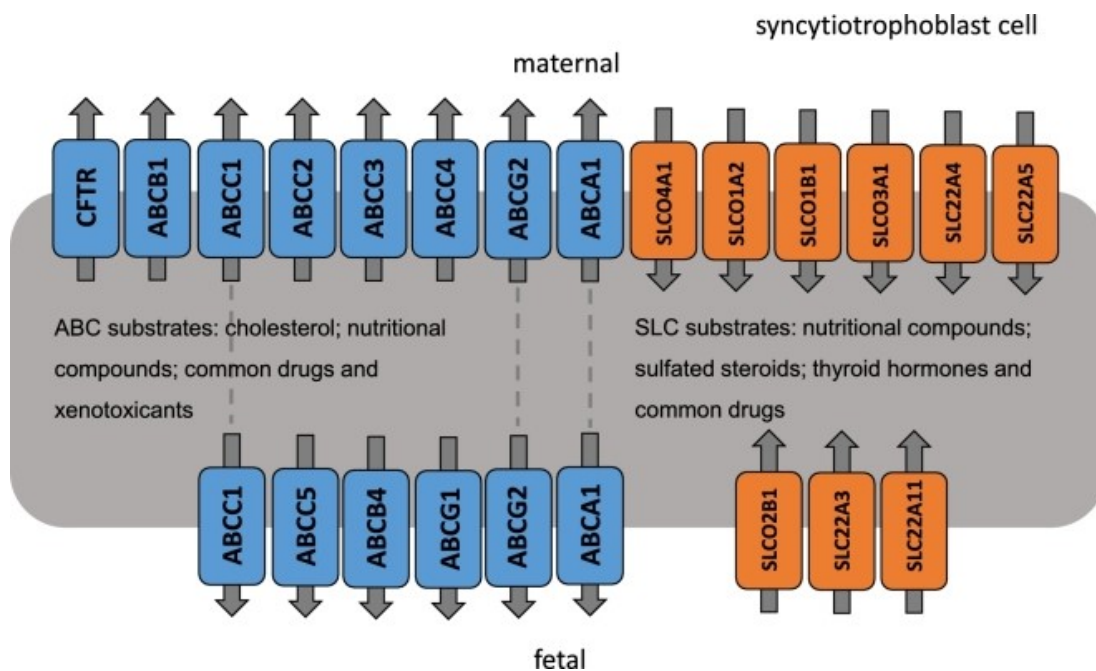
Tento transportér taktiež ako *SLCO3A1* transportuje estrogény, prostaglandíny, thyroidné hormóny. Podieľa sa aj na transporte taurocholátu, benzylpenicilínu a unoprostónu (*Kalliokoski & Niemi, 2009; Tamai et al., 2000*).

SLCO1B3 (OATP1B3)

Transportér je exprimovaný na sinusoidnej membráne hepatocytov tak ako transportér *OATP1B1*. Taktiež jeho endogénne substráty sú podobné substrátom *OATP1B1* ako napr. bilirubín, žľčové kyseliny, konjugované steroidy, eikosanoidy, hormóny štítnej žľazy ale aj cholecystokinín, ktorý je transportovaný len pomocou *OATP1B3*. Taktiež transportuje množstvo liečiv ako *OATP1B1*, avšak ako jediný pečenný OATP transportér transportuje digoxín, docetaxel a paklitaxel (*Kalliokoski & Niemi, 2009; Meyer zu Schwabedissen et al., 2011*).

SLCO2B1 (OATP2B1)

Tento membránový transportér je lokalizovaný hlavne na sinusoidálnej membráne hepatocytov, taktiež ma vysokú expresiu v slezine, placente, pľúcach, obličkách, srdci, vaječníkoch, tenkom čreve a v mozgu. K jeho endogenným substrátom patria prostaglandíny a niektoré liečivá vrátane benzylpenicilínu, niektorých statínov a mnoho ďalších (*Kalliokoski & Niemi, 2009; Kullak-Ublick et al. 2001; Tamai et al., 2000; Grube et al., 2006*).



Obr. 6: Schematické znázornenie membránových transportérov umiestnených v syncytiotrofoblaste ľudskej placenty a ich smer transportu. SLC (oranžová) a ABC (modrá) sa nachádzajú na apikálnej (materskej) a bazálnej (fetálnej) membráne. Transportér exprimovaný na oboch membránach je vyznačený šedou prerušovanou čiarou.

Prevzaté z: Walker et al., 2017.

2.3 Predčasný pôrod

Pôrod je klasifikovaný ako synchronizovaný dej, pri ktorom plodové vajce (plod, placenta, pupočník, plodová voda, plodové obaly) opúšťajú matkin organizmus. Fyziologický pôrod je stav, kedy k počatiu dôjde v priebehu 38. – 42. týždňa tehotenstva. Jedná sa o pôrod v termíne alebo o potermínový pôrod. Je spúšťaný buď maternicovými kontrakciami alebo ruptúrou plodových obalov (Roztočil et al., 2008).

Predčasný pôrod je charakterizovaný ako pôrod pred 37. ukončenými týždňami tehotenstva. Môže sa jednať o nepriaznivý výsledok tehotenstva (ak plod nie je schopný dokončiť svoj rast) alebo o preferovaný výsledok (napríklad úspešným zabránením potratu). Môže byť spontánny a to v dôsledku spontánnych maternicových kontrakcií alebo spontánneho pretrhnutia membrán. Môže byť aj poskytovateľom

iniciovaný a to napríklad cisárskym rezom z dôvodu preeklampsie, eklampsie, placentárneho prerušenia alebo kvôli obmedzeniu vnútromaternicového rastu (*Vogel et al., 2018*).

Predčasné narodenie a nízka pôrodná hmotnosť sú hlavnými príčinami detskej úmrtnosti a chorobnosti počas detstva na celom svete. Celosvetovo sa približne 15 mil detí narodí predčasne, z toho 80 a viac % predčasných pôrodov sa neočakáva, asi 45-50 % predčasných pôrodov je idiopatických, 30 % súvisí s predčasným prasknutím membrán a cca 15-20 % sa pripisuje lekárske indikovaným alebo samovoľným predčasným pôrodom.

Jednou z príčin predčasného pôrodu môže byť bakteriálna infekcia a následná zápalová reakcia. Najčastejším spúšťačom predčasného pôrodu je práve chorioamnitída (*Ategeka et al., 2019*). Medzi komplikácie u predčasne narodených detí patrí zvýšené riziko novorodeneckých respiračných stavov, enterokolitída, sepsa, neurologické stavy, enoxická hypofýza, problémy so zrakom a sluchom, problémy so správaním a množstvo ďalších (*Vogel et al., 2018*).

2.4 Chorioamnitída

Chorioamnitída je perinatálny stav, ktorý je definovaný ako zápal amniochorionických (fetálnych) membrán a to buď mikrobiálnou inváziou, kde sa jedná o tzv. infekčný zápal alebo ako následok iného patologického procesu, tzv. sterilný zápal obalov bez prítomnosti infekčných agens. Fetálne membrány hrajú dôležitú úlohu pri ochrane plodu proti vonkajším činiteľom (najmä mikroorganizmami a toxínmi), ktoré môžu ohroziť tehotenstvo. Bez ohľadu na jej infekčnú etiológiu, je výzvou pre funkčnú integritu membrán, čo ich robí zraniteľnými voči iným environmentálnym škodám s patologickými následkami počas tehotenstva (*Menon et al., 2009*).

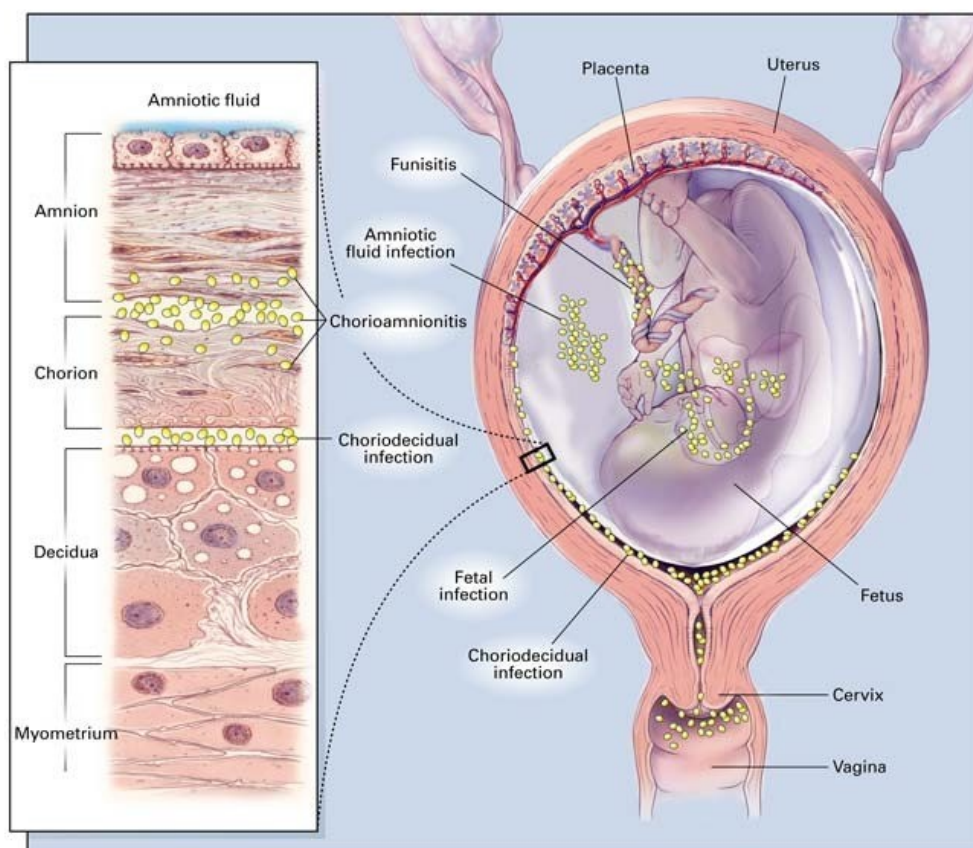
V závažných prípadoch môže chorioamnitída dokonca spôsobiť rôzne nepriaznivé novorodenecké následky až novorodeneckú sepsu ale aj rizikové následky postihujúce matku (*Peng et al., 2018*).

Bakteriálna chorioamnitída je najčastejšie spôsobená intrauterínnou infekciou a to ascendentým prienikom mikroorganizmov z dolného genitálneho traktu. Hematogénne šírenie sa vyskytuje len veľmi zriedkavo. Môže vzniknúť aj iatrogénne a to napríklad pri amniocentéze. Predpokladanou a najmenej bežnou je však aj anterográdna infekcia z pobrušnice cez vajcovody (Obr. 7) (*Ericson & Laughon, 2015*).

Prítomnosť infekčných agens vyvoláva zápalovú odpoveď matky a plodu, pri ktorej sa uvoľňujú rôzne kombinácie prozápalových a inhibičných cytokínov a chemokínov. Môže dôjsť nielen k priamej infekcii plodu a k sepse, ale aj k poraneniu bielej mozgovej hmoty, čo môže mať za následok mozgovú obrnu a iné neurologické deficity (*Tita & Andrews., 2010*).

Najdôležitejším klinickými príznakmi chorioamnitídy je horúčka, tachykardia matky a plodu, hnisavá alebo špinavá plodová voda a citlivosť maternicovej fundácie. Avšak subklinická chorioamnitída nevykazuje vyššie uvedené príznaky ale môže sa prejavovať ako predčasná pôrodná sila alebo zvyčajne ako predčasné pretrhnutie membrán (*Tita & Andrews., 2010*).

Ak sa jedná o infekčný zápal tak môžeme chorioamnitídu považovať za polymikrobiálnu infekciu zahrňujúcu zväčša dva alebo viac organizmov. Medzi najznámejšie organizmy spôsobujúce chorioamnitídu patria tzv. genitálne mykoplazmy ako je *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*. Ďalšími bežnými organizmami sú anaeróby ako je *Gardnerella vaginalis*, aeróby vrátane streptokokov skupiny B a gramnegatívne tyčinky vrátane *Escherichia coli*. Najznámejším organizmom pomocou hematogenného šírenia bakteriálnej alebo vírusovej infekcie na placentu je *Listeria monocytogenes* (*Tita & Andrews., 2010*).



Obr. 7: Potenciálne cesty bakteriálnej infekcie v maternici.

Prevzaté: Goldenberg et al., 2000.

2.5 Prehľad prozápalových mediátorov

Zápalová reakcia je komplexnou odpoveďou tkáni na škodlivé zápalové látky. Patrí medzi jeden z najdôležitejších procesov potrebných na ochranu buniek pred určitými poraneniami alebo mikrobiálnymi infekciami. Táto reakcia zahŕňa bunky imunitného systému, konkrétne bunky leukocytov – makrofágy, lymfocyty a neutrofilny, tiež známe ako zápalové bunky. V priebehu reakcie na zápalový proces, tieto bunky uvoľňujú špecializované látky, ktorými sú vazoaktívne amíny a peptidy, eikozanoidy, prozápalové cytokíny a proteíny akútnej fázy. V priebehu zápalového procesu zabraňujú ďalšiemu poškodeniu tkaniva a vedú k samotnému hojeniu a obnoveniu funkcie tkaniva. Predĺžený zápalový proces vedie k chronickým

chorobným procesom, ktoré môžu vyústiť do zlyhania až poškodenia orgánov (Abdulkhaleq et al., 2018).

Medzi prozápalové mediátory, ktoré sme použili v našej experimentálnej práci patria:

- Lipopolysacharid (LPS)
- Interleukin-1 β (IL-1 β)
- Interleukin 6 (IL-6)
- Interferon gamma (IFN γ)
- Teplom inaktivovaná (Heat-inactivated) *Escherichia coli* (*E.coli*)
- High-mobility group box 1 (HMGB1)

Lipopolysacharid (LPS)

LPS je veľký glykolipid, ktorý je hlavnou zložkou vonkajších bunkových membrán gramnegatívnych baktérií. Vykonáva niekoľko funkcií, z nich predovšetkým vytvára tzv. bariéru priepustnosti, ktorá chráni bunku pred vstupom toxických molekúl. LPS je primárna bakteriálna zložka, s ktorou sa stretáva imunitný systém hostiteľa, a preto hrá častú úlohu v bakteriálnej patogenite. Pretože LPS zdobí povrch mnohých bakteriálnych patogénov, vyvinul sa imunitný systém hostiteľa tak, že dramaticky až toxicky reagoval na jeho prítomnosť silnou imunitnou reakciou. Z toho dôvodu sa LPS nazýva „endotoxín“ v súvislosti s bunkovou (endo) toxicitou, ktorá bola pozorovaná u mnohých gramnegatívnych organizmov (Tang et al., 2019; Bertani & Ruiz, 2018).

Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β je jedným z najsilnejších prozápalových cytokínov, indukujúci zápalové reakcie prakticky vo všetkých tkanivách a orgánoch. IL-1 β je členom interleukínu 1 rodiny z cytokínov. Tento prozápalový mediátor je produkovaný aktivovanými makrofágmi a je zapojený do rôznych bunkových aktivít, vrátane bunkovej proliferácie, diferenciácie a apoptózy. Je skutočne nevyhnutný pre správnu akútnu zápalovú reakciu a zaisťuje zotavenie z infekcie. Cytokín poskytuje aj patogénnu

úlohu pri mnohých chronických ochoreniach ako sú napr. cukrovka, ateroskleróza a nádorové ochorenia (*Piccioli & Rubartelli, 2013*).

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 je multifunkčný prozápalový cytokín, ktorý je najlepšie rozpoznávaný ako primárny mediátor reakcie akútnej fázy. Je produkovaný mnohými bunkovými typmi vrátane imunitných buniek, buniek adipocytov, kostrových svalov a buniek hladkého svalstva. Vo svojej zápalovej reakcii, sprostredkuje zápalové kaskády vrátane produkcie C-reaktívneho proteínu a fibrinogénu. Poskytuje rôzne signály na reguláciu rastu buniek, sekrécie proteínov v akútnej fáze a v imunitných reakciách. Zohráva kľúčové úlohy v obrane hostiteľa, zápaloch, bunkovom raste a rakovine (*Lin et al., 2014; Didion, 2017*).

Interferon gamma (IFN γ)

IFN γ je dimérny rozpustný cytokín. Tento cytokín je produkovaný predovšetkým prírodnými zabíjačskými (NK) a prírodnými zabíjačskými T (NKT) bunkami a CD4 a CD8 cytotoxickými T lymfocytmi. Má základný význam pre prirodzenú i získanú imunitu proti virovým, bakteriálnym či protozoálnym infekciám. Má rozhodujúcu úlohu pri rozpoznávaní a eliminácii patogénov a môže koordinovať množstvo antimikrobiálnych funkcií. Jedná sa o dôležitého aktivátora makrofágov. Nepochybne jeho nadmerná aktivita spôsobuje nadmerné poškodenie tkaniva, nekrózu a zápal, čím môže prispievať k patológii chorôb (*Kak et al., 2018; Schoenborn & Wilson, 2007*).

Heat-killed Escherichia coli (E.coli)

Escherichia coli je klasifikovaná ako tyčinkovitá gramnegatívna baktéria z čeľade Enterobacteriaceae, ktorá obýva, ako komenzálny organizmus, hlavne dolný črevný trakt teplokrvných živočíchov vrátane ľudí. Jedná sa o aeróbnny organizmus žijúci v symbióze s hostiteľom Avšak *E.coli* sa vyvinula do patogénu dobre prispôbenému pre svojho hostiteľa a niektoré patogénne kmene spôsobujú infekcie močových ciest,

mäkkých tkanív a centrálneho nervového systému (*Jang et al., 2017; Nicolas-Chanoine et al., 2014*).

High-mobility group box 1 (HMGB1)

High-Mobility Group (HMG) je skupina nehistónových jadrových proteínov s vysokou elektroforetickou pohyblivosťou. Tieto HMG proteíny zahŕňajú tri superrodiny označované HMGB, HMGN a HMGA. Z nich HMGB1 je najštudovanejším proteínom HMG. Jadrová HMGB1 je zapojená do mnohých udalostí spojených s aktivitou DNA. Okrem svojej jadrovej funkcie hrá extracelulárnu úlohu pri zápaloch, imunite, raste buniek, množení buniek a bunkovej smrti. Sníma a koordinuje stresovú reakciu, je udržiavateľom autofágie ale aj ochraňuje bunky pred apoptickou smrťou. HMGB1 sekretuje bunky imunitného systému ako sú makrofágy, monocyty, dendritické bunky (*Kang et al., 2014; Vijayakumar et al., 2019; Klune et al., 2008*).

2.6 Modely využívané pri štúdiách placentárneho transportu

Z etických dôvodov je klinický výskum prevádzaný na tehotných ženách veľmi zriedkavo. Aby štúdie mohli vyhodnocovať placentárny transport, musia používať alternatívne modely, ktoré napodobňujú materno-fetálne rozhranie (*Staud et al., 2012*).

Okrem počítačových *in silico* modelov sa v súčasnosti využívajú modely zvieracích placent *in vivo*, bunkových línií *in vitro* a ľudská placenta získaná po pôrode, poprípade v priebehu tehotenstva.

Problémom využitia zvieracích modelov a zvieracích placent je, že žiadna zo zvieracích placent nie je štrukturálne a funkčne identická s ľudskou placentou. Využitie tak majú v dostatočnej miere používané bunkové línie odvodené z malígneho alebo normálneho placentárneho ľudského tkaniva odvodeného od trofoblastu (napr. BeWo, JEG-3, Jar) alebo živočíšneho tkaniva (napr. HRP-1). Ich výhodou je pomerne ľahká manipulácia. Získané údaje z bunkových línií sú ale obmedzené skutočnosťou, že ich expresné transportéry nemusia odrážať expresiu transportérov v placentárnom tkanive (*Staud & Ceckova, 2015; Staud et al., 2012*).

Ak je to možné, tak sa zväčša dáva prednosť ľudským placentám poskytnutých priamo po pôrode, ktoré si zachovávajú tkanivovú štruktúru. Optimálnym modelom na predpovedanie transportu je izolovaný ľudský placentárny lalok perfundovaný *ex vivo*. Tento spôsob nám poskytne jedinečnú príležitosť skúmať transplacentárnu farmakokinetiku priamo v ľudskej placente. Živočíšne placenty môžu byť perfundované *in situ*, kde sa stále udržuje kontakt s materským organizmom. Nevýhodou je viacmennej veľká požiadavka na technickú zručnosť a s ním i súvisiaca pomerne nízka úspešnosť perfúzií. Za veľmi elegantnú variantu je preto považovaná i možnosť kultivácie malých kúskov placentárneho vilózného tkaniva, tzv. explanty vilózneho tkaniva a prípadná izolácia určitých typov buniek ako sú trofoblastové bunky, endoteliálne bunky fetálnych ciev alebo Hofbauerové bunky (Staud & Ceckova, 2015; Staud et al., 2012).

Výsledný pohľad na dianie v placente je potom daný kombináciou poznatkov získaných jednotlivými metódami.

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či stimulácia placentárnych buniek v BeWo bunkovej línii a na placentárnych vilózných explantoch pomocou prozápalových mediátorov viedla k zmene expresie vybraných ABC a SLC, konkrétne OATP, placentárnych transportérov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál a chemikálie

- Aqua pro injectione (API)
- CMRL médium (explanty), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Chloroform
- DMEM médium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (BeWo b30), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- ELISA Kit (Human Chorionic Gonadotropin Beta Polypeptide, CGb, Wuhan P.R. China):
 - koncentrovaný roztok konjugovanej biotínovej protilátky (100x)
 - koncentrovaný roztok streptavidín-HRP (100x)
 - lyofilizovaný štandard
 - premývací pufer (30x)
 - roztok konjugovanej biotínovej protilátky (R2)
 - stop roztok
 - streptavidín - HRP roztok (R3)
 - štandard/ riediaci roztok (R1)
 - TMB (tetrametylbenzidín) substrátový roztok
- Ethanol 75%
- Fosfátový pufer (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Gb Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Isopropanol
- PCR gene expression assays (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, MA USA)
 - gény kódujúce nasledujúce transportéry: *ABCB1*, *ABCG2*, *SLCO1B3*, *SLCO2A1*, *SLCO2B1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1*, *SLCO1A2*
 - housekeepingový gén: *YWHAZ*
- Stimulátory:
 - Heat-killed *Escherichia coli* (*E. coli*), Invivogen (Baria)

- High-mobility group box 1 protein (HMGB), R&D Systems (Bio-Techne)
- Interleukin 1 β (IL-1 β), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Interleukin 6 (IL-6), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Interferon γ (INF γ), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Lipopolysacharid (LPS), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- TaqManTM Universal Master Mix II (Applied BiosystemsTM, Thermo Fisher Scientific, MA USA) - MM
- TriReagent (TR 118, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)
- Trypsín, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

4.2 Použitý biologický materiál

V tejto diplomovej práci boli použité dva placentárne modely (1) bunková línia choriokarcinómu ľudskej placenty BeWo, konkrétne klon b30 získaný od prof. Christiane Albrecht (University of Bern, Switzerland) s láskavým dovolením, Dr. Alana Schwartze (Washington University, St. Louis, MO) a (2) placentárne vilózne explanty získané po pôrode zo zdravých placent od rodičiek z Fakultnej nemocnici v Hradci Králové na základe informovaného súhlasu (schváleného etickou komisiou č. 201006S15P) vďaka spolupráci s prof. MUDr. Mariánom Kacerovským, Ph.D.

4.3 Metodika

4.3.1 Kultivácia bunkových línií BeWo b30

V experimentálnej časti diplomovej práce sa používali bunkové línie BeWo b30, ktoré sa kultivovali v kultivačnom médiu DMEM s 10 % FBS bez prítomnosti antibiotík pri teplote 37 °C. Pri kultivácii bunkových línií je dôležité sterilné prostredie za pomoci práce v laminárnom boxe, s použitím rukavíc a laboratórneho plášťa. Všetky potrebné materiály, ktoré sa pri kultivácii používali sa pred použitím ostriekali 70 % ethanolom, aby sa predišlo kontaminácií. Pred samotnou prácou sa vysvietil laminárny box UV žiarením. Zároveň sa zahrialo PBS, trypsin a médium v prehriatej vodnej lázni na 37 °C. Pred začatím pasážovania sa mikroskopicky skontrolovala či

konfluencia buniek na dne kultivačnej fľaše dosiahla žiadaných 70 – 90 %. Najprv sa pri sterilných podmienkach odsalo médium a pridaním 10 ml PBS sa bunky premyli a zbavili sa prípadných nečistôt. Potom sa PBS odsalo a pridalo sa 1,5 ml trypsínu. Kultivačná fľaša bola premiestnená do inkubátora na čas potrebný k oddeleniu buniek od dna nádoby. Opäť sa bunky mikroskopicky skontrolovali či už sú dostatočne oddelené od dna nádoby. K 1,5 ml trypsínu sa pridalo 8,5 ml média a dostatočne sa premiešalo, čím sa trypsin deaktivoval a bunky resuspendovali. Adekvátne množstvo suspenzie sa pridalo do kultivačnej komôrky so 7 ml média. Kultivačná komôrka sa opäť umiestnila do inkubátora a nechala inkubovať. Pasážovanie sa opakovalo každé 3, resp. 4 dni podľa konfluencie rastu buniek.

4.3.2 Prozápalová stimulácia BeWo b30

Nakultivované BeWo b30 bunkové línie sa v dostatočnom objeme za sterilných podmienok pridali do 12 jamkovej titračnej doštičky a nechali narásť 48 hodín do cca 70-80% konfluencie. Potom sa ku všetkým jamkám aplikovali konkrétne stimulatory *E.coli*, IL-1 β , IL-6, INF γ , LPS, ktoré sa vopred narieslili a čisté médium slúžiace ku kontrole. Dané doštičky sa nechali inkubovať 24, 48 a 72 hodín. Chronologicky sa suspenzie stiahli do mikroskúmaviek a následne sa do jamiek pridalo dostatočné množstvo TriReagentu k požadovanej lýze buniek. Nakoniec sa suspenzie a lyzáty ponechali v mrazáku pri -80 °C do doby izolácie RNA. Táto stimulácia sa opakovala viackrát s rôznymi stimulatormi v rôznych časových intervaloch.

4.3.3 Kultivácia a prozápalová stimulácia placentárnych explantov

Z poskytnutej zdravej placenty sa pomocou nožníc a pipety odstrihli obaly placenty a odobrali sa 3 väčšie kusy tkaniva z 3 rozličných miest v placente do väčších skúmaviek s vopred prehriatym médium. Následne sa odobralo niekoľko malých kusov tkaniva a po trojnásobnom oplachu v PBS sa nechalo zamraziť v kryoskúmavkách pri -80 °C.

Tkanivá vo veľkých skúmavkách sa ďalej spracovali. Pri vopred prehriatom fosfátovom pufre sa viackrát tkanivá opláchli v Petriho miskách pre odstránenie

zvýškov materskej krvi a krvných elementov. Nasledovalo strihanie malých kúskov tkanív do 3 rozličných misiek s pufrom. Následne sa vybrali vhodné nastrihané kúsky tkanív do jednej Petriho misky s pufrom, čím sa docielilo zmiešanie explantov z 3 rôznych miest v placente a dôsledné premytie. Pripravila sa 12 jamková doštička s insertmi, do ktorých sa vložili 3 explanty, rozmiestnené tak aby sa nedotýkali. Pridalo sa 1,5 ml média a doštička s explantmi sa nechala inkubovať. Do mikroskúmaviek sa následne zbieralo médium 5 dní po 24 hod a to tak, aby sa dodržal presný časový interval. V 5. deň sa pridávali vopred nariadené stimulatory a nimi boli IL-1 β , IL-6, INF γ , LPS, HMGB a čisté médium slúžiace na kontrolu. Po 48 hod sa odobrali explanty do mikroskúmvky s TriReagentem pre izoláciu RNA. Do doby izolácie boli vzorky v Trizolu uchovávané a zamrazené pri -80 °C. Tento pokus sa opakoval trikrát z troch poskytnutých zdravých placent, vždy v duplikátoch pre daný stimulator.

4.3.4 Izolácia RNA

Vlastná RNA izolácia prebiehala podľa protokolu výrobcu TriReagentu na princípe fenol-chloroformovej extrakcie (Obr. 8).

Homogenizácia vzoriek

Vzorky s TriReagentom sa nechali rozmraziť pri pokojovej teplote a pripravila sa centrifúga na 12 000 g a 4 °C. Ak sa pracovalo s placentárnymi explantmi, tak sa vzorky najprv zhomogenizovali pomocou homogenizátoru dvakrát po sebe, na ľade s odstupom 20 sekúnd, aby sa udržala nízka teplota pred prevenciou z prehriatia tkaniva a teda RNA degradáciou. Ak sa pracovalo s BeWo bunecnou líniou homogenizácia vzoriek nebola nutná.

Separáčná fáza

K vzorkám sa pridalo požadované množstvo chloroformu (200 μ l/1 ml TriReagentu) a dôkladne sa suspenzia pretrepala po dobu najmenej 15 sekúnd a nechala stáť 5 až 15 minút. Vzorky sa vložili do predpripravenej centrifúgy na 15 minút. Následne sa suspenzia rozdelila do troch rozdielnych fáz. Vrchná fáza, tzv. vodná fáza alebo priehľadná fáza obsahovala RNA. Interfáza alebo biela fáza obsahovala DNA a dolná fáza, tzv. organická fáza, sfarbená do ružova, obsahovala

proteíny a lipidy. Do novej mikroskúmavky sa opatrne pomocou pipety zozbierala vodná fáza a to tak, aby sa neporušili ďalšie dve fázy. Ostatné fázy sa zlikvidovali.

RNA precipitácia

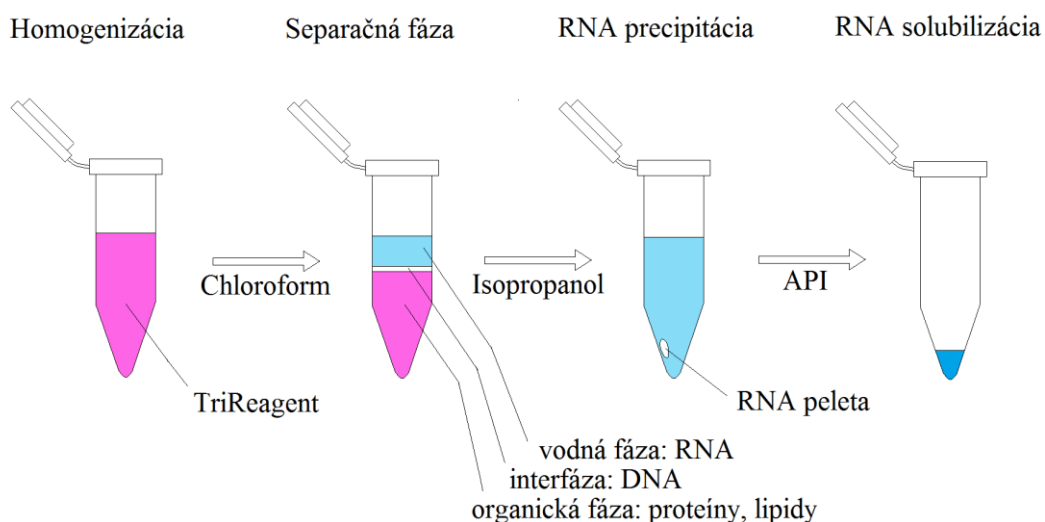
K vodnej fáze sa pridalo požadované množstvo isopropanolu (500 μ l/1 ml TriReagentu) a vzorky sa ponechali stáť pri pokojovej teplote 10 minút. Následne sa vzorky jemne pretrepali a nechali scentrifugovať pri 12 000 g a 4 °C po dobu 10 minút. RNA precipitáciu sme pozorovali ako bielu peletu na stenách mikroskúmaviek.

Oplach RNA pelety

Opatrne sa odstránil isopropanol bez porušenia RNA pelety a peleta sa opláchla so 75% ethanolom (1 ml/1 ml TriReagentu). Opäť sa nechali vzorky scentrifugovať pri 12 000 g a 4 °C po dobu 5 minút. Tento krok sa zopakoval ešte raz pre dokonalé očistenie pelety.

RNA solubilizácia

Pomocou pipety sa odstránil ethanol a zvyšný ethanol sa nechal odpariť z pelety. Dôležité je aby sa nenechala peleta úplne vyschnúť. Po odparení zvyšného ethanolu sa pridalo k pelete 20 μ l API na rozpustenie pelety.



Obr. 8: Izolácia RNA.

Meranie čistoty a koncentrácie RNA pomocou spektrofotometru NanoDrop

Do novej mikroskúmavky sa odpipetovalo 2 μl izolovanej RNA. Zvyšné množstvo vzoriek sa zamrazilo v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do spektrofotometru sa aplikoval 1 μl RNA a za pomoci programu Nucleic acid – RNA 40 sa zmerala koncentrácia RNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$ a rozsah absorbancie pri vlnových dĺžkach. Absorbancia nám odráža čistotu vzorku. Ak je absorbancia 260/280 nm menšia ako 1,8 tak je vzorka kontaminovaná proteínmi a DNA, ak je absorbancia 260/230 nm menšia ako 1,7 tak je vzorka kontaminovaná organickými rozpúšťadlami.

4.3.5 Reverzná transkripcia

Vzorky s RNA (1 μg) sa pomocou reverznej transkripcie prepísali do komplementárnej DNA tzv. cDNA. Do 0,2 ml mikroskúmavky sa pridalo:

- 10 μl pripraveného RT kitu
- 2 μl RNA roztoku ($c = 200\text{ ng}/\mu\text{l}$)
- 8 μl API

Vzorky sa vložili do prístroja Bio-Rad T100TM thermal cykléru pri teplote $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ na požadovanú dobu k transkripcii. Získaná cDNA sa uskladnila pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.6 qRT – PCR

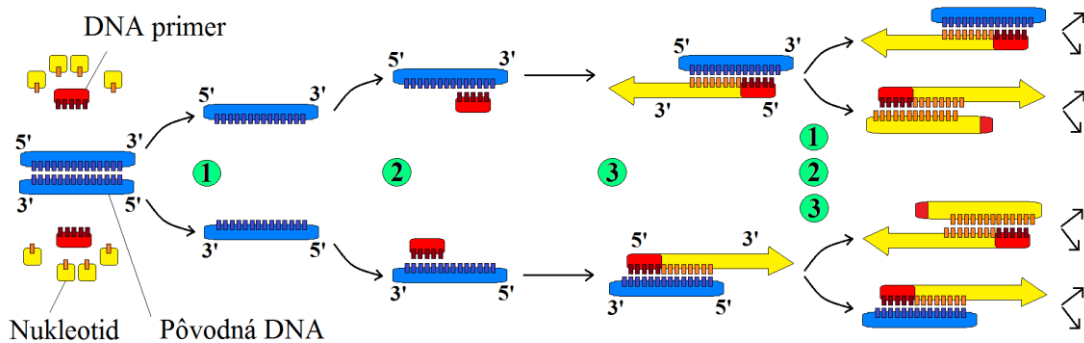
Pomocou qRT-PCR (kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia) bola cDNA amplifikovaná a expresia transportných proteínov kvantifikovaná v reálnom čase. Princíp PCR je založený na amplifikácii vlákna určitého úseku DNA za pomoci DNA polymerázy. Úsek DNA (amplikon) je ohraničený dvojicou primerov, ktoré sú totožné, tzv. komplementárne s vláknom DNA, potrebného na amplifikáciu.

Počas celého priebehu PCR sa cyklicky opakujú nasledovné kroky (Obr. 9):

- denaturácia dvojvláknovej DNA – prerušenie väzieb medzi reťazcami tepelnou denaturáciou templátovej DNA zohriatím reakčnej zmesi na teplotu $>90\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- hybridizácia – za poklesu teploty na $45\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ dochádza k pripojeniu primerov s DNA vláknom na komplementárnych miestach;

- polymerizácia – zvýšením teploty na 72 °C začína Taq-polymeráza syntetizovať nové komplementárne DNA vlákna.

Výsledkom celého priebehu PCR je znásobenie počtu DNA na 2^n krát (n = počet cyklov).



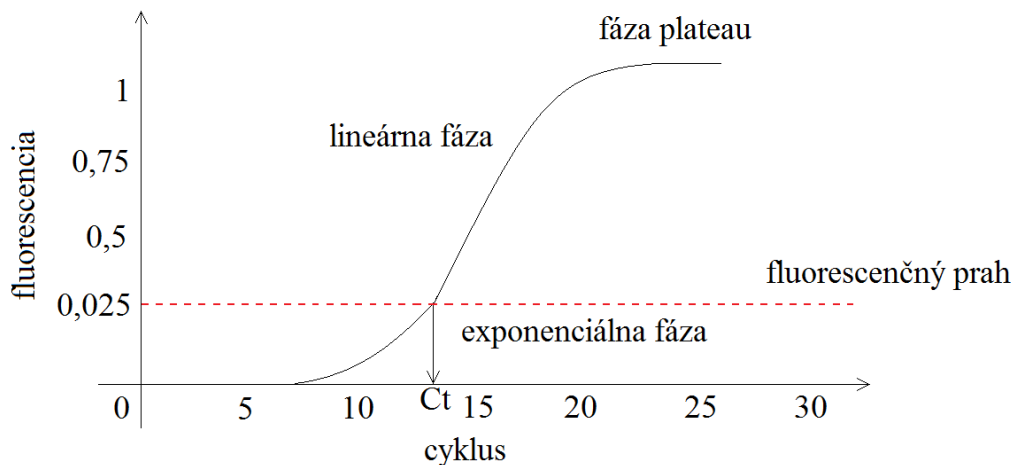
Obr. 9: Schématické znázornenie cyklu PCR. 1 – denaturácia; 2 – hybridizácia; 3 – polymerizácia.

Kvantitatívna PCR (qPCR) alebo PCR v reálnom čase sa používa na kvantifikáciu génovej expzie konkrétnych génov. Princípom je pridanie fluorescenčného farbiva do reakčnej zmesi, ktoré fluoreskuje pri naviazaní len na dvojvláknové DNA. Za pomoci špeciálneho termálneho cykléru s detektorom fluorescence zaznamenáva množstvo DNA počas každého cyklu.

Priebeh qPCR graficky znázorňuje amplifikačná krivka. Každá qPCR sa skladá zo 4 fáz (Obr. 10):

- 1. fáza – nízka intenzita fluorescence je spôsobená malým množstvom DNA, čím nedôjde k presahu pozadia a intenzita je pod tzv. detekčným limitom;
- 2. fáza (exponenciálna fáza) – fluorescencia presahuje fluorescenčný prah (úroveň pozadia) spôsobená množstvom DNA, ktorú je schopné detekovať. V tejto fáze dochádza k zdvojnásobeniu množstva amplikonu po každom cykle. Nárast DNA dosahuje až 2^n (n = počet cyklov);

- 3. fáza (lineárna fáza) – dochádza k neúmerne narastajúcemu množstvu amplikonu a teda k prudkému nárastu fluorescence;
- 4. fáza (fáza plateau) – množstvo amplikonu sa už nezvyšuje vďaka spotrebovaniu niektorých zložiek reakcie, kinetika reakcie sa spomalí a amplikony sa začínajú rozpadat’.



Obr. 10: Grafické znázornenie amplifikačnej krivky a priebehu qPCR.

Výsledkom PCR sú hodnoty Ct (cycle of treshold). Hodnota Ct odráža cyklus v ktorom dôjde k nárastu amplifikačnej krivky nad fluorescencný prah a zároveň ju je možné detekovať. Čím je hodnota Ct vyššia, tým menej templátovej DNA bolo na začiatku reakcie.

Pre PCR reakciu musí byť koncentrácia cDNA 25 ng/μl. Do každej jamky na 384 jamkovej mikrotitračnej doštičke sa pridalo 5 μl suspenzie:

- 2,5 μl Master Mix;
- 1,75 μl API;
- 0,25 μl PCR génovej expresnej eseje;
- 0,5 μl cDNA.

Všetky vzorky boli analyzované v duplikátoch a profil PCR amplifikácie vyzeral nasledovne: 10 minút pri 95 °C, 40 cyklov pri 95 °C na 15 s a 60 °C po dobu 1 minúty. Pre každý gén sa použili negatívne kontroly, ktoré obsahovali API bez cDNA. Expresia génov sa určila za pomoci komparatívnej Ct metódy. Analyzovaná bola expresia 8 génov pre membránové transportéry (*ABCB1*, *ABCG2*, *SLCO1B3*, *SLCO2A1*, *SLCO2B1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A*, *SLCO1A2*) a jeden housekeepingový gén (*YWHAZ*). Pri jednotlivých génoch sa vypočítala ΔCt hodnota a to tak, že sa hodnota daného vzorku odčítavala od príslušných housekeepingových génov. Následne sa vypočítala $\Delta\Delta Ct$ za pomoci kontrolných roztokov a to tak, že sa ΔCt vypočítaná v predchádzajúcom kroku odčítala od ΔCt kontrolného vzorku. Záverečná hodnota bola vložená do vzorca $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3.7 Stanovenie hCG (ELISA test)

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) alebo EIA (enzyme immunoassay) je dôležitá analytická metóda pre stanovenie antigénov. Dochádza k interakcii antigénu a protilátky, pričom je na protilátke kovalentne naviazaný enzým (najčastejšie peroxidáza). Priebeh reakcie je zaistený enzýmom, ktorý katalyzuje chemickú premenu substrátu, pridaného do reakcie na produkt, ktorý je farebný. Výsledný produkt sa stanovuje spektrofotometricky.

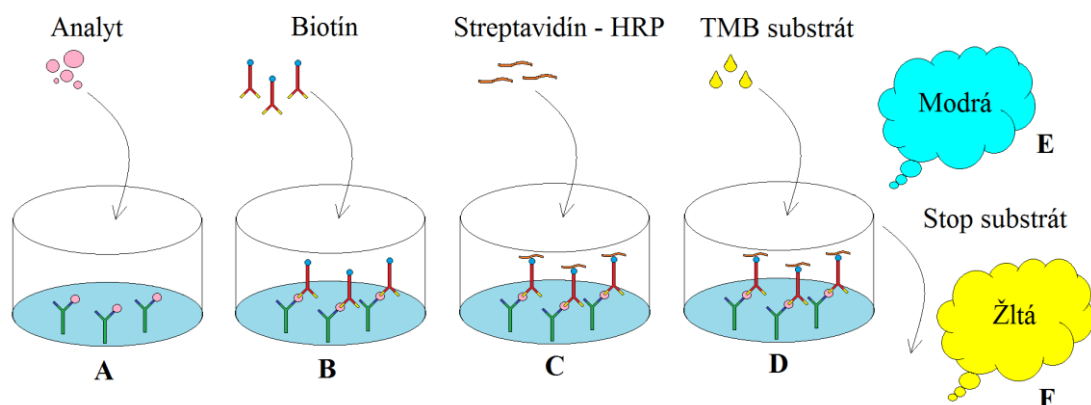
Pre stanovenie hCG hormónu sme využili tzv. sendvičovú ELISU, ktorá pozostávala z niekoľkých krokov (Obr. 11):

- prídanie vzorku do mikrotitračnej doštičky so zakotvenou protilátkou na nerozpustnom nosiči. Inkubácia zaistí vznik väzby antigen-protilátka a následné odsatie nenaviazaného antigénu;
- prídanie druhej protilátky, tzv. detekčnej protilátky viažúcej rovnaký antigén, inkubácia a odsatie nadbytočnej detekčnej protilátky;
- prídanie enzýmu, inkubácia a odsatie nadbytočného enzýmu;
- prídanie substrátu, čím sa zaistí priebeh enzýmom katalyzovanej reakcie;
- zastavenie reakcie a meranie absorbancie.

Vlastné stanovenie hCG hormónu prebiehalo podľa protokolu ELISA KITS. Pre stanovenie hCG hormónu je potrebný ELISA kit, ktorý obsahoval príslušné reagentie. Pred samotným začatím sa vybrali všetky reagentie a nechali stáť pri pokojovej teplote. Taktiež sa vzorky so supernatantmi nechali rozmraziť, po rozmrazení sa zvortexovali a dali do centrifúgy na 20 min pri 4 °C a 1 000 g. Pomocou príslušných reagentií sa nariedili a vytvorili kalibračné roztoky.

Prvým krokom bolo pridanie 1 ml štandardu/riediaceho roztoku (R1) do lyofilizovaného štandardu, ktorý sa jemne premiešaval 15 minút a pripravil sa tak roztok 100 ng/ml. Postupne sa nariedili kalibračné roztoky na 50; 25; 12,5; 6,25 ng/μl, z ktorých sme neskôr zhotovili kalibračnú krivku. Na mikrotitračnú doštičku sa postupne pipetovalo 100 μl rozdielnych vzoriek do každej jamky a 100 μl štandardu s kalibračnými roztokmi v duplikátoch. Takto napipetovaná doštička sa nechala inkubovať 1 hodinu pri 37 °C. Po hodine sa odsali štandardy a vzorky, doštička sa nepremývala. Pridalo sa 100 μl nariedeného koncentrovaného roztoku konjugovanej biotínovej protilátky (100x) s roztokom konjugovanej biotínovej protilátky (R2). Takto nariedený roztok sa pripravil a použil do 30 minút. Doštička sa nechala inkubovať 1 hodinu pri 37 °C. Po hodine sa doštička oplachovala trikrát pomocou nariedeného premývacieho pufra (30x). Pridalo sa 100 μl nariedeného koncentrovaného roztoku streptavidín - HRP (100x) so streptavidín - HRP roztokom (R3). Takto nariedený roztok sa pripravil a použil do 30 minút. Následne sa doštička inkubovala 30 minút pri 37 °C. Opäť nasledoval oplach, tentokrát však päťkrát.

Po dôkladnom opláchnutí doštičky sa pridalo 90 μl TMB substrátového roztoku, krytím pred svetlo a dôsledným prepipetovaním a následným vytvorením modrej farby v jamkách. Opäť nasledovala inkubácia 15-20 min. Počas inkubácie sa nastavil a prehrial spektrofotometer Hidex na meranie absorbancie. Pridalo sa 50 μl Stop roztoku a modrá farba v jamkách sa zmenila na žltú. Počas 5 minút sa zmerala absorbancia pri 450, 570, 630 nm.

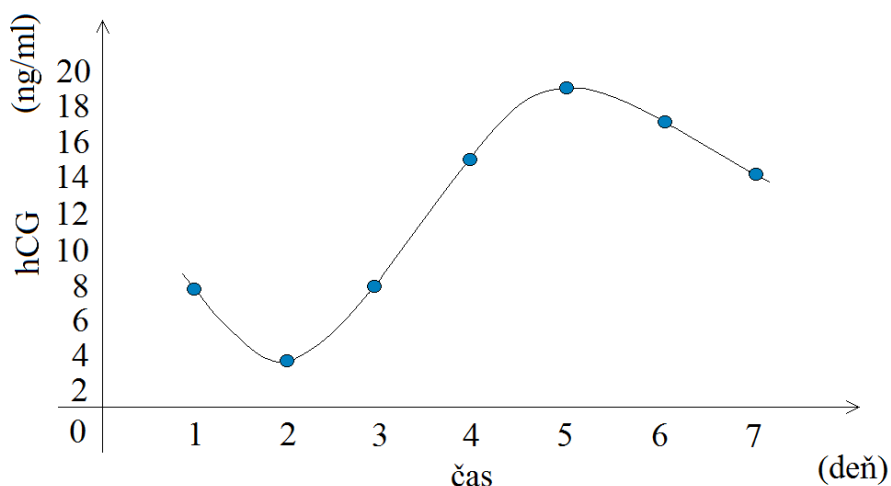


Obr. 11: *Detailný popis Elisa testu. A – prichytenie analytu na protilátku, vopred potiahnutú v plate; B – pridanie druhej protilátky značenej biotínom (detekčná protilátka), ktorý sa viaže na zachytený analyt; C – naviazanie Streptavidínu – HRP polyméru na detekčnú protilátku; D – do jamiek sa pridá roztok substrátu tetrametylbenzidínu (TMB); E – vytvorenie modrej farby v pomere k množstvu analytu prítomného vo vzorke po pridání TMB substrátu; F – vývoj modrej farby sa zastaví po pridání Stop substrátu a farba v jamkách sa zmení na žltú.*

Zo zmeranej absorbancie sa vypočítala hodnota ΔA , ktorá sa vypočítala ako rozdiel absorbancie pri 450 nm a absorbancie pri 570 nm. Z kalibračných roztokov sa zhotovila kalibračná krivka. Následne sa pomocou kalibračného vzorca vypočítali hodnoty hCG hormónu v 2. a 5. dni pre každý jeden explant zvlášť. Na základe práce s ľudskými vzorkami, kde automaticky nemôžeme predpokladať Gaussovské rozdelenie, sa zvolil pre výpočet medián. Následne sa vypočítal medián pre 2. a 5. deň. Nakoniec sa vypočítal celkový medián produkcie hCG stanovenej v médiu pre 2. deň (posledných 24 hodín od 1. dňa) a celkový medián produkcie hCG pre 5. deň (produkcie hCG za posledných 24 hodín od 4. dňa kultivácie) v jednotkách (ng/ml) na 1 explant. Pre overenie životaschopnosti našich explantov sa vypočítal tento pomer, ktorý udáva nárast dennej produkcie hCG hormónu medzi 5. a 2. dňom kultivácie explantov.

Referenčné hladiny hCG produkcie by mali viesť k trojnásobnému alebo vyššiemu nárastu medzi 5. a 2. dňom kultivácie explantov (Turner et al., 2006).

Priebeh poklesu a nárastu hCG hladín sa môže graficky znázorniť, pričom produkcia hCG v 1. dni rapídne klesá, v 2. dni sa produkcia ustáli na určitej hladine a s ďalšími dňami v súlade s obnovou buniek trofoblastu produkcia rastie a nadobúda najvyššie hodnoty približne v 5. alebo niekedy v 6. dni. Po 5. alebo 6. dni opäť produkcia hCG klesá (Obr. 12).



Obr. 12: Grafické znázornenie referenčných hladín hCG produkcie na základe článku (Turner et al., 2006).

4.4 Štatistická analýza

K vyhodnoteniu štatistickej analýzy a grafického spracovania bol použitý program GraphPad Prism 8. Dáta génovej expresie sú interpretované ako priemer minimálne troch nezávislých meraní \pm smerodajná odchýlka. Pre hodnotenie štatistickej významnosti bol použitý t-test. V prípade produkcie hCG u explantov bola táto hodnota uvedená vo forme mediánu.

5 VÝSLEDKY

Táto kapitola zahŕňa výsledky expresie vybraných ABC a SLC, konkrétne OATP, transportérov pomocou prozápalovej stimulácie BeWo bunkovej línie a placentárnych vilózných explantov. Výsledková časť zahŕňa aj stanovenie hCG produkcie vilózných explantov pre overenie stavu tkanív v priebehu experimentov.

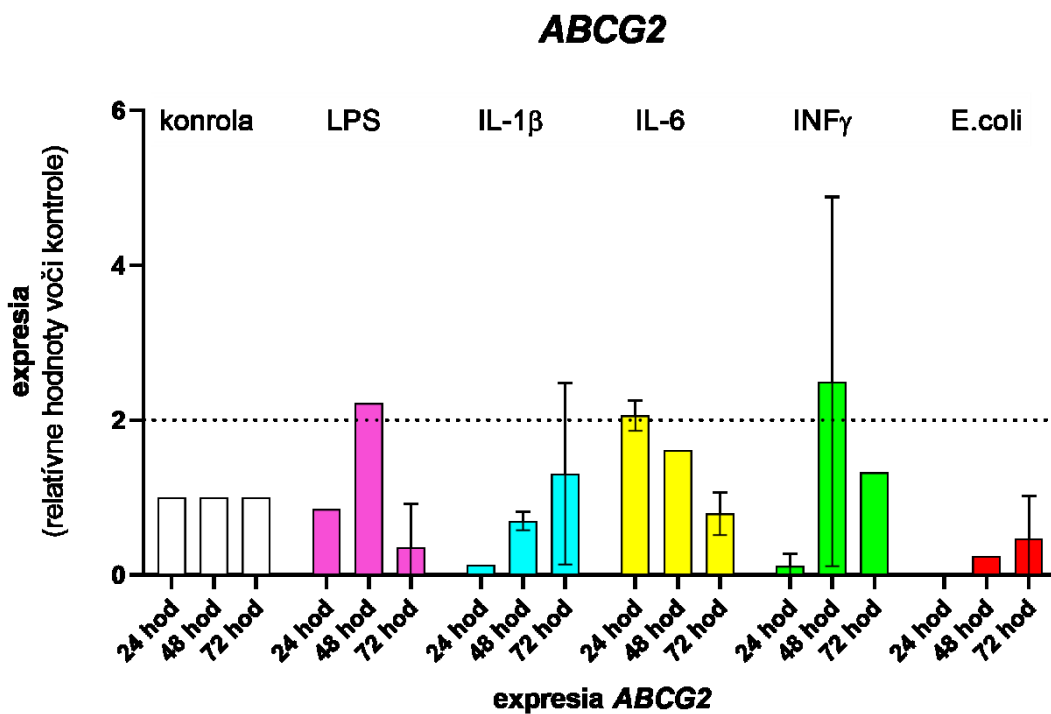
V jednotlivých podkapitolách sa nachádzajú výsledky z vykonaných metód detailnejšie uvedených v experimentálnej časti. Uvedené grafy zobrazujú zmenu expresie ABC a OATP membránových prenášačov v závislosti na rozličných prozápalových stimulátoroch.

5.1 Výsledky expresie transportérov

Na hodnotenie expresie vybraných transportérov bola použitá metóda qRT-PCR. Táto metóda je normalizovaná k expresii referenčného génu *YWHAZ* a vyjadrená ako pomer k nestimulovanej kontrole. Referenčný, tzv. housekeepingový gén bol zvolený na základe predchádzajúcich experimentálnych výsledkov a následnej analýzy pomocou programu RefFinder (*Michalská, 2019*).

5.1.1 Expresia ABC transportérov po stimulácii prozápalovými cytokínmi v bunkovej línii BeWo

Expresia *ABCB1* nebola detekovaná v žiadnej, kontrolnej ani stimulovanej vzorke. Vo všetkých vzorkách sme pozorovali zmeny expresie *ABCG2* v čase. Zvýšenie expresie *ABCG2* nad dvojnásobok kontroly môžeme vidieť v reakcii na expozíciu endotoxínu LPS po 48 hod, IL-6 po 24 hod a INF γ po 48hod, hoci v poslednom prípade vykázala zmena vysokú variabilitu (Obr. 13).

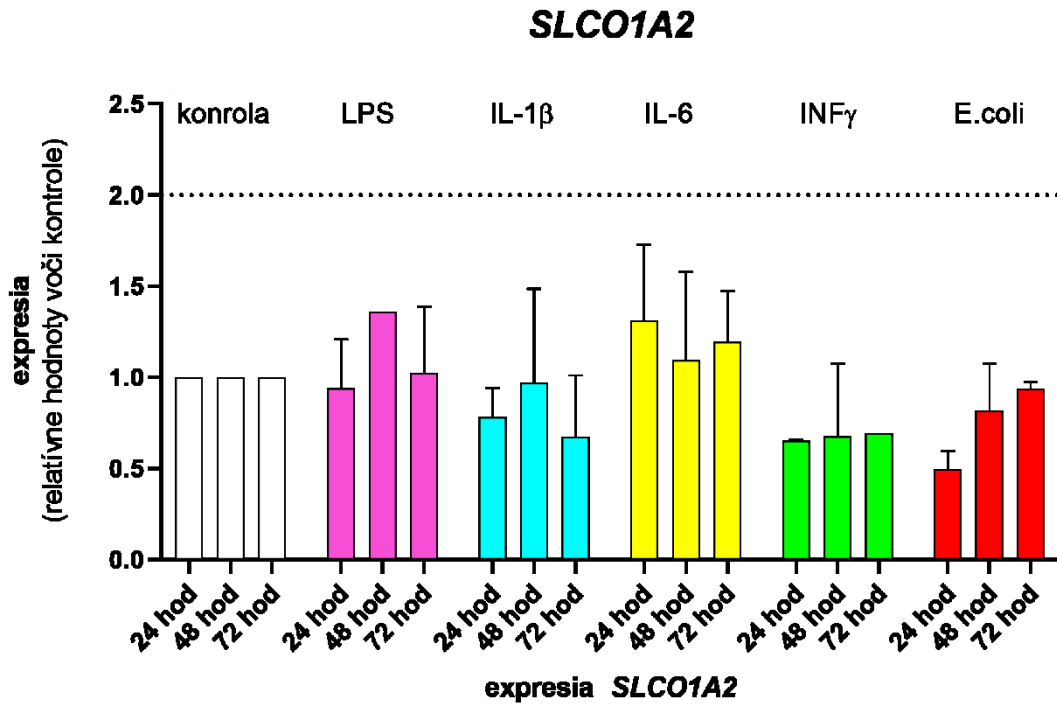


Obr. 13: Grafické znázornenie výsledkov *BeWo* expresie ABCG2 efluxného transportéru na základe vybraných prozápalových stimulátorov v rôznych časových intervaloch. Prezentované dáta odpovedajú priemernej hodnote minimálne 3 nezávislých biologických pokusov prevedených a stanovených v duplikátoch \pm smerodajná odchýlka.

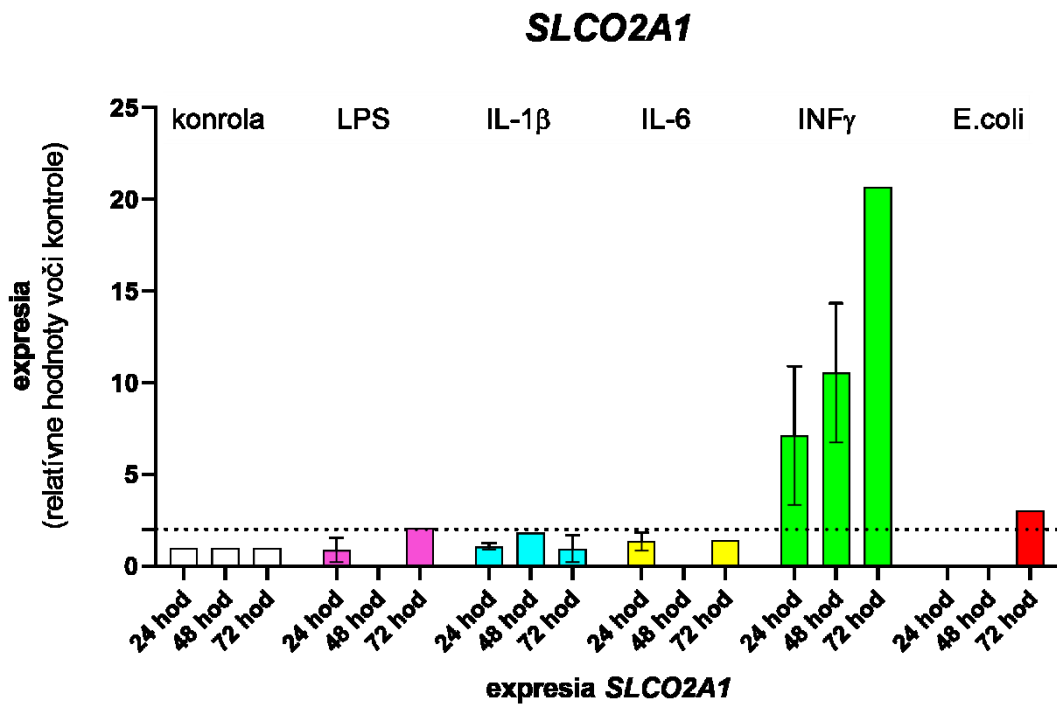
5.1.2 Výsledky expresie OATP transportérov

Z našich vybraných OATP transportérov sme expresiu *SLCO1B3* nedetekovali v žiadnej nastimulovanej vzorke. Rovnako takto bola u väčšiny vzoriek nedetekovateľná expresia génu *SLCO3A1* po vystavení stimulátorom. Nadprahovú hodnotu dvojnásobku kontroly dosiahla expresia *SLCO4A1* po vystavení stimulátorom INF γ a LPS po dobu 48 hod (Obr. 14D). Vysoké zvýšenie expresie môžeme pozorovať v géne *SLCO2A1* za pomoci stimulátoru INF γ , a to po 24, 48 i 72 hod a mierne zvýšenie expresie za pomoci stimulátoru *E. coli* po 72hod (Obr. 14B). V géne *SLCO2B1* pozorujeme zvýšenú expresiu po vystavení stimulátorom *E.coli* po dobu 48 hod, avšak táto expresia bola medzi vzorkami vysoko variabilná (Obr. 14E).

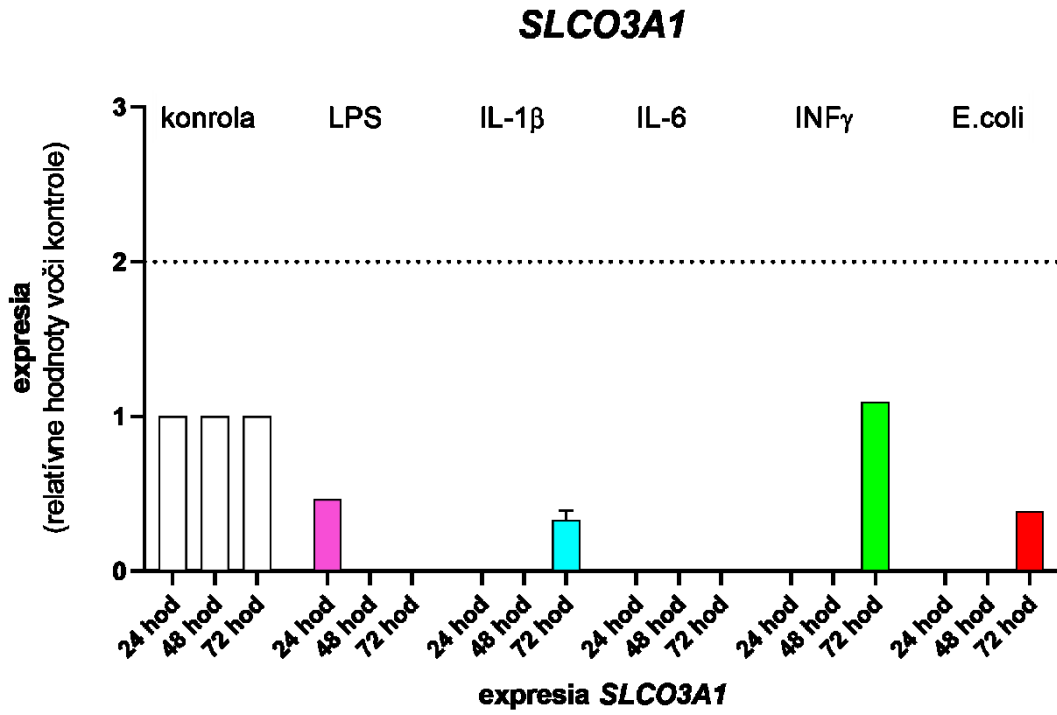
A)



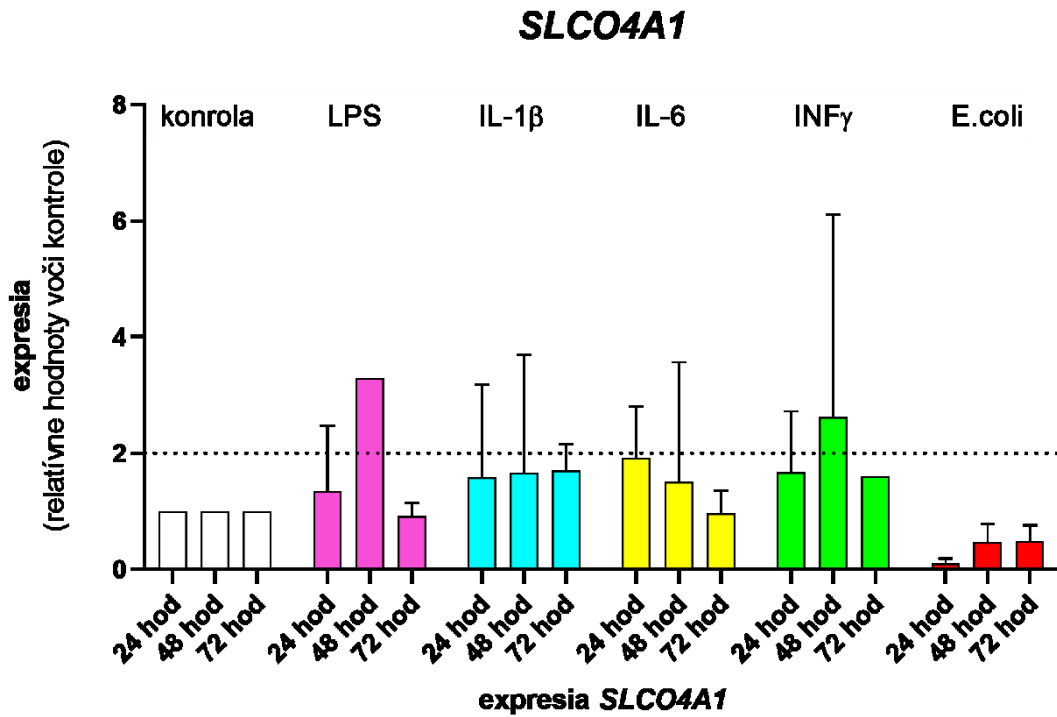
B)



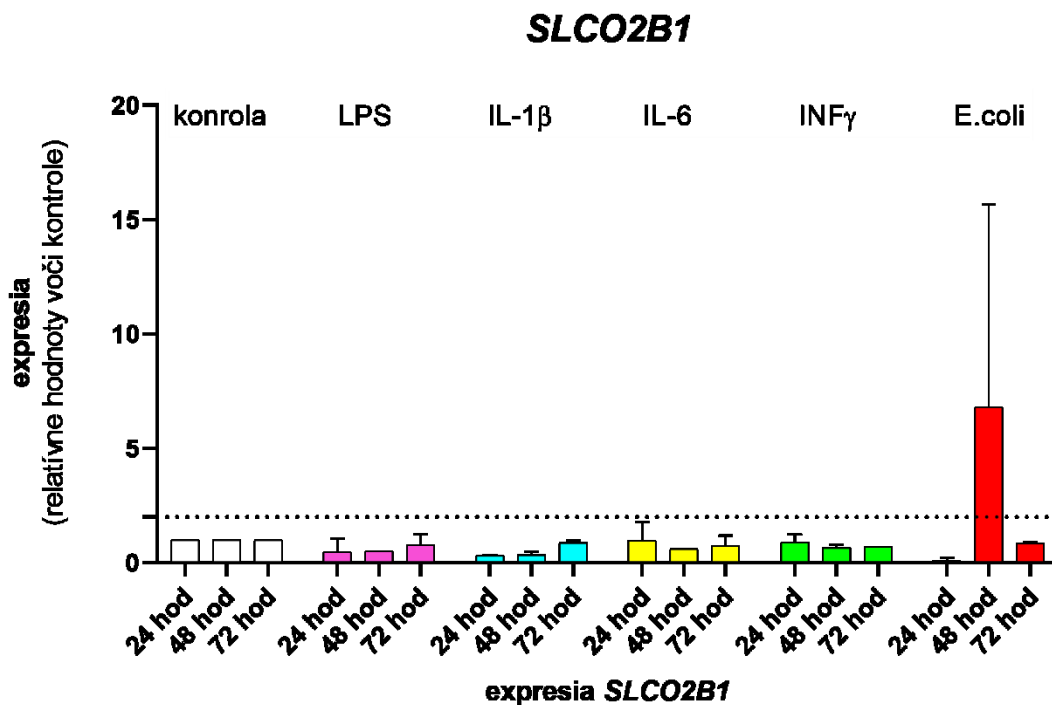
C)



D)



E)



Obr. 14: Grafické znázornenie výsledkov BeWo expresie vybraných OATP transportérov – *SLCO1A2*, *SLCO2A1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1*, *SLCO2B1* na základe vybraných prozápalových stimulátorov v rôznych časových intervaloch. Prezentované dáta odpovedajú priemernej hodnote minimálne 3 nezávislých biologických pokusov prevedených a stanovených v duplikátoch \pm smerodajná odchýlka.

5.2 Výsledky zmeny produkcie hCG placentárnych explantov

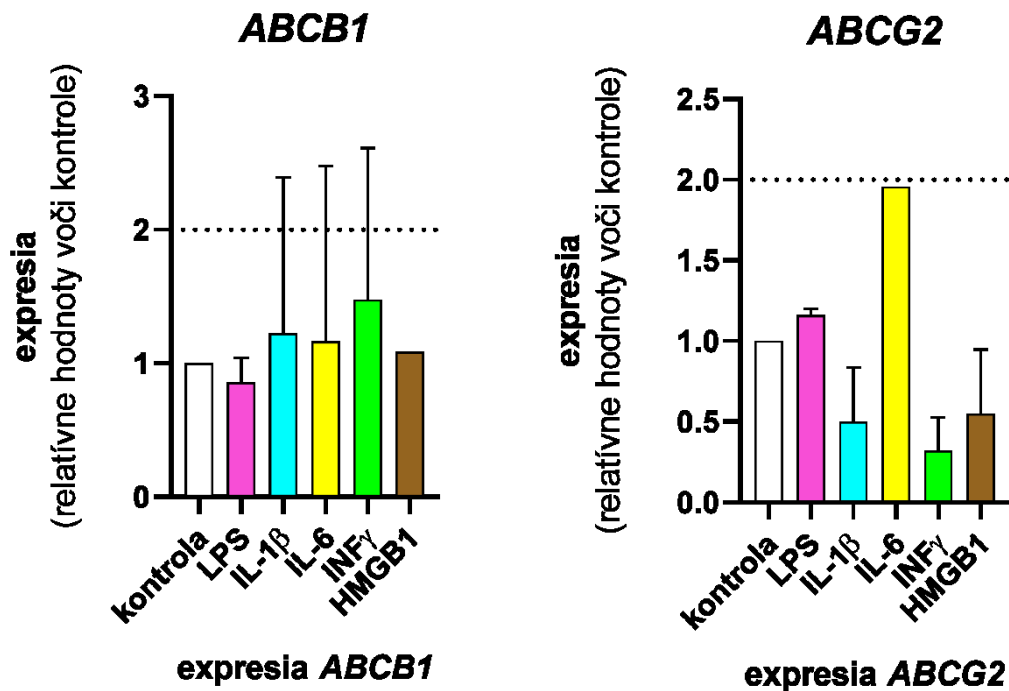
Pomocou našich použitých vzoriek sa vypočítali hodnoty produkcie hCG pomocou postupu uvedeného v experimentálnej časti. Celkový medián produkcie hCG pre 2. deň vyšiel 7,6 ng/ml a celkový medián pre 5. deň vyšiel 97,4 ng/ml na 1 explant. Celkovo došlo u všetkých explantov v priemere k 12,8-násobnému zvýšeniu produkcie hCG medzi 5. a 2. dňom kultivácie, čo potvrdzuje viabilitu a funkčnosť kultivovaných tkanív.

5.3 Expresia študovaných transportérov na placentárnych explantoch

Pri hodnotení expresie vybraných transportérov na vilózných explantoch sa použil rovnaký postup, ktorý bol použitý pri hodnotení výsledkov BeWo expresie. Nasledujúce grafy boli opäť rozdelené podľa jednotlivých génov.

5.3.1 Expresia ABC transportérov v placentárnych explantoch

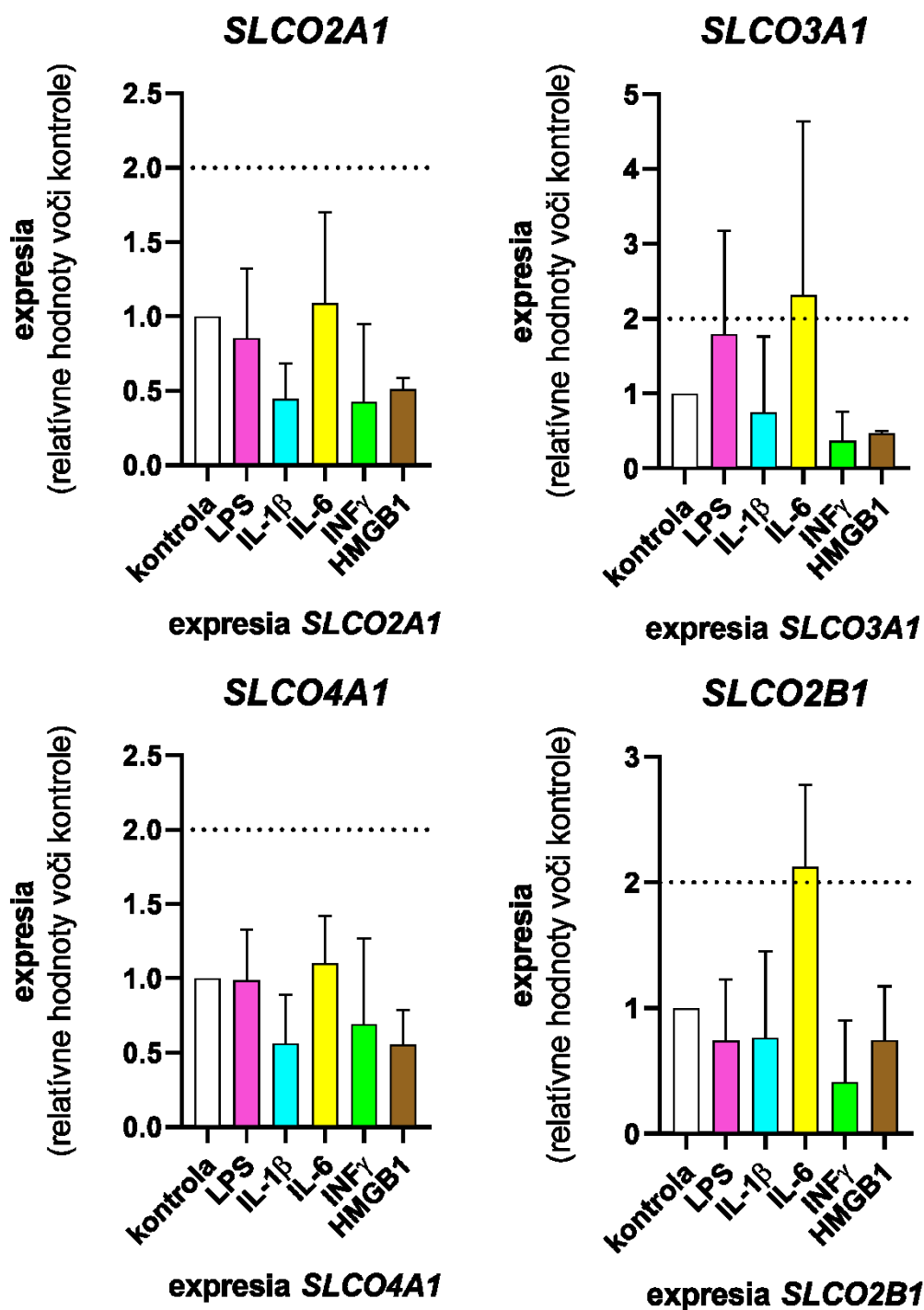
V expresii *ABCB1* a *ABCG2* môžeme pozorovať určitú tendenciu k nárastu hodnôt v prítomnosti stimulátorov IL-1 β , IL-6 a INF γ . Dáta však vykazovali pomerne vysokú variabilitu medzi experimentmi a pozorované zmeny tak nedosiahli štatistickej významnosti. U *ABCG2* bolo zrejmé zvýšenie expresie po stimulácii prostredníctvom IL-6 (Obr. 15).



Obr. 15: Grafické znázornenie výsledkov vybraných ABC transportérov na expresii vilózných explantov, konkrétne *ABCB1* a *ABCG2* efluxných transportérov pomocou vybraných prozápalových stimulátorov. Prezentované dáta odpovedajú priemernej hodnote 3 nezávislých meraní \pm smerodajná odchýlka.

5.3.2 Expresia OATP transportérov v placentárných explantoch

Expresia *SLCO1A2* a *SLCO1B3* sa nedetekovala v žiadnom z placentárných explantov, ani po stimulácii prozápalovými látkami. U ostatných OATP génov, konkrétne *SLCO2A1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1* a *SLCO2B1* sme nepozorovali zmenu expresie v prítomnosti stimulantu LPS modelujúceho bakteriálnu stimuláciu, zmeny nenastali ani v prítomnosti IL-1 β , INF γ či HMGB1. Tendenciu ku zvýšenej expresii sme pozorovali u génov *SLCO3A1* a *SLCO2B1* po stimulácii explantov pomocou prozápalového stimulantu IL-6 (Obr. 16).



Obr. 16: Grafické znázornenie výsledkov vybraných OATP transportérov na expresii vilózných explantov, konkrétne *SLCO2A1*, *SLCO3A1*, *SLCO4A1*, *SLCO2B1* na základe vybraných prozápalových stimulátorov. Prezentované dáta odpovedajú priemernej hodnote 3 nezávislých meraní \pm smerodajná odchýlka.

6 DISKUSIA

Počas tehotenstva sa placentárne tkanivo musí prispôbiť rôznym genetickým, vývojovým či iným vonkajším stimulom. Správne fungovanie placenty je nevyhnutné pre vývoj a rast plodu. Expresia membránových transportérov je vo všeobecnosti ovplyvňovaná a regulovaná kvantom vonkajších a vnútorných faktorov. Tieto faktory môžu navodiť zmeny a spôsobiť, že expresia transportérov sa môže v priebehu tehotenstva meniť.

V našej práci sme sa zamerali na ABC transportéry, ktoré v placentárnom tkanive plnia predovšetkým protektívnu úlohu pred škodlivými látkami, ktoré sa môžu vyskytovať v krvi matky. Značnú časť sme venovali aj OATP transportérom, ktoré majú tiež dôležitú úlohu v placentе, hlavne pri prijímaní mnohých nenahraditeľných zlúčenín pre vývoj plodu.

V tele matky môže dochádzať k rôznym zmenám v priebehu tehotenstva. Expresia transportérov a tým aj samotná funkcia placenty, môže byť ovplyvnená patologickými faktormi a liekmi používanými počas tehotenstva. Medzi najznámejšie patofyziologické zmeny v tehotenstve patrí hypoxia, preeklampsia, intrauterínna rastová restrikcia (*Han et al., 2018; Staud & Ceckova, 2015; Javam et al., 2014*), gestačný diabetes mellitus (*Ruchat et al., 2013; Anger et al., 2012*), intrahepatálna cholestáza (*Cui et al., 2009*), HIV (*Camus et al., 2006*) či samotné nádorové ochorenia (*Staud & Ceckova, 2015*). Jednou z častých zmien vyskytujúcich sa práve v tehotenstve, je zápalová infekcia. V tejto práci sme sa zamerali na štúdium zmeny expresie ABC a OATP transportérov pomocou prozápalových mediátorov, a to na úrovni mRNA expresie analyzovanej pomocou qRT-PCR. Zvolili sme si preto modely, ktoré sú využívané pri štúdiách placentárneho transportu a to konkrétne nádorovú bunkovú líniu BeWo a explanty vilózneho tkaniva.

Výsledky z BeWo nádorovej bunkovej línie, boli v skutku rozdielne v rôznych časových intervaloch pri rôznych pokusoch. Dá sa teda diskutovať, či je tento model vhodný pre študovanie zmien expresie transportérov. Jedná sa o nádorovú líniu a rada regulačných mechanizmov v nej prebieha odlišne než vo fyziologických bunkách

trofoblastu. Naše výsledky potvrdili skôr pozorovanú absenciu expresie *ABCB1* v tejto bunkovej línii odvodenej od choriokarcinomu placenty (*Ceckova et al., 2006; Tupova et al., 2020*). Avšak expresia *ABCB1* nebola následne pozorovaná ani po expozícií buniek prozápalovými cytokínmi.

Explanty vilózneho tkaniva odrážajú známu expresiu *ABCB1* v placentárnom tkanive a celkovo sú považované za relevantnejší model pre študovanie zmien expresie transportérov, pretože pochádzajú z fyziologicky zdravých placent rodičiek.

Zmena expresie v ABC transportéroch vplyvom prozápalovej stimulácie

Mason et al. (2011) vo svojej práci naznačuje, že prozápalové cytokíny môžu byť zapojené do ciest regulujúcich *ABCB1* a *ABCG2*. Vo svojej práci pozoroval vyššiu expresiu *ABCB1* a *ABCG2* u placent získaných z predčasných pôrodov, kde mohla byť prítomná zápalová reakcia. V našej práci však zmena expresie *ABCB1* u BeWo bunkovej línii vôbec nenastala. V prípade *ABCG2* pozorujeme zvýšenú hladinu expresie u explantov vystavených niektorým prozápalovým mediátorom (Obr. 13). Na rozdiel pri použití vilóznych explantov *ex vivo* došlo k miernym (nie výrazne signifikantným) zmenám zvýšenia expresie týchto transportérov. Najvyššiu mieru stimulácie v našich vzorkách vykazoval IL-6 (Obr. 15), ktorý je ako prozápalový cytokín jedným z markerov chorioamnitiídy a je detekovateľný pri takýchto zápalových stavoch vo vzorkách plodovej vody. *Kacerovsky et al. (2018)* a *Petrovic et al. (2015)* vo svojej práci preukázali, že expresia prozápalového mediátoru IL-6 sa zvyšuje pri zápalových infekciách. Samotné stimulatory *E.coli* a LPS by mali simulovať infekčný zápal, no k žiadnej výraznej zmene v expresii v našich vzorkách nedošlo, čo naznačuje, že v prípade bakteriálnej infekcie agens exprimujúcom LPS vo svojej bunkovej stene k zmenám expresie transportérov, a tým k transportnej funkcii placenty nenastáva. K výraznej zmene expresie avšak nedochádzalo ani pri použitom HMGB1, ktorý mal stimulovať sterilný zápal.

Zmena expresie hCG explantov v priebehu kultivácie

Na overenie životaschopnosti placentárnych explantov sme využili metódu stanovenia hCG produkcie pomocou ELISA testu. *Turner et al. (2006)* vo svojej práci preukázal na zmeny expresie hCG explantov v priebehu kultivácie a hlavne nárast medzi 2. a 5. dňom kultivácie. Pomer v produkcii hCG za posledných 24 hodín medzi dňom 5. a dňom 2. slúži ako rozhodujúce kritérium pre odhad rekonštitúcie trofoblastu placentárneho tkaniva v kultúre a sprostredkovanie i viability explantov v priebehu experimentu. Naším výsledkom produkcie explantov sme zistili, že sa hodnoty mediánu zvýšili v priemere o viac ako 12x a teda môžeme konštatovať, že placentárne explanty produkovali hCG hormón počas celej kultivácie podobne ako pri fyziologickej produkcii. Týmto výsledkom sme si potvrdili, že priebeh celej kultivácie prebiehal v poriadku. Vzorky boli zdravé a tým sme ich mohli využiť pri ďalších stimulačných experimentoch.

Zmena expresie v OATP transportéroch vplyvom prozápalovej stimulácie

Membránové transportéry patriace do skupiny OATP sa oproti ABC transportérom v placente vyskytujú v menšej miere. Bohužiaľ, aj preto nemáme dostatok informácií ohľadom zmeny expresie z predchádzajúcich štúdií. V našej štúdií sme poukázali na nárast expresie *SLCO2A1* v BeWo bunkách pri stimulácii pomocou $\text{INF}\gamma$ (Obr. 14B). $\text{INF}\gamma$ je cytokín, ktorý zohráva dôležitú úlohu v aktivácii makrofágov. V súlade s našim pozorovaním, *Blitek & Szymanska (2020)* poukázali vo svojej práci na zvýšenú expresiu *SLCO2A1* pri súčasnej zvýšenej hladine $\text{INF}\gamma$. V placentárnych explantoch sme však toto pozorovanie už nepotvrdili a významnú zmenu expresie *SLCO2A1* po 48-hodinovej stimulácii pomocou $\text{INF}\gamma$ nepozorovali. Zvýšená expresia vplyvom stimulantu $\text{INF}\gamma$ a tiež LPS bola pozorovaná aj pre gén *SLCO4A1* (Obr. 14D). Opäť, toto pozorovanie bolo viazané hlavne na BeWo bunky a u placentárnych explantov nebolo viditeľné žiadne zvýšenie. Stimulácie pomocou *E.coli*, ktorá indukuje rovnako ako samotná baktéria zápal, naznačila možnosť zvýšenia expresie *SLCO2B1* v BeWo bunkách, avšak tento transportér mal zvýšenú expresiu predovšetkým vplyvom IL-6 u placentárnych explantov, podobne ako gén *SLCO3A1*.

Vzhľadom na vyššie preukázané dáta, môžeme hypotetizovať, že model BeWo bunkovej líniei vykazoval veľmi rozličné výsledky, čo mohlo byť spôsobené, že sa jednalo o nádorovú líniu, a preto uprednostňujeme model vilóznych explantov získaných priamo z ľudského placentárneho tkaniva. Všeobecne stimulácie na IL-6 vedú k miernej zvýšenej expresii niektorých z OATP transportérov. Domnievame sa, že táto expresia je spojená s transportom prostaglandínov, ktoré sú prozápalovými cytokínmi. Pre získanie validných záverov by bolo potrebné rozšíriť počet hodnotených vzoriek vilóznych explantov, ktoré sú na kultiváciu a vyhodnotenie pracné a časovo náročné. Získané výsledky by sa mali potom overiť aj na úrovni proteínov a priamo na úrovni transportérovej funkcie.

7 ZÁVER

Membránové transportéry lokalizované v placentárnej membráne plnia významnú úlohu pri transporte endo- či exogénnych substrátov. Hlavne ABC transportéry hrajú aj významnú protektívnu rolu, v podobe efluxu potenciálne škodlivých látok.

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom konkrétnych ABC a OATP placentárnych transportérov a ich možnou zmenou génovej expresie za pomoci stimulácie prozápalovými mediátormi. Práca obsahuje základné informácie o týchto transportéroch a detailné postupy práce pri samotnom získaní výsledkov.

Výsledky predložené v tejto práci poukazujú na to, že priama prozápalová stimulácia, jednak stimulátormi napodobňujúcimi prozápalovú stimuláciu (LPS, IL-1 β , IL-6, INF γ , *E.coli*), tak aj tými ktorí stimulujú sterilný zápal (HMGB1) nevedla k zreteľnému konzistentnému ovplyvneniu expresie placentárnych transportérov v oboch modeloch. Môžeme tvrdiť, že ochranná funkcia ABC transportérov bude na rovnakej úrovni ako u fyziologických placentách a nebude obmedzený alebo zvýšený transport prostredníctvom OATP transportérov. Zaujímavým výsledkom bola stimulácia IL-6 a INF γ , kde sme pozorovali určitú zmenu, ktorá môže byť v súvislosti s transportom prostaglandínov ako zápalovými cytokínmi.

8 LITERATÚRA

Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. (2018). *The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review*. *Veterinary world*, 11(5), 627–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>

Al-Enazy, S., Ali, S., Albekairi, N., El-Tawil, M., & Rytting, E. (2017). *Placental control of drug delivery*. *Advanced drug delivery reviews*, 116, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.08.002>

Anger, G. J., Cressman, A. M., & Piquette-Miller, M. (2012). *Expression of ABC Efflux transporters in placenta from women with insulin-managed diabetes*. *PloS one*, 7(4), e35027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035027>

Ategeka, J., Wasswa, R., Olwoch, P., Kakuru, A., Natureeba, P., Muehlenbachs, A., Kanya, M. R., Dorsey, G., & Rizzuto, G. (2019). *The prevalence of histologic acute chorioamnionitis among HIV infected pregnant women in Uganda and its association with adverse birth outcomes*. *PloS one*, 14(4), e0215058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215058>

Bai, M. R., Sun, D. L., Jiang, H. D., & Zheng, C. H. (2016). *[Expression and regulation of drug transporters in placenta]*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 51(6), 879–885.

Beis K. (2015). *Structural basis for the mechanism of ABC transporters*. *Biochemical Society transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>

Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). *Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides*. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>

Blitek, A., & Szymanska, M. (2020). *Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ and γ agonists differentially affect prostaglandin E2 and cytokine synthesis and nutrient transporter expression in porcine trophoblast cells during implantation.* *Theriogenology*, 152, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.024>

Bloise, E., Ortiga-Carvalho, T. M., Reis, F. M., Lye, S. J., Gibb, W., & Matthews, S. G. (2016). *ATP-binding cassette transporters in reproduction: a new frontier.* *Human reproduction update*, 22(2), 164–181. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv049>

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). *The placenta: a multifaceted, transient organ.* *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1663), 20140066. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>

Camus, M., Deloménie, C., Didier, N., Faye, A., Gil, S., Dauge, M. C., Mabondzo, A., & Farinotti, R. (2006). *Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women.* *Placenta*, 27(6-7), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.08.001>

Ceckova, M., Libra, A., Pavek, P., Nachtigal, P., Brabec, M., Fuchs, R., & Staud, F. (2006). *Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo.* *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(1-2), 58–65. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04324.x>

Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., & Staud, F. (2006). *P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function.* *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 22(3), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007>

Cole L. A. (2010). *Biological functions of hCG and hCG-related molecules.* *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>

Cui, T., Liu, Y., Men, X., Xu, Z., Wu, L., Liu, S., & Xing, A. (2009). *Bile acid transport correlative protein mRNA expression profile in human placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy.* *Saudi medical journal*, 30(11), 1406–1410.

Čech, E., Hájek, Z., Maršál, K., Srp, B. a kol. *Porodnictví. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-80-247-1303-8

Čečková M. *Role membránových transportérů ve farmakokinetice a mnohočetné lékové resistenci.* Hradec Králové, 2017. Habilitační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems.* Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 72(2), 317–364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>

Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.* Genome research, 11(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>

Didion S. P. (2017). *Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature.* International journal of molecular sciences, 18(12), 2563. <https://doi.org/10.3390/ijms18122563>

Ericson, J. E., & Laughon, M. M. (2015). *Chorioamnionitis: implications for the neonate.* Clinics in perinatology, 42(1), 155–ix. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.10.011>

Goldenberg, R. L., Hauth, J. C., & Andrews, W. W. (2000). *Intrauterine infection and preterm delivery.* The New England journal of medicine, 342(20), 1500–1507. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005183422007>

Grube, M., Köck, K., Oswald, S., Draber, K., Meissner, K., Eckel, L., Böhm, M., Felix, S. B., Vogelgesang, S., Jedlitschky, G., Siegmund, W., Warzok, R., & Kroemer, H. K. (2006). *Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart.* Clinical pharmacology and therapeutics, 80(6), 607–620. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2006.09.010>

Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). *Growth and function of the normal human placenta.* Thrombosis research, 114(5-6), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>

Guttmacher, A. E., Maddox, Y. T., & Spong, C. Y. (2014). *The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time*. *Placenta*, 35(5), 303–304. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.012>

Han, L. W., Gao, C., & Mao, Q. (2018). *An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus*. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 14(8), 817–829. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1499726>

Huber, R. D., Gao, B., Sidler Pfändler, M. A., Zhang-Fu, W., Leuthold, S., Hagenbuch, B., Folkers, G., Meier, P. J., & Stieger, B. (2007). *Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(2), C795–C806. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00597.2005>

Huppertz B. (2008). *The anatomy of the normal placenta*. *Journal of clinical pathology*, 61(12), 1296–1302. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277>

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). *Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review*. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Javam, M., Audette, M. C., Iqbal, M., Bloise, E., Gibb, W., & Matthews, S. G. (2014). *Effect of oxygen on multidrug resistance in term human placenta*. *Placenta*, 35(5), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.010>

Chan, T., Zhu, L., Madigan, M. C., Wang, K., Shen, W., Gillies, M. C., & Zhou, F. (2015). *Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells*. *British journal of pharmacology*, 172(9), 2343–2353. <https://doi.org/10.1111/bph.13060>

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., & Li, J. (2016). *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade*. *Cancer letters*, 370(1), 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>

Kacerovsky, M., Vlkova, B., Musilova, I., Andrys, C., Pliskova, L., Zemlickova, H., Stranik, J., Halada, P., Jacobsson, B., & Celec, P. (2018). *Amniotic fluid cell-free DNA in preterm prelabor rupture of membranes.* *Prenatal diagnosis*, 38(13), 1086–1095. <https://doi.org/10.1002/pd.5366>

Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). *Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases.* *Biomolecular concepts*, 9(1), 64–79. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>

Kalliokoski, A., & Niemi, M. (2009). *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics.* *British journal of pharmacology*, 158(3), 693–705. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x>

Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X. G., Yan, Z., Sun, X., Wang, H., Wang, Q., Tsung, A., Billiar, T. R., Zeh, H. J., 3rd, Lotze, M. T., & Tang, D. (2014). *HMGB1 in health and disease.* *Molecular aspects of medicine*, 40, 1–116. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.05.001>

Kittnar, O. a kol. *Lékařská fyziologie.* 1.vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4

Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., & Tsung, A. (2008). *HMGB1: endogenous danger signaling.* *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(7-8), 476–484. <https://doi.org/10.2119/2008-00034.Klune>

Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M. G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P. J., & Hagenbuch, B. (2001). *Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver.* *Gastroenterology*, 120(2), 525–533. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21176>

Li, Q., & Shu, Y. (2014). *Role of solute carriers in response to anticancer drugs.* *Molecular and cellular therapies*, 2, 15. <https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-15>

Lin, H., Joehanes, R., Pilling, L. C., Dupuis, J., Lunetta, K. L., Ying, S. X., Benjamin, E. J., Hernandez, D., Singleton, A., Melzer, D., Munson, P. J., Levy, D., Ferrucci, L., & Murabito, J. M. (2014). *Whole blood gene expression and interleukin-6 levels.* Genomics, 104(6 Pt B), 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.10.003>

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). *SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities.* Nature reviews. Drug discovery, 14(8), 543–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>

Mao Q. (2008). *BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation.* Pharmaceutical research, 25(6), 1244–1255. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9537-z>

Mason, C. W., Buhimschi, I. A., Buhimschi, C. S., Dong, Y., Weiner, C. P., & Swaan, P. W. (2011). *ATP-binding cassette transporter expression in human placenta as a function of pregnancy condition.* Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 39(6), 1000–1007. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.038166>

Menon, R., Taylor, R. N., & Fortunato, S. J. (2010). *Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome.* Placenta, 31(2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.012>

Meyer zu Schwabedissen, H. E., Ware, J. A., Finkelstein, D., Chaudhry, A. S., Mansell, S., Leon-Ponte, M., Strom, S. C., Zaher, H., Schwarz, U. I., Freeman, D. J., Schuetz, E. G., Tirona, R. G., & Kim, R. B. (2011). *Hepatic organic anion transporting polypeptide transporter and thyroid hormone receptor interplay determines cholesterol and glucose homeostasis.* Hepatology (Baltimore, Md.), 54(2), 644–654. <https://doi.org/10.1002/hep.24391>

Michalská M. *Expresia vybraných membránových transportérov v placentách tehotných žien s diagnostikovanou predčasnou ruptúrou plodových obalov.* Hradec Králové, 2019. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Nakanishi, T., & Tamai, I. (2017). *Roles of Organic Anion Transporting Polypeptide 2A1 (OATP2A1/SLCO2A1) in Regulating the Pathophysiological Actions of Prostaglandins.* The AAPS journal, 20(1), 13. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0163-8>

Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group.* Clinical microbiology reviews, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>

Nigam S. K. (2015). *What do drug transporters really do?.* Nature reviews. Drug discovery, 14(1), 29–44. <https://doi.org/10.1038/nrd4461>

Peng, C. C., Chang, J. H., Lin, H. Y., Cheng, P. J., & Su, B. H. (2018). *Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis.* Pediatrics and neonatology, 59(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.09.001>

Petrovic, V., Kojovic, D., Cressman, A., & Piquette-Miller, M. (2015). *Maternal bacterial infections impact expression of drug transporters in human placenta.* International immunopharmacology, 26(2), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.020>

Piccioli, P., & Rubartelli, A. (2013). *The secretion of IL-1 β and options for release.* Seminars in immunology, 25(6), 425–429. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.007>

Roztočil, A. a kol. Moderní porodnictví. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1941-2

Ruchat, S. M., Houde, A. A., Voisin, G., St-Pierre, J., Perron, P., Baillargeon, J. P., Gaudet, D., Hivert, M. F., Brisson, D., & Bouchard, L. (2013). *Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases.* Epigenetics, 8(9), 935–943. <https://doi.org/10.4161/epi.25578>

Schaller, L., & Lauschke, V. M. (2019). *The genetic landscape of the human solute carrier (SLC) transporter superfamily.* Human genetics, 138(11-12), 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02081-x>

Schneider H. (1991). *Placental transport function*. *Reproduction, fertility, and development*, 3(4), 345–353. <https://doi.org/10.1071/rd9910345>

Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. *Advances in immunology*, 96, 41–101. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2)

Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). *Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy*. *Pharmacology & therapeutics*, 149, 1–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>

Staud, F., & Ceckova, M. (2015). *Regulation of drug transporter expression and function in the placenta*. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 11(4), 533–555. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1005073>

Staud, F., Cervený, L., & Ceckova, M. (2012). *Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure*. *Journal of drug targeting*, 20(9), 736–763. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>

Stillwell, W. (2013). *Membrane Transport*. *An Introduction to Biological Membranes*, 305–337. doi:10.1016/b978-0-444-52153-8.00014-3

Szakács, G., Váradi, A., Ozvegy-Laczka, C., & Sarkadi, B. (2008). *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. *Drug discovery today*, 13(9-10), 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.12.010>

Szöllösi, D., Rose-Sperling, D., Hellmich, U. A., & Stockner, T. (2018). *Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters*. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1860(4), 818–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.028>

Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., & Tsuji, A. (2000). *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family*. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(1), 251–260. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2922>

Tang, X., Chang, S., Luo, Q., Zhang, Z., Qiao, W., Xu, C., Zhang, C., Niu, Y., Yang, W., Wang, T., Zhang, Z., Zhu, X., Wei, X., Dong, C., Zhang, X., & Dong, H. (2019). *Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB2FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism*. *Nature communications*, 10(1), 4175. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11977-1>

Tita, A. T., & Andrews, W. W. (2010). *Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis*. *Clinics in perinatology*, 37(2), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2010.02.003>

Trowitzsch, S., & Tampé, R. (2018). *ABC Transporters in Dynamic Macromolecular Assemblies*. *Journal of molecular biology*, 430(22), 4481–4495. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.028>

Tupova, L., Hirschmugl, B., Sucha, S., Pilarova, V., Székely, V., Bakos, É., Novakova, L., Özvegy-Laczka, C., Wadsack, C., & Ceckova, M. (2020). *Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta*. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 129, 110506. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110506>

Turner, M. A., Roulstone, C. J., Desforges, M., Cretney, M., Champion, E., Lacey, H., & Greenwood, S. L. (2006). *The extent and variability of effects of culture conditions on the secretion of human chorionic gonadotrophin and interleukin-6 by human, term placental explants in culture*. *Placenta*, 27(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.12.004>

Vijayakumar, E. C., Bhatt, L. K., & Prabhavalkar, K. S. (2019). *High Mobility Group Box-1 (HMGB1): A Potential Target in Therapeutics*. *Current drug targets*, 20(14), 1474–1485. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190618125100>

Vogel, J. P., Chawanpaiboon, S., Moller, A. B., Watananirun, K., Bonet, M., & Lumbiganon, P. (2018). *The global epidemiology of preterm birth*. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 52, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003>

Walker, N., Filis, P., Soffientini, U., Bellingham, M., O'Shaughnessy, P. J., & Fowler, P. A. (2017). *Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences†*. Biology of reproduction, 96(4), 733–742. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox012>

Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2015). *The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance*. Critical reviews in oncology/hematology, 96(2), 220–256. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.012>

Wilkins S. (2015). *Structure and mechanism of ABC transporters*. F1000prime reports, 7, 14. <https://doi.org/10.12703/P7-14>

Zhang, B., Liang, R., Zheng, M., Cai, L., & Fan, X. (2019). *Surface-Functionalized Nanoparticles as Efficient Tools in Targeted Therapy of Pregnancy Complications*. International journal of molecular sciences, 20(15), 3642. <https://doi.org/10.3390/ijms20153642>