

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Placentární transport dopaminu a noradrenalinu

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Hana Horáčková

Hradec Králové 2022

Helena Turková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové

Helena Turková

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří Mgr. Haně Horáčkové za odborné vedení, ochotu, cenné rady, čas a podporu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat prof. Františku Štaudovi za jeho odborné vedení a příležitost vykonávat experimenty ve spolupráci s jeho postgraduálními studenty.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Helena Turková

Školitel: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Název diplomové práce: Placentární transport dopaminu a noradrenalinu

Během těhotenství je striktní placentární homeostáza monoaminů serotoninu (5-HT), noradrenalinu (NA) a dopaminu (DA) klíčová pro správnou funkci placenty a vývoj plodu. Všechny monoaminy jsou důležité neuromodulátory, které zasahují do buněčné proliferace, diferenciace a neurální migrace. Vysoká sekrece monoaminů během gestace vyžaduje mechanismy zajišťující jejich clearance, jelikož porušení jejich rovnováhy může vést k dlouhodobým změnám ve struktuře a funkci mozku, vedoucí dále například k vyššímu riziku poruch pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), autismu či deprese. Nicméně, transport NA a DA skrze fetoplacentární jednotku nebyl dosud plně a podrobně popsán. Proto se v této diplomové práci zabýváme transportem NA a DA skrze *ex vivo* izolované vezikuly mikrovilózní (MVM) a bazální membrány (BM) ze zdravých lidských terminálních placent. Naše výsledky ukazují, že transport NA a DA je zprostředkován vysoko-afinitním a nízko-kapacitním serotoninovým (SERT) a noradrenalinovým transportérem (NAT) skrze MVM a nízko-afinitním a vysoko-kapacitním transportérem organických kationtů 3 (OCT3) skrze BM. Expres dopaminového transportéru (DAT) je zanedbatelná a nehraje tedy žádnou roli v placentárním transportu monoaminů. Díky společnému zapojení SERT a NAT v transportu NA i DA skrze MVM odhalujeme promiskuitu monoaminů také v placentární tkáni. Tato diplomová práce poskytuje doposud neznámý, ucelený přehled o transportu NA a DA skrze obě placentární membrány.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Helena Turková

Supervisor: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Title of diploma thesis: Placental transport of dopamine and norepinephrine

During the whole course of pregnancy, it is important to maintain proper monoamine homeostasis, namely serotonin (5-HT), norepinephrine (NE), and dopamine (DA), which are crucial for proper placental function and fetal development. Monoamines are important neuromodulators, involved in cell proliferation, and differentiation. and neuronal migration. High fetal monoamine secretion during gestation demands a responsible clearance mechanism, as disruption of their balance may lead to long-lasting changes in brain structure and function, provoking a higher risk of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism or depression. However, uptake of NE and DA through the fetoplacental unit has not been fully and in detail described. Therefore, in this diploma thesis, we focus on the uptake of NE and DA through *ex vivo* isolated vesicles of microvillous (MVM) and basal (BM) membranes from healthy human term placentas. Our results show that NE and DA uptake is mediated via high-affinity and low-capacity serotonin (SERT) and norepinephrine (NET) transporters in MVM and via low-affinity and high-capacity organic cation transporter 3 (OCT3) in BM. DAT expression in human placental tissue is negligible and excludes any DAT involvement in placental monoamine uptake. Thanks to the joint involvement of SERT and NET in NE and DA uptake through MVM, we reveal monoamine transporter promiscuity also in placental tissue. This diploma thesis provides an unknown, comprehensive overview of the NE and DA uptake through both placental membranes.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK.....	9
2	ÚVOD	11
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	Placenta.....	12
3.1.1	Funkce placenty.....	12
3.1.2	Morfologie placenty	13
3.1.3	Syncytiotrofoblast	13
3.2	Monoaminy.....	14
3.2.1	Noradrenalin a vývoj plodu.....	15
3.2.2	Dopamin a vývoj plodu	16
3.3	Fetální vývoj a programování.....	16
3.4	Placentární transport.....	17
3.5	Noradrenalinový transportér (NAT).....	18
3.6	Dopaminový transportér (DAT)	19
3.7	Serotoninový transportér (SERT).....	19
3.8	Transportér pro organické kationty 3 (OCT3).....	19
3.9	Inhibitory monoaminových transportérů	20
3.10	Experimentální metody	20
4	CÍL PRÁCE.....	22
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
5.1	Materiály.....	23
5.1.1	Biologický materiál	23
5.1.2	Chemikálie	23
5.2	Přístroje.....	25
5.3	<i>Ex vivo</i> izolace mikrovilózní a bazální membrány ze zdravé terminální placenty....	26
5.3.1	Složení roztoků.....	26

5.3.2	Postup izolace.....	28
5.4	<i>Ex vivo</i> transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu	29
5.4.1	Stanovení vazby a/nebo pasivní difuze DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu.....	30
5.4.2	Vliv intrabuněčného K ⁺ na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu.....	30
5.4.3	Efekt kontrolních inhibitorů na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu.....	31
5.5	Digitální droplet PCR	31
5.5.1	Reakční směs.....	31
5.5.2	Postup	31
5.6	Western blot.....	32
5.6.1	Roztoky	32
5.6.2	Gelová SDS-PAGE elektroforéza	34
5.6.3	Přenos proteinů z gelu na membránu	35
5.6.4	Blokování a inkubace s primární a sekundární protilátkou.....	35
5.6.5	Detekce.....	35
5.6.6	Kvantifikace proteinu	36
5.7	Statistická analýza	36
6	VÝSLEDKY	36
6.1	Transport DA a NA přes <i>ex vivo</i> izolovanou mikrovilózní a bazální membránu.....	36
6.1.1	Transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu ve 4 °C	36
6.1.2	Efekt intrabuněčného K ⁺ na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu.....	37
6.1.3	Vliv inhibitorů na transport DA, NA přes mikrovilózní a bazální membránu...	38
6.1.4	Exprese monoaminových transportérů v lidské a potkaní placentě pomocí ddPCR	39

6.1.5	Exprese dopaminového transportéru na úrovni proteinu v lidských a potkaních placentárních homogenátech	40
7	DISKUZE.....	42
8	ZÁVĚR.....	45
9	ZDROJE	46

1 SEZNAM ZKRATEK

5-HT	serotonin
ABC transportéry	ATP-vázající transportéry
ADs	antidepresiva
BM	bazální membrána
COMT	katechol-O-methyltransferáza
KORT	kortisol
D22	decynium-22
DA	dopamin
DAT	dopaminový transportér
ddPCR	digitální droplet PCR
GBR	GBR12935
hCG	lidský choriový gonadotropin
MAOA	monoaminoxidáza A
MVM	mikrovilózní membrána
NA	noradrenalin
NAT	noradrenalinový transportér
NIS	nisoletin
OCT3	transportér organických kationtů 3
PAR	paroxetin
SERT	serotoninový transportér
SLC transportéry	transportní membránové proteiny pro elektrolyty

SNRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SSRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
STB	syncytiotrofoblast
VEN	venlafaxin
WB	Western blot

2 ÚVOD

Placenta je jedinečný multifunkční orgán spojující matku a dítě devět měsíců. Mezi její hlavní funkce patří přívod živin a kyslíku, odvod odpadních látek, imunitní ochrana a endokrinní aktivita (1). Hlavním sekrečním místem je syncytiotrofoblast (STB) produkující hormony a neurotransmitery zásadní pro vznik endometria, implantaci embrya, udržení těhotenství, vývoj plodu a porod (1). Dopamin (DA) a noradrenalin (NA) jsou velmi důležité monoaminy pro správný vývoj plodu a jako neuromodulátory mají vliv na vývoj mozkových struktur. Mimo to má DA endokrinní funkci, kdy reguluje placentární produkci lidského choriového gonadotropinu a placentárního laktogenu (2). NA je nepostradatelný pro postnatální adaptaci a správný vývoj kardiovaskulárního systému a plic (3). Proto během celého průběhu těhotenství musí být koncentrace obou monoaminů ve fetoplacentární jednotce přísně regulována. Nicméně, rovnováha DA a NA může být narušena vnějšími i vnitřními faktory jako jsou například infekce, stres, podvýživa, užívání návykových látek či léků, což může vést až k nesprávným koncentracím DA a NA ve fetoplacentární jednotce (4, 5). Ačkoliv se na tyto faktory plod a placenta snaží reagovat adaptačními mechanismy, může docházet k poškození placentární funkce a k porušení vývoje mozku plodu (6). To vše vede ke zvýšenému riziku nemocí v průběhu celého života jedince (1, 4, 5, 6, 7, 8). Jedná se především o neurologické poruchy jako je autismus či predispozice k depresi (8, 9, 10). Navzdory významu DA a NA pro vývoj plodu, nebyl do dnešní doby jejich placentární transport podrobně popsán a veškerá literatura zkoumá pouze transport skrze maternální stranu. Proto se v této diplomové práci zabýváme různými aspekty transportu DA a NA (zapojení pasivní difuze/ vazba na vezikuly, efekt intrabuněčného K^+ , určení zodpovědných transportérů) nejen na maternální, ale také na fetální straně.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Placenta

Placenta je dočasný, ale zásadní orgán pro správný vývoj plodu (11). Během těhotenství slouží k výživě a okysličení plodu, vyloučení odpadních látek a imunitní ochraně (1, 12). Placenta má taktéž endokrinní funkci, syntetizuje neurotransmitery a hormony důležité pro vznik endometria, implantaci embrya, udržení těhotenství, správný růst a vývoj plodu a na závěr porod, při němž je vypuzena z dělohy a stává se z ní biologický odpad (1, 11).

Lidská placenta je hemochoriálního typu, kdy choriové klky prorůstají endotelem mateřských cév, což způsobí přímý kontakt trofoblastu s mateřskou krví (12, 13). Toto uspořádání je klíčové pro správný přenos látek mezi matkou a plodem. Plod je spojen s placentou skrze pupečník (*umbilicus*), ve kterém je pupečnicková žíla (*vena umbilicalis*) a dvě pupečnickové tepny (*arteria umbilicalis*). Pupečnicková žíla přivádí okysličenou krev a látky z placenty do plodu. Pupečnickové tepny odvádí z fetálního oběhu přes terminální části choriových klků do placenty odkysličenou krev a odpadní látky (12).

3.1.1 Funkce placenty

Jak již bylo zmíněno, placenta má velké množství funkcí potřebných pro správný vývoj plodu. Jedna z hlavních funkcí je přenos živin a kyslíku z mateřské cirkulace k plodu a odvod katabolitů a oxidu uhličitého z fetální cirkulace do placenty (12). Kyslík a oxid uhličitý přestupují skrze placentu pasivní difuzí. Glukóza, aminokyseliny a mastné kyseliny přestupují pomocí specifických transportérů (14).

V rámci rozsáhlé ochranné funkce, placenta zabraňuje škodlivému působení imunitního systému matky. STB exprimuje transportéry a enzymy, které omezují přestup xenobiotik k plodu. Tuto funkci zajišťují především ATP-dependentní transportéry (ABC transportéry) (12).

Endokrinní funkce STB zahrnuje syntézu důležitých hormonů, například lidského choriového gonadotropinu, placentárního laktogenu, růstových hormonů a adipokinů, progesteronu a estrogeneru (1, 11).

Placentární bariéra má rovněž zásadní význam při přenosu patogenů (15).

3.1.2 Morfologie placenty

Terminální placenta váží průměrně 500 g, je vysoká asi 2-3 cm a její průměr je 15-20 cm (14). Na placentě rozlišujeme maternální stranu, která je nakloněna směrem k děloze a fetální stranu, která je nakloněna směrem k plodu. Maternální stranu tvoří *decidua basalis*. Na fetální straně nalezneme choriovou ploténku. *Decidua basalis* rozděluje placentu do menších funkčních jednotek, kotyledonů (15-20), které jsou omývány mateřskou krví. Kotyledony jsou tvořeny choriovými klky, které vybíhají z fetální choriové ploténky (Obr. 1). Každý choriový klk je tvořen vrstvou trofoblastu a fetálními cévami s endotelovými buňkami a tvoří hlavní místo transportu látek mezi mateřskou a fetální krví. Jejich zvrstvení zvětšuje plochu určenou k přenosu látek (11, 16).

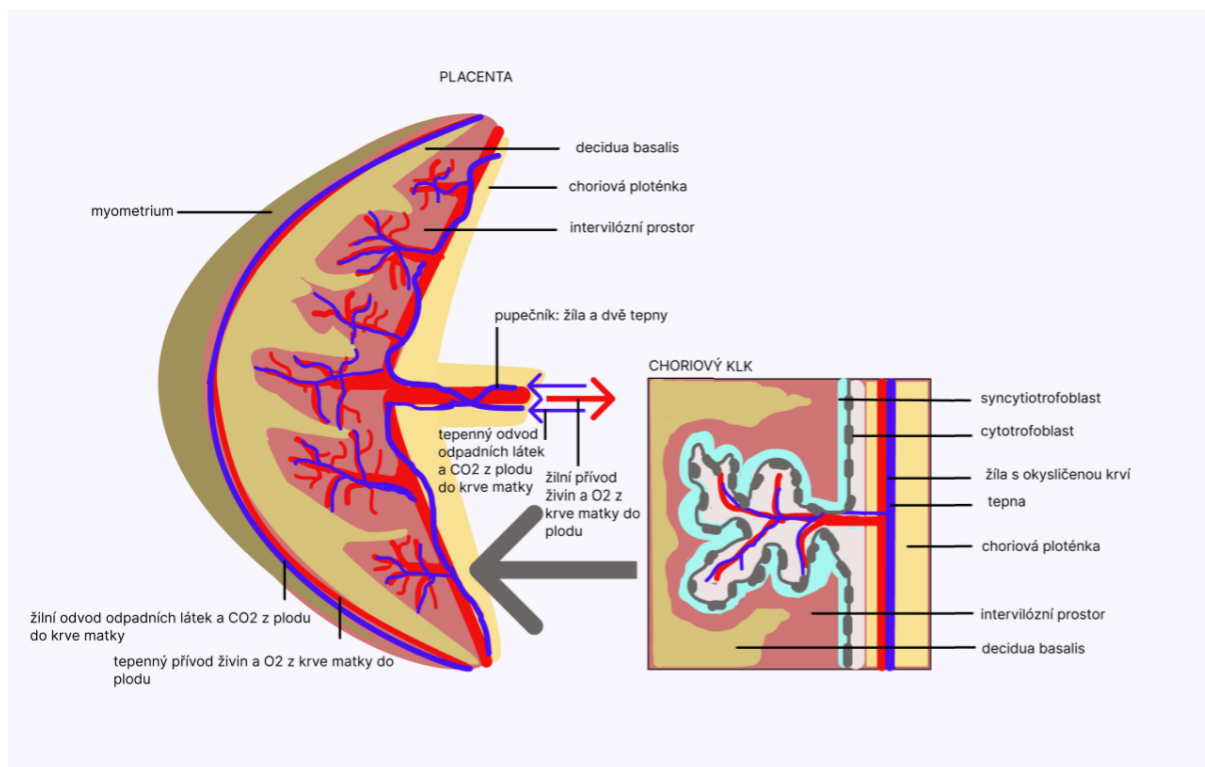
Vrstva trofoblastu v choriových klcích se skládá z vnitřní vrstvy mononukleárního cytotrofoblastu, který se diferencuje do vnějšího syncytiotrofoblastu (12).

3.1.3 Syncytiotrofoblast

STB se skládá ze dvou odlišných membrán. Mikrovilózní membrány (apikální) směřující k matce a bazální membrány směřující k plodu (12). Společně vytváří hlavní bariéru pro přenos endo-/exogenních molekul. Mikrovilózní a bazální membrána se liší nejen zvrstvením, kdy mikrovilózní membrána je více zvrstvená, ale také expresí transportérů a enzymů.

Během vývoje placenty se trofoblast diferencuje a prolifерuje za vzniku buněk trofoblastu dvojího fenotypu. První, vilózní fenotyp, se diferencuje do mnohjaderného STB. STB tvoří hlavní přestupní bariéru. Druhý, extravilózní fenotyp, se diferencuje do intersticiálního trofoblastu iEVTs, který je důležitý pro remodelaci maternálních spirálních arterií (1).

STB obsahuje aktivní enzymy schopné metabolizovat různé molekuly a je hlavním sekrečním místem placenty (1, 17). Produkuje steroidní hormony – estrogen a progesteron, proteinové hormony – lidský choriový gonadotropin, růstové hormony, adipokiny a také neurotransmitery, dopamin (DA), noradrenalin (NA) a serotonin (5-HT) (1, 6, 11).



Obrázek 1. Shrnutí morfologie placenty a choriového klku. Vnější mikrovilózní membrána syncytiotrofoblastu je omývána mateřskou krví, kdežto vnitřní bazální membrána je situována směrem k plodu.

3.2 Monoaminy

Monoaminy jsou základními mediátory známými pro svou neurotransmiterovou funkci v nervovém systému. Jsou však také nepostradatelné pro správnou funkci placenty a vývoj plodu, včetně buněčné proliferace a diferenciace (10, 18, 19). Vývoj mozku je vysoce organizovaný proces s načasovanými fázemi (18). Dochází k neurogenezi (tvarování a propojování nervové soustavy), migraci a diferenciaci neuronů, tvorbě dendritů a synaptogenezi (18). Neurony se utváří a propojují v raných fázích vývoje, tj. během kritického období. Jejich nesprávná tvorba může změnit mozkové funkce a promítnout se v dospělosti změnou chování (20).

Proto po celé těhotenství musí být udržována správná fetoplacentární homeostáza monoaminů. I jen přechodné narušení rovnováhy NA a DA může vést k trvalým změnám ve struktuře a funkci mozku, promítající se do dospělosti. V důsledku změněné homeostázy dochází po

porodu k vyššímu riziku neurologickým poruch, jako je schizofrenie, porucha autistického spektra, porucha pozornosti s hyperaktivitou či deprese (18, 19, 21, 22).

Monoaminy jsou v mozku uvolňovány depolarizací z presynaptické části do synaptické štěrbin, kde po předání signálu jsou presynaptickými membránovými transportéry odčerpány zpět, tak aby mohlo dojít k desenzibilizaci receptorů. Transportéry zodpovědné za transport monoaminů v neurální tkáni jsou vysoko-afinitní a nízko-kapacitní serotoninový transportér (SERT), noradrenalinový transportér (NAT) a dopaminový transportér (DAT) a vysoko-kapacitní a nízko-afinitní transportér organických kationtů 3 (OCT3). Důležitá je také role degradujících enzymů, monoaminoxidázy A (MAOA) a katechol-O-methyltransferázy (COMT), které udržují správnou koncentraci na synapsi. Přestože placenta není neurální tkáň, exprimuje podobné transportéry a enzymy k regulaci monoaminů jako tkáň neurální. NAT a SERT byly detekovány na mikrovilózní straně STB (23, 24), zatímco OCT3 byl detekován na bazální straně STB (25). DAT zatím nebyl detekován v placentární tkáni (26, 27). STB kromě transportérů exprimuje MAOA a COMT, které metabolizují přenesené monoaminy v STB a zabraňují jejich akumulaci (28).

Primární fetální zdroj monoaminů, extraadrenální chromafinní tkáň, dozrává okolo 11. týdne gestace, zatímco dřeň nadledvin později okolo 14. týdne (29). V průběhu těhotenství společně s vývojem dřeně nadledvin se zvyšuje fetální produkce monoaminů skrze tyrosin hydroxylázu (30). Na konci gestace bylo ukázáno, že navzdory vysoké fetální produkci monoaminů, je koncentrace monoaminů ve fetální cirkulaci nízká a to díky vysoké fetoplacentární clearance (31).

Po porodu se signifikantně zvyšuje koncentrace cirkulujících monoaminů u novorozence, jelikož jsou vitální pro kardiovaskulární, pulmonální, metabolickou a endokrinní adaptaci. Při porodu císařským řezem nejsou hladiny katecholaminů tak vysoké jako při přirozeném vaginálním porodu, protože nedochází k tak stresové události (3).

3.2.1 Noradrenalin a vývoj plodu

NA v dospělém mozku určuje behaviorální i fyziologické procesy jako je učení, paměť, pozornost, nálada, reaktivita k stresu, chuť k jídlu či vzrušení (32). Kromě již zmíněné role ve vývoji fetálního mozku je NA klíčový monoamin pro kardiovaskulární systém plodu, funkci plic, mobilizaci glukózy a postnatální adaptaci, během které dochází k redistribuci srdečního

výdeje, absorpci alveolární tekutiny, podpoře dýchání, energetické autonomii a regulaci teploty. V druhé polovině těhotenství dochází ke zvyšování katecholaminů a jejich metabolitů v placentární vodě, což dokazuje postupné zrání sympatoadrenálního systému plodu. Tento systém společně s dalšími faktory spouští nejen porod, ale také postnatální adaptaci. Z tohoto důvodu jsou hladiny katecholaminů v pupečnickové krvi několikanásobně vyšší než v krvi matky a to hlavně v případě přirozeného vaginálního porodu spojeného s hypoxií a následnou redistribucí srdečního výdeje. Oproti tomu při porodu pomocí císařského řezu, kdy nedochází k hypoxii, jsou katecholaminy v pupečnickové krvi zvýšeny pouze mírně (3, 33).

3.2.2 Dopamin a vývoj plodu

DA má v dospělém mozku behaviorální a kognitivní funkce, řídí pohyb, pocit odměny, emoce, učení, paměť, myšlenky (34). Ve vývoji plodu má zásadní roli ve vytváření typické mozkové struktury a funkce, je zodpovědný za diferenciaci předního mozku, modulaci migrace neuronů a dendritický růst před synaptogenezi (34). Stimulovaný D₂-receptor při vývoji zvyšuje počet bodů větvení a prodlužuje délku neuritů (19). DA ovlivňuje endokrinní funkci placenty, a to vazbou na placentární D₂-receptory. Tato vazba vede k inhibici bazální a hormonálně stimulované produkce placentárního laktogenu a choriového gonadotropinu (hCG) (2, 35). Placentární laktogen se postupně zvyšuje až do porodu a je zodpovědný za růst a vývoj plodu a za metabolismus bílkovin a sacharidů v něm (36). Naopak v rané fázi gestace je důležitý hCG, který stimuluje žluté tělísko tvořící progesteron a estrogen. Později dochází k degeneraci žlutého tělíska a sekreční funkci přebírá placenta (37). V případě poškození rovnováhy DA ve vyvíjejícím se mozku dochází k neurologickým onemocněním typu schizofrenie, ADHD a zvyšuje se pravděpodobnost mikroskopických neuroanatomických abnormalit způsobujících poruchy autistického spektra, pro něž je typické narušení vzájemné sociální interakce a potíže s verbální a neverbální komunikací (8, 22, 38).

3.3 Fetální vývoj a programování

Správný vývoj plodu závisí na *in utero* podmínkách. Jakýkoliv vnější zásah v průběhu těhotenství může vést ke komplikacím, například preeklampsii, zpomalení růstu a vývoje plodu, malformacím či k chybnému fetálnímu programování. Výraz fetální programování popisuje jev, při němž se plod adaptuje na různé exogenní faktory (infekce, stres, organické polutanty,

kouření, podvýživa, návykové látky), aby přežil (4, 5). Tato adaptace ovšem může ovlivnit morfologii, endokrinní a metabolické funkce plodu a způsobit vyšší predispozici k patologickým stavům v dospělosti (9). S touto hypotézou poprvé přišel David Barker, který předpokládal, že nepříznivá výživa v těhotenství může zvýšit náchylnost k hypertenzi, hyperlipidémii a obezitě v dospělosti (8, 9). Tento mechanismus, při nesprávné homeostáze monoaminů v průběhu gestace, je zodpovědný za již zmíněné vyšší riziko psychiatrických nemocí přetrvávající i v dospělosti.

3.4 Placentární transport

Placentární bariérou prochází živiny, hormony, plyny, odpadní látky, ale i xenobiotika (39). Míra přestupu závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech látky, vazbě na plazmatické bílkoviny a expresi transportérů pro danou látku. Lipofilní látky přestupují přes placentu pasivní difuzí bez spotřeby ATP. Hydrofilní látky využívají k přestupu transportéry. V průběhu těhotenství vzniká větší množství klků na MVM, čímž se zvětšuje plocha pro transport, dále se mění exprese transportérů a enzymů (40). Látky pronikají z plodu do krevního oběhu matky a naopak, některé jsou metabolizovány v placentě a některé se v ní kumulují (39). Jakýmkoliv narušením homeostázy dochází k ovlivnění funkce placenty. Hlavními ochrannými mechanismy jsou aktivní eflux látek proti koncentračnímu gradientu a jejich degradace aktivními enzymy (40).

Existuje několik typů transportu přes placentu, které můžeme rozdělit na aktivní a pasivní transport. Pod pasivní transport patří pasivní difuze, která probíhá po koncentračním gradientu bez spotřeby energie a jsou tak transportovány hlavně malé (do 500 Da) molekuly jako kyslík, oxid uhličitý, sodík, či draslík. Rychlost průchodu ovlivňuje také rychlost průtoku krve a acidita látky (pH krevního řečiště plodu je kyselější, tudíž slabě kyselé látky budou mít tendenci se v něm kumulovat). Dalším typem pasivního transportu je facilitovaná difuze, která je zprostředkována transportérem, ovšem bez spotřeby ATP a po koncentračním gradientu. Tímto mechanismem fungují například OCT transportéry. Aktivní transport je zprostředkován po koncentračním gradientu za spotřeby energie a dělí se na primární a sekundární aktivní transport. Jako primární aktivní transport fungují například ABC transportéry. ABC transportéry jsou efluxní pumpy, které získávají energii rozštěpením ATP. Mezi tyto pumpy patří P-glykoprotein (ABCB1) přenášející převážně lipofilní, mírně nabitě sloučeniny, jehož exprese je nejvyšší v prvním trimestru a s gestací klesá. Dalším zástupcem jsou BCRP

(ABCG1) a MRP (ABCC 1-6, 10-11). BCRP jsou polymorfní a odstraňují konjugáty i nekonjugovaná xenobiotika. MRP odstraňují z plodu endogenní konjugované lipofilní molekuly, anionty, nekonjugovaný bilirubin, žlučové kyseliny a jejich substrátem je např. i kyselina listová a její antagonist methotrexát (39, 40). Dalším mechanismem přenosu látek je endocytóza a exocytóza (39, 40). Receptorem zprostředkovanou endocytózou prochází např. protilátky imunoglobulinu G oběma směry (39, 41). Příkladem sekundárního aktivního transportu jsou SLC transportéry, které přenášejí především hydrofilní a nabitě molekuly bez spotřeby ATP. Jejich substráty jsou aminokyseliny, glukóza, vitamíny, mastné kyseliny, hormony, či monoaminy (42) a jsou buď širokospektré (transportéry organických kationtů-OAT) nebo vysoce selektivní (transportéry AMK). Superrodina SLC transportérů má tedy významnou roli od buněčného příjmu živin až po absorpci léčiv, transport neurotransmiterů a udržení homeostázy (43). Exprimované jsou v celém těle, ale hlavně v epitelu jater, střev, ledvin a orgánů s bariérovou funkcí jako je např. placenta, mozek či varle (43). Existují však i orgánově specifické SLC transportéry. Typy SLC transportérů mají velkou rozmanitost, která zatím není plně prozkoumána. Přenos může probíhat facilitovaným (pasivním) transportem, kdy je přenášena pouze jedna molekula v termodynamicky příznivém směru. Dalším typem přenosu je již zmíněný sekundární transport, který je nejčastější. Jedná se o přenos dvou a více látek. V tomto případě se jedna látka přenáší po elektro-chemickém či iontovém gradientu za vzniku volné energie, jež je spotřebována na přenos druhé látky ve stejném (symport) či opačném směru (antiport). Předpokládaným mechanismem je střídavý přístup vazebného místa pro ligand mezi stranami membrány změnou konformace transportéru. Afinita k substrátu, rychlost transportu a jeho aktivita je určena různými posttranslačními modifikacemi (44).

3.5 Noradrenalinový transportér (NAT)

NAT je transportér z rodiny SLC, konkrétně SLC6A2, nacházející se v neuronech, dřeni nadledvin, plicích a na mikrovilózní membráně placenty (24, 45). Jedná se o sekundárně aktivní transport, což znamená, že využívá gradient vzniklý při energeticky náročném primárně aktivním transportu (46). Influx substrátu skrze NAT je závislý na Na^+ , Cl^- gradientu. Jeho zvýšení lze dosáhnout při kyselejších pH a intrabuněčném K^+ gradientu (uvnitř > ven) (47, 48).

NAT je elektrogenní transportér, stimulovaný vnitřním negativním membránovým potenciálem. Při jeho vnitřní konformaci, NAT váže K^+ , ale nedochází k jeho antiportu. Ještě před návratem do vnější konformace dochází k jeho uvolnění (49).

Prvním krokem pro správnou funkci NAT je vytvoření gradientu pomocí Na^+/K^+ ATPázy, která za použití energie přeneše dvě molekuly K^+ dovnitř a tři molekuly Na^+ ven skrze membránu. NAT je otevřen na extracelulární straně, kde naváže Na^+ , Cl^- a společně se substrátem je transportuje dovnitř. NAT transportuje kromě NA, v závislosti na tkáni, také DA a 5-HT (50, 51, 52). Tomuto fenoménu se říká promiskuita monoaminových transportérů.

3.6 Dopaminový transportér (DAT)

DAT (SLC6A3) je stejně jako NAT napětově řízený, sekundárně aktivní, elektrogenní transportér závislý na transmembránovém gradientu Na^+ , Cl^- (49). V lidském těle je exprimován centrálně i periferně. Jeho dysfunkce je spojena s ADHD, Parkinsonovou nemocí a lékovou závislostí (53). Jeho placentární exprese nebyla nikdy popsána (27).

3.7 Serotoninový transportér (SERT)

SERT, další transportér z SLC skupiny transportérů, SLC6A4, je také sekundárně aktivní transportér a stejně jako NAT a DAT potřebuje Na^+ , Cl^- gradient pro svoji správnou funkci. Ovšem na rozdíl od nich se jedná o elektroneutrální transport. Po transportu 5-HT, Na^+ , Cl^- do buňky je K^+ antiportován ven. Díky tomu nedochází ke změně v transmembránovém gradientu a tento transport je elektroneutrální a nezávislý na napětí. Intrabuněčná koncentrace K^+ zvyšuje influx substrátu nezávisle na vytvořeném gradientu (48, 49, 54). Také pro SERT byla potvrzena tzv. promiskuita transportérů, tedy transport DA a NA pomocí SERT (55, 56).

3.8 Transportér pro organické kationty 3 (OCT3)

OCT je rodina polyspecifických transportérů superrodiny SLC (57). Jsou to nízko-afinitní, vysoko-kapacitní a obousměrné facilitované difuzní systémy nezávislé na K^+ a Na^+ (57, 58). Tyto transportéry jsou saturabilní tzn., že rychlost přenosu se zvyšuje až do doby, kdy dosáhne nasycení substrátem, při kterém se již rychlost dále nezvyšuje (46). OCT slouží například ke střevní absorpci, transportu látek játry a vylučování kationtů ledvinami (57).

OCT3 je transportér organických kationtů 3 vyskytující se v různých tkáních mj. i v mozku a na BM placenty (40). Má afinitu ke všem monoaminům a slouží k modulaci neurotransmise jejich zpětným vychytáváním ze synaptické štěrbině do vezikulů v presynapsích (57, 59).

V synapsích tedy určuje maximální koncentrace monoaminů a tím trvání a šíření vzruchu (58) OCT3 v průběhu těhotenství zvyšuje svou expresi na úrovni mRNA a proteinu na BM, což dokazuje jeho protektivní funkci (60, 61).

3.9 Inhibitory monoaminových transportérů

Jak již bylo zmíněno, transportéry zodpovědné za facilitovanou difuzi, tak i aktivní transportéry lze inhibovat. SERT, NAT a DAT jsou sensitivní na inhibici psychostimulačními látkami a antidepresivy (62, 63, 64, 65). OCT3 transportér je inhibovatelný D22, kortizolem a také antidepresivy.

Při naší hypotéze, že jsou SERT, NAT a OCT3 zodpovědné za transport DA a NA v placentě, inhibicí jejich funkce by mohlo docházet k akumulaci DA a NA v maternální či fetální cirkulaci. Jakékoliv narušení regulace monoaminů je spojené s dysfunkcí placenty a následnými patofyziologickými poruchami. Jelikož jsou monoaminy vazoaktivní, zvýšení jejich koncentrace v obou cirkulacích může mít za následek vasokonstrikci, která narušuje průtok krve fetoplacentární jednotkou, čímž se zhoršuje přenos živin a okysličení plodu. To by mohlo vést k retardaci plodu, zpomalení jeho růstu a vývoje. Vysoké hladiny mohou také potencovat kontrakce, čímž způsobí předčasný porod (66).

V našich experimentech jsme použili jako kontrolní inhibitory pro OCT3 kortisol (KORT) (57), decynium 22 (D22) (67) a paroxetin (PAR) (68, 69). Pro inhibici SERT jsme použili PAR (69) a venlafaxin (VEN) (70). Pro inhibici NAT jsme použili VEN (71) a nisoxtetin (NIS) (72). Jako kontrolní inhibitor DAT byl použit GBR12935 (GBR), který je mj. používán ve výzkumu Parkinsonovy choroby. Použití ADs je farmakologicky relevantní, jelikož až 10 % těhotných žen s depresí bere ADs a jako kontrolní inhibitory již byly použity v naší předchozí studii zabývající se transportem 5-HT skrze MVM a BM (73).

3.10 Experimentální metody

Použití lidské placenty k experimentům musí být v souladu s etikou, tudíž je možné využít terminální placenty po porodu pouze se souhlasem rodičky. Placenta se zpracovává různými kroky včetně homogenizace a sériové centrifugace, poté se MVM a BM vezikulují a vzorky se uchovávají při -80 °C. Mezi stěžejní kroky patří jistě etické získání placenty a její okamžité zpracování, které je časově náročné a musí probíhat při 4 °C. Výhodou použití vezikulů je umožnění studia transportu na jednotlivých membránách, tedy zvláště na maternální a fetální

straně. Nicméně pro správný transport musí být zvolena správná koncentrace proteinu, vezikuly musí mít správnou orientaci a musí se dbát správnému zacházení, aby se vezikuly opět neotevřely. Nedodržení správné práce by mohlo vést k falešným výsledkům. Pro potvrzení/vyvrácení exprese transportérů na mRNA úrovni jsme použili metodu digitálního droplet PCR. Výhodou této metody je její vynikající sensitivita, která nám umožňuje odhalit expresi genů, které by metodou kvantitativní PCR nebyly stanoveny. Největší přednost této metody ovšem tkví v poskytnutí absolutních hodnot genové exprese. Nevýhodou může být vyšší finanční náročnost experimentu a sensitivita vzniklých droplet na okolní teplotu a pohyb, kdy při vyšší teplotě a prudších pohybech mají droplety tendenci se degradovat. Tato metoda se mimo jiné využívá k měření cílové DNA např. při genetických abnormalitách, ale i při analýze virové a bakteriální zátěže. Poslední použitou metodou je metoda Western blotu, která nám umožňuje detekovat a kvantifikovat specifický protein ve směsi dalších proteinů. Tato metoda je jednoduchá a poměrně finančně nenáročná. Nicméně absolutně stěžejní pro získání správných výsledků je správné a precizní zvolení podmínek pro jednotlivé protilátky, blokování a další jednotlivé kroky této metody. Také kvantifikace musí být velice pečlivě vyhodnocena, aby nedocházelo k nepřesným výsledkům.

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je podrobně popsat transport DA a NA skrze MVM a BM, které jsou izolované z terminální lidské placenty. K tomu bylo potřeba určit zodpovědné transportéry pro transport DA a NA na obou placentárních membránách a stanovit možné zapojení pasivní difuze a/nebo nespecifické vazby na vezikuly.

K dosažení tohoto cíle bylo potřeba:

- Izolovat MVM a BM ze zdravé lidské terminální placenty
- Stanovit zapojení nespecifické vazby a/nebo pasivní difuze v transportu DA a NA přes MVM a BM
- Určit efekt intrabuněčného K^+ na transport DA a NA přes MVM a BM za účelem rozlišení neurálních a extra-neurálních transportérů
- Potvrdit/vyvrátit přítomnost transportérů pomocí kontrolních selektivních inhibitorů
- Potvrdit/vyvrátit expresi transportérů na úrovni mRNA pomocí metody ddPCR
- Potvrdit/vyvrátit expresi dopaminového transportérů na úrovni proteinu pomocí metody Western blotu

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiály

5.1.1 Biologický materiál

Terminální placenty od zdravých rodiček byly poskytnuty Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Všechny ženy se zúčastnily této studie v souladu s etickými standardy stanovenými Helsinskou deklarácí a všechny ženy daly podepsaný informovaný souhlas. Protokol studie byl schválen Etickým výborem pro výzkum univerzitní nemocnice (201006 S15P).

5.1.2 Chemikálie

- (+)-Sodium L-ascorbate, Sigma-Aldrich
- 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide, Sigma-Aldrich
- 2-Mercaptoethanol, Bio-rad
- 30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1, Bio-rad
- 4x Laemmli sample buffer, Bio-rad
- Albumin from bovine serum, minimum 98% electrophoresis, Sigma-Aldrich
- Ammonium persulfate, Bio-rad
- anti-DAT, 1:1000, Sigma-Aldrich
- anti-NET, 1:500, Abcam
- ART0172 Norepinephrine (0.2NHOAc:EtOH 9:1) 1mCi/ml, American Radiolabeled Chemicals
- ART0760 Dihydroxyphenylethylamine (EtOH:0.2.NHOAc 1:9) 1mCi/ml, American Radiolabeled Chemicals
- ART1551 5-Hydroxytryptamine 3H trifluoroacetate (H₂O:EtOH:TFA:Mercaptoethanol 98:2:0.1:0.2) 1mCi/ml, American Radiolabeled Chemicals
- ddPCR GEX assay B2M,Hsa, Bio-rad
- ddPCR Supermix for probes (no dUTP) 500 RXns, Bio-rad
- Dimethyl sulfoxide for molecular biology (DMSO), Sigma-Aldrich
- Droplet Generation oil for probes, Bio-rad

- Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Sigma-Aldrich
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sigma-Aldrich
- GBR 12935 dihydrochloride, Sigma-Aldrich
- Glycin, Penta chemicals unlimited
- HEPES, Sigma-Aldrich
- Hydrocortisone, Sigma-Aldrich
- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát čistý, Penta chemicals unlimited
- Kyselina chlorovodíková, Sigma-Aldrich
- Chlorid draselný, Penta chemicals unlimited
- Chlorid hořečnatý, Sigma-Aldrich
- Chlorid sodný, Penta chemicals unlimited
- Chlorid vápenatý dihydrát, Penta chemicals unlimited
- iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Methanol, Honeywell
- Nisoxetine hydrochloride, Sigma-Aldrich
- Paroxetine hydrochloride, Sigma-Aldrich
- Phenylmethansulfonyl fluoride (PMSF), Sigma-Aldrich
- Pierce BCA protein assay kit, Thermo scientific
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse immunoglobulins/HRP, Dako
- Polyclonal Swine Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP, Dako
- Sacharosa, Penta chemicals unlimited
- Síran hořečnatý heptahydrát, Penta chemicals unlimited
- *SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, SLC22A3, B2M, Net, Dat, Sert, Oct3, Ywhaz*, Thermo Fisher Scientific
- Sodium dodecyl sulfate (SDS), Sigma-Aldrich
- Temed, Bio-rad
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Penta chemicals unlimited
- Tween 20, Sigma-Aldrich
- Venlafaxine hydrochloride, Sigma-Aldrich
- β -aktin (Abcam, Ab8226)

5.2 Pístroje

- ChemiDoc MP Imaging (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini-PROTEAN System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Multidetekční destičkový systém Hidex
- Multiple Punch Assembly (Merck Millipore)
- MultiScreen 96 well plate vacuum filtrační systém (Merck Millipore)
- PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- QX200™ Droplet generator (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- QX200™ Droplet Reader+ softwaru QuantaSoft™
- Sorvall WX 80 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Hercules, CA, USA)
- Trans-Blot Turbo Transfer Systém (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Tri-Carb 2910 TR instrument (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Tyčový mixér

5.3 *Ex vivo* izolace mikrovilózní a bazální membrány ze zdravé terminální placenty

5.3.1 Složení roztoků

Tabulka 1- Placentární roztok 1

	Složka:	Finální koncentrace:
PLACENTÁRNÍ ROZTOK 1	Tris Hepes 1M pH 7,2	50 mM
	EGTA 100 mM	5 mM
	EDTA 100 mM	5 mM
	PMSF	1 mM
	Sacharóza	250 mM

Tabulka 2- Placentární roztok 2

	Složka:	Finální koncentrace:
PLACENTÁRNÍ ROZTOK 2	Tris Hepes 1M pH 7,2	10 mM
	Sacharóza	250 mM

Tabulka 3 – Sacharózový gradient

Složka:	Finální koncentrace/ hustota 1,165 g/cm³	Složka:	Finální koncentrace/ hustota 1,19 g/cm³
	100ml		50 ml
Sacharóza	42,206 g	Sacharóza	24,39 g
Tris Hepes 1M	1 ml	Tris Hepes 1M	0,5 ml

Tabulka 4- Extravezikulární pufr, intravezikulární pufr

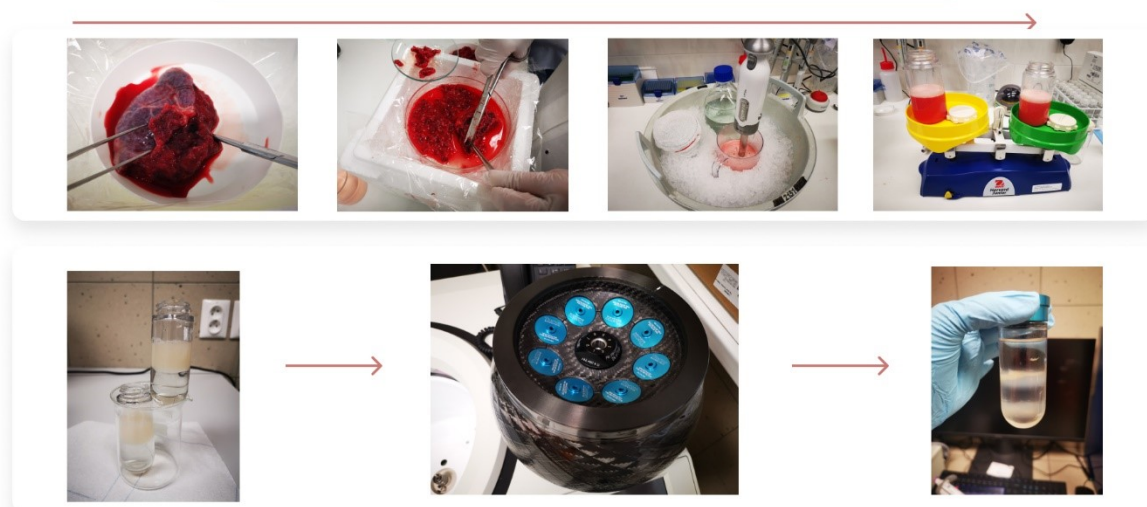
		100ml
EVB + NaCl	5 mM Tris	0,06 g
	5 mM HEPES	0,12 g
	145 mM NaCl	0,85 g
IVB	5 mM Tris	0,06 g
	5 mM HEPES	0,12 g
	290 mM Sacharóza	9,93 g
<i>pH 7,4 docíleno pomocí HCl</i>		

Tabulka 5 – Stop roztok

		2 l
Stop roztok	130 mM NaCl	15,22 g
	10 mM Na ₂ HPO ₄	2,84 g
	4,2 mM KCl	0,63 g
	1,2 mM MgSO ₄	0,59 g
	0,75 mM CaCl ₂	0,22 g
<i>pH 7,4 docíleno pomocí HCl při 4 °C</i>		

5.3.2 Postup izolace

Kroky izolace mikrovilózní a bazální membrány z čerstvé lidské placenty



Obrázek 2. Jednotlivé kroky izolace MVM a BM z terminální, zdravé placenty, počínající jejím rozřezáním na menší díly a následnou úpravou vč. odstranění cév a kalcifikací. Dalšími kroky jsou homogenizace a centrifugace.

Nejdůležitější při *ex vivo* izolaci placentárních MVM a BM vezikulů z lidské terminální placenty je udržovat studené prostředí, aby nedošlo k degradaci tkáně. To znamená dodržování práce na ledu, předchlazení centrifugy a uchování potřebných roztoků v lednici. Placenta je těsně po porodu přemístěna do laboratoře, kde je rozřezána na 4-5 menších dílů. Tyto díly jsou promyty fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl) a uchovávány v tomto roztoku na ledu. Dále se na chlazených Petriho miskách odstraní fetální choriová membrána a maternální *decidua basalis*. Zbylou tkáň nůžkami nastříháme na kousky cca 0,5cm x 0,5cm. Tuto tkáň opět promyjeme fyziologickým roztokem, dokud přestane být krvavá a odstraníme cévy a kalcifikace. Poté ji zvážíme a resuspendujeme v placentárním roztoku 1 (Tab. 1) a homogenizujeme 3 minuty pomocí ručního mixéru. Homogenát přefiltrujeme přes dvojitě složenou gázu. 2 ml tohoto homogenátu uložíme do lednice pro pozdější charakterizaci vezikulů. Zbytek odstředíme 15 minut při 10 000 x g ve 4 °C. Výsledný supernatant (S1) uchováme na ledu a peletu resuspendujeme v co nejmenším množství placentárního roztoku 1 (Tab. 1) a homogenizujeme pomocí homogenizátoru s teflonovou špičkou (8x). Opět odstředíme 15 minut při 10 000 x g ve 4 °C a výsledný supernatant (S2) spojíme s prvotním (S1) a filtrujeme skrz dvojitě složenou gázu. Přefiltrovaný supernatant vzniklý po tomto kroku se znovu odstředuje, tentokrát 60 minut při 47 500 x g při 4 °C a vzniklá peleta se resuspenduje

v 2 x 600 ml placentárního roztoku 1 (Tab. 1) a 2-3x homogenizuje pomocí homogenizátoru s teflonovou špičkou. Odebereme alikvotní část suspenze a stanovíme koncentraci proteinu pomocí BCA testovacího kitu, abychom mohli výsledný protein naředit na 10-15 mg/ml. K našemu vzorku přidáme čerstvě připravený roztok 12 mM MgCl₂ a necháme 20 minut na ledu za stálého míchání. Vzorek poté odstředíme 15 minut při 2500 x g při 4 °C, čímž dojde k oddělení MVM (supernatant) a BM (Mg²⁺ vytvoří peletu).

Supernatant s MVM odstředíme 30 minut při 47 500 x g při 4 °C. Vzniklý supernatant zlikvidujeme a peletu resuspendujeme v placentárním roztoku 2 (Tab. 2). Tento krok opakujeme ještě 2x. Konečnou peletu resuspendujeme v IVB (Tab. 4) (objem závisí na množství proteinu) a pomocí malého skleněného ručního homogenizátoru zhomogenizujeme suspenzi a určíme koncentraci proteinu pomocí BCA testovacího kitu. Uchovááme při -80 °C.

BM peletu resuspendujeme v placentárním roztoku 2 (Tab. 2) a 2-3 x homogenizujeme pomocí homogenizátoru s teflonovou špičkou. Odebereme část suspenze, určíme koncentraci proteinu a zředíme suspenzi na 1.5-2 mg/ml. Připravíme sacharózový gradient (Tab. 3) a odstředíme v ultracentrifuze s rotorem T865 (Sorvall) 70 minut při 141 000 x g. Po centrifugaci odebereme pruh B (BM) (Obr. 2) a resuspendujeme v maximálním množství placentárního roztoku 2 (Tab. 2) a odstředíme 30 minut při 47 500 x g. Vzniklou peletu resuspendujeme v IVB (Tab. 4) odstředíme stejným způsobem. Dále homogenizujeme pomocí malého skleněného ručního homogenizátoru, určíme koncentraci proteinu a uchováme při -80 °C.

Posledním krokem zpracování vzorků je vezikulace membrán pomocí 25 g jehly, kterou 20 x natáhneme část vzorku MVM či BM. Tento krok děláme v den experimentu.

5.4 *Ex vivo* transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu

Před samotným experimentem si připravíme všechny potřebné roztoky a naředíme protein na 10mg/ml pomocí IVB (Tab. 4). Dále připravíme roztoky ³H-DA, 20 μCi/ml (112 nM) a ³H-NA, 20 μCi/ml (332 nM) v EVB Na⁺ (Tab. 4). K roztokům přidáme 1mM kyselinu askorbovou, abychom zabránili neenzymatické oxidaci DA a NA.

Nyní můžeme začít s experimentem. Nejprve si připravíme první mikrotitrační destičku s triplicátou vzorků MVM/BM (10mg/ml), EVB Na⁺ a ³H-DA nebo ³H-NA. Všechny roztoky zvlášť. Do druhé titrační destičky odebereme pomocí multipipety vždy do každé jamky 3 μL MVM/BM. K nim přidáme 3 μL EVB Na⁺ (s inhibitorem/bez inhibitoru). V případě inhibitorů

necháme preinkubovat 10 minut. Reakci začneme přidáním 3 μl ^3H -DA či ^3H -NA a necháme inkubovat 1 minutu. Experiment provádíme v technickém triplicátu. Dbáme na dostatečné promíchání opětovným nasátím a vypuštěním tekutiny z pipety. Reakci zastavíme přidáním 200 μl studeného stop roztoku (Tab. 5) ke každému vzorku a následně těchto 200 μl přeneseme do 1,8 ml stop roztoku vychlazeného na ledu. Přefiltrujeme přes vakuový filtrační systém (0,45 μm mixed cellulose ester filter (Merck Millipore, Burlington, MA, USA); cat. no. MAHAS4510) a 10 x promyjeme 300 μl stop roztoku, abychom dosáhli co nejnižší nespecifické vazby radioaktivní látky na filtr. Abychom zjistili vazbu radioaktivní látky na filtr, připravíme vždy kontrolní triplicát bez MVM/BM (NPC – no protein control) z EVB Na^+ a radioaktivně značeného monoaminu v poměru 6:3 a postupujeme stejným způsobem. Poté vyrazíme jednotlivé filtry do vialek se scintilační tekutinou (MultiScreen Multiple Punch system (Merck Millipore, Burlington, MA, USA)) a pomocí radioluminiscence změříme radioaktivitu scintilátorem. Z výsledné hodnoty odečteme zjištěnou vazbu na filtr (NPC) a vypočítáme hodnotu transportu (pmol/mg proteinu).

5.4.1 Stanovení vazby a/nebo pasivní difuze DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu

Pro posouzení vazby ^3H -DA a ^3H -NA na MVM/BM a/nebo pasivního transportu ^3H -DA a ^3H -NA přes MVM a BM byl experiment proveden ve studeném prostředí na ledě. Použité roztoky byly předchlazeny. Inkubace trvala 0 minut a 1 minutu. Výsledky byly porovnány s výsledky provedenými za pokojové teploty.

5.4.2 Vliv intrabuněčného K^+ na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu

Pro vyhodnocení efektu intrabuněčného K^+ na transport ^3H -DA a ^3H -NA skrze MVM/BM byly vezikuly preinkubovány se 140 mM KCl přes noc při 4 $^{\circ}\text{C}$. Zbytek experimentu probíhal stejně. Výsledek byl vztažen k experimentu bez preinkubace se 140 mM KCl.

5.4.3 Efekt kontrolních inhibitorů na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu

K určení transportérů zodpovědných za transport $^3\text{H-DA}$ a $^3\text{H-NA}$ skrze MVM a BM byly použity následující inhibitory. Paroxetine 100 μM (SERT, OCT3 inhibitor), venlafaxin 100 μM (SERT, NAT inhibitor), nisoxetine 20 nM (NAT), GBR12935 50 nM (DAT), kortisol 100 μM (OCT3 inhibitor), decynium-22 10 μM (OCT3 inhibitor).

Na rozdíl od předchozích experimentů si připravíme roztoky jednotlivých inhibitorů v DMSO (dimethylsulfoxid), jehož obsah musí být dostatečně nízký, aby nepůsobil toxicky (<2 %). Výsledek je vztažen k transportu bez inhibitorů, který je připraven se stejným množstvím DMSO.

5.5 Digitální droplet PCR

5.5.1 Reakční směs

Tabulka 6- Příprava vzorků pro ddPCR

	Složka:	Množství:
	2x supermix	11 μl
Vzorky pro ddPCR	FAM esej	1,1 μl
	HEX esej	1,1 μl
	cDNA (25 ng/ μl)	1,1 μl
	Voda pro inj.	7,7 μl

5.5.2 Postup

Digitální droplet PCR nám na rozdíl od qPCR přináší absolutní hodnoty. Připravíme si reakční směs ze supermixu (DNA polymeráza prodlužující řetězec DNA), FAM esej (SERT, NAT, DAT, OCT3, Sert, Nat, Dat, Oct3), HEX esej (housekeeping gen, pro lidi *B2M*, pro potkany *Ywhaz*), cDNA (vzorek) a vody pro injekce (Tab. 6). Poté vložíme 70 μl oleje do spodních dírek destičky určené do generátoru droplet a do prostředních dírek napipetujeme 22 μl

připravené směsi vzorků. Necháme generátor vytvořit droplety, které jsou velmi senzitivní, proto musíme pracovat velmi opatrně a v pokojové teplotě. Speciální pipetou je převedeme do další destičky a zakryjeme fólií, kterou přitavíme během 5 sekund v PCR plate sealeru. Destičku vložíme do termocykléru na 2 hodiny. Polymerázová řetězová reakce probíhá v každé jednotlivé dropletě a přístroj nám spočítá přesný počet molekul (PCR pozitivních a PCR negativních droplet) pomocí fluorescence ve dvou optických kanálech. Pozitivní droplety (obsahující gen FAM/HEX) mají zvýšenou fluorescenci oproti těm negativním. Do výsledků zahrnujeme pouze hodnoty s vygenerovanými 13 000 dropletami a více.

5.6 Western blot

5.6.1 Roztoky

Tabulka 7 – 1,5M a 0,5M Tris- HCl

	Složka:	Množství:
1,5M Tris- HCl	Tris base	36,330 g
	Destilovaná voda	150 ml
	HCl do pH 8,8	X ml + destil. voda do 200ml
0,5M Tris- HCl	Tris base	3,0275 g
	Destilovaná voda	35 ml
	HCl do pH 6,8	X ml + destil. voda do 50ml

Tabulka 8- Příprava gelů

	Složka:	Množství:
Horní vrstva „stacking“ gelu	Destilovaná voda	0,955 ml
	30% akrylamid	0,203 ml
	10% SDS	16 μ l
	0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	0,391 ml
	10% APS	32 μ l
	Temed	1,6 μ l
Spodní/separační vrstva gelu 12,5% pro DAT	Destilovaná voda	1,77 ml
	30% akrylamid	2,325 ml
	10% SDS	55,5 μ l
	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,4 ml
	10% APS	74 μ l
	Temed	3,75 μ l

Tabulka 9 - Pracovní roztok

	Složka:	Množství:
5x Pracovní roztok	Tris base	15,1 g
	Glycin	72 g
	SDS	5 g
	Destilovaná voda	900 ml
	HCl do pH 8,3	X ml + destil. voda do 1 l
Pracovní roztok	5x pracovní roztok	200 ml
	Destilovaná voda	800 ml

Tabulka 10 - Blotovací roztok, pH 8,3

	Složka:	Množství
Blotovací roztok	Tris base	3,0275 g
	Glycin	14,2633 g
	Destilovaná voda	800 ml
	Methanol	200 ml

Tabulka 11 - TBST

	Složka:	Množství:
10x TBS	Tris base	24 g
	NaCl	88 g
	Destilovaná voda	900 ml
	HCl do pH 7,6	X ml + destil. voda do 1 l
TBST	10 x TBS	100 ml
	Destilovaná voda	900 ml
	Tween 20	1 ml

5.6.2 Gelová SDS-PAGE elektroforéza

Prvotním krokem je příprava spodní vrstvy gelu (Tab. 8) z destilované vody, čerstvě připraveného roztoku amonium persulfátu (10% APS), dodecylsírany sodného (10% SDS), TRISu (1,5M pro separační spodní vrstvu s pH 8,8 a 0,5M pro horní vrstvu s pH 6,8) (Tab. 7) a tetramethylethyldiaminu (Temed), který spouští polymerizaci. Po nalití 12,5% separačního gelu mezi skla, použijeme isopropanol k urovnání hladiny směsi/okraje gelu a čekáme na ztuhnutí. Poté přidáme „stacking“ gel, do kterého zaboříme hřebínek vytvářející jamky určené pro aplikaci jednotlivých vzorků. Mezitím, co gely tuhnou, si připravíme vzorky. Pomocí pipety důkladně promícháme vzorky s lyzačním pufrem a Laemmli pufrem. Vzorky necháme 5 minut při 95 °C. Elektroforetický systém naplníme pracovním roztokem (Tab. 9). Do jamek napipetujeme 5 µL standardu a 10 µL vzorků. Když máme hotovo, zapneme přístroj nejprve na 25 minut při 80 V a následně 90 minut při 120 V a čekáme, až se vyvine škála standardů. Stejným směrným elektrickým polem dojde k separaci proteinů dle molekulové hmotnosti.

5.6.3 Přenos proteinů z gelu na membránu

Po separaci proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy následuje přenesení proteinů z gelu na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Navrstvíme houbu, 3 filtrační papíry, PVDF membránu, gel a na to opět 3 filtrační papíry a houbu. Membránu aktivujeme 10 s v metanolu, následně ji opláchneme 5 s v destilované vodě a necháme v blotovacím pufru (Tab. 10). Aby nám gel při práci nevyschl, můžeme si jej ponechat v blotovacím pufru do doby, než jej budeme potřebovat k vrstvení. Při skládání vrstev se snažíme opatrně vytlačit vzduchové bublinky pomocí válečku. Vše umístíme do blotovacího zařízení, kde působením elektrického proudu 40 minut při 25 V jsou proteiny obalené SDS (záporně nabitě) unášeny k anodě směrem dolů a tím přeneseny z gelu na membránu.

5.6.4 Blokování a inkubace s primární a sekundární protilátkou

Membránu vložíme do zkumavky s 5% BSA (hovězí sérový albumin) a necháme promývat 1 hodinu, čímž zablokujeme nespecifická místa na membráně. Poté membránu 3 x proplachujeme 10 minut s 5 ml TBST (Tab. 11). Nakonec necháme membránu inkubovat s primární protilátkou k námi hledanému proteinu (anti-DAT, 1:1000, Sigma-Aldrich) a inkubuji celou noc při 4 °C, čímž se protilátka naváže na antigenní epitopy proteinů vzorku. Druhý den, opět 3 x po 10 minutách, promyjeme membránu pomocí 5 ml TBST a poté necháme membránu inkubovat se sekundární protilátkou (Polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP, 1:20 000, Dako) v 3% BSA, která se naváže na primární protilátku. Nakonec 5x promyji 5 ml TBST a mohu detekovat.

5.6.5 Detekce

Membránu se snažím položit bez bublinek do detekčního přístroje, kde kontroluji její pozici. Pokud je v měřicím poli, nakapu na ni chemiluminiscenční směs AmershamTM ECLTM Prime (GE Healthcare life Science), přikryji průhlednou fólií a detekuji nestabilní substrát, stabilizovaný vyzářením kvanta světla. Dle molekulové hmotnosti standardů určím „pruhy“ námi hledaného proteinu. Po detekci lze membránu uchovávat v roztoku TBST (Tab. 11) v lednici pro další případné potřeby.

5.6.6 Kvantifikace proteinu

Membránu promyji 3 x TBST po 5 minutách a nechám jednu hodinu inkubovat s β -aktinem v 3% BSA v poměru 1:10 000 (Abcam, Ab8226). Poté 4x promyji TBST po 10 minutách a 1 hodinu inkubuji membránu se sekundární protilátkou (specifická anti-mouse HRP protilátkou, 1:20 000, Dako) v 3% BSA. Opět 6x promyji TBST po 10 minutách a detekuji. β -aktin je protein s konstantní expresí, k němuž můžeme kvantitativně porovnat množství proteinu v našem vzorku.

5.7 Statistická analýza

Efekt teploty na $^3\text{H-DA}$ a $^3\text{H-NA}$ transport skrze MVM a BM byl hodnocen pomocí 2Way ANOVA testu. Efekt intrabuněčného K^+ na $^3\text{H-DA}$ a $^3\text{H-NA}$ transport skrze MVM a BM byl hodnocen pomocí Mann-Whitneyho testu. K vyhodnocení efektu inhibitorů na $^3\text{H-DA}$ a $^3\text{H-NA}$ transport skrze MVM a BM jsme použili Kruskal-Wallis test. Statistická analýza byla vyhodnocena pomocí programu GraphPad prism 9.3.1 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Hvězdička v popisku grafů značí úroveň signifikance: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), and *** ($p \leq 0,001$).

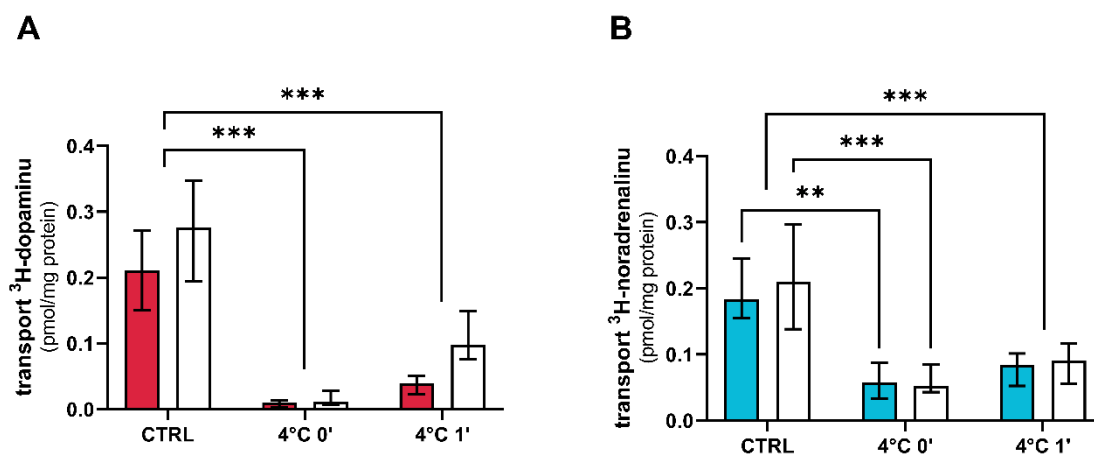
6 VÝSLEDKY

6.1 Transport DA a NA přes *ex vivo* izolovanou mikrovilózní a bazální membránu

6.1.1 Transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu ve 4 °C

Ke zjištění možné nespecifické vazby $^3\text{H-DA}$ a $^3\text{H-NA}$ na MVM a BM a/nebo zapojení pasivní difuze jsme provedli experimenty za laboratorní teploty a ve 4 °C v čase 0 minut a 1 minuty. Transport $^3\text{H-DA}$ v čase 0 byl na obou membránách zanedbatelný. 1minutový transport $^3\text{H-DA}$ ve 4 °C ve srovnání s transportem za pokojové teploty byl 17,9% na MVM a 36,3% na BM. Tento výsledek naznačuje zapojení nespecifické vazby a/nebo pasivní difuze v transportu

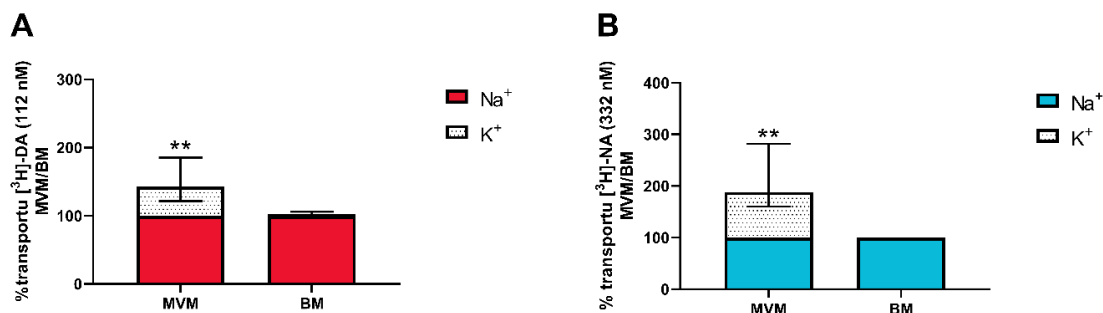
³H-DA, s výraznějším výsledkem na BM (Obr. 3A). Transport ³H-NA ve 4 °C byl podobný na MVM i BM. Navíc hodnoty transportu jsou srovnatelné v obou zkoumaných časech (Obr. 3B). Tyto výsledky naznačují zapojení nespecifické vazby a/nebo pasivní difuze pro ³H-NA na obou membránách.



Obrázek 3. Zapojení nespecifické vazby a/nebo pasivní difuze v transportu ³H-DA (A) a ³H-NA (B) přes MVM (červená/modrá) a BM (bílá). Data jsou prezentována jako medián + IQR, n=4. Statistická analýza byla provedena pomocí 2Way ANOVA testu: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

6.1.2 Efekt intrabuněčného K⁺ na transport DA a NA přes mikrovilózní a bazální membránu

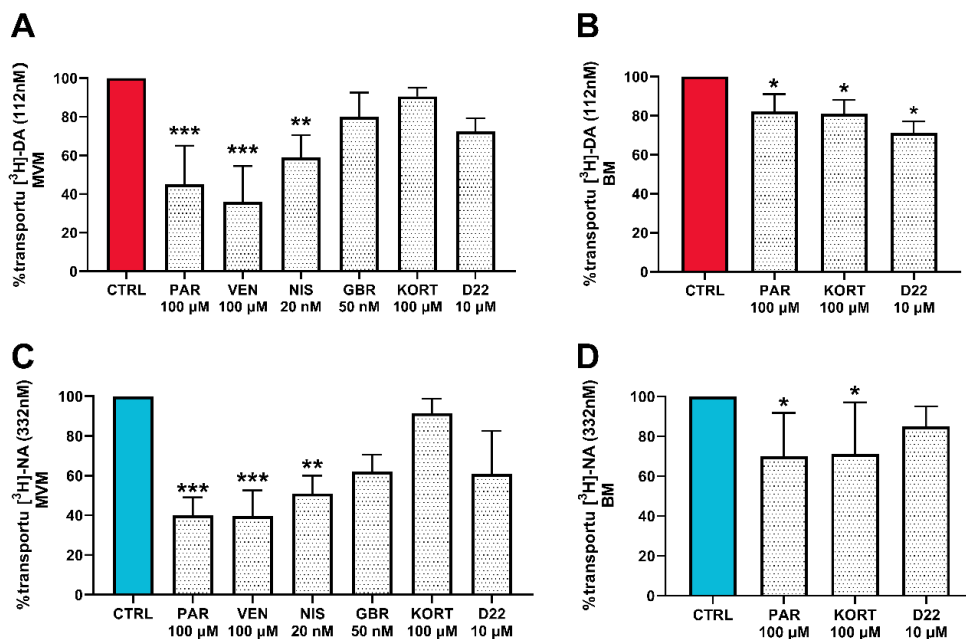
Abychom rozlišili neurální (SERT, NAT, DAT) a extra-neurální (OCT3) monoaminové transportéry na MVM a BM, zkoumali jsme vliv intrabuněčného K⁺ na ³H-DA a ³H-NA transport, jelikož pouze neurální monoaminové transportéry jsou závislé na Na⁺/Cl⁻ a intrabuněčném K⁺ koncentračním gradientu. Inkubace se 140 mM K⁺ významně zvýšila transport ³H-DA a ³H-NA pouze na MVM. Medián transportu ³H-DA se zvýšil o 42,5 % a ³H-NA o 88,0 %. Inkubace s K⁺ neměla na transport skrze BM žádný vliv (Obr. 4).



Obrázek 4. Efekt intrabuněčného K⁺ na transport ³H-DA (A) a ³H-NA (B) přes MVM a BM. Data jsou prezentována jako medián + IQR transportu s Na⁺ (červená/modrá) a K⁺ (bílá s tečkami), n=4. Statistická analýza byla provedena pomocí ne-parametrického Mann-Whitney testu: * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001).

6.1.3 Vliv inhibitorů na transport DA, NA přes mikrovilózní a bazální membránu

Kontrolní inhibitory neurálních (SERT, NAT, DAT) a extra-neurálních transportérů (OCT3) byly testovány, abychom určili zodpovědné transportéry pro transport ³H-DA a ³H-NA skrze MVM a BM. Jelikož výsledky efektu intrabuněčného K⁺ vylučují zapojení neurálních transportérů na BM, byly zde testovány pouze kontrolní inhibitory pro OCT3. Výsledky ukazují, že paroxetin, venlafaxin a nisoxtetin signifikantně inhibují ³H-DA (Obr. 5A) a ³H-NA (obr. 5C) transport skrze MVM. SERT a NAT jsou tedy zásadní transportéry pro transport DA a NA na maternální straně placenty. Dále paroxetin a kortisol slabě a přesto signifikantně inhibovali transport ³H-DA (Obr. 5B) a ³H-NA (Obr. 5D) skrze BM. Transport ³H-DA skrze BM byl navíc inhibován D22 (Obr. 5B). Výsledky naznačují, že transport obou monoaminů skrze BM je zprostředkován OCT3.

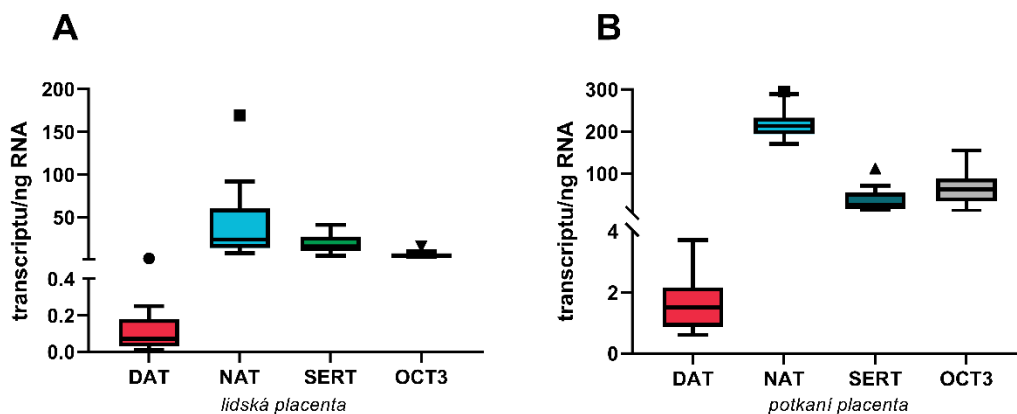


Obrázek 5. Vliv inhibitorů na transport ³H-DA skrze MVM (A) a BM (B) a ³H-NA skrze MVM (C) a BM (D). 1minutový transport ³H-DA a ³H-NA byl hodnocen v přítomnosti 100 μM paroxetinu (PAR), 100 μM venlafaxinu (VEN), 20 nM nisoxetinu (NIS), 50 nM GBR12935 (GBR), 100 μM kortisolu (KORT) a 10 μM decynia-22 (D22). Výsledky jsou prezentovány jako % transportu vztažené k transportu bez inhibitorů. Data jsou prezentována jako medián ± IQR, n ≥4. Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallis testu: * (p ≤ 0,05), ** (p ≤ 0,01), *** (p ≤ 0,001).

6.1.4 Expres monoaminových transportérů v lidské a potkaní placentě pomocí ddPCR

K určení a porovnání exprese neurálních a extra-neurálních transportérů na úrovni mRNA jsme použili metodu ddPCR. V lidské placentě byl nejvíce exprimován *NAT*, 24,20±161,20 transkriptů/ng transkribované RNA. *SERT* a *OCT3* byly srovnatelné expresí 16,00±36,00 a 5,00±13,00 transkriptů/ng transkribované RNA. Oproti tomu *DAT* exprese byla zanedbatelná, 0,07±0,87 transkriptů/ng transkribované RNA (Obr. 6A). V potkaní placentě byl také nejvíce

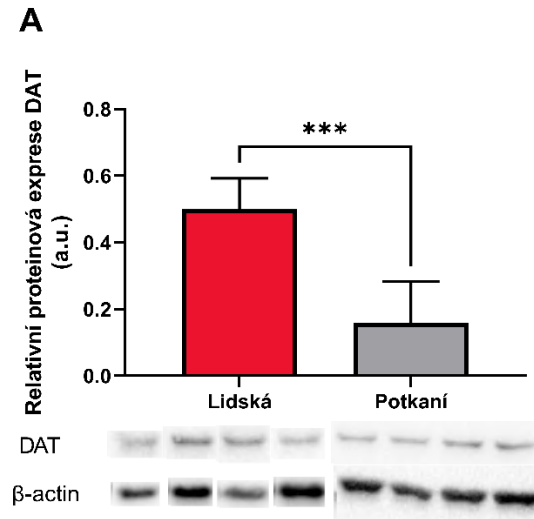
exprimován *Nat*, $213,14 \pm 124,50$ transkriptů/ng transkribované RNA. *Sert* a *Oct3* byly exprimovány $26,09 \pm 99,18$ a $62,73 \pm 144,00$ transkriptů/ng transkribované RNA, respektive. *Dat* exprese byla $1,51 \pm 3,10$ transkriptů/ng transkribované RNA (Obr. 6B). Placentární exprese všech zkoumaných transportérů je tedy srovnatelná u obou druhů.



Obrázek 6. Expres monoaminových transportérů v lidské (A) a potkaní (B) placentě pomocí metody ddPCR. Výsledky jsou prezentovány jako počet transkriptů/ng transkribované RNA. Data jsou prezentována jako medián \pm IQR, $n > 12$.

6.1.5 Expres dopaminového transportéru na úrovni proteinu v lidských a potkaních placentárních homogenátech

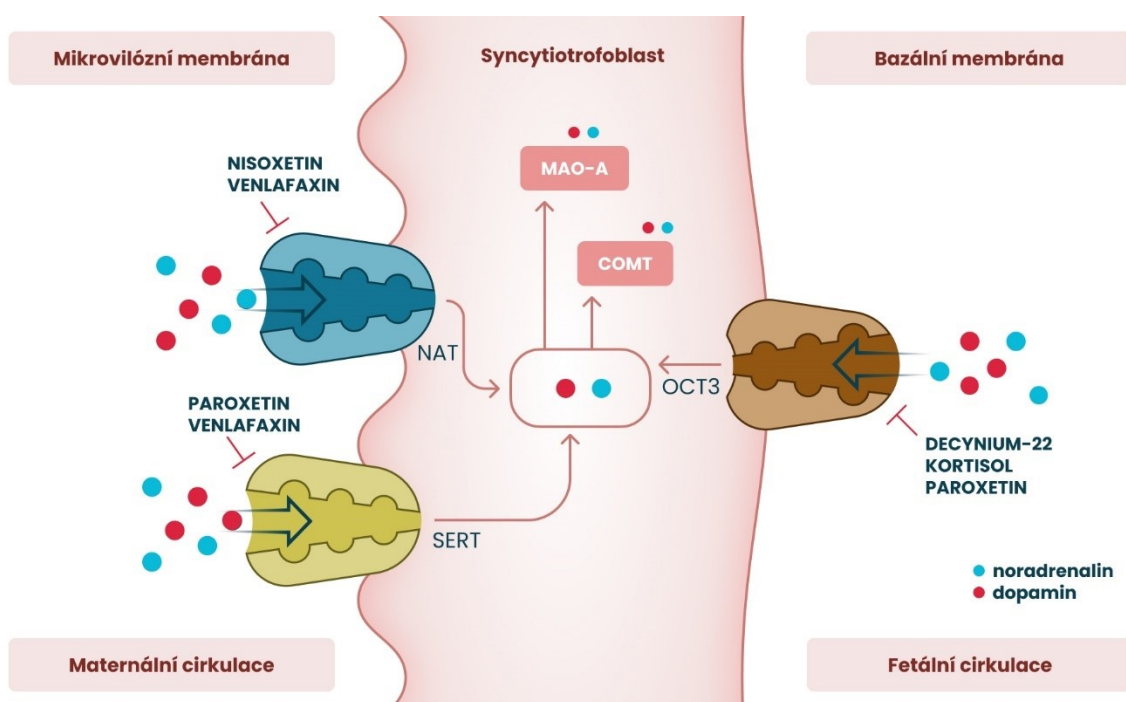
Výsledky ddPCR naznačují pouze zanedbatelnou expresi DAT na úrovni mRNA. Jelikož DAT zatím nebyl v lidské ani potkaní placentě detekován, stanovili jsme jeho expresi také na úrovni proteinu. Proteinová expresi DAT byla detekována v lidské i v potkaní placentě, ale na rozdíl od exprese na úrovni mRNA, lidská placenta vykazovala signifikantně vyšší relativní proteinovou expresi (0,5 a.u.) než potkaní placenta (0,16. a.u.) (Obr. 7).



Obrázek 7. Expese dopaminového transportérů v lidské a potkaní placentě pomocí metody Western blotu. Data jsou prezentována jako medián \pm IQR, $n > 6$. Statistická analýza byla provedena pomocí ne-parametrického Mann-Whitneyho testu: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

7 DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá mechanismy transportu monoaminů skrze lidské placentární membrány, které jsou hlavním místem přestupu látek mezi maternální a fetální cirkulací. Transport DA a NA byl prozatím výhradně zkoumán na MVM. Navzdory zvyšující se fetální produkci monoaminů směrem k porodu, fetální extrakce skrze BM nebyla doposud popsána (31). Navíc většina dostupných studií je více jak 20 let stará. Z tohoto důvodu pomocí *ex vivo* izolovaných lidských placentárních vezikulů, MVM a BM, přinášíme nový obrázek transportu DA a NA na obou stranách placenty (Obr. 8).



Obrázek 8. Shrnutí transportu DA a NA skrze lidské placentární membrány. Aktivní transport skrze MVM je zprostředkován pomocí vysoko-afinitních a nízko-kapacitních SERT a NAT transportérů. Na fetální straně je transport zprostředkován nízko-afinitním a vysoko-kapacitním OCT3 transportérem. Převzato z Horackova a kol. (2022) (74) .

Pomocí vysoce sensitivní metody ddPCR jsme detekovali expresi *NAT*, *SERT* a *OCT3* v lidské placentě. Překvapivým výsledkem byla exprese *DAT*, která je ovšem zanedbatelná díky velmi nízkému počtu transkriptů/ng RNA. Placentární tkáň tedy exprimuje neurální (*SERT*, *NAT*) a extra-neurální (*OCT3*) transportéry. K jejich rozlišení na jednotlivých placentárních

membránách jsme využili jejich rozdílného využití vnitřního K^+ gradientu (49). Jednoznačný vliv intrabuněčného K^+ pouze na transport skrze MVM potvrdil expresi neurálních transportérů (SERT, NAT) jen na maternální straně syncytiotrofoblastu.

V rámci transportu monoaminů je v literatuře popsána v placentární tkáni na maternální straně přítomnost vysoko-afinitních a nízko-kapacitních monoaminových transportérů, NAT a SERT (23, 75), nicméně exprese DAT nebyla nikdy potvrzena (26, 27). Specificky, transport NA skrze MVM byl do dnešní doby připisován pouze NAT (47). V našich experimentech kontrolní inhibitory NAT, VEN a NIS signifikantně inhibovali transport NA skrze MVM. Nicméně, kontrolní inhibitor SERT, paroxetin, také signifikantně inhiboval transport NA skrze MVM. Z těchto výsledků vyplývá, že NAT a SERT jsou společně zodpovědný za transport NA skrze MVM. Zjištění této zkřížené substrátové afinity již není ničím překvapivým. Takzvaná promiskuita těchto vysoko-afinitních monoaminových transportérů a uvolnění NA skrze SERT byly již dříve popsány, v závislosti na lokalizaci v tkáni (55).

Na rozdíl od NA, exprese specifického dopaminového transportéru v lidské placentě je zanedbatelná. V literatuře byl transport DA skrze MVM přisuzován také NAT (26). Dle našich experimentů, sensitivita DA transportu k inhibici paroxetinem i nisoxtinem ukazuje překrývající se substrátovou specifitu, kdy SERT i NAT přispívají k transportu DA na maternální straně placenty. Selektivní inhibitor DAT neměl žádný efekt na transport DA a NE. Afinita DA k těmto transportérům v neurální tkáni byla již v literatuře popsána, kdy například transport DA ve frontálním kortexu byl závislý na funkci NAT (76). Nicméně, způsob translokace substrátu oběma transportéry se liší mechanismem (77).

Jelikož byl v nedávné studii popsán OCT3 jako hlavní mechanismus transportu 5-HT z fetální cirkulace (25), a také byla popsána jeho afinita k DA a NA v neurální tkáni (57), domnívali jsme se, že bude OCT3 zodpovědný také za jejich transport v placentární tkáni. Pomocí několika kontrolních OCT3 inhibitorů, PAR, D22 a KORT, jsme potvrdili zapojení tohoto transportéru v placentárním transportu fetálního DA a NA. Nicméně, ve srovnání se 5-HT, byl inhibiční potenciál všech zkoušených látek na transport DA a NA slabší.

I když se do dnešního dne neseťkáváme často s možností pasivního transportu DA a NA skrze biologické membrány a jejich transport je skoro vždy připisován aktivnímu transportu, objevilo se v odborné literatuře několik studií, které popisují zapojení pasivního transportu pro DA a NA (78, 79). Navíc v placentě je tento mechanismus skrze BM běžně diskutován díky její vyšší propustnosti ve srovnání s MVM (80). Proto jsme dalšími experimenty chtěli zjistit, zda může

pasivní transport hrát také roli v placentárním přenosu monoaminů. Proto jsme provedli experimenty ve 4 °C. K našemu překvapení jsme objevili zapojení buď nespecifické vazby a/nebo pasivního transportu pro oba monoaminy, s větším vlivem na transport DA skrze BM. Je ovšem nutné zdůraznit, že i nespecifická vazba radioaktivně značené látky na vezikuly se může zvyšovat s časem. Tento výsledek vysvětluje slabší efekt inhibitorů na transport DA a NA skrze BM, oproti třetímu monoaminu, 5-HT, který byl studován v jiné práci (25).

Dále jsme stanovili expresi SERT, NAT, DAT a OCT3 v potkaní placentě za účelem zjištění její vhodnosti ke studiu transportu monoaminů. Výsledky ukazují stejný trend v expresi *Nat*, *Sert*, *Dat* a *Oct3*. Potkaní placenta je tedy vhodná pro studium transportu monoaminů, alespoň z pohledu srovnatelnosti exprese monoaminových transportérů.

Zároveň jsme stanovili expresi DAT také na úrovni proteinu v lidské placentě. Nicméně tento transportér z funkčního hlediska nehraje žádnou roli v transportu DA a NA v terminální lidské placentě, což vidíme díky nesignifikantní inhibici DA transportu pomocí kontrolního DAT inhibitoru. Příčina jeho nízké exprese v lidské placentě může být tedy cílem dalšího výzkumu.

Závěrem lze říci, že placenta poskytuje funkční transportní systém pro DA a NA clearance z maternální a fetální cirkulace. Nicméně tento systém může být v těhotenství ovlivněn běžně používanými antidepresivy, paroxetinem a venlafaxinem, jejichž inhibicí SERT, NAT a OCT3 může docházet k dysregulaci monoaminové homeostázi ve fetoplacentární jednotce, která může vést k narušení vývoje plodu a jeho fetálního programování.

8 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme popsali transport DA a NA přes maternální a fetální stranu terminální lidské placenty. Výsledky ukazují, že DA a NA jsou transportovány pomocí neurálních transportérů, SERT a NAT, skrze MVM a pomocí extra-neurálního transportéru, OCT3, skrze BM. Společné zapojení SERT a NAT v transportu obou monoaminů odhaluje jejich promiskuitní chování také v placentární tkáni. Na druhou stranu výsledky vylučují funkční zapojení DAT v transportu monoaminů. Mimo aktivní transport naše experimenty navrhnou zapojení nespecifické vazby a/nebo pasivní difuze v transportu obou monoaminů skrze MVM a BM. Nakonec, podobná mezidruhová exprese transportérů nabízí možnost využití potkaní placenty k dalšímu studiu placentárního transportu monoaminů.

Výsledky této diplomové práce byly využity v publikaci Horackova H., Karahoda R., Vachalova V., Turkova H., Abad C., Staud F.: Functional characterization of dopamine and norepinephrine transport across the apical and basal plasma membranes of the human placental syncytiotrophoblast. *Sci Rep.* 2022 (74).

9 ZDROJE

1. **Staud F, Karahoda R.** Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Dec; 30266525., 105:35-40. doi: 10.1016/j.biocel.2018.09.016. Epub 2018 Sep 25. PMID:30266525. [Online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30266525/>.
2. **Petit A, Vaillancourt C, Bellabarba D, Lehoux JG, Gallo-Payet N, Bélisle S.** Presence of D2-dopamine receptors in human term placenta. *J Recept Res.* 1990;10(3-4):205-15. doi: 10.3109/10799899009064666. PMID: 2148190.
3. **JF., Padbury.** Functional maturation of the adrenal medulla and peripheral sympathetic nervous system. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989 Nov;3(3):689-705. doi: 10.1016/s0950-351x(89)80049-7. PMID: 2698151.
4. **Barker DJ, Clark PM.** Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod.* 1997 May;2(2):105-12. doi: 10.1530/ror.0.0020105. PMID: 9414472.
5. **Brown AS, Vinogradov S, Kremen WS, Poole JH, Deicken RF, Penner JD, McKeague IW, Kochetkova A, Kern D, Schaefer CA.** Prenatal exposure to maternal infection and executive dysfunction in adult schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2009 Jun;166(6):683-90. doi:10.1176/appi.ajp.2008.08010089. Epub 2009 Apr 15. PMID: 19369317; PMCID: PMC2885160.
6. **CS., Rosenfeld.** The placenta-brain-axis. *J Neurosci Res.* 2021 Jan;99(1):271-283. doi: 10.1002/jnr.24603. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32108381; PMCID: PMC7483131.
7. **Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL.** Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol Reprod.* 2014 Jun;90(6):130. doi: 10.1095/biolreprod.113.117259. Epub 2014 May 14. PMID: 24829026.
8. **Debnath M, Venkatasubramanian G, Berk M.** Fetal programming of schizophrenia: select mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Feb;49:90-104. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.12.003. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25496904; PMCID: PMC7112550.

9. **Barker DJ, Osmond C.** *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet.* 1986 May 10;1(8489):1077-81. doi: 10.1016/s0140-6736(86)91340-1. PMID: 2871345.
10. **McCarthy D, Lueras P, Bhide PG.** *Elevated dopamine levels during gestation produce region-specific decreases in neurogenesis and subtle deficits in neuronal numbers. Brain Res.* 2007 Nov 28;1182:11-25. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.088. Epub 2007 Sep 21. PMID: 17950709; PMCID: PMC2141544.
11. **MA., Costa.** *The endocrine function of human placenta: an overview. Reprod Biomed Online.* 2016 Jan;32(1):14-43. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.10.005. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26615903.
12. **Staud F, Cerveny L, Ceckova M.** *Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. J Drug Target.* 2012 Nov;20(9):736-63. doi: 10.3109/1061186X.2012.716847. Epub 2012 Sep 20. PMID:22994411.
13. **Soares MJ, Varberg KM, Iqbal K.** *Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. Biol Reprod.* 2018 Jul 1;99(1):196-211. doi: 10.1093/biolre/ioy049. PMID: 29481584; PMCID: PMC6044390.
14. **Griffiths, S. K., & Campbell, J. P. (2015).** *Placental structure, function and drug transfer. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 15(2), 84–89.* doi:10.1093/bjaceaccp/mku013 .
15. **Arora N, Sadovsky Y, Dermody TS, Coyne CB.** *Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. Cell Host Microbe.* 2017 May 10;21(5):561-567. doi: 10.1016/j.chom.2017.04.007. PMID: 28494237; PMCID: PMC6148370.
16. **Herrick EJ, Bordoni B.** *Embryology, Placenta. 2021 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 31869098.*
17. **Mohammed AM, Huuskonen P, Juvonen R, Sahlman H, Repo J, Myöhänen K, Myllynen P, Woo CJ, Karttunen V, Vähäkangas K.** *Activities of metabolizing enzymes in human placenta. Toxicol Lett.* 2020 Jun 15;326:70-77. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.02.014. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32113805.

18. **Saboory E, Ghasemi M, Mehranfard N.** *Norepinephrine, neurodevelopment and behavior.* *Neurochem Int.* 2020 May;135:104706. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104706. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32092327.
19. **RD., Todd.** *Neural development is regulated by classical neurotransmitters: dopamine D2 receptor stimulation enhances neurite outgrowth.* *Biol Psychiatry.* 1992 Apr 15;31(8):794-807. doi: 10.1016/0006-3223(92)90311-m. PMID: 1643194.
20. **Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH.** *New evidence for neurotransmitter influences on brain development.* *Trends Neurosci.* 1997 Jun;20(6):269-74. doi: 10.1016/s0166-2236(96)01028-4. PMID: 9185309.
21. **FH, Previc.** *Prenatal influences on brain dopamine and their relevance to the rising incidence of autism.* *Med Hypotheses.* 2007;68(1):46-60. doi: 10.1016/j.mehy.2006.06.041. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16959433.
22. **Robinson PD, Schutz CK, Macciardi F, White BN, Holden JJ.** *Genetically determined low maternal serum dopamine beta-hydroxylase levels and the etiology of autism spectrum disorders.* *Am J Med Genet.* 2001 Apr 15;100(1):30-6. doi:doi: 10.1002/ajmg.1187. PMID: 11337745.
23. **Prasad PD, Hoffmans BJ, Moe AJ, Smith CH, Leibach FH, Ganapathy V.** *Functional expression of the plasma membrane serotonin transporter but not the vesicular monoamine transporter in human placental trophoblasts and choriocarcinoma cells.* *Placenta.* 1996 May;17(4):201-7. doi: 10.1016/s0143-4004(96)90039-9. PMID: 8761963.
24. **Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslén B, Marsál K, Hansson SR.** *Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) i in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. . in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies.* *Placenta.* 2004 Jul;25(6):518-29. doi: 10.1016/j.placenta.2003.10.017. PMID: 15135235. : autor neznámý.
25. **Karahoda R, Horackova H, Kastner P, Matthios A, Cerveny L, Kucera R, Kacerovsky M, Duintjer Tebbens J, Bonnin A, Abad C, Staud F.** *Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin*

by human and rat term placenta. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020 Aug;229(4):e13478. doi: 10.1111/apha.13478. Epub 2020 May 18. PMID: 32311818; PMCID: PMC8345021. : autor neznámý.

26. **Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V.** *Active transport of dopamine in human placental brush-border membrane vesicles. Am J Physiol.* 1992 May;262(5 Pt 1):C1189-96. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.5.C1189. PMID: 1590360.

27. **Shearman LP, Meyer JS.** *Norepinephrine transporters in rat placenta labeled with [3H]nisoxetine. J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Feb;284(2):736-43. PMID: 9454822.

28. **Castrén O, Saarikoski S.** *The simultaneous function of catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase in human placenta. Acta Obstet Gynecol Scand.* 1974;53(1):41-7. doi: 10.3109/00016347409156887. PMID: 4817627.

29. **M., Phillippe.** *Fetal catecholamines. Am J Obstet Gynecol.* 1983 Aug 1;146(7):840-55. doi: 10.1016/0002-9378(83)91088-8. PMID: 6346884.

30. **C., Verney.** *Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. Microsc Res Tech.* 1999 Jul 1;46(1):24-47. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990701)46:1<24::AID-JEMT3>3.0.CO;2-E. PMID: 10402270.

31. **Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Tseng YT, Hay WW Jr, Padbury JF.** *Placental norepinephrine clearance: in vivo measurement and physiological role. Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 1):E145-9. doi: 10.1152/ajpendo.1995.269.1.E145. PMID: 7631769.

32. **Levine ES, Litto WJ, Jacobs BL.** *Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. Brain Res.* 1990 Oct 29;531(1-2):189-95. doi: 10.1016/0006-8993(90)90773-5. PMID: 2289120.

33. **Sodha RJ, Proegler M, Schneider H.** *Transfer and metabolism of norepinephrine studied from maternal-to-fetal and fetal-to-maternal sides in the in vitro perfused human placental lobe. Am J Obstet Gynecol.* 1984 Feb 15;148(4):474-81. doi: 10.1016/0002-9378(84)90729-4. PMID: 6696006.

34. **Money KM, Stanwood GD.** *Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. Front Cell Neurosci.* 2013 Dec 19;7:260. doi: 10.3389/fncel.2013.00260. PMID: 24391541; PMCID: PMC3867667.

35. **Vaillancourt C, Petit A, Bélisle S.** *Expression of human placental D2-dopamine receptor during normal and abnormal pregnancies. Placenta.* 1998 Jan;19(1):73-80. doi: 10.1016/s0143-4004(98)90101-1. PMID: 9481788.
36. **Handwerger S, Freemark M. R.** *Role of placental lactogen and prolactin in human pregnancy. Adv Exp Med Biol.* 1987;219:399-420. doi: 10.1007/978-1-4684-5395-9_19. PMID: 3324681.
37. **Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd.** *Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. Reprod Biomed Online.* 2009;18 Suppl 2:19-24. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60444-0. PMID: 19406027.
38. **Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E.** *A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. Neuron.* 2010 Mar 11;65(5):585-96. doi: 10.1016/j.neuron.2010.02.014. PMID: 20223196; PMCID: PMC4929859.
39. **Tetro N, Moushaev S, Rubinchik-Stern M, Eyal S.** *The Placental Barrier: the Gate and the Fate in Drug Distribution. Pharm Res.* 2018 Feb 23;35(4):71. doi: 10.1007/s11095-017-2286-0. PMID: 29476301.
40. **Evseenko, D., Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2006).** *Active transport across the human placenta: impact on drug efficacy and toxicity. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2(1), 51–69.* doi:10.1517/17425255.2.1.51 .
41. **Elad D, Levkovitz R, Jaffa AJ, Desoye G, Hod M.** *Have we neglected the role of fetal endothelium in transplacental transport? Traffic.* 2014 Jan;15(1):122-6. doi: 10.1111/tra.12130. Epub 2013 Nov 8. PMID: 24127903.
42. **Walker N, Filis P, Soffientini U, Bellingham M, O'Shaughnessy PJ, Fowler PA.** *Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences†. Biol Reprod.* 2017 Apr 1;96(4):733-742. doi: 10.1093/biolre/iox012. PMID: 28339967; PMCID: PMC5441296.
43. **Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM.** *SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. Nat Rev Drug Discov.* 2015 Aug;14(8):543-60. doi: 10.1038/nrd4626. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26111766; PMCID: PMC4698371.

44. **Pizzagalli MD, Bensimon A, Superti-Furga G.** *A guide to plasma membrane solute carrier proteins.* *FEBS J.* 2021 May;288(9):2784-2835. doi: 10.1111/febs.15531. Epub 2020 Sep 18. PMID: 32810346; PMCID: PMC8246967.
45. **Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2003).** *Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function.* *Nature Reviews Neuroscience,* 4(1), 13–25. doi:10.1038/nrn1008 .
46. **Miloš Langmeier, kol.** *Celulární transportní systémy v Základy lékařské fyziologie* Grada Publishing a.s., 1. 1. 2009 :23-24.
47. **Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V.** *Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast.* *Biochemistry.* 1993 Feb 9;32(5):1346-53. doi: 10.1021/bi00056a021. PMID: 8448143.
48. **Gu HH, Wall S, Rudnick G. I.** *Ion coupling stoichiometry for the norepinephrine transporter in membrane vesicles from stably transfected cells.* *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6911-6. doi: 10.1074/jbc.271.12.6911. PMID: 8636118.
49. **Bhat S, Niello M, Schicker K, Pifl C, Sitte HH, Freissmuth M, Sandtner W.** *Handling of intracellular K⁺ determines voltage dependence of plasmalemmal monoamine transporter function.* *Elife.* 2021 Jun 1;10:e67996. doi: 10.7554/eLife.67996. PMID: 34061030; PMCID: PMC8192120.
50. **LC., Daws.** *Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy.* *Pharmacol Ther.* 2009 Jan;121(1):89-99. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.10.004. Epub 2008 Oct 29. PMID: 19022290; PMCID: PMC273998.
51. **Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G.** *Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals.* *J Neurochem.* 1990 Sep;55(3):1067-70. . doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04599.x. PMID: 2117046..
52. **Carboni E, Silvagni A.** *Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule?* *Crit Rev Neurobiol.* 2004;16(1-2):121-8. doi: 10.1615/critrevneurobiol.v16.i12.130. PMID: 15581407.

53. **Mackie P, Lebowitz J, Saadatpour L, Nickoloff E, Gaskill P, Khoshbouei H.** *The dopamine transporter: An unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson's Disease. Brain Behav Immun.* 2018 May;70:21-35. doi: 10.1016/j.bbi.2018.03.020. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29551693; PMCID: PMC5953824.
54. **Rudnick G, Sandtner W.** *Serotonin transport in the 21st century. J Gen Physiol.* 2019 Nov 4;151(11):1248-1264. doi: 10.1085/jgp.201812066. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31570504; PMCID: PMC6829555.
55. **Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP.** *Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. J Neurosci.* 2004 Sep 8;24(36):7888-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1506-04.2004. PMID: 15356201; PMCID: PMC6729924..
56. **Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto T, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, Uhl GR, Sora I.** *Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine/or serotonin transporters. Neuropsychopharmacology.* 2004 Oct;29(10):1790-9. doi: 10.1038/sj.npp.1300476. PMID: 15226739.
57. **H., Koepsell.** *Organic Cation Transporters in Health and Disease. Pharmacol Rev.* 2020 Jan;72(1):253-319. doi: 10.1124/pr.118.015578. PMID: 31852803.
58. **PJ., Gasser.** *Roles for the uptake2 transporter OCT3 in regulation of dopaminergic neurotransmission and behavior. Neurochem Int.* 2019 Feb;123:46-49. doi: 10.1016/j.neuint.2018.07.008. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30055194; PMCID: PMC6338509.
59. **Ganapathy V, Prasad PD.** *Role of transporters in placental transfer of drugs. Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep 1;207(2 Suppl):381-7. doi: 10.1016/j.taap.2005.02.023. PMID: 15979662.
60. **Ahmadimoghaddam D, Zemankova L, Nachtigal P, Dolezelova E, Neumanova Z, Cerveny L, Ceckova M, Kacerovský M, Micuda S, Staud F.** *Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. Biol Reprod.* 2013 Mar 7;88(3):55. doi: 10.1095/biolreprod.112.105064. PMID: 23303678..

61. **Karahoda R, Abad C, Horackova H, Kastner P, Zaugg J, Cerveny L, Kucera R, Albrecht C, Staud F.** *Dynamics of Tryptophan Metabolic Pathways in Human Placenta and Placental-Derived Cells: Effect of Gestation Age and Trophoblast Differentiation.* *Front Cell Dev Biol.* 2020 Sep 18;8:574034. doi: 10.3389/fcell.2020.574034. PMID: 33072756; PMCID: PMC7530341.
62. **Howell LL, Negus SS.** *Monoamine transporter inhibitors and substrates as treatments for stimulant abuse.* *Adv Pharmacol.* 2014;69:129-76. doi: 10.1016/B978-0-12-420118-7.00004-4. PMID: 24484977; PMCID: PMC4406244.
63. **Patel K, Allen S, Haque MN, Angelescu I, Baumeister D, Tracy DK.** *Bupropion: a systematic review and meta-analysis of effectiveness as an antidepressant.* *Ther Adv Psychopharmacol.* 2016 Apr;6(2):99-144. doi: 10.1177/2045125316629071. Epub 2016 Feb 18. PMID: 27141292; PMCID: PMC4837968.
64. **Sansone RA, Sansone LA.** *Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors: a pharmacological comparison.* *Innov Clin Neurosci.* 2014 Mar;11(3-4):37-42. PMID: 24800132; PMCID: PMC4008300.
65. **Chu A, Wadhwa R.** *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors.* [Updated 2022 Jan 11]. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-*
66. **Bzoskie L, Yen J, Tseng YT, Blount L, Kashiwai K, Padbury JF.** *Human placental norepinephrine transporter mRNA: expression and correlation with fetal condition at birth.* *Placenta.* 1997 Mar-Apr;18(2-3):205-10. doi: 10.1016/s0143-4004(97)90094-1. PMID: 90897.
67. **Horton RE, Apple DM, Owens WA, Baganz NL, Cano S, Mitchell NC, Vitela M, Gould GG, Koek W, Daws LC.** *Decynium-22 enhances SSRI-induced antidepressant-like effects in mice: uncovering novel targets to treat depression.* *J Neurosci.* 2013 Jun 19;33(25):10534-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5687-11.2013. PMID: 23785165; PMCID: PMC3685842.
68. **Zhu HJ, Appel DI, Gründemann D, Richelson E, Markowitz JS.** *Evaluation of organic cation transporter 3 (SLC22A3) inhibition as a potential mechanism of antidepressant action.* *Pharmacol Res.* 2012 Apr;65(4):491-6. doi: 10.1016/j.phrs.2012.01.008. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22342816.

69. **Bourin M, Chue P, Guillon Y.** *Paroxetine: a review. CNS Drug Rev.* 2001 Spring;7(1):25-47. doi: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00189.x. PMID: 11420571; PMCID: PMC6741642.
70. **Gould GG, Altamirano AV, Javors MA, Frazer A.** *A comparison of the chronic treatment effects of venlafaxine and other antidepressants on serotonin and norepinephrine transporters. Biol Psychiatry.* 2006 Mar 1;59(5):408-14. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.07.011. Epub 2005 Sep 2. PMID: 16140280.
71. **Suwala J, Machowska M, Wiela-Hojeńska A.** *Venlafaxine pharmacogenetics: a comprehensive review. Pharmacogenomics.* 2019 Jul;20(11):829-845. doi: 10.2217/pgs-2019-0031. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31368838.
72. **J., Zhou.** *Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. Drugs Future.* 2004 Dec;29(12):1235-1244. doi: 10.1358/dof.2004.029.12.855246. PMID: 16871320; PMCID: PMC1518795.
73. **Horackova H, Karahoda R, Cerveny L, Vachalova V, Ebner R, Abad C, Staud F.** *Effect of Selected Antidepressants on Placental Homeostasis of Serotonin: Maternal and Fetal Perspectives. Pharmaceutics.* 2021 Aug 20;13(8):1306. doi: 10.3390/pharmaceutics13081306. PMID: 34452265; PMCID: PMC8397948.
74. **Horackova H, Karahoda R, Vachalova V, Turkova H, Abad C, Staud F.** *Functional characterization of dopamine and norepinephrine transport across the apical and basal plasma membranes of the human placental syncytiotrophoblast. . Sci Rep.* 2022 Jul 8;12(1):11603. doi: 10.1038/s41598-022-15790-7. PMID: 35804076; PMCID: PMC9270497. : autor neznámý.
75. **Vadivel Ganapathy, Sammanda Ramamoorthy, Frederick H. Leibach.** *Transport and metabolism of monoamines in the human placenta: A review, Placenta, Volume 14, Supplement 1, 1993, Pages 35-51, ISSN 0143-4004, [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80281-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80281-4).*
76. **Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT.** *Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. J Neurosci.* 2002 Jan 15;22(2):389-95. doi:

10.1523/JNEUROSCI.22-02-00389.2002. PMID: 11784783; PMCID: PMC6758674. : autor neznámý.

77. Larsen MB, Sonders MS, Mortensen OV, Larson GA, Zahniser NR, Amara SG.

Dopamine transport by the serotonin transporter: a mechanistically distinct mode of substrate translocation. J Neurosci. 2011 Apr 27;31(17):6605-15. doi:

10.1523/JNEUROSCI.0576-11.2011 PMID: 21525301; PMCID: PMC3107525.

78. Ingebretsen OC, Flatmark T. *Active and passive transport of dopamine in chromaffin granule ghosts isolated from bovine adrenal medulla. J Biol Chem. 1979 May*

25;254(10):3833-9. PMID: 438162.

79. Scholze P, Sitte HH, Singer EA. *Substantial loss of substrate by diffusion during uptake in HEK-293 cells expressing neurotransmitter transporters. Neurosci Lett. 2001 Aug*

31;309(3):173-6. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02058-4. PMID: 11514069.

80. Jansson T, Illsley NP. *Osmotic water permeabilities of human placental microvillous and basal membranes. J Membr Biol. 1993 Mar;132(2):147-55. doi: 10.1007/BF00239004.*

PMID: 8496946.

81. Miura Y, Yoshikawa T, Naganuma F, Nakamura T, Iida T, Kárpáti A, Matsuzawa T, Mogi A, Harada R, Yanai K. *Characterization of murine polyspecific monoamine transporters. FEBS Open Bio. 2017 Jan 9;7(2):237-248. doi: 10.1002/2211-5463.12183.*

PMID: 281746.

82. Leung YM, Chu CC, Kuo CS, Chen YW, Wang JJ. *Nisoxetine blocks sodium currents and elicits spinal anesthesia in rats. Pharmacol Rep. 2013;65(2):350-7. doi: 10.1016/s1734-1140(13)71010-7. PMID: 23744419.*

83. Rothman RB, Lewis B, Dersch C, Xu H, Radesca L, de Costa BR, Rice KC, Kilburn RB, Akunne HC, Pert A. *Identification of a GBR12935 homolog, LR1111, which is over*

4,000-fold selective for the dopamine transporter, relative to serotonin and norepinephrine transporters. Synapse. 1993 May;14(1):34-9. doi: 10.1002/syn.890140106. PMID: 8511716.

84. Jiao X, Paré WP, Tejani-Butt SM. A. *Antidepressant drug induced alterations in binding to central dopamine transporter sites in the Wistar Kyoto rat strain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006 Jan;30(1):30-41. doi:*

10.1016/j.pnpbp.2005.06.017. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16091300.

85. **Handwerger S, Freemark M.** *Role of placental lactogen and prolactin in human pregnancy. Adv Exp Med Biol. 1987;219:399-420. doi: 10.1007/978-1-4684-5395-9_19. PMID: 3324681.*