

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Studie vlivu adenosinu na proliferaci buněčné linie JEG-3

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Nguyen Ngoc Duong

Prohlášení:

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

V Hradci Králové 1.9.2022

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné poznámky a rady, který mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Mohammedu Naji Husaen Ali za velkou pomoc během experimentální části diplomové práce. Dále děkuji své rodině a blízkým za podporu po celou dobu studia.

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Nguyen Ngoc Duong

Školitel: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: Studie vlivu adenosinu na proliferaci buněčné linie JEG-3

Adenosin je signální molekula purinového charakteru, která se podílí na syntéze nukleových kyselin. Transport hydrofilních nukleosidů skrz plazmatickou a organelové membrány je zajištěn dvěma rodinami: SLC28 kódující koncentrační nukleosidové transportéry (CNTs) a SLC29 kódující ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs). Placenta je komplexní, rychle rostoucí orgán. Vykazuje určitou podobnost s nádory s tím rozdílem, že růst je plně kontrolován. Bylo zjištěno, že u nádorových, ale i některých typů nenádorových buněk, proliferaci podporují extracelulární nukleosidy. Placenta exprimuje vysoké hladiny NTs, což naznačuje schopnost placenty přijímat i vylučovat nukleosidy a využívat je pro svůj růst.

Cílem této práce je testování vlivu adenosinu a dalších nukleosidů na proliferaci trofoblastu. Analýza byla provedena na JEG-3 buněčné linii odvozené od placentárního choriokarcinomu pomocí několika metod monitorujících zvýšení počtu buněk na různých úrovních: i) CCK-8 metody, ii) Click-It EdU, iii) CyQuant a iv) analýzy proliferčního markeru *MKI-67*. Adenosin, ale i další nukleosidy zvyšovaly proliferaci buněčné linie JEG-3.

Tato práce přináší výsledky vlivu adenosinu a ostatních nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněk a přispívá k porozumění mechanismu vlivu nukleosidů na proliferaci buněčné linie odvozené od placenty. Tato studie je prvním krokem k navazující studii, která by měla být provedena na placentárních explantech, u nichž je prokázána zachovaná schopnost proliferace.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Nguyen Ngoc Duong

Supervisor: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of adenosine on the proliferation of JEG-3 cell line

Adenosine is a purinergic signaling molecule that is used in nucleic acid synthesis. Transport of hydrophilic nucleosides through the plasma and/or organelle membranes is provided by equilibrative nucleoside transporters (ENTs), members of the SLC29A transporter family, and concentrative nucleoside transporters (CNTs), members of the SLC28A transporter family. The placenta is a complex and rapidly growing organ. It shows some patterns similar to tumors except for the fact that the placenta's growth is fully controlled. It was found that extracellular nucleosides support the proliferation of cancerous and some non-cancerous cells. The placenta expresses high levels of NTs which indicates the placenta's ability to take up the nucleosides from circulation, however, the contribution of this process to placental growth is known.

The diploma thesis aims to test the effect of adenosine and other nucleosides on trophoblast proliferation. We evaluated whether adenosine and other nucleosides increase the proliferation of the choriocarcinoma-derived JEG-3 cell line. We analyzed cell proliferation using methods i) CCK-8, ii) Click-It EdU, iii) CyQuant, and iv) analysis of proliferation marker *MKI-67*.

We have shown the effect of adenosine and other nucleosides on the proliferation of JEG-3 cells. Therefore, this diploma thesis helps to understand their mechanism of proliferation. In the future, the results should be confirmed in explants known to maintain the ability to proliferate.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	7
2	ÚVOD	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1.	Placenta: funkce, vývoj a struktura	11
3.2	Placentární modely	13
3.3	Transport v placentě	14
3.4	Nukleosidy	15
3.4.1	Adenosin: funkce a syntéza	16
3.4.2	Nukleosidové transportéry	17
3.4.3	Expres a lokalizace nukleosidových transportérů v placentě	18
3.5	Regulace NTs (ENT, CNT) a AR a jejich vzájemná interakce	19
4	HYPOTÉZA	21
5	CÍL PRÁCE	22
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
6.1	Chemikálie a reagenty	23
6.2	Přístroje	24
6.3	Kultivace buněčné linie JEG-3	25
6.4	Příprava JEG-3- buněk pro proliferační testy	25
6.5	Metodika CCK-8	26
6.6	Metodika CyQUANT Cell Proliferation	26
6.7	Metodika Click-iT EdU	26
6.8	Metodika RT-PCR	27
6.9	Statistická analýza dat:	28
7	VÝSLEDKY	29
7.1	Analýza exprese nukleosidových transportérů v JEG-3 buněčné linii	29
7.2	Analýza vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněčné linie pomocí CCK8	29
7.3	Analýza vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněk pomocí Click-IT EdU	31
7.4	Sledování vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 pomocí metody Cyquant	33
7.5	qRT-PCR analýza vlivu adenosinu na genovou expresi <i>MKI-67</i> a ARs	35
8	DISKUSE	37
9	ZÁVĚR	40
10	LITERATURA	41

1 SEZNAM ZKRATEK

Ado	adenosin
AMP	adenosimonofosfát
API	voda pro injekci
AR	adenosinový receptor
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
CREB	vazebný protein odpovídající na cAMP
CTB	cytotrofoblasty
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
Gua	guanosin
hCG	lidský choriový gonadotropin
HIF-1 α	hypoxií indukovatelný faktor 1 - alfa
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
MKI-67	proliferační marker
NTs	nukleosidové transportéry
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PDE	fosfodiesteráza
PKA	proteinkináza A

SLC	z angl. solute carrier transporter
STB	syncytiotrofoblast
WST-8	1-methoxyfenazinmethylsulfát

2 ÚVOD

Placenta je komplexní a rychle rostoucí orgán, který zamezuje přímému kontaktu krevního oběhu matky a plodu. Během těhotenství zastává pro vyvíjející se plod roli plic, ledvin, jater, střeva a placentou tvořené endokrinní působky a tím regulují metabolismus a fyziologii matky; napomáhají správnému vývoji a programování plodu (Burton & Jauniaux, 2015). Placentární bariéra je tvořena polarizovanou vrstvou trofoblastu, která je složená z kmenových buněk, cytotrofoblastu (CTB) a diferencovaného syncytiotrofoblastu (STB) (Nicholson R, 2013).

Transport živin, endogenních látek do placenty a plodu nebo odvod odpadních látek z plodu zajišťují transportéry lokalizované v cytoplasmatické membráně syncytiotrofoblastu (Gaccioli & Lager, 2016a). Mezi takové transportéry patří např. nukleosidové transportéry (NTs), které zajišťují primárně přenos nukleosidů a látek strukturálně od nich odvozených (King et al., 2006b). Placenta exprimuje vysoké hladiny NTs, což naznačuje schopnost placenty přijímat i vychytávat nukleosidy (Traut, 1994); placentární tkáň obsahuje velké množství nukleosidů a jejich metabolitů.

NTs dělíme na ekvilibrační (ENTs) a koncentrační (CNTs) (Young et al., 2013). CNTs jsou influxní koncentrační nukleosidové transportéry kódované solute-carrier gene 28 (SLC28) a ENTs jsou kódované geny SLC29 a zajišťují usnadněnou difuzi nukleosidů. SLC28 a SLC29 rodiny zahrnují 3 a 4 podskupiny, které se od sebe odlišují jejich substrátovou selektivitou a energetickou potřebou (Li et al., 2012). Tkáňová distribuce těchto transportérů není mezi tkáněmi rovnoměrná; navíc jejich exprese může být regulována (Molina-Arcas et al., 2009a). Konkrétně u adenosinu NTs svým přenosem regulují jeho extracelulární koncentraci, dokonce i jeho signalizaci při zánětlivém a imunitním procesu (Haskó et al., 2008). Extracelulární adenosin je především získán enzymatickou konverzí z adenosinu trifosfátu (ATP), který je uvolněn z různých druhů buněk (např. platelety, neutrofil); následně působí skrz čtyři druhy adenosinových receptorů (AR) (Löffler et al., 2007).

Každý AR je charakterizován unikátní buněčnou a tkáňovou distribucí a fyziologickým efektem, a proto jsou rozděleny na čtyři podtypy A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 (Young et al., 2013). A_1 a A_3 aktivují G_i a G_o , nacházející se na vnitřní straně membrány, které signalizují snížení aktivity adenylát cyklázy a tím i cAMP hladiny. Zatímco A_{2A} asociovaný s G_s proteinem vykazuje opačný jev: zvyšuje aktivitu adenylát cyklázy, tím i cAMP a PKA, která dokáže fosforylizovat fosfodiesterázu (PDE), receptory nebo cAMP response element-binding protein (CREB) (Ohta & Sitkovsky, 2001). V jiné studii bylo popsáno, že by placenta měla exprimovat všechny čtyři

subtypy (Traut, 1994a). Vzhledem k širokému rozsahu účinku adenosinu je významné sledovat jeho extracelulární koncentraci a činnost navázání na jednotlivé podtypy ARs během fyziologického i patofyziologického stavu. Bylo zjištěno, že během těhotenství je hladina adenosinu v trimestru těhotenství vyšší, avšak při preeklampsii je hladina snižena jak v mateřském, tak i fetoplacentálním oběhu (Espinoza et al., 2011).

Existují studie poukazující na roli nukleosidů pro růst nádorů. Placenta a nádor vykazují stejnou aktivitu, a to schopnost napadat zdravé tkáně, tvořit nové cévy a podporovat prostředí chráněné před imunitním systémem. Placentální trofoblasty rychle proliferují a napadají mateřské deciduum (Costanzo et al., 2018b). Obecně je již známo, že purinové nukleosidy a nukleotidy mají vliv na proliferaci buněk např. lidské endoteliální buňky v mozku, astrocyty či buňky vaskulárního hladkého svalstva (Rathbone et al., 1992). Adenosin je za normálních podmínek v extracelulární tekutině ve velmi nízkých koncentracích (v řádech nM). Při patologických procesech se jeho koncentrace zvyšuje ve formě ATP (Leone & Emens, 2018). Na základě zmiňovaných studií můžeme uvažovat důležitost nukleosidů v placentárním vývoji.

Cílem této práce bude testování vlivu adenosinu a dalších nukleosidů na proliferaci trofoblastu pomocí experimentů provedených na JEG-3 buněčné linii. Především se budeme zaměřovat na adenosin, u kterého je již známá fyziologická role, přítomnost v cirkulaci a působení skrz adenosinové receptory. Proliferaci jsme sledovali na úrovni metabolické, syntetické aktivity DNA a proliferační aktivity (pomocí markeru).

Pro studium placenty je možné využít řadu modelů, které zahrnují duální perfuze lidské a potkaní placenty, explanty, primární trofoblasty, vilózní fragmenty, vezikuly a další (Staud & Ceckova, 2015). Role nukleosidů ve vývinu placenty nebyla dosud studována. V prvním kroku jsme tedy potřebovali ověřit hypotézu a zavést metodiku analýzy buněčné proliferace v placentě. Experimenty jsme tedy prováděli na buněčné linii JEG-3, která patří mezi zavedené in vitro modely a buňky je jednoduché kultivovat (Miller et al., 2005). Buňky JEG-3 jsou hypertriploidní, klonálně odvozené buňky lidského kmenu izolované z Erwin-Turnerovo nádoru. Vytváří maligní nádor shodný s choriokarcinomem a jsou schopné exprimovat funkční NTs (Cervený et al., 2018; Darashchonak et al., 2014; Jiraskova et al., 2018). Může tedy platit hypotéza, že influx nukleosidů slouží pro tvorbu nukleotidů, prekurzorů pro DNA syntézu (Fernández-Veledo et al., 2004) a tedy proliferaci těchto buněk.

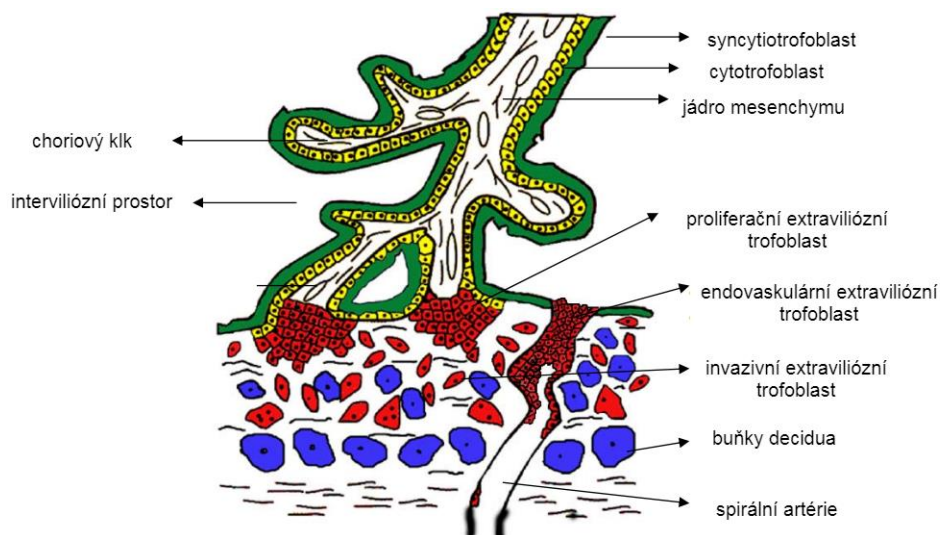
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Placenta: funkce, vývoj a struktura

Placenta je nezbytně důležitý orgán pro správný růst a vývoj plodu. Jedná se o komplexní systém, který zajišťuje přestup kyslíku a živin z matky do plodu, exkreci odpadních látek, dále funkci imunologickou (Guttmacher et al., 2014) a hormonální jako producent choriového gonadotropinu HcGH, estrogeneru a progesteronu (Staud & Karahoda, 2018). V neposlední řadě představuje pro plod ochrannou bariéru před vstupem mikroorganismů či škodlivými látkami užívané matkou jako jsou alkohol, drogy, léčiva (Nicholson, 2013).

Vývoj placenty začíná ve chvíli, kdy dojde k zahrnutí blastocysty do dělohy. Blastocysta je tvořena vnitřním embryoblastem a vnější vrstvou trofoblastu, která zajišťuje nidaci a výživu, později vznik vnitřního mesodermu (Chang et al., 2018; Staud & Karahoda, 2018). Z vnější vrstvy trofoblastu jsou odvozené cytotrofoblasty, které se nadále dělí na dva hlavní fenotypy: nemigrující vilózní trofoblasty (VT) a invazivní extravilózní trofoblasty (EVT). Jedním z úkolů EVT je invaze do mateřské děložní tkáně a migrace k uterinním spirálním artériím, kde se dále diferencují za vzniku endovaskulárního trofoblastu. VT jsou navázané k vilózní bazální membráně a tvoří vrstvu epiteliálních buněk, které poté proliferují, diferencují a vytváří syncytiotrofoblast (STB) pokrývající celý povrch klku (Malassiné & Cronier, 2005). Hlavní funkcí STB je kontrola a zajištění přenosu látek mezi matkou a plodem. Příklady jsou aktivní transport aminokyselin, usnadněná difuze glukózy či syntéza β -hCG (beta podjednotka lidského choriového gonadotropinu) (Huppertz, 2018). Mezitím se z povrchu chorionu z trofoblastu formují primární choriové klky. Vyplnění mesenchymem se vytváří sekundární klky [5]; s vývojem plodového oběhového systému se formují kapiláry v klcích a dávají vzniku terciálnímu klkům (Nicholson, 2013).

Hlavními strukturami tvořícími placentu jsou mateřská a choriová ploténka oddělené intervilózním prostorem, kde se rozkládá bohatá síť klků. Povrch klku je tvořen vnějším mnohoyaderným STB, vnitřní vrstva jednojaderným CTB a fetálními cévami. Vlastní placentární bariéra je složená z bazální membrány trofoblastu, fetálních cév a vazivové tkáně. Klky jsou omývány volně cirkulující mateřskou krví pumpovanou z endometria. Krev matky a plodu se tedy nikdy nemísí. Vzájemná výměna plynů, živin a odpadních látek probíhá skrz placentární bariéru (Gaccioli & Lager, 2016b). Schéma struktury klku je znázorněno na Obr. 1.



Obr.1 struktura choriového klku: vnější vrstva (zelená) z mnohoaderného STB a vnitřní (žlutá) jednoderná CTB část. Klk se nachází v tzv. intervillózním prostoru, který je naplněn mateřskou krví (pumpovanou z endometria skrz artérie). Díky intervillóznímu prostoru může docházet k výměně plynů, živin a odpadních látek mezi fetálními kapilárami a mateřskými cévami (modré žíly jako odvod a červené artérie jako přívod). Převzato a upraveno z: https://www.researchgate.net/figure/Villous-cytotrophoblasts-yellow-fuse-to-form-the-syncytiotrophoblast-green-The_fig1_258830792

Jakákoliv chyba při vývinu placenty se může odrážet u plodu na úrovni anatomické, molekulární či metabolické. Barker et al. (1990,1993) publikoval první práce popisující vztah mezi velikostí placenty a plodu a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních a metabolických dysfunkcí v dospělém životě, čímž položil základy konceptu tzv. fetálního programování (Staud & Karahoda, 2018). Konkrétně se jednalo o zvýšení poměru hmotnosti placenty vůči porodní váze plodu. V druhém trimestru roste placenta rychleji než plod. Nutriční deficit může ovlivňovat růst plodu a tím změnit komplexní interakce mezi plodem, placentou a matkou. Mírná malnutrice může vést ke zvětšení placenty, ale ne plodu; tento jev může být vysvětlený jako adaptační mechanismus k udržení nutricí od matky. V jiné studii je uvedeno, že při chybném vývoji placenty může nastat tzv. IUGR (intrauterine growth restriction), což opět zvyšuje náchylnost ke kardiovaskulárním a metabolickým onemocněním v dospělém životě (Nicholson, 2013).

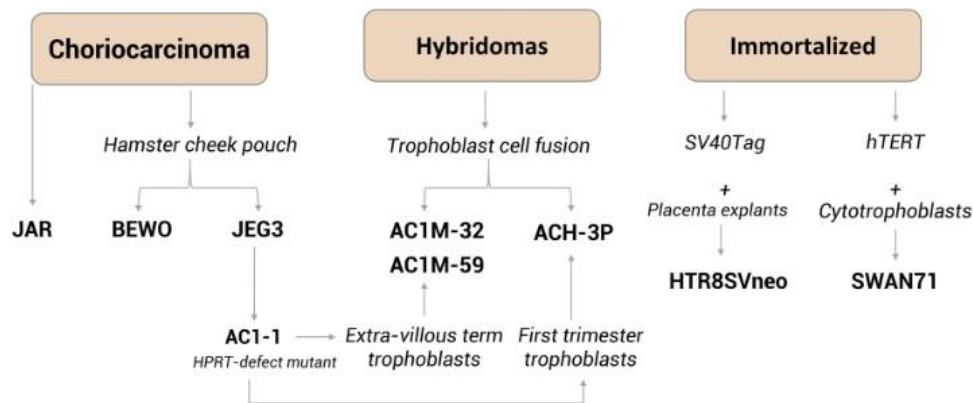
Preeklampsie je patologický stav během těhotenství, kdy trofoblasty nesprávně prorůstají cévy. Ve výsledku dochází k vasokonstrikci, omezení průtoku krve mezi matkou a plodem [4]. Nastává stav hypoxie a hypovolémie, který způsobuje zvýšení uvolňování katecholaminů a aktivaci krevních destiček kvůli poruše rovnováhy prostacyklinu a tromboxanu.

Edém, proteinurie a hypertenze jsou hlavními diagnostickými znaky tohoto stavu. Vedle toho lze predikovat preeklampsii pomocí proteinových markerů v různých fázích těhotenství např.: PAPP-A na konci prvního trimestru, Cystatin C od 15. týdne a od třetího trimestru proangiogenní faktor PIGF (Sahai et al., 2017). Kromě molekulárních markerů je preeklampsie doprovázena zvýšenou hladinou adenosinu v krvi matky (Espinoza et al., 2011) i placentě, dále abnormální funkcí ENTs ve fetoplacentální jednotce (Salsoso et al., 2017c). Cílem bylo zjistit, zda existuje přímá asociace mezi adenosinem a preeklampsií. Adenosin a purinový metabolismus je spojen s vysokou hladinou kyseliny močové v plazmě u žen s preeklampsií; ATP infuze generuje v myších onemocnění podobné preeklampsií. Dále víme, že adenosin indukuje vasodilataci i vasokonstrikci a reguluje angiogenezi, tudíž je možné že zvýšená hladina adenosinu ve fetoplacentální cirkulaci je adaptivním krokem kvůli změně mateřské krevní cirkulace (Escudero & Sobrevia, 2012). Navíc narušení funkce adenosin kinázy (enzymu regulující adenosin) vede k dysregulaci fetálního programování a tento fakt má poté vliv na kardio-metabolické následky (Silva et al., 2020).

3.2 Placentární modely

Placenta je evolučně diverzní orgán u jednotlivých zvířecích druhů: každý je charakteristický svou morfologií a molekulárním mechanismem. Navíc některé znaky se striktně vyskytují jen u primátů nebo lidské rasy. Z toho důvodu se vyhledávají a standardizují nové a vhodnější *in vitro* techniky, které by mohly nahradit *in vivo* modely. Momentálně komerčně dostupné jsou buněčné linie odvozené od trofoblastu, které jsou rozděleny do tří skupin: odvozené od choriokarcinomu, hybridoma a buňky učiněné nesmrtelnými.

Pro placentální výzkumy jsou nejčastěji užívané buněčné linie derivované od choriokarcinomu: BeWo, JEG-3 a JAR (Pastuschek et al., 2021). BeWo byla první lidská endokrinní buněčná linie, které byla sériově přenesena z maligní tkáně gestačního choriokarcinomu. JEG-3 jako sekundární buněčná linie byla klonálně a sériově odvozená od choriokarcinomu. Obě linie mají stejný DNA profil a podobné sekreční aktivity. BeWo jsou však citlivé k forskolinem-indukované syncytializaci. Linie JAR byla derivovaná přímo z placentálního trofoblastického nádoru a tím si zachovává mnoho morfologických a endokrinních rysů, které se nachází v lidském trofoblastu (Gonçalves et al., 2022). Shrnutí stromu rodových linií je znázorněno na Obr. 2.



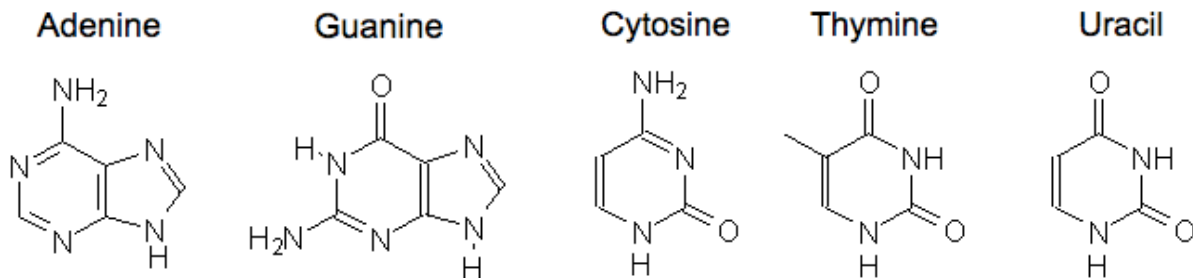
Obr.2.: Shrnutí rodových linií odvozené od trofoblastů. Základní rozdělení na choriokarcinom, hybridoma a nesmrtelné buňky. BeWo a JEG-3 jsou izolované z lícního vaku křečků. AC1-M32 a AC1-M59 jsou hybridomy, které vznikly fúzí AC1-1 (=HPRT-defektního mutanta JEG-3) s extravilózními trofoblasty. ACH-3P jsou produktem fúze AC1-1 s trofoblasty z prvního trimestru. Nesmrtelné buňky se získaly zvěčněním primárních trofoblastů. Převzato a upraveno z *Reproductive Toxicology* 112 (2022) 7-13 od (Gonçalves et al., 2022)

3.3 Transport v placentě

Jednotlivé látky přítomné v intervilózní krvi musí proniknout skrz placentální bariéru, aby dostály fetální cirkulace (Staud & Karahoda, 2018). Transport může probíhat pasivní cestou, a to prostou či usnadněnou difúzí, nebo aktivními transportéry; některé větší molekuly jsou pak transportovány endocytózou (Syme et al., 2004). Transportéry exprimované v STB se liší substrátovou specifitou, lokalizací (na bazální nebo apikální membráně), směrem transportu a závislostí na vnější energii (Staud & Karahoda, 2018). Množství přítomných transportérů je ovlivněno molekulárními regulacemi, patologickými ději (např. preeklampsie) nebo polymorfismy (Syme et al., 2004).

3.4 Nukleosidy

Nukleosidy nachází svůj význam v oblasti nutriční, energetické a syntetické. Jedná se o glykosidy, jejichž cukernou složkou je D-ribóza nebo 2deoxy-D-ribóza a na ní je připojena purinová báze adenin, guanin nebo pyrimidinová báze thymin, uracil nebo cytosin [1].



Obr.3: *Struktura purinových a pyrimidinových bází. Převzato a upraveno od <https://socratic.org/questions/what-is-difference-between-pyrimine-and-pyrimidine>*

Jsou základními stavebními kameny nukleotidů, z nichž jsou pak tvořeny nukleové kyseliny (NK). Role NK spočívá v uchování a překládání genetické informace v buňkách (Carrey et al., 2013). Hlavním místem syntézy purinů jsou játra. Ke konverzi purinových bází (adeninu, hypoxantinu, guaninu) v adenosinmonofosfát (AMP), inosinmonofosfát (IMP) a guanosinmonofosfát (GMP) je nutná přítomnost substrátu fosforobisyl-1-pyrofosfátu (PRPP) a katalytického enzymu fosforibosyl transferázu.

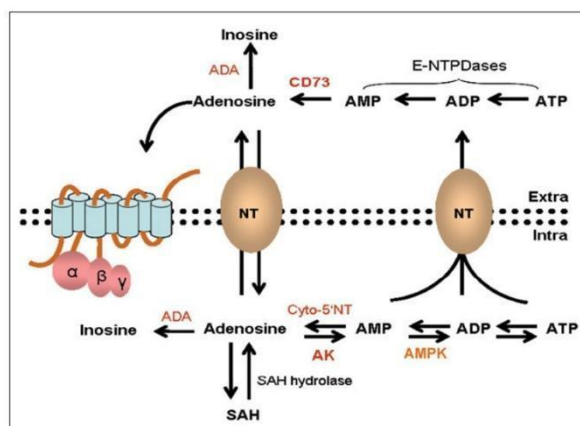
Syntéza probíhá i v erythrocytech, zde však ne *de novo* kvůli nepřítomnosti glutamin-PRPP-amidotransferázy; probíhá pouze recyklace volných purinových bází (adeninu, hypoxantinu, guaninu) a nukleosidů (adenosinu/Ado, inosinu/Ino, guanosinu/Gua) za tvorby vysoce energetických molekul adenosindifosfátu (ADP) a adenosintrifosfátu (ATP) za účasti adenylátkinázy, fosfoglycerátkinázy a pyruvátkinázy; guanosindifosfátu (GDP) a guanosintrifosfátu (GTP) v přítomnosti guanylátkinázy, nukleosidmonofosfátkinázy a nukleosiddifosfátkinázy. Defosforylací nukleotidů získáme příslušné nukleosidy: AMP > Ado, IMP > Ino, GMP > Gua; ty pak podléhají deaminaci (Ado > Ino) nebo fosforolýze Ino > Hyp. Hypoxantin a guanosin se uvolňují jako finální produkty katabolismu purinových nukleotidů v erythrocytech (Dudzinska et al., 2006).

3.4.1 Adenosin: funkce a syntéza

Adenosin je signální molekula purinového charakteru, která se nachází intra i extracelulárně. Extracelulární adenosin vzniká hydrolýzou ATP uvolněného z buněk pomocí adenosintrifosfatázy (ATPázy), adenosindifosfatázy (ADPázy) a 5'-nukleotidázy. Adenosin ovlivňuje vaskulární, nervový, respirační a endokrinní systém. Podílí se na syntéze nukleových kyselin, účastní se regulace imunitní odpovědi, zánětu, trombózy a angiogeneze (Pelleg & Porter, 1990). Jedná se tedy o klíčový element účastnící se nejen fyziologických, ale i patologických procesů (Leiva et al., 2017); například dlouhodobě zvýšená koncentrace v plazmě přispívá k rozvoji chronického zánětu, fibróze a dalším orgánovým poškozením (Borea et al., 2017). Je regulován adenosin kinázou a jeho působení je zprostředkováno metabotropními receptory: A₁R, A_{2A}AR, A_{2B}, A₃ (Young et al., 2013).

Záchyt adenosinových koncentrací a využití AR nabývá významu k zachycení a terapii různých onemocnění (Liu & Xia, 2015); např. A_{2A}AR agonisté se již uplatňují při terapii Parkinsonovy a Huntingtonovy choroby. Na druhou stranu se ukázalo, že ne vždy je farmakologicky cílená terapie založená na adenosinu a jeho receptorech spolehlivá. Jak již bylo zmíněno, AR se nachází v buňkách jak součástí patologického, tak i fyziologického stavu. Problémem mohou být neselektivní agonisté, u nichž je výsledný účinek těžko předvídatelný (Peleti et al., 2017).

V placentě též probíhá metabolizace adenosinu intra i extracelulárně. V intracelulárním kompartmentu může být fosforylizován adenosinkinázou; inkorporován do tzv. „adeninové nukleotidové nádrže“ nebo deaminován adenosindeaminázou na inosin (ten je defosforylizován na hypoxantin). Byla zpozorovaná i rychlá metabolická transformace adenosinu na bazální straně placenty (Acevedo et al., 1995). V jiné studii adenosintrifosfatáza, adenylátkináza a 5'-nukleotidáza byly mnohem aktivnější než adenosinkináza, adenosindeamináza a nukleosidfosforyláza (Sim et al., 1972). Výsledky této studie poukazují na to, že tvorba adenosinu z AMP nebo katabolismem je ovlivněna hladinou ATP. Metabolické schéma adenosinu vystihuje Obr. 4.



Obr. 4: Obecné schéma syntézy adenosinu a jeho metabolické dráhy uvnitř a vně buňky. Adenosin se syntetizuje hydrolýzou AMP působením cytosolické 5'-nukleotidázy (cyto-5'NT), dále může být fosforylován adenosin kinázou (AK). Následně může aktivovat AR a v případě nadbytku nevratně konvertován na inosin působením adenosin deaminázou (ADA). Zvýšenou spotřebou metabolické aktivity jsou usnadněnou difuzí a sekundárním aktivním transportem pumpovány ATP a adenosin do extracelulárního prostoru. Může tedy probíhat odbourávání ATP za vzniku adenosinu (Valdés et al., 2018). V rámci buňky jsou ATP a adenosin konstantně recyklovány defosforylací a fosforylací na základě energetické potřeby. Převzato od (Ham & Evans, 2012).

3.4.2 Nukleosidové transportéry

Transport hydrofilních nukleosidů skrz plazmatickou a organelové membrány je zajištěn dvěma rodinami NTs: SLC28 kódující Na-dependentní influxní koncentrační nukleosidové transportéry (CNTs) a SLC29 kódující ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs) řídící usnadněnou difuzi nukleosidů. Hrají klíčovou roli ve vychytávání nukleosidů a v menším množství nukleových bází či léčiv od nukleosidů odvozených. Mezi zástupce CNTs patří, CNT2 a CNT3 a ENTs zahrnují ENT1, ENT2, ENT3 a ENT 4 (Li et al., 2012).

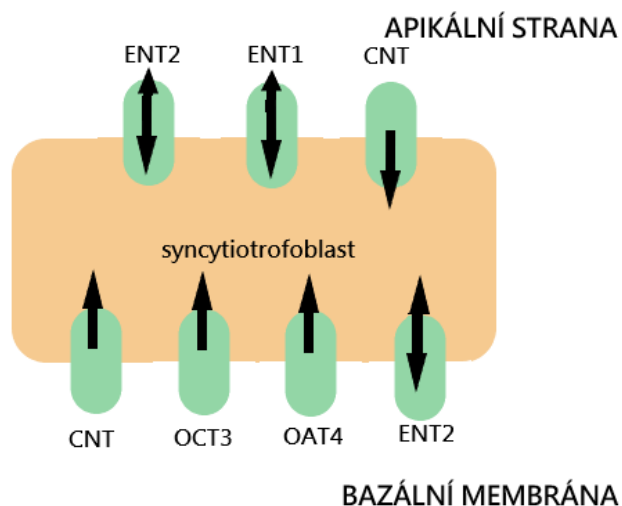
Všechny CNTs přenáší uridin. Avšak vůči purinovým a pyrimidinovým nukleosidům vykazují jednotlivé skupiny různou selektivitu. CNT1 přednostně přenáší pyrimidinové, purinové nukleosidy mají vysokou afinitu k CNT2, zatímco CNT3 transportuje pyrimidinové i purinové. Tento poznatek byl využit pro vývoj strukturálně podobných protinádorových a antivirových léčiv, která jsou právě transportována pomocí CNT transportérů. Jednotlivé druhy transportérů jsou exprimované v odlišných tkáních. CNT1 se nachází v ledvinách, játrech a tenkém střevě primárně v plazmatické membráně; CNT2 v srdci, kosterním svalstvu, placentě či mozku; CNT3 jsou široce rozšířené, primárně v plazmatické membráně, ale též v nukleární a mitochondriální membráně (Young et al., 2013).

ENT1 a ENT2 přenáší pyrimidinové i purinové nukleosidy a purinové nukleosidy mají k těmto transportérům mírně vyšší afinitu. ENT1 a ENT2 se funkčně odlišují pomocí inhibitoru nitrobenzylmercaptipurine riboside (NBMPR), který v koncentracích $\leq 1 \mu\text{M}$ inhibuje ENT1 a ve vyšších koncentracích ($\geq 1 \mu\text{M}$) inhibuje ENT2, ENT3 (Li et al., 2015). Dalším rozdílným znakem mezi těmito dvěma proteinovými transportéry je fakt, že ENT2 zajišťuje i přenos nukleových bází jako je hypoxantin (Robillard et al., 2008). Většina adenosinového uptake je zprostředkováno ENT1 a ENT2; jsou tedy funkčně nezbytnými adenosinovými transportéry ve většině druhů tkání. U ENT3 a ENT4 je mechanismus transportu stále nejasný (Salsoso et al., 2017). ENT3 se strukturně odlišuje od ENT1 a ENT2 (Young et al., 2013). Jedná se o pH-dependentní transportér purinových i pyrimidinových substrátů a uplatňuje svou funkci v membránách lyzozomů a pravděpodobně i mitochondrií (Singh et al., 2018). ENT4 zprostředkovává vylučování zejména serotoninu, a méně pak adenosinu. Vylučování adenosinu je posilováno kyselým extracelulárním pH, které je typické pro patologické situace jako je např. ischemie (Wang et al., 2012).

3.4.3 Exprese a lokalizace nukleosidových transportérů v placentě

Placenta patří mezi orgány s vyšší expresí ENTs. ENT1 a ENT2 jsou lokalizovány v apikální membráně, zatímco bazální strana obsahuje ENT2 a ENT1 podobný transportér. Množství mRNA ENT1 a ENT2 se neliší mezi prvním a třetím trimestrem, neuplatňuje se u nich epigenetická regulace a jejich množství se nemění v průběhu diferenciaci CTB, nicméně byly pozorovány inter-individuální rozdíly v expresi (Cervený et al., 2018). Situace s CNT je komplikovanější. Govindarajan a kol. nepozorovali CNT v placentě na proteinové úrovni, Errasti-Murugarren a kol. prokázali proteinovou expresi CNT1. My jsme v našich studiích potvrdili genovou expresi *SLC28A2* a *SLC28A3* ve všech vzorcích placenty, zatímco minimální expresi *SLC28A1* jsme detekovali pouze u některých donorů. Naše doposud nepublikovaná data naznačují proteinovou expresi CNT2 v apikální membráně a membráně jádra a potvrdili jsme, že genová exprese *SLC28A2* je vyšší v diferencovaném STB (Jirasková et al., 2018a). Genová exprese *SLC28A1*, *SLC28A2* a *SLC28A3* se během těhotenství zvyšuje, přičemž i v jejich případě se zjistila vysoká míra interindividuální variability; *SLC28A2* dominoval v prvním trimestru a v placentě, kdežto *SLC28A2* se ukázal jen v rámci placenty (Jirasková et al., 2018a). Pro zajímavost byla v BeWO (lidská odvozená choriokarcinómová buněčná linie) detekována mRNA *SLC28A2* a *SLC28A3* (Jirasková et al., 2018). Placentální ENT1 je lokalizován na apikální membráně, zatímco ENT2 se nachází jak na apikální, tak bazální straně

v trofoblastické vrstvě. CNTs byly zachyceny na úrovni mRNA a CNT1 (Yamamoto et al., 2007). U ENT3 se domnívá, že se vyskytuje hojně v intracelulárním prostoru a jeho role není doposud úplně známá (Beal et al., 2004). Všechny CNTs byly nachyceny na úrovni mRNA (Jiraskova et al., 2018a). Rozložení transportérů v placentě je znázorněno Obr. 5.



Obr. 5: Schématická ilustrace membránových transportérů v placentě: Na apikální straně mikrovilózní membrány se nachází OCTNs a ENT₁. Influx z bazální strany je zajištěn OCT₃ a OAT₄. ENT₂ je proliferován na obou stranách. Data ohledně exprese a lokalizace CNTs je stále neznámá. Inspirováno od (Cervený et al., 2021) a upraveno dle sebe.

3.5 Regulace NTs (ENT, CNT) a AR a jejich vzájemná interakce

Přesné mechanismy regulace NTs v placentě ještě nebyly dosud plně probádány. Jirásková et al. (2018) pozorovala vliv aktivace adenylátcyklázy, aktivace receptoru pro retinovou kyselinu a třeba epigenetických faktorů na míru genové exprese nukleosidových transportérů *SLC28A2* (kódující CNT2) a *SLC28A3* (kódující CNT3).

Existují i další studie zkoumající principy těchto transportérů, avšak na neplacentárních typech buněk. Např. ve studii využívající hepatocyty od Duflota popsali mechanismus regulace CNT2 A₁AR (Duflot et al., 2004). V práci (Medina-Pulido et al., 2013) konstatují, že CNT3 interaguje s AR při signalizaci adenosinem; v další studii konstatují, že A_{2B}AR reguluje ENT1 v placentálním mikrovaskulárním endotheliu. Byla rovněž nalezena souvislost mezi aktivací A_{2A}AR a zvýšenou expresí ENT2 (Godoy et al., 2014), přičemž o ENT2 je známo, že zvyšuje nabídku nukleosidů, což se podílí na zefektivnění syntézy DNA a postupu buněčného cyklu

(Grañé-Boladeras et al., 2016). Dále se konstatuje, že stimulace proteinkinázy C způsobí zvýšenou aktivitu ENT1 (Coe et al., 2002) nebo že faktor indukovaný hypoxií 1 α (HIF-1 α) stejně jako prozánětlivé cytokiny mohou negativně regulovat ENT1 expresi (Leisewitz et al., 2011).

Expresie adenosinových receptorů (AR) byla nalezena v různých karcinomových buňkách: v lidském kolorektálním adenokarcinomu nebo lidském melanomu linie A375. V lidských buňkách kolorektálního karcinomu se aktivací A₁AR a buněčné kaspázové signalizace reguluje apoptóza. V jiné studii se zjistila vysoká koncentrace A₁AR v buněčných liniích odvozených od prsního nádoru (Mirza et al., 2005). A_{2A}AR byl vysoce exprimován např. v Jurkatových leukemických T-buňkách nebo plicním karcinomu, kde ovlivňuje kromě buněčné proliferace i další děje (Sheth et al., 2014).

Podtyp A_{2B}AR je považován za proangiogenní. Aktivace tohoto receptoru stimuluje neovaskularizaci skrz produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) v lidských retinálních-endoteliálních buňkách (Sheth et al., 2014). Expresie A_{2B}AR je regulována HIF v buňkách kolorektálního karcinomu (Kong et al., 2006; Sheth et al., 2014). Inhibicí A_{2B}AR se výrazně sníží buněčná proliferace v hypoxickém prostředí (Ma et al., 2010; Sheth et al., 2014). Transportéry a receptory hrají roli v regulaci zdravých buněk i narušených (často nádorových) buněk. Mohou být regulovány nespočetnými drahami, proto identifikace receptoru a pochopení jeho mechanismu může být pilířem pro vývoj nové terapie onemocnění.

Doposud expresi AR v placentě řeší pouze jedna práce od (Darashchonak et al., 2014a). Expresi a funkci by tedy bylo vhodné potvrdit stejně jako expresi a funkci AR v buněčných liniích odvozených od chorikarcinomu.

4 HYPOTÉZA

Placenta je komplexní, rychle rostoucí orgán, který se velmi intenzivně stará, aby se plod správně vyvíjel. Placenta vykazuje určitou podobnost s nádory, s tím rozdílem, že růst je plně kontrolován. Předpokládá se, že proliferace placenty je stejně jako u nádorové tkáně podporovaná vícero mechanismy (Costanzo et al., 2018; Oliveira et al., 2021). U nádorových, ale i některých typů nenádorových buněk proliferaci podporují extracelulární nukleosidy (Fernandez-Gallardo et al., 2016; Rathbone et al., 1992.; Merighi et al., 2002). STB je plně vybaven pro transmembránový přestup nukleosidů, zároveň intracelulární molekulární děje mohou být regulovány extracelulárním adenosinem skrze vazbu na AR (Staud & Karahoda, 2018); Errasti-Murugarren et al., 2011; Jiraskova et al., 2018b). Adenosin je přítomný v krevním zásobení placenty a jeho koncentrace směrem ke konci gestace roste. I ostatní nukleosidy jsou přítomné v krevní cirkulaci (Dudzinska et al., 2010; Traut, 1994b).

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo studovat vliv adenosinu na proliferaci buněčné linie JEG-3 pomocí CCK-8 metody (analýza metabolické aktivity), Click-It EdU (měření syntetické aktivity DNA), CyQuant (stanovení celkového množství DNA) a analýzy proliferačního markeru MKI-67 pomocí qRT-PCR.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Chemikálie a reagenty

Reagenty pro kultivaci:

- PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Nutrient Gibco Opti-MEM I (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Reagenty pro CCK-8:

- CCK8 roztok – WST-8 (1-methoxyfenazin methylsulfát)

Reagenty pro Click-iT EdU

- HRP-azide
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- Click-iT EdU fixative
- Click-iT EdU master mix
- Click-iT EdU reaction additive
- Click-iT EdU wash buffer additive
- Amplex Ultrared reaction buffer
- Amplex Ultrared reagent a Amplex Ultrared stop reagent
- peroxid vodíku H_2O_2

Další potřebné látky, které nebyly součástí kitu:

- 95% ethanol
- 1,5% roztok BSA (bovine serum albumin) v PBS
- deionizovaná voda
- PBS (phosphate-buffered saline)

Reagencie pro RT-PCR:

- TRI REAGENT ® RT (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA)
- DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- TaqMan ® Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Master Mix pro reverzní transkripci (Reverse Transcription Master Mix) (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, ČR)
- Voda pro injekce/API
- Chloroform (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Ethanol (Merck, USA)

6.2 Přístroje

- Laminární box: BioUltra Telstar Class II Cabinet
- Thermal Cycler T-100 (Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA)
- QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Centrifuga: HERMLE Labortechnik GmbH, typ: Z 326 K (Wehingen, Německo)
- Spektrofotometr: NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Destičkový spektrofotometr: GENios Spectra FLUOR Plus (TECAN, Rakousko)

6.3 Kultivace buněčné linie JEG-3

Buňky JEG-3 jsou lidské hypertriploidní, klonálně odvozené buňky izolované z Erwin-Turnerova nádoru. Buněčná linie vytváří maligní nádor shodný s choriokarcinomem. Tato linie produkuje choriový gonadotropin, somatotropin a progesteron. Buňky jsou schopné přeměnit steroidní prekurzor na estron a estradiol [2]. Jedná se o dostupnou buněčnou linii, která exprimuje jak NTs tak AR (Cervený et al., 2018; Darashchonak et al., 2014b; Jirasková et al., 2018a).

JEG-3 byly kultivovány v médiu MEM (Minimum Essential Medium Eagle), tj. bez přítomnosti nukleosidů, a udržovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Po dosažení 70-80 % konfluencí byly buňky omyty PBS, trypsinizovány, resuspendovány a transferovány do nové kultivační láhve v poměru **1:3**.

6.4 Příprava JEG-3- buněk pro proliferační testy

Buňky nasazovány na 96-jamkovou destičku s tím, že každá jamka obsahovala 5000 (CCK-8 test, Click-iT EdU) nebo 15000 (CyQuant, Click-iT EdU) buněk a 100 µl kompletního média. Po 24 hodinách bylo kompletní medium nahrazeno médiem Opti-MEM obsahujícím testované nukleosidy; buňky byly v tomto médiu kultivovány po dalších 24 nebo 48 hodin. Poté byly provedeny analýzy proliferace pomocí CCK-8, CyQuant a Click-iT EdU testování. V případě testování pomocí qRT-PCR, buňky byly kultivovány v lahvích (25 cm²). Pro analýzu exprese NT byly využity buňky v konfluenci 80 % kultivované v kompletním médiu. Pro analýzu exprese *MKI-67* byly buňky trypsinizovány a po 24 hodinách kultivace bylo kompletní médium nahrazeno médiem Opti-MEM u kontrolních buněk a Opti-MEM s testovanou koncentrací adenosinu.

6.5 Metodika CCK-8

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) je určena ke zkoumání indukce a inhibice buněčné proliferace. Základem je ve vodě rozpustná tetrazolová sůl (WST-8), která je redukována mitochondriální dehydrogenázou a dává vzniku žlutě zbarvenému formazanu, jenž je rozpustný ve vodě, to znamená i v kultivačním médiu. Množství vzniklého formazanového zbarvení odpovídá množství živých buněk s enzymatickou aktivitou [3]. Deska se po 24 / 48hodinové inkubaci s nukleosidy omyla pomocí PBS, následně byl přidán Opti-MEM 100 μ l a předpřipravený roztok z CCK-8 kitu, nechal inkubovat 4 hodiny a následně měří absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 650 nm.

6.6 Metodika CyQUANT Cell Proliferation

Principem metody je užití CyQUANT GR barviva a detekce fluorescence při vazbě na buněčnou nukleovou kyselinu, která proporcčně odpovídá množství DNA, a tedy i buněk. Tímto způsobem lze zjistit množství DNA. Jedná se o senzitivní, rychlou a praktickou metodiku. Veškerý postup byl proveden dle protokolu od Thermo Fisher Scientific. Zamražené buňky se rozmrazí, lyzují s přidavkem CyQUANT GR barviva a následně se přímo měří fluorescence (jejíž excitační vlnová délka je 480nm a emisní maximum okolo 520nm). Metoda nevyžaduje dlouhé inkubace, omývání či výměnu kultivačního média.

6.7 Metodika Click-iT EdU

Tato metoda je založená na základě schopnosti nukleosidového analogu EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) se inkorporovat do dvoušroubovice buněk během její syntézy. Inkorporované EdU má ve své struktuře přítomnou alkylovou skupinu, které se kovalentně váže na HRP (horseradish/křenová peroxidáza) tzv. „klik“ reakcí mezi azidem a alkylem. Přítomnost peroxidu vodíku a přidavkem AmplexTM UltraRed reagentie vzniká fluorescenční produkt excitující při vlnové délce 568 nm a emitující při 585nm. Veškerý postup byl proveden dle protokolu od Thermo Fisher Scientific. Postup analýzy spočívá ve přidávání reagentů (10 μ M roztoku EdU; Click-iT EdU fixative k fixaci; omytí Click-iT EdU wash buffer; 200 μ l 1,5 % BSA; Amplex UltraRed mixture; Amplex Ultra red stop roztok k zastavení reakce) a následně jejich odsátí. Konečným krokem je měření na spektrometru při vlnové délce 568 nm – kvantifikujeme množství DNA v proliferujících buňkách. Jedná se o metodu citlivou na světlo, tudíž od procesu přípravy roztoků, po přidávání a měření je vhodné pracovat v temnějším prostředí.

6.8 Metodika RT-PCR

Nejdříve bylo odstraněno kultivační médium a buňky byly omyty PBS. Izolace mRNA byla provedena v malé kultivační lahvi dle protokolu Molecular Research Center pomocí TRI REAGENT®RT a chloroformové extrakce a precipitace isopropanolem. Čistota izolované RNA byla zkontrolována poměrem A260/280 a RNA integrita byla potvrzena elektroforézou na 1 % agarovém gelu. Koncentrace RNA se spočítala na základě měření A260. Pro reverzní transkripci byl využit gb Basic Reverse Transcription Kit od Generi Biotech s.r.o. Reverzní transkripce byla provedena s 1 µg celkové RNA ve 20µl reakci při teplotním profilu 42 °C po dobu jedné hodiny na přístroji Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Pro analýzu RT-PCR jsme použili destičku s 384 jamkami. Každá jamka obsahovala 5 µl reakční směsi složené z 2,5 µl TaqMan Universal Master Mix II, no UNG, 1 µl cDNA (ng), 1,25 µl API a 0,25 µl expresního systému (Tab. 1). Každá vzorek byl amplifikovaný v triplikát použitím PCR cycling profilu: 95 °C na 3 minuty, následně 40 cyklů při teplotě 95 °C na 15s a 60°C na 60 s. Získaná data byla normalizovaná na expresi dvou referenčních genů GAPDH a B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako „arbitrary units“.

Tab.1: Přehled expresních systémů a jejich kódů pro analýzu exprese *SLC28A*, *SLC29A*, *MKI-67* a referenčních genů *GAPDH* a *B2M*

NTs	<i>SLC29A1</i>	Hs01085704_g1 SLC29A1
	<i>SLC29A2</i>	Hs01546959_g1 SLC29A2
	<i>SLC28A1</i>	Hs00984403_m1 SLC28A1
	<i>SLC28A2</i>	Hs00188407_m1 SLC28A2
	<i>SLC28A3</i>	Hs00910439_m1 SLC28A3
MKI-67	<i>MKI-67</i>	Hs01032443_m1 MKI67
Referenční geny	<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1
	<i>B2M</i>	Hs00984230_m1

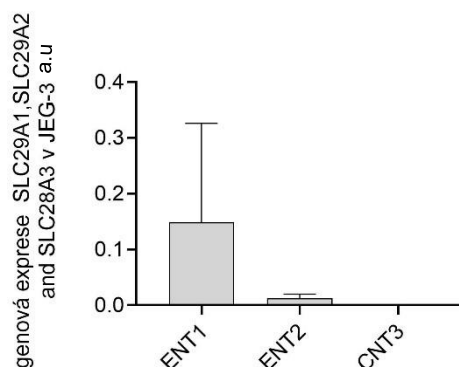
6.9 Statistická analýza dat

Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr hodnot ze 3-6 změřených jamek a n počtem nezávislých experimentů. Statistické analýzy byly provedeny párovým t-testem a one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Za statisticky signifikantní jsou považovány * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

7 VÝSLEDKY

7.1 Analýza exprese nukleosidových transportérů v JEG-3 buněčné linii

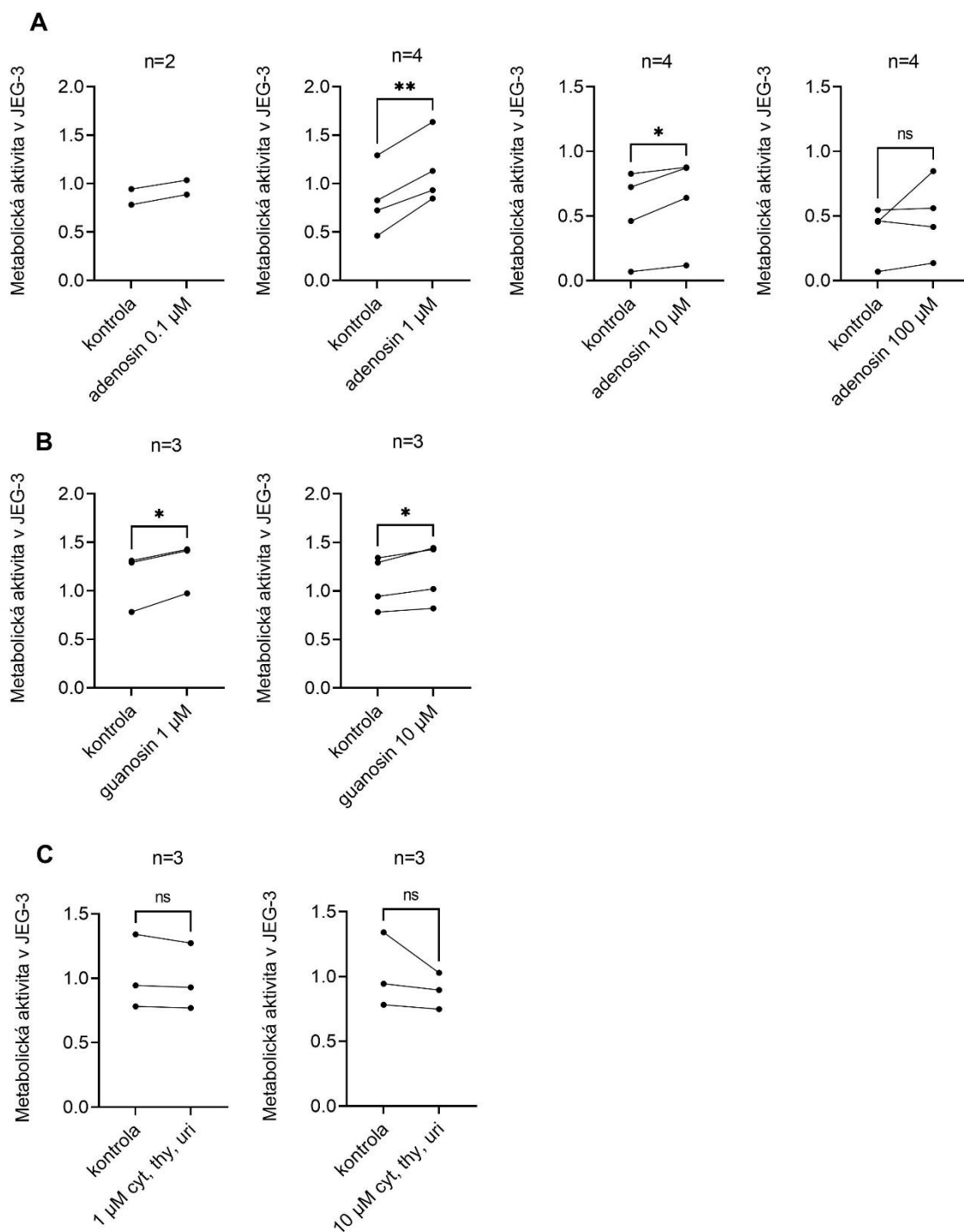
V buněčné linii JEG-3 jsme detekovali genovou expresi nukleosidových transportérů *SLC29A1* (ENT1), *SLC29A2* (ENT2) a *SLC28A3* (CNT3). Exprese *SLC28A3* (CNT3) byla na pomezí detekce zvolené metody. Další NTs *SLC28A1* (CNT1) a *SLC28A2* (CNT2) nebyly detekovány vůbec a v Obr. 6 nejsou uvedeny.



Obr. 6: Data znázorňují míru exprese ENTs a CNT3. Výsledky jsou prezentované jako průměr („arbitrary units“ a.u) ze tří nezávislých měření se směrodatnou odchylkou.

7.2 Analýza vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněčné linie pomocí CCK8

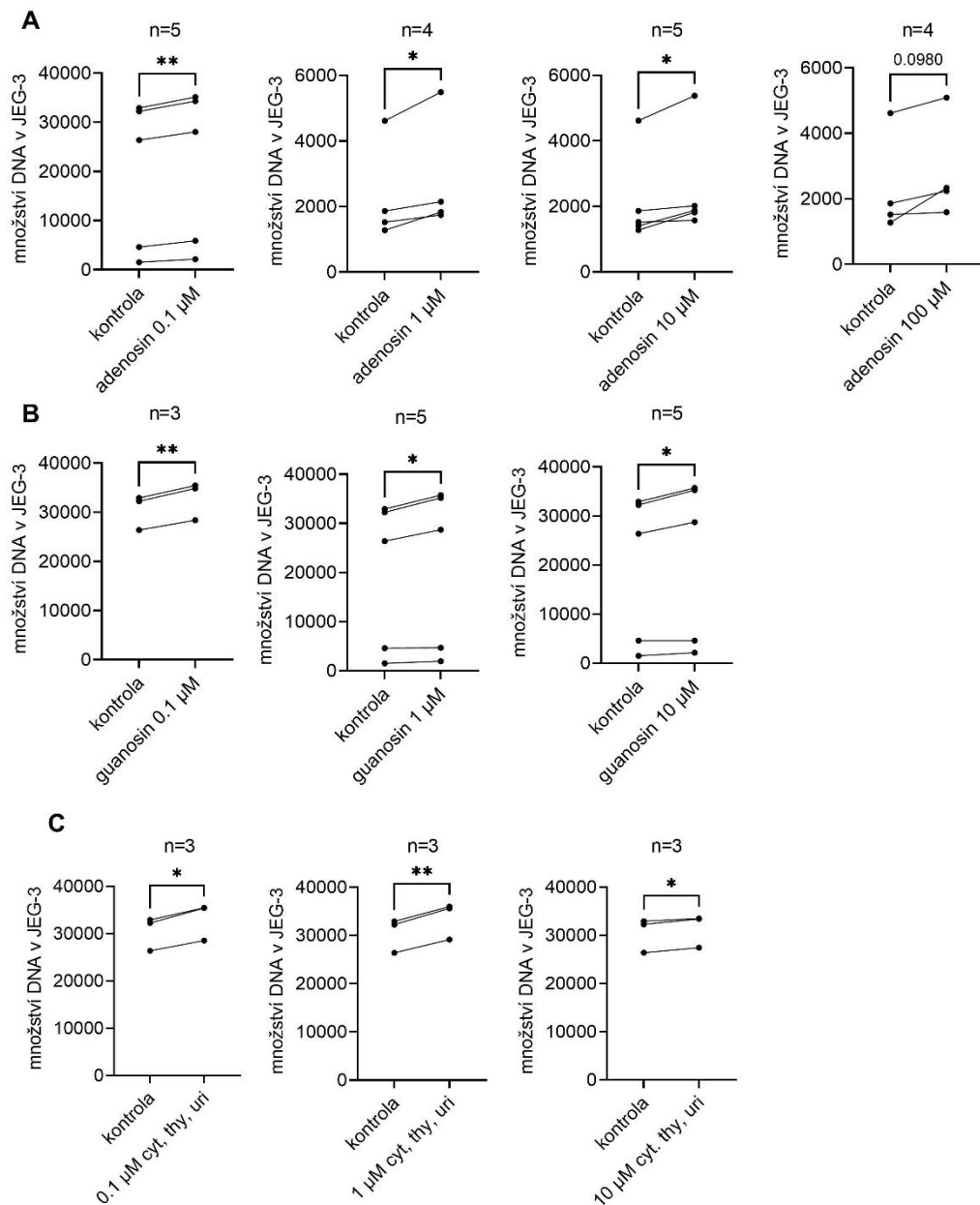
Metoda CCK-8 využívá mitochondriální reduktázu za vznik formazanu. Absorbance barevného produktu je úměrná množství živých buněk. Obr. 7 znázorňuje (A) vliv adenosinu při koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM a 100 μM ; (B) vliv guanosinu v koncentraci 1 μM a 10 μM ; (C) vliv pyrimidinových nukleosidů (cytidinu, uridinu a thymidinu) v koncentracích 1 μM a 10 μM na metabolickou aktivitu JEG-3. Po 48hodinové expozici adenosinem (Obr. 7A) došlo k nárůstu ve všech koncentracích kromě 100 μM . Stejný efekt vykazoval guanosin v koncentracích 1 μM a 10 μM (Obr. 7B). Pyrimidinové nukleosidy nebyly v obou koncentracích v metabolické úrovni zpozorovány (Obr. 7C)



Obr. 7: Vliv adenosinu (A) guanosinu (B) a pyrimidinových nukleosidů (C) na pozorovanou aktivitu mitochondriální oxidoreduktázy. Data v buněčné linii JEG-3 získaná metodou CCK8. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr hodnot ze 3 až 6 změřených jamek a n počtem nezávislých experimentů. U experimentu s adenosinem (A) v koncentraci 0,1 μM je n=2, proto jsme statistiku jsme nepočítali. Statistická analýza byla provedená párovým t-testem. Za statisticky signifikantní jsou považovány *p <0,05; **p <0,01.

7.3 Analýza vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněk pomocí Click-IT EdU

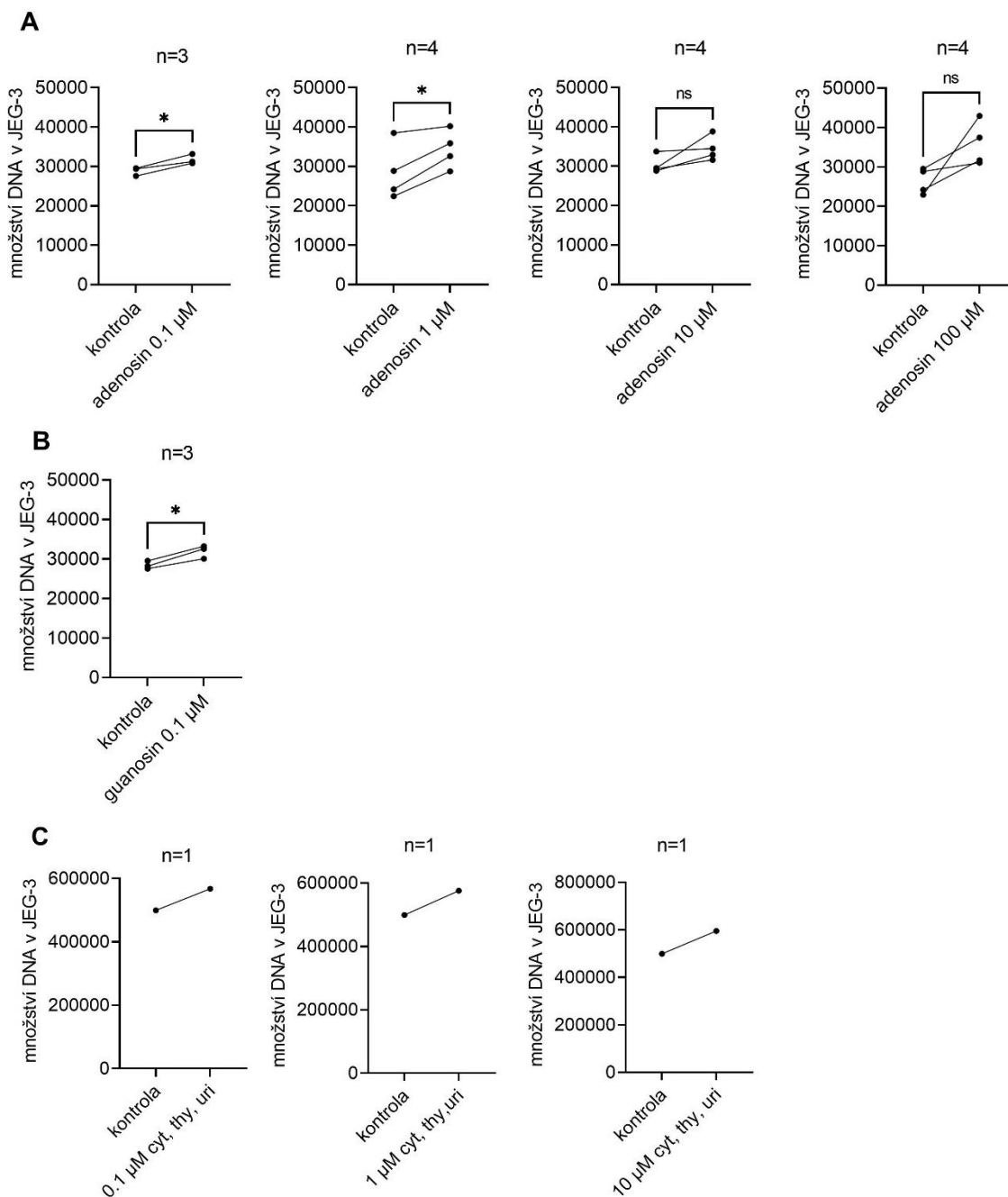
Jedná se o velice citlivou metodu, která je založená na schopnosti nukleosidového analogu EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) se inkorporovat tzv. „click reakcí“ mezi azidem a alkylem do dvoušroubovice buněk během její syntézy. Obr. 8 znázorňuje (A) vliv adenosinu při koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM a 100 μM ; (B) vliv guanosinu při koncentracích 0,1 μM , 1 μM a 10 μM ; (C) vliv pyrimidinových nukleosidů v koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM na míru syntézy DNA. Adenosin zvyšoval syntetickou aktivitu DNA ve všech testovaných koncentracích kromě 100 μM (Obr. 8A). U druhého purinového nukleosidu guanosinu v koncentracích 0,1 μM , 1 μM a 10 μM jsme také vyzorovali elevaci (Obr. 8B). Zvýšená syntetická aktivita byla prokázána i u buněk kultivovaných v médiu se směsí pyrimidinových nukleosidů v koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM (Obr. 8C).



Obr. 8: Vliv adenosinu (A), guanosinu (B) a pyrimidinových nukleosidů (C) na množství DNA v buněčné linii JEG-3 měřené pomocí metody Click-iT EdU. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr hodnot ze 3 až 6 změřených jamek a n počtem nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena párovým t-testem. Hodnota * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ jsou relativní vůči kontrole.

7.4 Sledování vlivu nukleosidů na proliferaci JEG-3 pomocí metody Cyquant

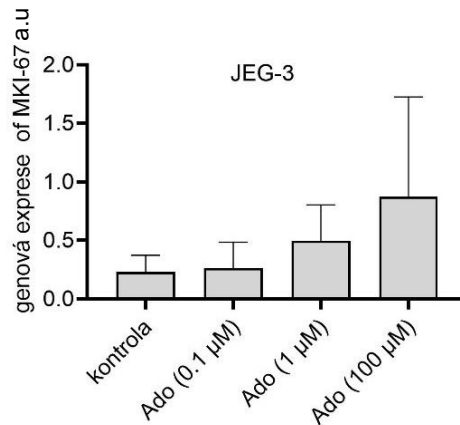
Principem metody je užití CyQUANT GR barviva, které vyzařuje silnou fluorescenci při vazbě na buněčnou nukleovou kyselinu. Obr. 9 znázorňuje (A) vliv adenosinu v koncentracích 0,1 μM , 1 μM , 10 μM a 100 μM ; (B) vliv guanosinu v koncentraci 0,1 μM ; (C) vliv pyrimidinových nukleosidů 0,1 μM , 1 μM , 10 μM na celkové množství DNA. Zaznamenali jsme staticky významnou elevaci u purinových nukleosidů adenosinu v koncentracích 0,1 a 1 μM (Obr. 9A) a u guanosinu v koncentraci 0,1 μM (Obr. 9B). Pyrimidinové nukleosidy zatím nebyly statisticky nevyhodnocené, protože byl doposud provedený jeden experiment přesto trendem u všech koncentrací je nárůst (Obr. 9C).



Obr. 9: Vliv adenosinu (A), guanosinu (B) a pyrimidinových nukleosidů (C) na množství DNA v buněčné linii JEG-3 měřené pomocí metody CyQuant. Data znázorňující celkové množství DNA v JEG-3 po 48hodinové inkubaci. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr hodnot ze 3 až 6 změřených jamek a n počtem nezávislých experimentů. Statistická analýza byla provedena párovým t-testem. Hodnota * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ jsou relativní vůči kontrole.

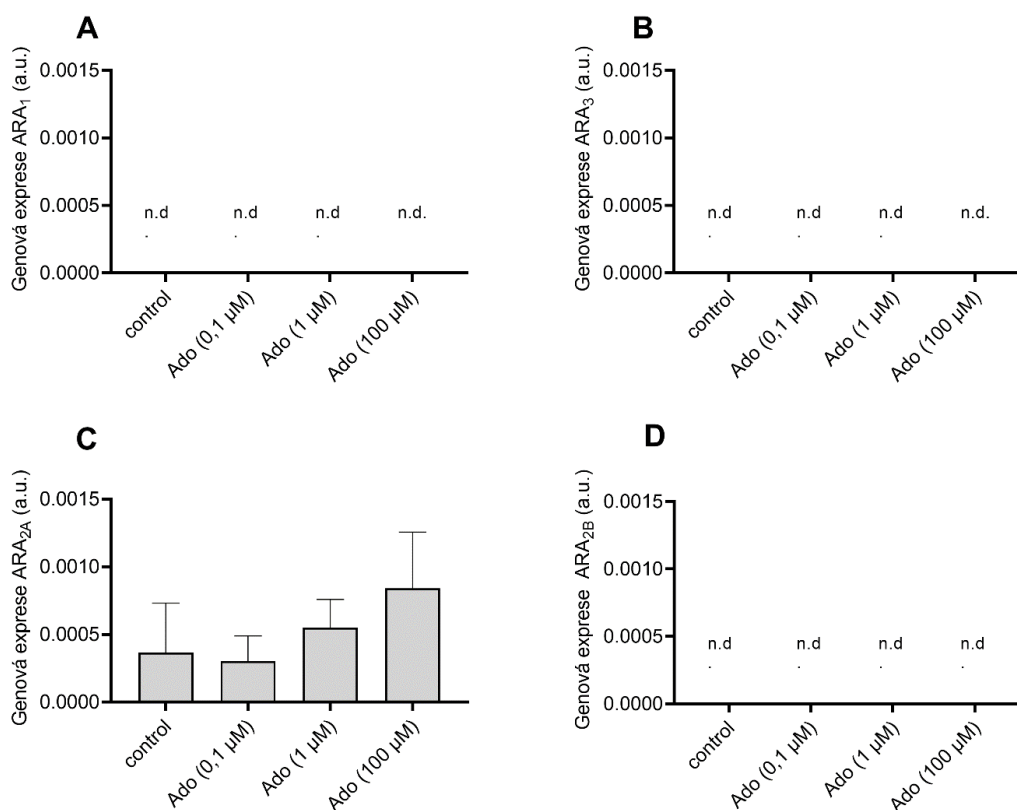
7.5 qRT-PCR analýza vlivu adenosinu na genovou expresi *MKI-67* a ARs

Pomocí této metody jsme testovali genovou expresi proliferačního markeru *MKI-67* po přidání adenosinu 0,1 μM ; 1 μM ; 100 μM . Testované koncentrace adenosinu po 48hodinové inkubaci neměly signifikantní vliv na hladiny *MKI-67* mRNA (Obr. 10).



Obr. 10: Míra genové exprese proliferačního markeru *MKI-67* v přítomnosti adenosinu. Výsledky jsou prezentované jako průměr („arbitrary units“ a.u) ze tří nezávislých měření se směrodatnou odchylkou. Analýza byla provedena s one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Ve všech případech byl efekt adenosinu nesignifikantní.

Dále jsme charakterizovali JEG-3 buněčnou linii z pohledu genové exprese AR podtypů A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 (Obr. 11). JEG-3 exprimovaly pouze A_{2A} AR (Obr. 11C). V dalším kroku jsme se zaměřili na to, zda 48hodinová expozice adenosinu ovlivňuje množství adenosinových receptorů. Zpozorovali jsme zvýšení u všech koncentrací a nejmó výrazněji u adenosinu 100 μ M. A_{2A} AR aktivuje signalizaci cAMP/PKA/CREB, která se podílí na buněčné proliferaci (Casana et al., 2008).



Obr. 11: Data znázorňují míru exprese ARs. Výsledky jsou prezentované se směrodatnou odchylkou. Vždy se jedná o tři nezávislé experimenty. Analýza byla provedena s one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test).

8 DISKUSE

Na základě výsledků můžeme shrnout, že purinové nukleosidy adenosin a guanosin zvyšovaly proliferaci buněk JEG-3 bez ohledu na použitou metodu (Obr. 7,8,9). Nesignifikantní efekt byl v případě adenosinu pozorován pro koncentraci 100 μM u všech použitých metod a 10 μM v případě metody CyQuant. To může být způsobeno pozorovanou větší variabilitou výsledků nebo popsáním růstově negativním působením nukleosidů při vysokých koncentracích (Sawa et al., 2021). Guanosin nebyl testován v koncentraci 100 μM . Zatímco u adenosinu může transientně dojít k dosažení této koncentrace; bazální koncentrace se pohybuje v rozmezí 30-200 nmol/L (Chen et al., 2013; Fredholm, 2014; Salsoso et al., 2017b), guanosin těchto plazmatických koncentrací nedosahuje. Účinek pyrimidinových bází se však mezi metodou CCK-8 a Click-iT Edu neshodovaly. To může být ovšem způsobeno rozdílnou citlivostí použitých metod (Romar et al., 2016). ENT1 je relativně vysokokapacitní, obvykle zajišťuje přenos hlavně adenosinu a guanosinu, hodně málo cytidinu a thymidinu (Molina-Arcas et al., 2009b). ENT2 jako méně specifický a velkokapacitní transportér uskutečňuje přenos purinových i pyrimidinových bází v podobné míře. V JEG-3 se nachází transportéry ENT1 (graf č.1), které přenášejí převážně purinové báze. To může být odůvodněním proč v JEG-3 se proliferační aktivita zvýšila v přítomnosti adenosinu a guanosinu, zatímco u směsi pyrimidinových bází byl nárůst detekovaný pouze při použití citlivé metody Click-iT Edu. U analýzy těchto transportérů nebyla provedena proteinová analýza, nicméně protože se jedná o linii odvozenou od placenty, předpokládáme funkční stav. Tuto naši domněnku potvrzují data popisující zvýšenou proliferaci v přítomnosti nukleosidů a existují práce, kde inhibice nukleosidových transportérů vede k nižšímu uptake v JEG-3.

Konstatuje se, že aktivace $A_2\text{AR}$ receptoru přispívá k proliferaci nádorových buněk (Rathbone et al., 1992). Pomocí kofeinu, neselektivního antagonisty AR jsme se pokusili zjistit roli $A_{A_2}\text{AR}$ a jeho stimulace adenosinem v proliferaci JEG-3, nicméně dosud dosažené výsledky nejsou konkluzivní (graf není uveden). Domníváme se, že zvýšená proliferace je podmíněna zvýšenou nabídkou nukleosidů a jejich vychytáváním buňkami. Předpokládáme, že variabilita výsledků dosažených s kofeinem může být způsoben tím, že kofein jako neselektivní inhibitor fosfodiesteráz stimuluje zvýšení hladiny cAMP, čímž působí protichůdně proti inhibici $A_{2A}\text{AR}$. V budoucnu bude tedy vhodné zvolit konkrétní selektivní agonisty a antagonisty AR bez vlivu na fosfodiesterázy.

Pomocí qRT-PCR jsme sledovali proliferaci pomocí markeru MKI-67, po 48hodinové inkubaci testované koncentrace adenosinu zvýšilo množství MKI-67. Obecně se tento marker účastní v buněčné fázi G₂ a S, kdy jeho proliferační aktivita bude nejvyšší, a naopak v M fázi rapidně klesá. Přestože buňky byly kultivovány za částečné nutriční deprivace (medium Opti-MEM), je možné, že během několika nezávislých experimentů jsme analyzovaly buňky v různých fázích buněčného cyklu. Dalším odůvodněním může být to, že při hladinách 100 μM se buňka nachází v patologickém stavu, tudíž buněčná regulace do nějaké míry selže a tím pádem se může spustit nadměrná proliferace. Další příčinou nejednoznačných výsledků může být doba inkubace, neboť exprese MKI-67 se cyklicky mění a je možné, že je nutné zvolit kratší dobu inkubace. Tuto hypotézu momentálně testujeme [6].

Každá metoda měla své limity (Tab.2), tudíž za účelem vzniku falešně pozitivních/negativních výsledků při detekci nárůstu buněčné linie jsme sledovali proliferaci na více úrovních. Prokázali jsme roli nukleosidů pro proliferaci JEG-3. Pro plné ověření bude potřeba provést experimenty i na modelech připravených z lidské placenty (placentární explanty). Pokud dojde k potvrzení našich výsledků, bude dalším krokem studium interference léčiv odvozených od nukleosidů s uptakem nukleosidů a dopadem na proliferaci.

Tab. 2: Přehled výhod a limitů jednotlivých metod

	VÝHODY	LIMITY
CCK8	nízká toxicita (WST-8 není buněčně propustný); při redukci je produkován ve vodě rozpustný formazan, čímž je ušetřen jeden krok rozpouštění [7].	redukce substrátů v eseji je ovlivněná změnami intracelulární metabolické aktivity, která nemá přímý efekt na celkovou buněčnou viabilitu [7].
CyQuant	citlivá, jednoduchá a rychlá (není třeba dlouhé doby inkubace, omývání či výměna média) [8]	drahá; zmrazení a vymrazení buněk následně zlyzování buněk; assay může interferovat s přítomnými látkami v kultivačním médiu (např. fenolová červeň) [8]
Click-it EdU	přímé měření množství DNA: barvivo se přímo naváže na místo ve dvoušroubovici; šetrná (není potřeba např. denaturace DNA, lepší prezervace buněk, antigenní struktura) [9]	toxická pro buňky, citlivá na světlo (práce v temném prostředí) [9]
qRT-PCR	rychlá metoda, vysoká detekce a kvantifikace příslušné DNA sekvence v různých matricích; snížená doba amplifikace a schopnost násobit amplifikaci [10]	genová exprese nemusí odpovídat proteinu; nevypovídá o absolutní kvantitě daného genetického materiálu; markerů detekce pomocí qRT-PCR je omezené množství; problematická izolace celkové RNA přímo ze vzorku (RNA je labilní s krátkým poločasem); RNA vzorek musí být nekontaminovaný DNA [11]

Převzato z [7], [8], [9], [10], [11]

9 ZÁVĚR

Tato práce přináší výsledky vlivu nejen adenosinu, ale i ostatních nukleosidů na proliferaci JEG-3 buněk. Přestože buňky rostou i bez přítomnosti nukleosidů, naše experimenty prokázaly, že nukleosidy zrychlují jejich růst a lze tak spekulovat, že přítomnost nukleosidů může napomáhat růstu a obnově placentární bariéry. Adenosin při koncentraci 1 μM , která je fyziologicky dosažitelná, vykazuje nejvyšší proliferační aktivitu. Vysoká koncentrace adenosinu při expozici 48 hodin neměla vliv na expresi AR. Bude však nutné analyzovat vliv adenosinu a specifických agonistů/antagonistů AR na expresi nukleosidových transportérů a proliferaci JEG-3. Výsledky této studie by přispěly k popisu molekulární regulace nukleosidových transportérů a jejich funkční propojení v JEG-3 buněčné linii. Buňky rostou i bez přítomnosti nukleosidů, nicméně naše experimenty prokázaly, že nukleosidy zrychlují jejich růst a lze tak spekulovat, že přítomnost nukleosidů Do budoucnosti by mohla napomocť k pochopení role nukleosidových transportérů a AR v růstu placenty, případně ke studiu možné interference léčiv odvozených od nukleosidů s vychytáváním nukleosidů v placentě či methylxantinů s buněčnou signalizací adenosinu.

10 LITERATURA

- Acevedo, C. G., Rojas, S., Ramirez, M., & Bravo, I. (1995). Transport and metabolism of adenosine in the perfused human placenta. *Placenta*, *16*(7), 611–622. [https://doi.org/10.1016/0143-4004\(95\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0143-4004(95)90030-6)
- Beal, P. R., Yao, S. Y. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., King, A. E., & Cass, C. E. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflegers Archiv European Journal of Physiology*, *447*(5), 735–743. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1103-2>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*(4), S6.e1–S6.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>
- Carrey, E. A., Perrett, D., & Simmonds, H. A. (2013). Nucleic Acids, Purine, and Pyrimidine Nucleotides and Nucleosides: Physiology, Toxicology, and Dietary Sources. In *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 189–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00191-4>
- Cervený, L., Murthi, P., & Staud, F. (2021). HIV in pregnancy: Mother-to-child transmission, pharmacotherapy, and toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1867*(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166206>
- Cervený, L., Ptacková, Z., Cecková, M., Karahoda, R., Karbanová, S., Jirasková, L., Greenwood, S. L., Glazier, J. D., & Staud, F. (2018). Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1, SLC29A1) facilitates transfer of the antiretroviral drug abacavir across the placenta. *Drug Metabolism and Disposition*, *46*(11), 1817–1826. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083329>
- Chang, C.-W., Wakeland, A. K., & Parast, M. M. (2018). Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *Journal of Endocrinology*, *236*(1), R43–R56. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0402>
- Chen, J.-F., Eltzschig, H. K., & Fredholm, B. B. (2013). Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(4), 265–286. <https://doi.org/10.1038/nrd3955>
- Costanzo, V., Bardelli, A., Siena, S., & Abrignani, S. (2018). Exploring the links between cancer and placenta development. *Open Biology*, *8*(6). <https://doi.org/10.1098/rsob.180081>
- Darashchonak, N., Sarisin, A., Kleppa, M.-J., Powers, R. W., & von Versen-Höyneck, F. (2014a). Activation of adenosine A2B receptor impairs properties of trophoblast cells and involves mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling. *Placenta*, *35*(9), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.369>
- Darashchonak, N., Sarisin, A., Kleppa, M.-J., Powers, R. W., & von Versen-Höyneck, F. (2014b). Activation of adenosine A2B receptor impairs properties of trophoblast cells and involves mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling. *Placenta*, *35*(9), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.369>

- Dudzinska, W., Hlynczak, A. J., Skotnicka, E., & Suska, M. (2006). The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochemistry (Moscow)*, *71*(5), 467–475. <https://doi.org/10.1134/S0006297906050014>
- Dudzinska, W., Lubkowska, A., Dolegowska, B., Safranow, K., & Jakubowska, K. (2010). Adenine, guanine and pyridine nucleotides in blood during physical exercise and restitution in healthy subjects. *European Journal of Applied Physiology*, *110*(6), 1155–1162. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1611-7>
- Duflot, S., Riera, B., Fernández-Veledo, S., Casadó, V., Norman, R. I., Casado, F. J., Lluís, C., Franco, R., & Pastor-Anglada, M. (2004). ATP-Sensitive K⁺ Channels Regulate the Concentrative Adenosine Transporter CNT2 following Activation by A₁ Adenosine Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(7), 2710–2719. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2710-2719.2004>
- Errasti-Murugarren, E., Díaz, P., Godoy, V., Riquelme, G., & Pastor-Anglada, M. (2011). Expression and Distribution of Nucleoside Transporter Proteins in the Human Syncytiotrophoblast. *Molecular Pharmacology*, *80*(5), 809–817. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071837>
- Escudero, C., & Sobrevia, L. (2012). Adenosine plasma levels in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *206*(4), e5–e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.12.032>
- Espinoza, J., Espinoza, A. F., & Power, G. G. (2011). High fetal plasma adenosine concentration: A role for the fetus in preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *205*(5), 485.e24–485.e27. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.06.034>
- Fernandez-Gallardo, M., González-Ramírez, R., Sandoval, A., Felix, R., & Monjaraz, E. (2016). Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, *11*(12), e0167445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167445>
- Fredholm, B. B. (2014). Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? *Journal of Molecular Medicine*, *92*(3), 201–206. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1101-6>
- Gaccioli, F., & Lager, S. (2016a). Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction. *Frontiers in Physiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00040>
- Gaccioli, F., & Lager, S. (2016b). Placental nutrient transport and intrauterine growth restriction. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00040>
- Godoy, V., Banales, J. M., Medina, J. F., & Pastor-Anglada, M. (2014). Functional crosstalk between the adenosine transporter CNT3 and purinergic receptors in the biliary epithelia. *Journal of Hepatology*, *61*(6), 1337–1343. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.036>
- Gonçalves, B. M., Graceli, J. B., da Rocha, P. B., Tilli, H. P., Vieira, E. M., de Sibio, M. T., Peghinelli, V. v., Deprá, I. C., Mathias, L. S., Olímpio, R. M. C., Belik, V. C., & Nogueira, C. R. (2022). Placental model as an important tool to study maternal-fetal interface. *Reproductive Toxicology*, *112*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.005>

- Grañé-Boladeras, N., Spring, C. M., Hanna, W. J. B., Pastor-Anglada, M., & Coe, I. R. (2016). Novel nuclear hENT2 isoforms regulate cell cycle progression via controlling nucleoside transport and nuclear reservoir. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4559–4575. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2288-9>
- Ham, J., & Evans, B. A. J. (2012). An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 3, Issue SEP). <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00113>
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>
- Huppertz, B. (2018). Human Placentation. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 431–439). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64926-7>
- Jiraskova, L., Cervený, L., Karbanova, S., Ptackova, Z., & Staud, F. (2018a). *Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents*. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238>
- Jiraskova, L., Cervený, L., Karbanova, S., Ptackova, Z., & Staud, F. (2018b). Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (*SLC28A*) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents. *Molecular Pharmaceutics*, 15(7), 2732–2741. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238>
- Kong, T., Westerman, K. A., Faigle, M., Eltzschig, H. K., & Colgan, S. P. (2006). HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *The FASEB Journal*, 20(13), 2242–2250. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6419com>
- Leisewitz, A. v., Zimmerman, E. I., Huang, M., Jones, S. Z., Yang, J., & Graves, L. M. (2011). Regulation of ENT1 expression and ENT1-dependent nucleoside transport by c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.125>
- Leiva, A., Guzmán-Gutiérrez, E., Contreras-Duarte, S., Fuenzalida, B., Cantin, C., Carvajal, L., Salsoso, R., Gutiérrez, J., Pardo, F., & Sobrevia, L. (2017). Adenosine receptors: Modulators of lipid availability that are controlled by lipid levels. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 55, pp. 26–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.007>
- Li, R. W. S., Yang, C., Sit, A. S. M., Lin, S. Y. T., Ho, E. Y. W., & Leung, G. P. H. (2012). Physiological and pharmacological roles of vascular nucleoside transporters. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 59(1), 10–15. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31820eb788>
- Liu, H., & Xia, Y. (2015). Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal of Applied Physiology*, 119(10), 1173–1182. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00350.2015>

- Löffler, M., Morote-Garcia, J. C., Eltzhig, S. A., Coe, I. R., & Eltzhig, H. K. (2007). Physiological Roles of Vascular Nucleoside Transporters. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), 1004–1013. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.106.126714>
- Ma, D.-F., Kondo, T., Nakazawa, T., Niu, D.-F., Mochizuki, K., Kawasaki, T., Yamane, T., & Katoh, R. (2010). Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. *Human Pathology*, 41(11), 1550–1557. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.04.008>
- Malassiné, A., & Cronier, L. (2005). Involvement of gap junctions in placental functions and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1719(1–2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.019>
- Medina-Pulido, L., Molina-Arcas, M., Justicia, C., Soriano, E., Burgaya, F., Planas, A. M., & Pastor-Anglada, M. (2013). Hypoxia and P1 receptor activation regulate the high-affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in differentiated neuronal PC12 cells. *Biochemical Journal*, 454(3), 437–445. <https://doi.org/10.1042/BJ20130231>
- Merighi, S., Mirandola, P., Milani, D., Varani, K., Gessi, S., Klotz, K.-N., Leung, E., Baraldi, P. G., & Borea, P. A. (2002). Adenosine Receptors as Mediators of Both Cell Proliferation and Cell Death of Cultured Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(4), 923–933. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.00111.x>
- Miller, R. K., Genbacev, O., Turner, M. A., Aplin, J. D., Caniggia, I., & Huppertz, B. (2005). Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*, 26(6), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.002>
- Mirza, A., Basso, A., Black, S., Malkowski, M., Kwee, L., Patcher, J. A., Lachowicz, J. E., Wang, Y., & Liu, S. (2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*, 4(12), 1355–1360. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.12.2196>
- Molina-Arcas, M., Casado, F., & Pastor-Anglada, M. (2009a). Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), 426–434. <https://doi.org/10.2174/157016109789043892>
- Molina-Arcas, M., Casado, F., & Pastor-Anglada, M. (2009b). Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), 426–434. <https://doi.org/10.2174/157016109789043892>
- Nicholson R. (2013). The Placenta: Development, Function and Diseases. In 978-1-62618-247-9.
- Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866), 916–920. <https://doi.org/10.1038/414916a>

- Oliveira, M. de M. S., Salgado, C. de M., Viana, L. R., & Gomes-Marcondes, M. C. C. (2021). Pregnancy and Cancer: Cellular Biology and Mechanisms Affecting the Placenta. *Cancers*, *13*(7), 1667. <https://doi.org/10.3390/cancers13071667>
- Pastuschek, J., Nonn, O., Gutiérrez-Samudio, R. N., Murrieta-Coxca, J. M., Müller, J., Sanft, J., Huppertz, B., Markert, U. R., Groten, T., & Morales-Prieto, D. M. (2021). Molecular characteristics of established trophoblast-derived cell lines. *Placenta*, *108*, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.02.022>
- Pelleg, A., & Porter, R. S. (1990). The pharmacology of adenosine. *Pharmacotherapy*, *10*(3), 157–174.
- Rathbone, M. P., Deforge, S., Deluca, B., Gabel, B., Laurensen, C., Middlemiss, P., & Parkinson, S. (1992). Purinergic stimulation of cell division and differentiation: Mechanisms and pharmacological implications. *Medical Hypotheses*, *37*(4), 213–219. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(92\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0306-9877(92)90190-N)
- Rathbone, M. P., Middlemiss, P. J., Gysbers, J. W., Deforge Penny Costello, S., & Rolando Del Maestro, A. F. (n.d.). PURINE NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES STIMULATE PROLIFERATION OF A WIDE RANGE OF CELL TYPES. In *In Vitro Cell. Dev. Biol* (Vol. 28).
- Romar, G. A., Kupper, T. S., & Divito, S. J. (2016). Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(1), e1–e7. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.020>
- Sahai, K., Saraswathy, S., Yadav, T. P., Arora, D., & Krishnan, M. (2017). Pre-eclampsia: Molecular events to biomarkers. *Medical Journal, Armed Forces India*, *73*(2), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.09.001>
- Salsoso, R., Fariás, M., Gutiérrez, J., Pardo, F., Chiarello, D. I., Toledo, F., Leiva, A., Mate, A., Vázquez, C. M., & Sobrevia, L. (2017a). Adenosine and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*, *55*, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.12.003>
- Salsoso, R., Fariás, M., Gutiérrez, J., Pardo, F., Chiarello, D. I., Toledo, F., Leiva, A., Mate, A., Vázquez, C. M., & Sobrevia, L. (2017b). Adenosine and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*, *55*, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.12.003>
- Salsoso, R., Fariás, M., Gutiérrez, J., Pardo, F., Chiarello, D. I., Toledo, F., Leiva, A., Mate, A., Vázquez, C. M., & Sobrevia, L. (2017c). Adenosine and preeclampsia. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 55, pp. 126–139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.12.003>
- Sawa, C., Yofu, S., Kiriya, K., Sutoh, K., Saito, T., Kishi, S., Gunji, M., Inoue, Y., Sugi, M., Shioda, S., & Honda, K. (2021). High concentration of extracellular nucleotides suppresses cell growth via delayed cell cycle progression in cancer and noncancer cell lines. *Heliyon*, *7*(11), e08318. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08318>
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 2024–2052. <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>

- Sim, M. K., & Maguire, M. H. (1972). Presence of Adenosine in the Human Term Placenta: DETERMINATION OF ADENOSINE CONTENT AND PATHWAYS OF ADENOSINE METABOLISM. *Circulation Research*, 31(5), 779–788.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.31.5.779>
- Singh, A., & Govindarajan, R. (2018). ENT3 utilizes a pH Sensing Mechanism for Transport. *Channels*, 12(1), 78–80. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1389581>
- 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., & Karahoda, R. (2018). Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 105, pp. 35–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.016>
- Syme, M. R., Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2004). Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(8), 487–514.
<https://doi.org/10.2165/00003088-200443080-00001>
- Traut, T. W. (1994a). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00928361>
- Traut, T. W. (1994b). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00928361>
- Valdés, F. Z., Luna, V. Z., Arévalo, B. R., Brown, N. v., & Gutiérrez, M. C. (2018). Adenosine: Synthetic Methods of Its Derivatives and Antitumor Activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(20), 1684–1701.
<https://doi.org/10.2174/1389557518666180516163539>
- Wang, P., Vanhoutte, P. M., & Miao, C.-Y. (2012). Visfatin and Cardio–Cerebro–Vascular Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 59(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31820eb8f6>
- Yamamoto, T., Kuniki, K., Takekuma, Y., Hirano, T., Iseki, K., & Sugawara, M. (2007). Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *European Journal of Pharmacology*, 557(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.10.062>
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., & Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 34, Issues 2–3, pp. 529–547).

WEBOVÉ ZDROJE:

[1]https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/nukleosidy.html

Přístup: 1.12.2021

[2]<https://www.addexbio.com/productdetail?pid=4940>

Přístup: 12.2.2022

[3]<https://www.vitascientific.com/colorimetric-cell-proliferation-and-cytotoxicity-assay-cell-counting-kit-8-cck-8-various-kit-sizes.html>

Přístup: 12.2.2022

[4]<https://www.wikiskripta.eu/w/Preeklampsie>

Přístup 14.2.2022

[5]https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps20/porodni_asistence/web/pages/02_06_vyvoj_placenty.html

Přístup 20.2.2022

[6]<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MKI67>

Přístup 10.6.2022

[7]https://www.intechopen.com/chapters/57717?fbclid=IwAR3XwHfCOpMolIxK7rE9gjPTy_pyJM4Dtd9YyVKfRGWOYp-xWDVWVIC2ehU

Přístup 1.9.2022

[8]<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/18/5515/htm?fbclid=IwAR3LZ4FxCImsiWKzNpH7tinaKW0RkEBHyd1wFYRavHMevADpbPPiT2CHwss>

Přístup 1.9.2022

[9]https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10337?fbclid=IwAR0UT3aW65_FobhMrycT_U0IdSjttx-c0li_tuDshH-aFhD8eKQ_iQKFXvM

Přístup 1.9.2022

[10]<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108/full#:~:text=The%20main%20advantages%20of%20qPCR,of%20newly%20formed%20DNA%20amplicons.>

Přístup 1.9.2022

[11]<https://academic.oup.com/femsec/article/67/1/6/518537>

Přístup 2.9.2022