

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**EXPRESIA VYBRANÝCH MEMBRÁNOVÝCH TRANSPORTÉROV
V PLACENTÁCH TEHOTNÝCH ŽIEN S DIAGNOSTIKOVANOU
PREDČASNOU RUPTÚROU PLODOVÝCH OBALOV**

Diplomová práca

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

Hradec Králové 2019

Martina Michalská

Prehlásenie:

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní diplomovej práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry, a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2019

Martina Michalská

Pod'akovanie:

Na tomto mieste by som rada poďakovala svojej školiteľke doc. PharmDr. Martine Čečkovej, Ph.D., za vedenie práce, za cenné rady, a ústretový prístup počas celého spracovávaní mojej diplomovej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Davidovi Floriánovi za trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval. Bez jeho podpory a povzbudivých slov by táto diplomová práca nikdy nevznikla. Nakoniec by som chcela poďakovať celej svojej rodine, pretože bez nich by som nebola tam, kde som.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Martina Michalská

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

Názov diplomovej práce: Expresia vybraných membránových transportérov v placentách tehotných žien s diagnostikovanou predčasnou ruptúrou plodových obalov

Placenta je orgán, ktorý má kľúčovú úlohu počas tehotenstva. Jednou z jej hlavných funkcií je transport látok medzi matkou a plodom. Tento prestup je z veľkej časti uskutočňovaný pomocou membránových transportérov, nachádzajúcich sa na apikálnej alebo bazálnej strane trofoblastu. Ich množstvo je ovplyvňované celou radou fyziologických i patologickými faktorov, mimo iného ich pravdepodobne ovplyvňuje aj infekcia a zápalová reakcia. Zápal je tiež jedným z rizikových faktorov predčasných pôrodov, a preto sa dá domnievať, že počas nich dôjde ku zmene expresie placentárnych prenášačov.

Táto štúdia bola uskutočňovaná na 51 placentách, získaných vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové od žien, u ktorých došlo k predčasnému pôrodu, a na 15 placentách žien s pôrodom v termíne. Na experiment bola použitá kvantitatívna RT-PCR metóda. Sledovala sa mRNA expresia membránových prenášačov ABCB1, ABCG2, OATP1A2, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, pričom sa tieto výsledky porovnávali s expresiou vybraných prenášačov u nepatologických placent.

Vyhodnotením sa zistilo, že ku zmene expresie dochádza u placent zo skupiny predčasných ruptúr plodových obalov, a to konkrétne u transportérov OATP2A1 a OATP2B1. Tieto transportéry boli exprimované vo väčšom množstve ako u termínových placent. Naopak zníženie bolo pozorované u expresie OATP1B3, v skupine predčasných ruptúr plodových obalov, tak spontánnych predčasných pôrodov, oproti termínovaným placentám. Zmena v expresii ďalších vybraných membránových prenášačov skupiny OATP a ABC medzi jednotlivými skupinami placent, nebola štatisticky významná. V rámci hodnotenej skupiny vzoriek placent z predčasných ruptúr plodových obalov, nebol pozorovaný rozdiel v závislosti na tom, či se jednalo o placenty po diagnostikovanej histologickej chorioamnitíde s prítomnosťou bakteriálnej infekcie, či bez nej. Pre získanie validných záverov bude nevyhnutné túto kohortu hodnotených vzoriek rozšíriť, a zohľadniť tiež ďalšie faktory prispievajúce k interindividuálnej variabilite expresie.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Martina Michalská

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

Title of diploma thesis: Expression of selected membrane transporters in placentas of pregnant women diagnosed for preterm rupture of membranes

Placenta is a key organ for pregnancy maintenance. One of its main functions is transport of compounds between mother and her fetus. The transplacental penetration is ensured due to membrane transporters that are present in the apical or basal side of trophoblast. Their expression level is affected by many physiological and pathological factors, among others it can be influenced by infection and inflammatory reaction. Inflammation is also one of the risk factors of preterm deliveries and it can be therefore assumed that these pathological states are accompanied by changes in expression of placental transporters.

This study was performed using 51 placentas obtained from Faculty hospital in Hradec Králové from women who underwent preterm delivery and on 15 placentas delivered in term. The study employed quantitative RT-PCR approach. The mRNA expression of membrane transporters ABCB1, ABCG2, OATP1A2, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1 was assessed and the results were compared to the expression of the transporters in non-pathological placentas delivered in term.

Evaluation of the data revealed affected expression of OATP2A1 and OATP2B1 in the group of premature ruptures of membranes. The level of transcripts for these transporters was significantly higher than in the term placentas. Contrary, decreased expression of OATP1B3 was observed in the case of preterm deliveries when compared to term placentas. No statistical significance among the placental groups was observed for the other evaluated OATP and ABC transporters. Within the group of premature rupture of membranes, no difference was observed among the placentas from women with/without diagnosed histological chorioamnitis and with/without detected bacterial infection. In order to drive a valid conclusions, it would be necessary to enlarge the cohort of analysed samples and take into consideration also other factors, which might contribute to interindividual variability in the gene expression.

1	ZOZNAM SKRATIEK	8
2	ÚVOD	10
3	TEORETICKÁ ČASŤ	12
3.1	PLACENTA	12
3.1.1	Stavba placenty	12
3.1.2	Funkcia placenty	14
3.1.3	Placentárny transport	14
3.1.4	Membránové transportéry v placente	16
3.1.4.1	ABC transportéry	17
3.1.4.2	SLC transportéry	18
3.1.4.3	Prehľad vybraných membránových transportérov	23
3.1.4.4	Regulácia expresie membránových transportérov v placente	25
3.2	PREDČASNÝ PÔROD	29
3.2.1	Klasifikácia predčasného pôrodu	29
3.2.2	Rizikové faktory	30
3.2.3	Patofyziológia predčasného pôrodu	31
3.2.4	Klinický obraz predčasného pôrodu	34
3.2.5	Dôsledky predčasného pôrodu	36
4	CIEĽ PRÁCE	37
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	38
5.1	MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	38
5.2	METODIKA	39
5.3	ŠTATISTICKÁ ANALÝZA	45
6	VÝSLEDKY	46
6.1	STANOVENIE VHODNÉHO REFERENČNÉHO GÉNU	46
6.1.1	Stanovenie vhodného referenčného génu metódou BestKeeper	46
6.1.2	Stanovenie vhodného referenčného génu metódou geNorm	47
6.1.3	Stanovenie vhodného referenčného génu metódou NormFinder	48

6.1.4	Stanovenie vhodného referenčného génu metódou Delta Ct (ΔCt)	49
6.1.5	Komplexné hodnotenie vhodného referenčného génu	50
6.2	VÝSLEDKY EXPRESIE JEDNOTLIVÝCH TRANSPORTÉROV	51
6.2.1	Výsledky expresie ABC transportérov	51
6.2.2	Výsledky expresie OATP transportérov	52
6.3	VÝSLEDKY EXPRESIE JEDNOTLIVÝCH TRANSPORTÉROV V RÁMCI PODSKUPINY PPROM	54
6.3.1	Výsledky expresie ABC transportérov	54
6.3.2	Výsledky expresie OATP transportérov	54
7	DISKUSIA	56
8	ZÁVER	59
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	60

1 ZOZNAM SKRATIEK

API	„aqua pro injectione“ – voda pre prípravu injekcií
ATP	adenosíntrifosfát
ABCB1	„ATP-binding cassette sub-family B member 1“, P-glykoprotein
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2, Breast cancer resistance protein (BCRP)
ABCC1	ATP-binding cassette sub-family C member 1
CD	cluster of differentiation
CNT	„concentrative nucleoside transporter“ – koncentračné nukleozidové transportéry
Ct	„cycle of treshold“ – cyklus prahu
DNA	„deoxyribonucleic acid“ - deoxyribonukleová kyselina
ENT	„equilibrative nucleoside transporter“ – ekvilibračné nukleozidové transportéry
HCA	„histologic chorioamnionitis“ – histologická chorioamnionitída
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“ – vírus ľudskej imunodeficiencie
IL	interleukín
MATE	multi-antimicrobial extrusion protein
MDR	multidrug resistance protein
MIAC	„microbial invasion of the amniotic cavity“ – mikrobiálna invázia amniotickej dutiny
MRP	multidrug resistance-associated protein
OAT	„organic anion transporter“ - transportéry organických aniónov
OATP	„organic anion transporting polypeptide“ - polypeptidy transportujúce organické anióny
OCT	„organic cation transporter“ - transportéry organických katiónov
OCTN	„organic carnitine transporter“ - transportéry karnitínu

PPROM	„preterm/prelabour premature rupture of membranes“ – predčasná ruptúra plodových obalov
PTL	„spontaneous preterm labour“ – spontánny predčasný pôrod
qRT-PCR	„quantitative real time polymerase chain reaction“ – kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
RNA	„ribonucleic acid“ – ribonukleová kyselina
RT	„reverse transcription“ – reverzná transkripcia
SLC	solute carrier transporters
SLCO	solute carrier organic anion transporter
T3	trijodtyronín
T4	tyroxín
WHO	„World Health Organisation“ – Svetová zdravotnícka organizácia
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

2 ÚVOD

Tehotenstvo je obdobie, počas ktorého sa v tele ženy vyvíja embryo a následne plod. Pre optimálny priebeh tehotenstva je dôležitá správna funkcia placenty. Placenta je dočasný orgán, ktorý spája vyvíjajúci sa plod s matkou, pričom umožňuje obom ponechať si samostatné cirkulácie.

Medzi základné funkcie placenty patrí výmena krvných plynov (kyslíka a oxidu uhličitého), prenos dôležitých živín od matky k plodu, exkrécia produktov metabolizmu vznikajúcich v plode, tvorba hormónov, či imunologická bariéra (*Staud and Ceckova, 2015*). Všetky tieto činnosti sú podmienené jej transportnou funkciou.

Prenos látok medzi organizmom matky a plodu, sa uskutočňuje niekoľkými spôsobmi. Látky dostatočne lipofilné, malé a nedisociované, prechádzajú cez placentárnu bariéru ľahko, pričom sa využíva transport pasívny. Pre prestup ostatných látok je za potreby využiť transportné proteíny, lokalizované buď na apikálnej, alebo bazálnej membráne trofoblastu (*Čech et al., 2006; Staud et al., 2012*). Z toho vyplýva, že schopnosť placenty plniť si svoju transportnú funkciu závisí aj na množstve rôznych transportérov, prenášajúcich endogénne (napr. živiny) a exogénne (napr. toxíny, liečivá) substráty.

ATP-dependentné (ABC) transportéry slúžia predovšetkým ako aktívna zložka placentárnej bariéry, chrániaca svojou efluxnou aktivitou plod pred potenciálne toxickými xenobiotikami, ale tiež ako modulátory steroidogénzie a imunologickej odpovede (*Ceckova-Novotna et al., 2006; Hahnova-Cygalova et al., 2011*). Sekundárne aktívne SLC transportné proteíny sú obecné považované za transportéry zaisťujúce predovšetkým prenos nutrientov a esenciálnych molekúl, nevyhnutných pre správnu funkciu placenty, rast a vývoj plodu (*Staud et al., 2012*).

Expresia membránových prenášačov je významne regulovaná, a mení sa činnosťou niektorých fyziologických či patologických faktorov (*Staud and Ceckova, 2015*). Zápal a infekcia patria medzi faktory, ktoré sú schopné ovplyvniť expresiu transportných proteínov, a to aj v placente (*Bloise et al., 2015*).

Endotoxínom indukovaný zápal viedol ku zmene expresie, a aj funkcie ABC transportérov u potkanov (*Wang et al., 2005; Petrovic et al., 2008*), stimulácia bakteriálnymi a vírovými antigénmi potom v závislosti na gestačnom veku ovplyvnila expresiu ABC transportérov v *ex vivo* explantoch ľudských placent (*Lye et al., 2015*).

Celosvetovo se cca 15 mil detí narodí predčasne, čo vedie ku zvýšenej morbidite aj mortalite detí do 5 rokov veku (*WHO, 2018*). Početnosť predčasných pôrodov kolíše medzi 5-18 % v závislosti na vyspelosti krajiny, a dostupnosti zdravotnej starostlivosti. Zápal je rizikovým faktorom predčasných pôrodov, doprevádzajúci aj ďalšie patofyziologické stavy v tehotenstve. Na jeho podklade môže dôjsť napríklad ku ruptúre plodových obalov a predčasnému odtoku plodovej vody (PPROM). Tento dej je pomerne komplexný, a môže potenciálne ovplyvňovať aj transportnú funkciu placenty, no prípadná zmena expresie a funkcie placentárnych transportérov, môže byť aj doprevádzajúcim javom, či následkom.

Uvedená problematika nebola doposiaľ detailnejšie skúmaná, preto sme sa na ňu zamerali v tejto práci, a študovali expresiu vybraných ABC a SLC membránových transportérov v placentách tehotných žien s diagnostikovanou predčasnou ruptúrou plodových obalov.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 PLACENTA

Pôvod slova placenta pochádza z rovnomenného latinského slova označujúceho koláč, z gréckeho *plakóenta/plakouínta*, v preklade ploché, a z nemeckého slova *mutterkuchen*, matkin koláč. Všetky pomenovania sa týkajú kruhového, plochého vzhl'adu ľudskej placenty (*Wang and Zhao, 2010*).

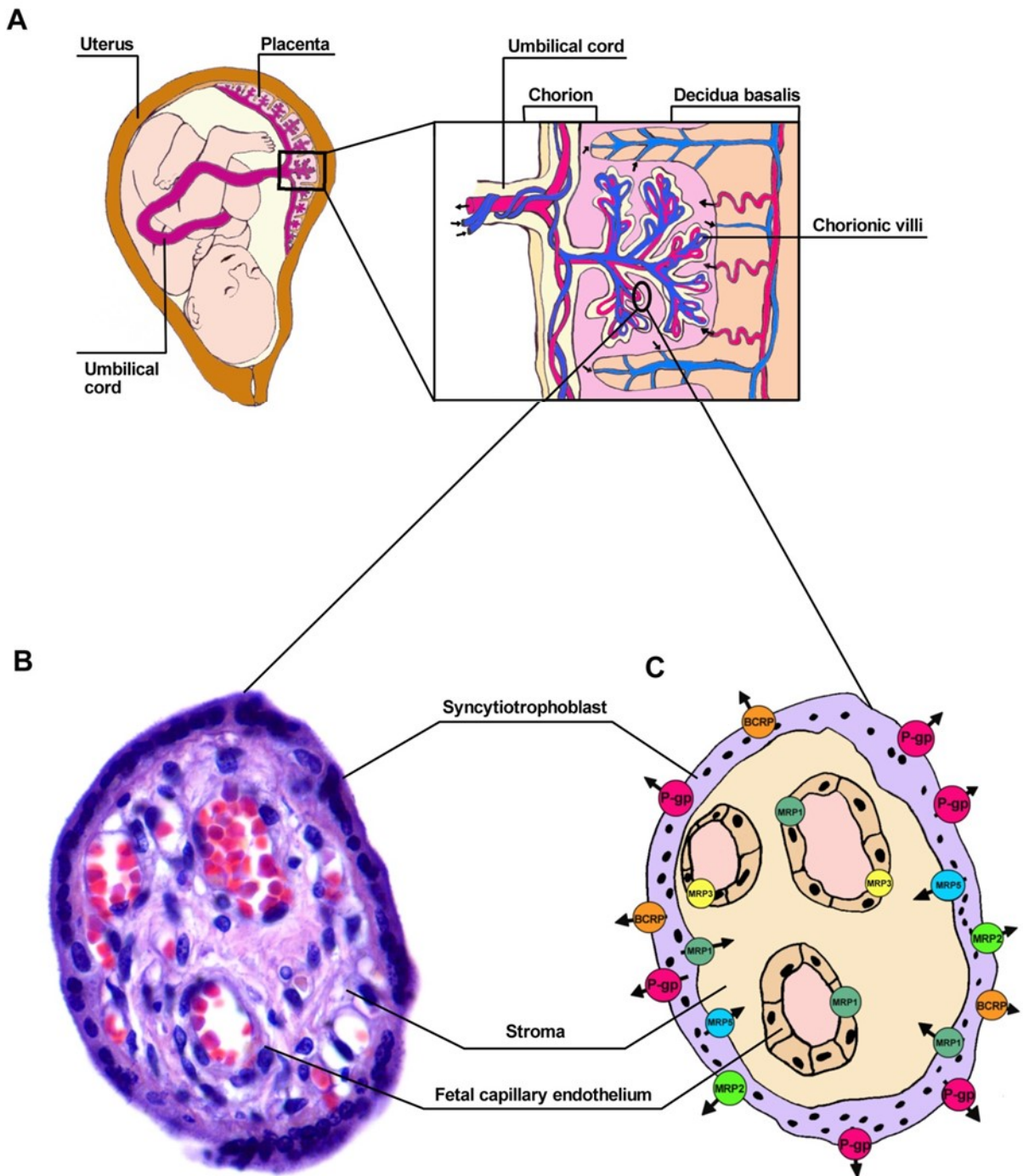
Placenta je vysoko špecializovaný orgán tehotenstva, ktorý zabezpečuje normálny priebeh rastu a vývoja plodu. Rast a funkcia placenty sú presne regulované a koordinované. Jej cieľom je zabezpečiť výmenu živín a odpadových produktov medzi materským a plodovým obehovým systémom. (*Gude et al., 2004*). Rast placenty končí najčastejšie v priebehu 36. - 38. týždňa tehotenstva. Na konci tehotenstva má kruhovitý tvar, priemer približne 20 cm, hrúbku 3 cm a váhu 500 g (*Čech et al., 2006*).

3.1.1 Stavba placenty

Placenta sa skladá z dvoch plôch, fetálnej a materskej. Fetálna plocha je obrátená smerom k plodu (*pars fetalis placentae*), a je tvorená choriovou platničkou (*chorion frondosum*). Materská, je obrátená k deložnej stene (*pars materna placentae*), kde sa rozprestiera decíduálna platnička (*decidua basalis*). Medzi nimi sa nachádza intervilózný priestor vyplnený materskou krvou.

Plodová plocha placenty má hladkú štruktúru a pokrýva ju lesklá blana – amnion, tá vytvára tekutinou naplnený vak, v ktorom je uložený plod. Pod ňou sa nachádzajú pupočníkové cievy, rozbiehajúce sa po choriovej platničke do okrajových častí placenty. Cievy, prenikajúce choriovou platničkou, sa rozvetvujú do kotyledónov, oddelených od seba decíduálnymi septami. Jednotlivé kotyledóny sú zakončené v tzv. klkoch (Obr. 1A). Ich povrch je tvorený syncytiotrofoblastom (Obr. 1B), pod ktorým sa nachádza vrstva cytotrofoblastu. Tieto klky sú obmývané materskou krvou, ktorá je privádzaná do intervilózneho priestoru pomocou spirálnych artérií, a odvádzaná odvodnými materskými vénami.

Materská plocha placenty je naopak nerovná, hubovitej štruktúry (*Čech et al., 2006; Kittnar et al., 2011; Wang and Zhao, 2010*).



Obr. 1: Detailne znázornená stavba placenty. *A* – prierez delohy v období tehotenstva, znázorňujúci plod spojený s placentou pomocou pupočnej šnúry, a detailná schéma zobrazujúca štruktúru kotyledónu, *B* – hematoxylin-eozínom farbené parafínové rezy terminálnych klkov v treťom trimestri, *C* – schematický popis terminálnych klkov s lokalizáciou membránových transportérov v placente (prevzaté z práce Ceckova-Novotna et al., 2006)

3.1.2 Funkcia placenty

Placenta je funkčne veľmi komplexný mechanizmus. Vykonáva prácu pľúc pri výmene kyslíka a oxidu uhličitého, pričom túto výmenu zabezpečuje prostou difúziou, vďaka gradientu odlišných parciálnych tlakov medzi krvou matky a plodu (*Kittnar et al., 2011*). Ďalej pracuje ako tráviaci systém, absorbuje všetky dôležité živiny pre vývoj a rast plodu, odstraňuje odpad ako obličky, a chová sa ako imunitná bariéra, zaisťujúca prevenciu imunitnej reakcie matky voči antigénne odlišnému plodu. Na druhú stranu je jej druhou imunologickou funkciou aktívny transfer IgG protilátok z matky do plodu, poskytujúci plodu ochranu pred prípadnými patogénmi. Placenta je taktiež dôležitým endokrinným orgánom, produkujúcim množstvo hormónov a rastových faktorov, ktoré regulujú priebeh tehotenstva, podporujú rast plodu a spúšťajú pôrod (*Wang and Zhao, 2010*).

Jedným z hormónov tvoreným v placente, presnejšie v choriových klkoch, je choriový gonadotropín (hCG). Medzi jeho účinky patria napríklad: pomoc pri diferenciácii cytotrofoblastu na syncytiotrofoblast, podpora žltého telieska pri produkovanií progesterónu, imunosupresia a zablokovanie fagocytózy invazívnych trofoblastových buniek, podpora rastu a diferenciácie fetálnych orgánov, a rast a vývoj pupočnej šnúry (*Cole, 2010*). Medzi hormóny produkované placentou patria aj progesterón a estradiol. Progesterón znižuje tonus myometria, podporuje rast prs, a je tiež substrátom pre tvorbu kortizolu v nadobličkách plodu. Estradiol stimuluje rast prs, a zvyšuje produkciu prolaktínu. Ďalšie hormóny produkované placentou sú placentárny laktogén, ovplyvňujúci rast mliečnej žľazy a tvorbu mlieka, vazopresín, folikuly stimulujúci hormón, adrenokortikotropný hormón a ďalšie (*Evain-Brion and Malassine, 2003; Kittnar et al., 2011*).

3.1.3 Placentárny transport

Placentárny transport je hlavným prostriedkom zaisťujúcim dodávanie živín a odstraňovanie metabolitov z plodu (*Schneider, 1991*). Prieepustnosť placenty je porovnateľná s inými lipidovými membránami. Permeabilita cez placentárnu membránu je závislá na veľkosti molekuly, jej rozpustnosti, a elektrickom náboji. Najľahšie prechádzajú molekuly malé, nedisociované, a dobre rozpustné v tukoch. Takéto molekuly prechádzajú skrz placentu difúziou (*Čech et al., 2006*).

Pasívna difúzia je najčastejší spôsob akým látky prestupujú cez biologické membrány. Uplatňuje sa pri nej Fickov zákon, ktorý tvrdí, že prestup cez membrány závisí na:

- difúznom koeficiente (schopnosť látok difundovať cez biologické membrány)
- rozdiel koncentrácií na oboch stranách membrány
- veľkosti plochy, cez ktorú musí látka prejsť
- hrúbke membrány

K presunu látok dochádza z miesta o vyššej koncentrácii do miesta s nižšou koncentraciou. Látka prechádza dovedy, pokiaľ sa koncentrácia na oboch stranách membrány nevyrovná. Tento mechanizmus je vhodný pre látky s vyššou lipofilitou.

Niektoré látky prechádzajú placentou pomocou špecifických transportných systémov. Jedná sa o transport sprostredkovaný prenášačmi. Tento spôsob sa delí na facilitovanú difúziu (A) a aktívny transport (B).

- A. Facilitovaná difúzia sa od prostej líši tým, že k prenosu je potrebný membránový prenášač (proteín, ktorý umožňuje presun solutu iontového alebo neiontového charakteru). U tohto typu transportu sa najčastejšie vyskytujú transportné proteíny typu kanálov (membránový proteín, umožňujúci špecifický prenos iontov alebo nenabitých molekúl po koncentračnom gradiente, či na základe elektrochemického potenciálu) a pórov (nešpecifické membránové transportéry). Spoločným znakom s prostou difúziou ale ostáva pohyb látok po koncentračnom gradiente. Pomocou facilitovanej difúzie je umožnený prestup aj hydrofilnejším látkam.
- B. Aktívny transport, tak ako facilitovaná difúzia, je sprostredkovaný membránovými prenášačmi, ktoré sú u aktívneho transportu vysoko špecializované pre určitý transport látok. Hlavný rozdiel, akým sa odlišuje od facilitovanej difúzie je ten, že na aktívny transport je potrebná energia, ktorá vzniká spôsobmi ako je: hydrolýza ATP na ADP, transport iontovými kanálmi, pasívny prechod jednej látky, pričom časť získanej energie z tohto prechodu sa použije na aktívny transport látky druhej, ďalej môže energia vznikáť oxidačne-redukčnými reakciami alebo svetelnou energiou.

Transport môže prebiehať aj proti koncentračnému gradientu, a podľa zdroja energie sa delí na primárny (a) a sekundárny (b).

- a) U primárneho aktívneho transportu je potreba, aby bola prítomná voľná energia. Patria sem napríklad iontové pumpy (transmembránové proteíny najčastejšie oligomérskej povahy).
- b) Sekundárny aktívny transport na svoju prácu energiu nepotrebuje, je ale spojený s iným systémom, ktorý energiu využíva. Ak sú prenášané cez membránové proteíny dve látky rovnakým smerom, jedná sa o symport, príkladom je transport glukózy a sodných iontov. Opačkom symportu je antiport, čiže transportný mechanizmus, kedy každá látka putuje opačným smerom. Patrí sem napríklad sodíkovo-kalciový výmenník (*Trejtner, 2016; Lodish et al., 2000*).

Okrem vyššie uvedených typov transportu, môžu látky prekonávať placentárnu bariéru aj mechanizmom transcytózy, kedy sa látka naviaže na membránu, dôjde ku jej vychlípeniu a tvorbe mechúrka. Podľa smeru transportu látok (von či dovnútra buniek) se označuje ako endo- či exocytóza. V placente potom zaisťuje predovšetkým transport materských imunoglobulínov (IgG) do plodu (*Saji et al., 1999*).

3.1.4 Membránové transportéry v placente

Placenta exprimuje celú radu membránových transportérov, zúčastňujúcich sa prenosu látok z matky do plodu (a naopak). Jednotlivé transportéry sa líšia svojou štruktúrou, substrátmi, ktoré prenášajú, a tiež mechanizmom, akým to vykonávajú.

Podľa smeru, ktorým transportéry prenášajú svoje substráty (dovnútra či von z bunky) sa delia na influxné a efluxné.

Pre prenos látok z matky do plodu je kľúčová predovšetkým prítomnosť transportérov v polarizovanej vrstve trofoblastu. Transportné proteíny sa nachádzajú najmä v mikrovilóznej apikálnej membráne trofoblastu, ktorá je priamo omývaná materskou krvou. Radu transportérov exprimuje i bazálna membrána, obrátená smerom k fetálnej cirkulácii (*Schneider, 1991*). Aktivitou transportných membránových proteínov, je zaisťovaný prestup esenciálnych

látok, ako napríklad glukózy, aminokyselín, sodíka, draslíka či horčíka, z matky do plodu. Zároveň niektoré, napr. efluxné transportéry v mikrovilóznej membráne, tvoria ochranu pred potenciálne toxickými xenobiotikami.

Membránové transportéry sú aktuálne klasifikované do dvoch veľkých rodín, ABC a SLC, s celou radou zástupcov, nachádzajúcich sa aj v placente.

3.1.4.1 ABC transportéry

ABC transportéry, tzv. „ATP binding cassettes“ sú primárne aktívne transportné proteíny, lokalizované v bunečnej membráne, kde zaisťujú vďaka svojej efluxnej aktivite transfer látok von z buniek za spotreby ATP. Obsahujú 48 členov rozdelených do 7 podrodín. Súhrnne rozpoznávajú veľmi široký rozsah substrátov, vrátane xenobiotík.

Transportéry ABC boli pôvodne objavené v nádorových tkanivách, kde vytvárajú rezistenciu na mnohé protirakovinové zlúčeniny. Následne sa však zistilo, že sa tiež nachádzajú v mnohých bežných tkanivách, ako sú črevá, hematoencefalická bariéra, pečeň, obličky, či placenta. Expresia ABC efluxných transportérov v týchto fyziologických tkanivách je úzko spojená s absorpciou, distribúciou, a elimináciou mnohých klinicky dôležitých liečiv (*Szakács et al., 2008*).

Transportéry ABC, ktorých expresia a funkcia v placente je zatiaľ najviac popísaná, sú P-glykoproteín (ABCB1) a BCRP proteín (ABCG2).

Ich substráty sú najmä liečivá, preto sú považované za tzv. liekové transportéry placentárnej bariéry. Lokalizované sú predovšetkým na apikálnej mikrovilóznej membráne trofoblastu (Obr. 1C), kde svojou efluxnou aktivitou zaisťujú prestup svojich substrátov späť do materského obehu, čím poskytujú ochranu plodu.

P-glykoproteín (P-gp, MDR1, ABCB1)

P-glykoproteín je prvým objaveným membránovým transportérom. Jeho štruktúra je zložená z polypeptidového reťazca s 1280 aminokyselinami, dosahujúceho veľkosť 170kDa. Tento transportér je u človeka kódovaný génom *ABCB1*. V organizme sa nachádza na mnohých miestach, ako napríklad v apikálnej membráne enterocytov tenkého čreva, v bunkách

proximálnych renálnych tubulov, na apikálnom póle pečenej buniek, je súčasťou hematoencefalickej a hematotestikulárnej bariéry, a významá je aj jeho expresia v placentе (Ceckova-Novotna et al., 2006). Jeho fyziologická aktivita zahŕňa ochranu citlivých tkanív pred potenciálne škodlivými xenobiotikami či toxínmi, a to tak, že bráni ich absorpcii, následnej distribúcii, a nakoniec pomáha pri ich exkrécii eliminačnými orgánmi. Rozoznáva veľké množstvo chemicky aj štrukturálne odlišných substrátov. Substrátmi sú väčšinou neutrálne alebo hydrofilné pozitívne nabité molekuly (prehľadne Tab. 2). P-glykoproteín sa nachádza aj v bunkách nádorov, kde spôsobuje ich rezistenciu voči cytostatikám (Čečková, 2017; Staud et al. 2012), preto bol pôvodne označovaný aj ako tzv. „multidrug resistance protein 1“ (MDR1). Je popísaný napríklad u nádoroch prs, vaječníkov, hrubého čreva, obličiek, či pečene, a tiež u leukémiách (Callaghan et al., 2008; Chan et al., 1991; Penson et al., 2004).

BCRP (ABCG2)

BCRP proteín bol prvýkrát objavený v rezistentnej línii buniek MCF-7 odvodenej od karcinómu prs, súčasne ale bola identifikovaná aj jeho intenzívna expresia v placentе (Hahnova-Cygalova, 2011). Skladá sa z polypeptidického reťazca s 655 aminokyselinami. Jedná sa o efluxný transportér, nachádzajúci sa ako P-glykoproteín na apikálnej membráne tkanív. Jeho umiestnenie a úloha je podobná P-glykoproteínu. Navyše plní úlohu v homeostáze bunky, a v transporte hému a porfyrínu. Substráty BCRP zahŕňajú ako endogénne, tak aj exogénne látky (Tab. 2), a je napríklad tiež schopný vylučovať vitamín K, biotín a riboflavín do materského mlieka (Čečková, 2017; Staud et al., 2012).

MRP transportéry (ABCCs)

V placentе a izolovaných trofoblastových bunkách sa tiež detekovalo niekoľko členov transportných proteínov, viažúcich sa na multirezistenciu (MRP), ako MRP1, MRP2, MRP3, MRP5. Tieto transportéry okrem niektorých liečiv prenášajú tiež konjugáty, ako xenobiotík, tak aj endogénnych látok.

3.1.4.2 SLC transportéry

Skupina transportérov označovaných ako „solute carriers“, SLC, sa skladá z viac ako 300 členov, delených do viac ako 50 skupín.

Táto skupina transportérov bola identifikovaná v rôznych tkanivách po celom tele. Mnohé transportéry SLC sú substrátovo špecifické, rozpoznávajúce a transportujúce určité endogénne zlúčeniny, ako sú cukry, aminokyseliny alebo nukleozidy.

Niekoľko ďalších členov však vykazuje širokú substrátovú špecificitu, pričom rozoznáva široké spektra molekúl s rôznymi štruktúrami a rozmermi. Potvrdilo sa, že tieto „polyšpecifické“ transportéry sú exprimované v mnohých fyziologických lokalitách, a zohrávajú hlavnú úlohu vo farmakokinetických udalostiach, najmä pri vylučovaní obličiek a žlčových ciest.

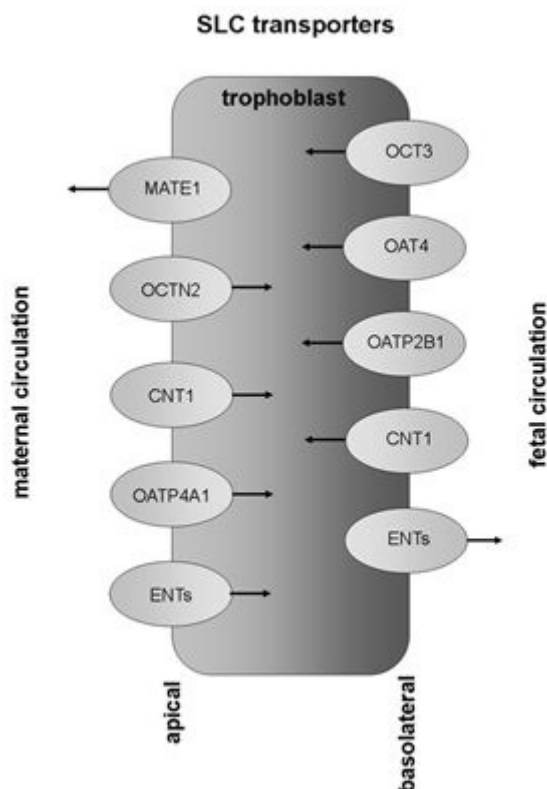
Transportéry SLC sú prevažne sekundárne aktívne transportné nosiče, ktoré využívajú koncentračné gradienty iných substancií na transport svojich substrátov, napríklad liečiv, ktoré sú typicky hydrofilné, alebo sú to nabité molekuly (katióny a anióny).

Priebeh transportu sprostredkovaného SLC je často, ale nie výlučne, smerovaný z extracelulárneho priestoru do buniek (influxný transport). Niektoré transportéry SLC však môžu transportovať svoje substráty z vnútra bunky do extracelulárneho priestoru. Jedným takýmto transportérom je proteín MATE (multi-antimicrobial extrusion protein) exprimovaný v obličkách, pečeni a placentе.

Transportéry SLC, o ktorých je známe, že sú exprimované v placente zahŕňajú:

- a) transportéry organických katiónov (organic cation transporters, OCT)
- b) transportéry organických aniónov (organic anion transporters, OAT)
- c) transportéry karnitínu (carnitine transporters, OCTN)
- d) koncentračné nukleozidové transportéry (concentrative nucleoside transporter, CNT)
- e) ekvilibračné nukleozidové transportéry (equilibrative nucleoside transporters, ENT)
- f) polypeptidy transportujúce organické anióny (organic anion-transporting polypeptides, OATP)
- g) nedávno objavené MATE proteíny (multidrug and toxic compound extrusion).

Tieto transportéry uľahčujú prechod substrátových molekúl cez membrány trofoblastov (Obr. 2).



Obr. 2: Schematické znázornenie SLC membránových transportérov v trofoblaste, MATE 1 - multidrug and toxic compound extrusion 1, OCTN2 - carnitine transporter 2, CNT1 - concentrative nucleoside transporter 1, OATP4A1 - organic anion-transporting polypeptide 4A1, OATP2B1 - organic anion-transporting polypeptide 2B1, ENTs - equilibrative nucleoside transporters, OCT3 - organic cation transporter 3, OAT4 - organic cation transporter 4 (prevzaté z práce Staud et al., 2012)

V tejto práci sme sa zamerali viac na štúdium skupiny OATP transportérov, zaradených v rámci SLC klasifikácie ako SLCO rodina. OATP transportéry zahŕňajú influxné transportéry s expresiou v rôznych tkanivách, ako napríklad v hepatocytoch, enterocytoch, či hematoencefalickej bariére. V ľudskom tele je popísaných jedenásť členov, a ich úlohou je hlavne transport organických aniontov cez bunecnú membránu, distribúcia a exkrécia (Kalliokoski et al., 2009). Výskyt niektorých OATP transportérov bol popísaný aj v placentе.

OATP1A2 (SLCO1A2)

Tento transportér bol prvým objaveným členom zo skupiny polypeptidov transportujúcich organické anionty. Nachádza sa napríklad v mozgu, pečeni, obličkách či črevách (Kullak-Ublick *et al.*, 1995; Glaeser *et al.*, 2007). Jeho endogénne substráty zahŕňajú žlčové kyseliny, tyroidné hormóny, steroidné hormóny, a ich konjugáty. Navyše sú jeho substrátmi aj niektoré liečivá (Tab. 3) (Kullak-Ublick *et al.*, 1995, 1998; Bossuyt *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 2001).

OATP1B3 (SLCO1B3)

Nachádza sa najmä na sinusoidnej membráne hepatocytov (König *et al.*, 2000b; Abe *et al.*, 2001), a medzi jeho endogénne substráty patrí bilirubin, žlčové kyseliny, eikosanoidy, tyroidné hormóny, cholecystokinín. Medzi jeho exogénne substráty patrí napríklad digoxín či paklitaxel (Tab. 3) (König *et al.*, 2000b; Abe *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2001; Kullak-Ublick *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2001).

OATP2A1 (SLCO2A1)

Je prítomný v širokej škále rôznych tkanív, a plní úlohu prostaglandínového transportéru (Lu *et al.*, 1996). V súčasnej dobe ale žiadne liečivo nie je jeho substrátom.

OATP2B1 (SLCO2B1)

Je lokalizovaný na sinusoidálnej membráne hepatocytov, čriev, srdca, a tiež na bazálnej membráne syncytiotrofoblastu. Medzi jeho substráty patrí napríklad prostaglandín E2, estrón, dehydroepiandrosterón (Tamai *et al.*, 2000; Kullak-Ublick *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2003; Grube *et al.*, 2006), a tiež niektoré liečivá popísané v Tab. 3.

OATP3A1 (SLCO3A1), OATP4A1 (SLCO4A1)

Títo dvaja zástupcovia SLCO rodiny transportujú estrogény, prostaglandíny, tyroidné hormóny, vazopresín, a z liečiv benzylpenicilín (Tamai *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005).

Tabulka 1: Typické charakteristiky transportérov ABC a SLC v placente (*Staud and Ceckova, 2015*)

	ABC	SLC
<i>Lokalizácia v bunke</i>	Najmä apikálna membrána (smerujúca k matke)	Umiestnené na oboch stranách membrány, apikálnej (smerujúcej k matke) aj bazálnej (smerujúcej k plodu)
<i>Typ transportu</i>	Aktívny transport závislý na energii	Sekundárne aktívny transport, niektoré facilitovanou difúziou
<i>Smer transportu</i>	Eflux z buniek, späť do materského obehu	Influx do vnútra buniek, niektoré uľahčujú eflux alebo prenos oboma smermi
<i>Substrátová špecificita</i>	Prevažne hydrofóbne exogénne molekuly (liečivá, toxíny, metabolity, konjugáty)	Hydrofilné alebo nabité molekuly, endogénne aj exogénne molekuly
<i>Zástupcovia v ľudskej placente</i>	Apikálna membrána: P-glykoprotein, ABCG2 ABCC2 Bazálna membrána: ABCC1 Iné MRP transportéry	Apikálna membrána: OCTN1, 2 CNT1 OATP4A1 ENT2 MATE1, 2 Bazálna membrána: OCT1, 2, 3 OAT4 OATP2B1 CNT1 ENT1, 2

3.1.4.3 Prehľad vybraných membránových transportérov

Tabuľka 2: Prehľad vybraných ABC transportérov študovaných v rámci tejto diplomovej práce, ich expresia, funkcia a vybrané substráty (NIH, U.S. National Library of Medicine, 2019; Staud and Pavek, 2005; Staud et al., 2012; Szakacs et al., 2008; van Herwaarden and Schinkel., 2006; Bloise et al., 2015)

Názov transportéru	Ďalšie pomenovania	Uloženie	Funkcia	Substráty
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1; P-glykoprotein 1 (P-gp); multidrug resistance protein 1 (<i>MDR1</i>); cluster of differentiation 243 (<i>CD243</i>)	Apikálne, epitel tenkého čreva, placenta, na apikálnej strane buniek hepatocytov a proximálneho tubulu obličiek, súčasť endoteliálnych buniek hematotestikulárnej a hematoencefalickej bariéry	Efluxný transportér, uľahčuje exkréciu eliminačnými orgánmi, bráni prechodu xenobiotík do citlivých tkanív, zúčastňuje sa na liekovej rezistencii	Farmakologické substráty: digoxín, rosiglitazón, abakavir, tenofovir disoproxil fumarát, efavirenz, nevirapín, ritonavir, lopinavir, indinavir, saquinavir, fenytoin, fenobarbital, lamotrigín, levetiracetam, karbamazepín, ondansetron, daunorubicin, doxorubicin, docetaxel, erytromycín, chinidín, vinkristín, vinblastín Fyziologické substráty: 17-hydroxyprogesterón, aldosterón, protizápalové cytokíny (IL-4), chemokíny (CCL2), endogénne (cortisol) a syntetické glukokortikoidy, estradiol-17b-glukuronid, estriol, estrón, flavonoidy, PAF, pregnenolon, prozápalové cytokíny (IL-1b, IL-2, IL-6, IFNg, GM-CSF, TNF-a), sfingomyelín a fosfolipidy s krátkymi reťazcami
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G member 2, Breast cancer resistance protein (BCRP), M338 (CD338)	Apikálne, Membrána kmeňových buniek, placenta, epitel tenkého čreva, súčasť endoteliálnych buniek hematotestikulárnej a hematoencefalickej bariéry, apikálna membrána renálnych proximálnych tubulov a žľazových kanálikov hepatocytov	Efluxný transportér, ochrana pred toxickým pôsobením látok, pri laktácii vylučuje do materského mlieka vitamíny ako riboflavín, biotín a vitamín K, spôsobuje rezistenciu nádorových buniek voči mitoxantrónu, topotekanu a irinotekanu	Farmakologické substráty: zidovudín, lamivudín, abacavir, efavirenz, delaviridín, lopinavir, ritonavir, nelfinavir, saquinavir, atazanavir, etoposid, irinotekan, atorvastatín, ciprofloxacín, furosemid, vitamín K Fyziologické substráty: estradiol-17b-glukuronid, dehydroepiandrosterón, estrón-3-sulfát, folát, porfyrín, sfingolipidy, prostaglandíny

Tabuľka 3: Prehľad vybraných SLC transportérov študovaných v rámci tejto diplomovej práce, ich expresia, funkcia a vybrané substráty (Franke et al., 2009; Huber et al., 2007; Kalliokoski et al., 2009; König et al., 2006; Nakanishi et al., 2018; NIH, U.S. National Library of Medicine, 2019; Staud et al., 2012)

Názov transportéru	Ďalšie pomenovania	Uloženie	Funkcia	Substráty
OATP1A2	Organic anion transporting polypeptide 1A2, Solute carrier organic anion transporter family member 1A2 (SLCO1A2)	Apikálne, enterocyty a cholangiocyty, hemoencefalická bariéra, pľúca, obličky	Influxný transportér, reabsorpcia látok, ktoré boli vylúčené do žlče, reabsorpcia alebo vylučovanie látok do moču, prenos cholových kyselín, bilirubínu, T3, T4, prostaglandínu E2	erythromycín, fexofenadín, imatinib, levofloxacin a ďalšie fluorochinolóny, lopinavir, metotrexát, rocuronium, statíny (rosuvastatín, pitavastatín), ouabain, saquinavir, deltophorin II, DPDPE, sulfobromophthalein, unaproston, acebutolol, atenolol, atrasentan, celiprolol, sotalol, talinolol, tebipenem, pivoxil
OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 1B3, Solute carrier organic anion transporter family member 1B3 (SLCO1B3)	Bazolaterálna membrána hepatocytov, v menšom množstve aj v prostate, hrubom čreve	Influxný transportér, prenáša žľožové kyseliny, bilirubín, cholecystokinín, steroidné hormóny	statíny, fexofenadín, valsartan, telmisartan, enalapril, erythromycín, mykofenolová kyselina, tacrolimus
OATP2A1	Organic anion transporting polypeptide 2A1, solute carrier organic anion transporter family member 2A1 (SLCO2A1), prostaglandin transporter (PGT)	Apikálna membrána, štítna žľaza, pľúca, močový mechúr, placenta, srdce, obličky, slezina	Hrá kľúčovú úlohu v uvoľňovaní a distribúcii novo syntetizovaných prostaglandínov (napr. PGE2, PGF _{2α} , PGD2, TxB2), a tiež aj v ich odstránení z obehu	Latanoprost a iné prostanoidy
OATP2B1	Organic anion transporting polypeptide 2B1, solute carrier organic anion transporter family member 2B1 (SLCO2B1)	Bazolaterálna membrána hepatocytov, apikálna membrána enterocytov, srdce, pľúca, slezina, placenta	Influxný transportér, prenáša žľožové kyseliny a steroidné hormóny	Glyburid, repaglinid, fexofenadín, pravastatín, lopinavir, saquinavir, nelfinavir,
OATP3A1	Organic anion transporting polypeptide 3A1, solute carrier organic anion transporter family member 3A1 (SLCO3A1)	Má dve varianty, prvá sa nachádza v širokej škále tkanív, ako napr. v semenníkoch, pľúcach, slezine, mozgu, štítnej žľaze, pričom druhá sa nachádza najmä v semenníkoch a mozgu	Transport prostaglandínov (PGE1, PGE2), T4, vazopresínu	Benzylpenicilín
OATP4A1	Organic anion transporting polypeptide 4A1, solute carrier organic anion transporter family member 4A1 (SLCO4A1)	Apikálne, srdce, placenta, pľúca, pečeň, kostrové svalstvo, obličky, gastrointestinálny trakt	Transport estrogénov, prostaglandínov, T3, T4	Benzylpenicilín

3.1.4.4 Regulácia expresie membránových transportérov v placente

Tehotenstvo je dynamický stav, ktorý si vyžaduje prispôbenie sa placentárneho tkaniva na rôzne vlastné (genetické a vývojové) a vonkajšie (okolité) stimuly. Práve preto je aktivita a expresia placentárnych transportérov vysoko regulovaná fyziologickými a patologickými faktormi.

Transkripčné faktory regulujúce expresiu membránových transportérov v placente

Je známe, že expresia génov kódujúcich membránové transportéry je regulovaná skupinou nukleárných receptorov a transkripčných faktorov, ktoré zahŕňajú aryl hydrokarbónový receptor (AHR), konštitutívny androstanový receptor (CAR), pregnan X receptor (PXR), vitamín D3 receptor (VDR), PPAR- α , farnesoid X receptor (FXR) a glukokortikoidný receptor (GR).

Transkripčná regulácia génov, kódujúcich P-gp, BCRP, OATP transportných proteínov, bola sledovaná hlavne na hepatocytoch a tumorových bunkách, avšak regulácia transportných prenášačov v placente zatiaľ nie je úplne známa (*Staud and Ceckova, 2015*).

Expresia P-glykoproteínu môže byť znížená cez aktiváciu PXR, regulovaná je tiež pomocou histon deacetylázy (HDCA)-2. Efekt glukokortikoidov na expresiu *ABCB1* génu kódujúceho P-glykoproteín, je zjavne odlišný v závislosti na živočíšnom druhu a experimentálnom modele (*Han et al., 2018*).

Regulácia BCRP expresie bola skúmaná niekoľkými štúdiami, ktoré naznačujú, že by sa na nej mohli podieľať AHR, HIF1 α , ER α a ER β (*Ebert et al. 2005, Ee et al. 2004, Krishnamurthy et al. 2004, Wang et al. 2006*).

Bolo zistené, že ľudské transportéry OATP sú regulované tiež špecifickým spôsobom na úrovni bunky a tkaniva, aktiváciou jadrových receptorov FXR, PXR, CAR a HNF-4 (*Svoboda et al., 2011*). Relevantnosť týchto regulačných ciest k placentárnemu tkanivu však zostáva sporná v dôsledku neprítomnosti, alebo veľmi nízkej expresii týchto jadrových receptorov v placente. (*Staud and Ceckova, 2015*).

Zmeny expresie membránových transportérov vplyvom patofyziologických zmien v placente počas tehotenstva

Existuje niekoľko ochorení a patológií súvisiacich s graviditou, ktoré môžu ovplyvniť expresiu a funkciu placentárnych transportérov. Deje sa tak v dôsledku zmien v homeostáze (a teda v hladinách hormónov, cytokínov a mediátorov) alebo v dôsledku liekov, ktoré sú používané na liečbu týchto stavov (*Staud and Ceckova, 2015*).

Zápal je príznakom mnohých patologických stavov týkajúcich sa tehotenstva, vrátane infekcií, preeklampsie a gestačného diabetu. Zápalová reakcia často zahŕňa indukciu endogénnych prozápalových cytokínov, ktoré ovplyvňujú expresiu génu. *Wang a kol. (2005)* preukázali, že funkčná aktivita P-glykoproteínu v placente a mozgu je u endotoxemických potkanov zmenená, podobné výsledky neskôr opísali *Petrovic et al. (2008)*, ktorí preukázali, že zápal vyvolaný endotoxínom u potkanov spôsobuje výrazné zníženie placentárnej expresie niekoľkých transportérov liečiv z rodiny ABC a SLC vrátane P-glykoproteínu, BCRP a OATP1A4, OATP2B1 a OATP4A1. Bakteriálny a virový antigén ovplyvnil expresiu ABCB1 a ABCG2 v explantoch z ľudských placent prvého, resp. tretieho trimestru (*Lye et al., 2015*). Uvedená práca tak naznačuje, že bakteriálne infekcie môžu ovplyvniť expozíciu zárodka toxínom v priebehu tehotenstva, virová infekcia naopak narušuje ochranu plodu reguláciou ABCB1 a ABCG2 skôr v pozdnych fázach tehotenstva.

Medzi ochorenia schopné ovplyvňovať endogénne procesy patrí aj gestačný diabetes mellitus (GDM). Javí sa, že materský diabetes ovplyvňuje tieto procesy pravdepodobne prostredníctvom epigenetických modifikácií (*Ruchat et al., 2013*). V štúdií, kde sa sledovala mRNA a proteínová expresia rôznych ABC transportérov v placentách zdravých a inzulínom riadených diabetických tehotenstiev ukázala, že hladiny P-glykoproteínu, BCRP nie sú zmenené, keď je hyperglykémia dobre kontrolovaná. Zmeny v expresii BCRP nastali u zle riadeného diabetu (*Anger et al., 2012*).

Ďalším stavom schopným ovplyvniť expresiu membránových transportérov je hypoxia. Výsledkom štúdií, ktoré boli nedávno vypracované bolo, že hypoxické stavy v placentách prvého trimestra sú aspoň čiastočne zodpovedné za silnú expresiu P-glykoproteínu a BCRP (*Javam et al., 2014, Lye et al., 2013*). V práci *Iqbal et al. (2012)* sa zamýšľali, že regulačné účinky hypoxie môžu vysvetliť relatívne vysoké hladiny transportérov v slabo vaskularizovaných preeklamptických a predčasných tehotenstvách.

Okrem toho sa predpokladá, že hypoxia ovplyvňuje epigenetické mechanizmy placenty, spôsobuje obmedzenie rastu plodu, preeklampsiu a diabetes (*Yuen et al., 2013*).

Intrahepatálna cholestáza je častým ochorením, postihujúcim tehotné ženy. OATP1A2 mRNA bola upregulovaná v placentách žien s intrahepatálnou cholestázou oproti placentám zdravých žien (*Cui et al., 2009*). Expresiu BCRP transportérov môže ovplyvniť aj kyselina ursodeoxycholová, používaná na pri liečbe intrahepatálnej cholestázy (*Azzaroli et al., 2007, Azzaroli et al., 2013*).

Zmena v expresii membránových transportérov sa tiež zistila u HIV pozitívnych žien. Mnohé zo zlúčenín používaných pri tejto liečbe sú substrátmi, inhibítormi alebo induktormi placentárnych transportérov a tak modulujú protektívne účinky prenášačov na plod. Bolo zistené, že expresia ABCB1 mRNA a P-glykoproteínu v placentách HIV pozitívnych matiek je významne vyššia ako u HIV negatívnej skupiny (*Camus et al., 2006*). Záverom bolo, že infekcia HIV priamo indukuje expresiu ABCB1. Ďalším dôvodom prečo to nastalo, mohla byť antiretrovírusová liečba podávaná gravidným HIV pozitívnym ženám, pretože väčšina z nich bola liečená zidovudínom, potvrdeným induktorom ABCB1 (*Papp et al., 2008*).

Medzi patológie, ktoré by mohli byť schopné meniť fyziologické transportné funkcie placenty, sa radia aj nádorové ochorenia. Mnohé cytostatické zlúčeniny používané na liečbu nádorov, sú substrátmi, inhibítormi, alebo induktormi placentárnych transportérov liečiv, a môžu tak spôsobiť interakcie medzi liekmi, alebo inak ovplyvniť ich funkciu.

Zmeny expresie membránových transportérov v placente v priebehu tehotenstva

Endogénne faktory ovplyvňujú to, v akej miere sa jednotlivé placentárne prenášače vyskytujú, pričom sa táto miera mení gestačným vekom. Medzi tieto faktory patria hormóny produkované matkou a placentou (estrogén, glukokortikoidy) (*Staud and Ceckova, 2015*).

Bolo preukázané, že expresia transportéru ABCB1 a jeho proteínu P-glykoproteínu, sa znižuje od prvého do tretieho trimestra (*Mathias et al., 2005, Gil et al., 2005, Sun et al., 2006*). Taktiež sa množstvo P-glykoproteínu zvýšilo pri nedostatku kyslíka v placentárnom tkanive (*Lye et al., 2012, Javam et al., 2014*).

Naopak, hladina ABCG2 je stála počas celého tehotenstva, a jeho množstvo je omnoho vyššie v čase pôrodu, ako množstvo ABCB1 (*Mathias et al., 2005, Yeboah et al., 2006*). Avšak, jeho proteín BCRP, sa vyskytoval vo vyššej miere na konci tehotenstva ako na začiatku. Tento jav je pripisovaný post-transkripčným zmenám spôsobenými vyššou hladinou estrogénu a progesterónu na konci tehotenstva (*Yeboah et al., 2006*). V inej štúdií sa ale zistilo zníženie expresie ABCG2 a jeho proteínu v 39. týždni tehotenstva oproti 28. týždňu tehotenstva. Autor tento jav pripisoval ako adaptačnú odpoveď na zvýšené nároky vyvíjajúceho sa plodu pre zachovanie folátovej homeostázy (*Meyer et al., 2006*).

Množstvo SLC transportérov ako SLC22A2, SLC22A3, SLC47A1, SLC47A2 so zvyšujúcim sa gestačným vekom klesá. Hladina SLC22A1 je stála (*Lee et al., 2013, Ahmadimoghaddam et al., 2013*).

3.2 PREDČASNÝ PÔROD

Pôrod je proces, ktorým sa označuje každé ukončené tehotenstvo, pri ktorom plod opustí matkinu delohu, pričom váži minimálne 500 g, v prípade nižšej hmotnosti je podmienkou, aby novorodenec prežil viac ako 24 h. Ak dôjde ku pôrodu medzi 38. - 42. týždňom tehotenstva, hovorí sa o pôrode v termíne alebo včasnom pôrode (*partus maturus*).

Predčasný pôrod (*partus praematurus*) je klasifikovaný ako narodenie živého alebo mŕtveho plodu pred 37. týždňom tehotenstva (Čech et al., 2006). Podľa výsledkov zverejnených na stránkach Českej neonatologickej spoločnosti podiel detí narodených s pôrodnou hmotnosťou nižšou ako 2500 g v roku 2017 dosahoval 7,42 % (ČNeoS, 2017).

3.2.1 Klasifikácia predčasného pôrodu

Predčasný pôrod je možné rozdeliť do niekoľkých skupín podľa rôznych kritérií:

1. Vo všeobecnosti sa delí podľa dĺžky trvania tehotenstva na:
 - A. extrémne predčasný pôrod (pôrod prebieha pred alebo počas 27. týždňa tehotenstva)
 - B. veľmi predčasný pôrod (pôrod medzi 28. - 31. týždňom tehotenstva)
 - C. mierne predčasný pôrod (pôrody medzi 32. - 36. týždňom tehotenstva)
 - D. oneskorený predčasný pôrod.

2. Podľa spôsobu vyvolania predčasného pôrodu sa delí na:
 - A. spontánny, tvorí 70–80 % všetkých predčasných pôrodov.

Ten sa ďalej môže rozdeliť na:

 - a) spontánny predčasný pôrod so zachovanými plodovými obalmi (PTL), ktorý je definovaný ako pôrod, pri ktorom nastupujú pravidelné kontrakcie pred koncom 37. týždňa tehotenstva, pričom plodové obaly zostávajú neporušené, približne 40–50 % spontánnych predčasných pôrodov
 - b) spontánnu predčasnú ruptúrou plodových obalov (PPROM), je to stav, kedy dochádza ku ruptúre obalov spolu s odtokom plodovej vody viac ako hodinu pred tým, ako nastúpia kontrakcie (Goldenber et al., 2008), približne 20–30 % spontánnych predčasných pôrodov

B. iatrogénny (lekársky ukončený pôrod), vykonaný cisárskym rezom alebo vyvolaním. Iatrogénny predčasný pôrod môže nastať vplyvom komplikácii stavu matky (preeklampsia, eklampsia, ruptúra placenty, patologické uloženie placenty) alebo stavu dieťaťa (intrauterínna rastová retardácia), za účelom zachovania zdravia matky a plodu (*Vogel et al., 2018, Roztočil et al., 2008*).

3.2.2 Rizikové faktory

Rizikové faktory predčasného pôrodu sa podľa *Roztočila (2008)* dajú rozdeliť na: „riziká zo strany matky, ktoré môžu byť ovplyvniteľné alebo neovplyvniteľné. Ďalej sa môže jednať o riziká z reprodukčnej anamnézy matky, ovplyvniteľných a neovplyvniteľných tehotenských komplikácií.“

Medzi neovplyvniteľné riziká zo strany matky sa radí:

- vek, menej ako 18, alebo naopak viac ako 35 rokov
- zlé sociálne podmienky, ako napríklad nezamestnanosť, absencia partnera, nízke vzdelanie
u žien s vyšším vzdelaním sa riziko predčasného pôrodu znižuje (*Smith et al., 2007*)
- primigravidita, multigravidita (viac ako 5 detí)
- afroamerická rasa (*Hamilton et al., 2005*)

Ovplyvniteľnými rizikovými faktormi zo strany matky môžu byť:

- body mass index (BMI) menší ako 20%
- fyzicky náročná práca, ktorú musí gravidná žena vykonávať
- fajčenie pred a počas gravidity
- užívanie drog a alkoholu
- nadmerný stres

Do skupiny rizík z reprodukčnej anamnézy matky patria:

- dva spontánne potraty v prvom alebo druhom trimestri
- umelé ukončenie gravidity v prvom trimestri
- predčasný pôrod v anamnéze tehotnej

K rizikám predčasného pôrodu z dôvodu neovplyviteľných tehotenských komplikácií sa radia: viacpočetné tehotenstvo, ťažšie ochorenia matky, ktoré zhrňajú akútne ochorenia a systémové infekcie, vrodené vývojové vady plodu, ďalej je to hypertenzia, či renálne ochorenie matky. (*Roztočil et al., 2008*).

Medzi riziká prameniace z ovplyviteľných tehotenských komplikácií sa uvádzajú: infekcie urogenitálneho systému, zahŕňajúce napríklad bakteriálnu vaginózu, infekcie streptokokmi skupiny B, sexuálne prenosné choroby (STD), a tiež tu patrí inkompetencia deložného hrdla. (*Roztočil et al., 2008*).

Medzi najvýznamnejšie rizikové faktory patrí bakteriálna vaginóza, jedná sa o stav, pri ktorom sa naruší mikroflóra pošvy, a zníži sa ochranná bariéra pôrodných ciest. Dochádza aj ku zníženiu obsahu acidofilných baktérií (*Lactobacillus acidophilus*), ktoré zaisťujú prirodzene nízke pH prostredia (*Koucký et al., 2014*).

Predčasné pôrody bývajú častejšie aj u žien, ktoré podstúpili umelé vyvolanie ovulácie alebo asistovanú reprodukciu. Po asistovanej reprodukcii je riziko trojnásobne väčšie ako po spontánnom počatí (*Helmerhorst et al., 2004*).

3.2.3 Patofyziológia predčasného pôrodu

Predčasný pôrod aj pôrod v termíne sú odbornosťou považované za rovnaké procesy, ktoré sa ale vyskytujú v iných gestačných obdobiach.

Ako u predčasného pôrodu, tak aj u pôrodu v termíne, dochádza ku zmenám v kontraktilite myometria, dozrievaniu deložného hrdla, a ku aktivácii plodových obalov (*Koucký et al., 2014*).

Najpodstatnejším rozdielom je ich aktivácia. Pri pôrode v termíne dochádza k fyziologickej aktivácii, pričom hlavnú úlohu zohráva hypothalamo-hypofyzárna osa (*Liggins and Thornburn, 1994, Flint et al., 1975*). U predčasného pôrodu je aktivácia patologická.

Príčiny predčasného pôrodu nie sú úplne známe. Za spúšťače sa považujú:

- infekcie,
- uteroplacentárne ischemie a decíduálne hemorágie
- abnormálne pôsobenie progesteronu
- alergie, materský a fetálny stres
- nadmerné rozšírenie delohy, inkompetencia deložného hrdla
- porucha imunologickej tolerancie plodu matkou (*Koucký et al., 2014*)

Infekcie

Za najvýznamnejšie príčiny predčasného pôrodu sa pokladajú infekcie. Ich prevalencia sa pohybuje medzi 25–40 % všetkých predčasných pôrodov.

Amniotická dutina za normálnych okolností neobsahuje baktérie detekovateľné kultivačnými metódami alebo molekulárne mikrobiologickými metódami. Rovnako nie sú prítomné ani biele krvinky.

Najčastejšími pôvodcami bývajú ureaplasmata a mykoplasmata. Tieto mikroorganizmy môžu spôsobiť niekoľko závažných chorôb, a ohroziť tak matku či plod (fetálna zápalová odpoveď (FIRS)). Patria sem:

- A. mikrobiálna invázia amniotickej dutiny (MIAC), definovaná ako prítomnosť organizmov v amniotickej tekutine, ktorej vzorka sa získa pomocou amniocentézy a je detekovaná kultivačnými metódami a molekulárne mikrobiologickými technikami
- B. intraamniotický zápal, pri ktorom je zvýšená koncentrácia zápalových biomarkrov (IL-6), alebo sa tu vyskytujú zápalové bunky
- C. intraamniotická infekcia, toto pomenovanie sa používa, ak sa preukáže mikrobiálna invázia amniotickej dutiny spolu s intraamniotickým zápalom

- D. sterilný intraamniotický zápal, týmto termínom sa myslí stav, pri ktorom chýba výskyt mikroorganizmov
- E. klinická chorioamnionitída, označujúca zápal plodových obalov spolu so zápalom amnionu
- F. akútna histologická chorioamnionitída, typická tým, že sú prítomné neutrofile v membráne chorioamnionu alebo chorioamnionitickej platničke. (Romero et al., 1998, Koucký et al., 2014, Polin et al., 2017).

Bakteriálne produkty a prozápalové cytokíny (IL-1 β , TNF- α) sa potom môžu realizovať ako parakrinné alebo autokrinné signály pre metalloproteázu 9 (MMP-9). U žien s mikrobiálnou inváziou amniotickej dutiny bol potvrdený vyšší výskyt tohto enzýmu. MMP-9 je zapojená do mechanizmu ruptúry membrán, tým že narúša kolagénovú sieť vo fibroblastoch a špongiovej vrstve, a tým mení membránovu morfológiu (Tchirikov et al., 2018)

Uteroplacentárne ischémie a decíduálne hemorágie

Tieto spúšťače sú spôsobené poruchami zrážanlivosti krvi, či už vrodenými, alebo získanými. V tele dochádza k nadmernej tvorbe trombínu, čoho následkom je vznik mikrotrombov v cievach placenty, spôsobujúce ischémiu a oxidatívny stres, zároveň tiež môže dôjsť až ku odlúčeniu placenty na podklade decíduálnej hemorágie (Koucký et al., 2014).

Progesteron

Za najdôležitejší hormón pre udržanie tehotenstva sa považuje progesterón, ktorý zaisťuje remodeláciu deložného hrdla. Progesterón je schopný ovplyvňovať napätie deložnej svaloviny a udržiavať ju v kľude, takisto môže aktivovať plodový vak a obaly.

Gestagény, najmä progesterón, môžu spôsobiť zvýšenú expresiu génov pre claudíny (transmembránové proteíny, vytvárajúce gap aj tight junctions, a tým ovplyvňujúce vlastnosti epitelu). Pri ich neprimeranej expresii môže dôjsť ku predčasnej prestavbe deložného hrdla (Balkovetz, 2006).

Progesteron je tiež inhibítorom prozápalových cytokínov (IL-6, IL-8) a inhibítorom tvorby prostaglandínov (Shields et al., 2005, Koucký et al., 2014).

Alergie a materský, či fetálny stres

Obe majú podobný mechanizmus, ktorý sa uplatňuje pri aktivácii predčasného pôrodu. V oboch prípadoch hrajú významnú úlohu prostaglandíny, ktoré sa u alergií vyplavujú po degranulácii mastocytov. Pri strese je ich produkcia stimulovaná kortikoliberínom. Majú schopnosť meniť kontraktilitu myometria, remodelovať deložné hrdlo a tiež môžu aktivovať plodový vak a obaly (*Ritchie et al., 1984, Rajabi et al., 1991, Romero et al., 1994*). Pri strese sa tiež uvoľňujú prozápalové markery (IL-1, IL-6, TNF α) (*Coussons-Read et al., 2005, Coussons-Read et al., 2007*).

Nadmerné rozpätie dĕlohy a inkompetencia deložného hrdla

Predčasný pôrod môže byť zapríčinený aj nadmerným rozpätím delohy, čo spôsobí mechanické narušenie plodových obalov, alebo inkompetenciou deložného hrdla, kedy je jeho uzatváracia schopnosť porušená. Dôvodom môžu byť vrodené vady, ako hypoplázia deložného hrdla, alebo napríklad vystavenie matky diethylstilbestrolom v prvom trimestri, intrauterínne infekcie, či opakované prerušenie tehotenstva, a s tým spojená dilatácia deložného hrdla (*Koucký et al., 2014*).

3.2.4 Klinický obraz predčasného pôrodu

Predčasný pôrod sa delí na indikovaný predčasný pôrod, ktorý tvorí približne 25 % z celkového počtu žien, a spontánny predčasný pôrod, predstavujúci približne 75 % všetkých žien.

Indikovaný predčasný pôrod je iniciovaný v prípade, ak by mohlo dôjsť ku ohrozeniu na strane matky (závažné ochorenie maty), plodu (napr. intrauterínna rastová restrikcia alebo hypoxia plodu), poprípade oboch (napr. predčasné odlučovanie placenty) (*Meis et al., 1995, Meis et al., 1998*).

Klinický obraz spontánneho predčasného pôrodu sa dá rozdeliť do piatich foriem:

1. spontánny predčasný pôrod s kontrakciami je charakterizovaný tým typom kontrakcií, ktoré nastupujú v pravidelných intervaloch, a dochádza ku zmenám na deložnom hrdle (*Koucký et al., 2014*)
2. predtermínový predčasný odtok plodovej vody sa zisťuje pomocou ultrazvuku, pričom sa sleduje skrátenie deložného hrdla, a biochemickými metódami, napr. Actim Prom testom, ktorý hodnotí prítomnosť insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP) alebo Amnisure testom, hodnotiacim placental alpha mikroglobulin-1 (PAMG-1), či fetálnym fibronektínom (fFN) (*Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP, 2017*), PPRM je nutné odlišiť od iných stavov, ktoré môžu mať podobný klinický obraz, napr. vaginálny výtok, či únik moču
3. cervikálnou inkompetenciou sa nazýva stav, kedy dochádza ku skráteniu (<25 mm) alebo dilatácii deložného hrdla (>10 mm) (*Crane and Hutchens, 2008*)
4. chorioamnionitída sa klinicky diagnostikuje pomocou tzv. Gibbových kritérií: vzostup teploty matky nad 38 °C, doprevádzané výskytom minimálne dvoch z nasledujúcich kritérií: tachykardia matky/plodu, hypertonus delohy, zápachajúci poševný výtok, vzostup CRP/leukocytov nad 18 tis v krvi matky (*Gibbs and Duff, 1991*).
5. nevysvetliteľné krvácanie z delohy (*Ananth and Vintzileos, 2006*)

3.2.5 Dôsledky predčasného pôrodu

Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) umrie každoročne približne 1 milión detí na následky predčasného pôrodu, pričom nedonosenosť je jedným z najčastejších dôvodov úmrtia detí pod 5 rokov (*WHO, 2018*).

Medzi najčastejšie dôsledky predčasných pôrodov patrí:

- novorodenecká morbidita, ktorá je zapríčinená nevyzrelosťou ich orgánových systémov
- vnútrokomorové krvácanie (IVH) alebo periventrikulárna leukomalácia (PVL), postihujúce centrálny nervový systém, ktoré by mohli neskôr spôsobiť mentálnu retardáciu alebo detskú mozgovú obrnu (DMO)
- syndrómom dychovej tiesne (RDS), ohrozujúci pľúca, ktorý môže viesť ku rozvoju bronchopulmonálnej dysplázie (BPD), nekrotizujúcej enterokolitíde, či retinopatii (*Koucký et al., 2014*)

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či sa líši expresia vybraných membránových transportérov medzi placentami tehotných žien s diagnostikovanou ruptúrou plodových obalov, u žien, u ktorých nastal spontánny predčasný pôrod, čiže plodové obaly zostali neporušené, a u žien, ktoré rodili v termíne.

Placenty tých žien, ktorým bola preukázaná ruptúra plodových obalov, sa navyše rozdelili do skupín podľa toho, či im bola diagnostikovaná HCA, MIAC, oba stavy alebo ani jeden z uvedených.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

- TriReagent® (TR 118, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)
- Chemikálie pre izoláciu RNA a agarózovú elektroforézu:
 - Izopropanol
 - Chloroform
 - Ethanol
- Aqua pro injectione
- Agaróza
- Tris
- EDTA
 - kyselina octová (všetko v čistote pre molekulárnu biológiu, dodávateľ fi MERCK/Sigma (Darmstadt, Nemecko))
 - GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc., Fremont, CA USA)
- Gb Reverse Transcription Kit (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- PCR gene expression assays (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, MA USA) pre kvantitatívnu PCR analýzu
 - génov kódujúcich nasledujúce transportéry: *ABCB1*, *ABCG2*, *OATP1B1*, *OATP1B3*, *OATP2A1*, *OATP2B1*, *OATP3A1*, *OATP 4A1*
 - referenčných génov: *HPRT*, *beta-2-microglobulin*, *YWHAZ*, *ubiquitin*, *GAPDH*
- TaqMan™ Universal Master Mix II (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, MA USA)

5.2 METODIKA

Prvotné spracovanie placentárnych tkanív

Placenty boli poskytnuté tehotnými ženami vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové spolu s informovaným súhlasom, schváleným etickou komisiou FN HK. Malé kusy vilózneho tkaniva sa odobrali z troch odlišných kotyledónov do 30 minút od pôrodu, následne boli buď rovno spracované, alebo zamrazené pri -80 °C.

Celkom bolo hodnotených 51 placent predčasných pôrodov a 15 placent získaných po spontánnom pôrode v termíne. Klinické údaje ohľadom diagnostikovanej histologickej chorioamnitídy a prítomnosti mikrobiálnej infekcie boli získané od doc. MUDr. Mariana Kacerovského, Ph.D. Mikrobiálna infekcia pritom bola hodnotená na základe pozitívnej PCR analýzy pre gény identifikujúce *Ureaplasma species*, *M. hominis* či *C. trachomatis* alebo na základe pre gén kódujúcu 16S rRNA po kultivácii vzorky plodovej vody.

Izolácia RNA z placentárnych tkanív (fenol-chloroformová extrakcia)

Jednotlivé placentárne vzorky boli rozmrazené, a z celkového množstva sa odobralo 50 – 100 mg tkaniva pre izoláciu RNA, toto tkanivo sa 3x opláchlo vo fosfátovom pufré pre odstránenie zvyškov materskej krvi a krvných elementov. Oddelené tkanivo bolo vložené do viálky s TRI reagentom (1ml TRI reagentu odpovedá 100 mg tkaniva) a homogenizované pomocou homogenizátoru na ľade dvakrát po sebe, v dvadsať sekundových pulzoch (aby nedošlo k prehriatiu tkaniva).

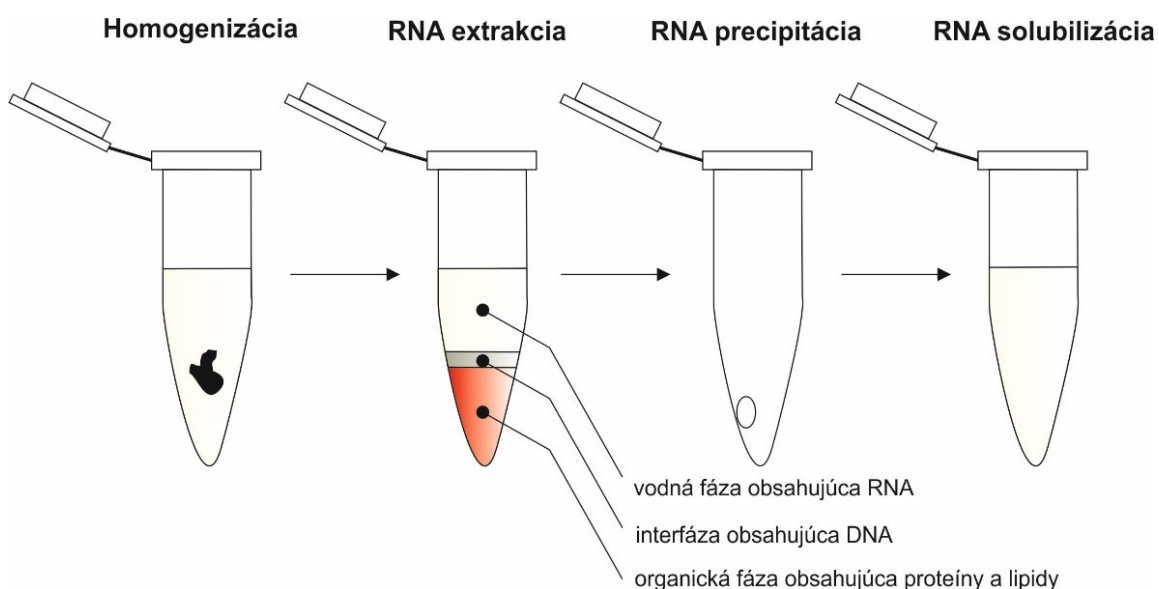
Ku zhomogenizovaným vzorkám sa pridal chloroform (200 µl chloroformu odpovedá 1 ml použitého TRI reagentu). Vzorky boli dôkladne pretrepané po dobu 15 s a centrifugované pri 12 000 g po dobu 15 min pri 4 °C. Počas centrifugácie sa oddelili 3 fázy: vodná fáza, obsahujúca RNA, medzifáza s DNA, a organická fáza s proteínmi a lipidmi (Obr. 3).

Do Eppendorfových skúmaviek bola odobratá vodná fáza. Ku prenesenej fáze sa pridal izopropanol (500 µl izopropanolu odpovedá 1 ml použitého TRI reagentu). Takto pripravená zmes bola premiešaná a inkubovaná pri laboratórnej teplote pre precipitáciu

RNA. Po uplynutí 10 min boli vzorky vložené do centrifugy pri 12 000 g po dobu 10 min pri 4 °C, čím došlo ku vytvoreniu bielej pelety RNA na stenách skúmaviek (Obr. 3).

Následne bol izopropanol odsatý, pelety premyté 75 % etanolom (1 ml etanolu odpovedá 1 ml použitého TRI reagentu), a centrifugované pri 12 000 g pri 4 °C. Tento krok bol opakovaný dvakrát. Po 5 min sa za pomoci pipety odstránil etanol, a zvyšná časť sa nechala odpariť.

Nakoniec boli pelety rozpustené v 10 - 40 μ l API. Celý proces separácie prebiehal na ľade, aby nedošlo ku degradácii RNA.



Obr 3: Izolácia RNA

Meranie čistoty a koncentrácie RNA

Koncentrácia a čistota vyizolovanej RNA sa merala na spektrofotometre NanoDrop. Koncentrácia bola meraná v ng/ μ l, čistota zasa pomerom absorbancií pri špecifických vlnových dĺžkach.

Pomer absorbancií pri 260 a 280 nm sa pohyboval v intervale hodnôt 1.8 - 2.2, čím sa vylúčila kontaminácia proteínmi a DNA. Pomer absorbancií pri vlnovej dĺžke 260 a 230 nm sa zasa pohyboval nad hodnotu 1.7, nižší pomer signalizoval kontamináciu organickými látkami.

Pred reverznou transkripciou boli vzorky nariadené na koncentráciu ~ 500 ng/ μ l pomocou API, a znova zmerané na NanoDrope (Thermo Scientific).

Agarózová elektroforéza

Elektroforéza na 1,5 % agarózovom géle bola použitá pre overenie integrity RNA a prípadnej kontaminácie DNA.

Tento gél sa pripravil rozpustením:

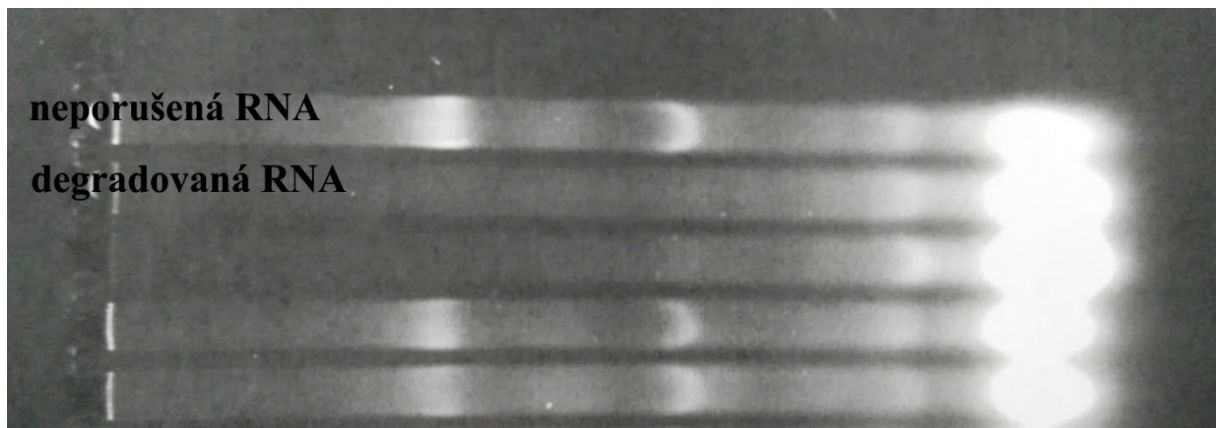
- 0.6 g agarózy
- 40 ml TAE pufru (4 mM Tris, 1 mM disodná sůl EDTA, 2 mM ľadovej kyseliny octovej, destilovanej vody)
- 4 μ l Gel Red

Vzorka pre elektroforézu sa pripravila zmiešaním:

- 3 μ l API
- 1 μ l Gel Loading Dye Blue
- 2 μ l izolovanéRNA (ried. 500 μ g/ μ l)

Do každej jamky v stuhnutom géle sa napipetovalo 6 μ l pripravenej vzorky, ktoré sa následne vyvíjali približne po dobu 1 h.

Výsledky boli zobrazené a vyhodnocené na BIO-RAD ChemiDocTMMP Imaging System (Obr. 4).



Obr. 4: Elektroforéza RNA na agarózovom géle. Zobrazený je výsledok piatich náhodných vzoriek RNA izolovaných z placent, s rozlíšením vzorky s intaktnou RNA, a pravdepodobne do určitej miery degradovanou RNA.

Reverzná transkripcia

Všetky vzorky s vyizolovanou neporušenou RNA boli pomocou reverznej transkripcie prepísané do komplementárnej DNA za pomoci:

- 10 μ l RT kitu
- 2 μ l RNA (c=500 ng/ μ l \rightarrow celkovo 1000 ng v reakcii)
- 8 μ l API

Reverzná transkripcia bola realizovaná jedнокrokovu pri teplote 42 °C pomocou Bio-Rad T100TM thermal cykléru. Po dokončení sa pripravená cDNA zriedila na koncentráciu 25 ng/ μ l pre PCR.

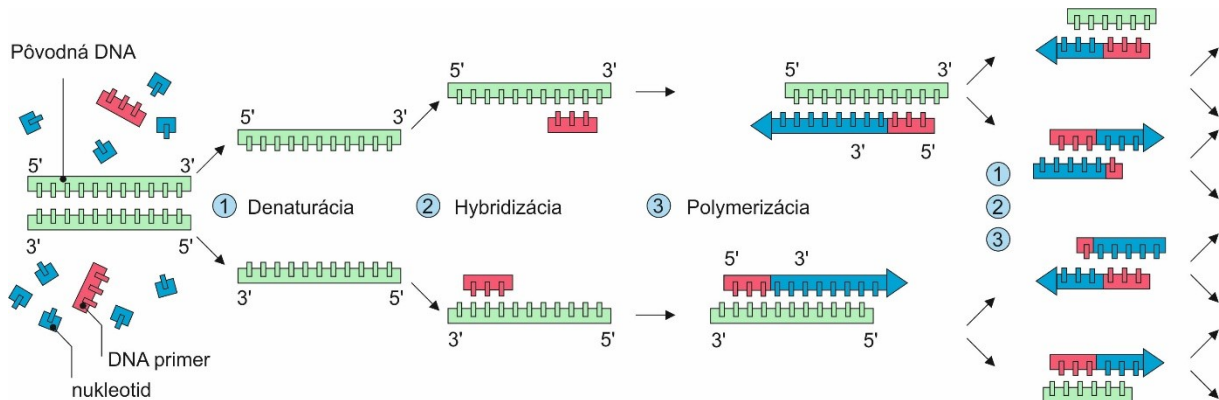
qRT-PCR (kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia)

Prepísaná cDNA bola amplifikovaná pomocou PCR, a expresia génov kódujúcich študované transportné proteíny bola kvantifikovaná v reálnom čase.

Princípom PCR je replikácia určitého úseku nukleovej kyseliny. Tento úsek (amplikon) je ohraničený dvojicou primérov, ktoré sú komplementárne s úsekom cieľového génu.

Počas PCR sa cyklicky opakujú 3 kroky (Obr. 5):

1. denaturácia dvojvláknovej chromozomálnej DNA - dôjde ku prerušeniu väzieb medzi reťazcami
2. hybridizácia - pripojenie primérov
3. polymerizácia - syntéza nových vlákien



Obr. 5 Schematické znázornenie cyklu PCR (graficky upravené podľa AIDSinfo)

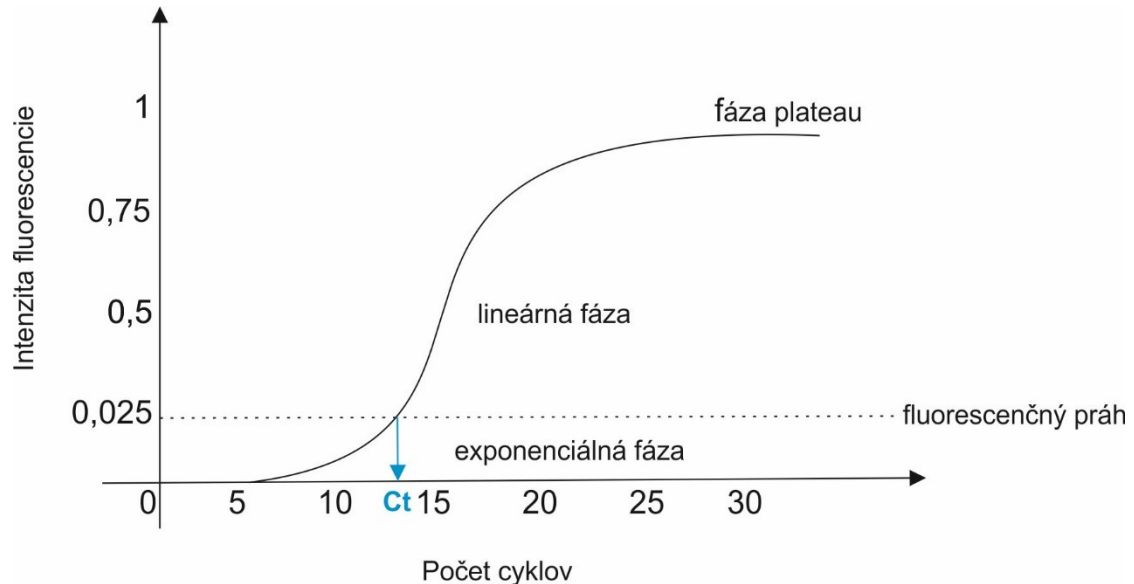
Výsledkom je znásobenie pôvodného počtu na 2^n krát (n = počet cyklov) (Šmarda et al., 2005, Křemen and Stríbrná, 1998).

Pri kvantitatívnej PCR v reálnom čase sa využíva cyklér, ktorý zaznamenáva množstvo DNA počas každého cyklu.

Tento proces je možné rozdeliť do štyroch fází (Obr. 6):

1. fáza – malé množstvo DNA spôsobuje nízku intenzitu fluorescence, a tým nedochádza k presahu pozadia
2. fáza = exponenciálna – DNA je v takom množstve, že fluorescencia presahuje úroveň pozadia (fluorescenčný prah) a je schopné ju detekovať. Ideálnym stavom je nárast DNA ako 2^n (n = počet cyklov). Množstvo templátovej DNA sa zisťuje podľa intenzity fluorescence a množstva DNA.
3. fáza = lineárna – v tejto fáze dochádza ku prudkému nárastu fluorescence, vďaka veľkému množstvu uvolnenej génovo špecifickej sonde a teda počtu templátov DNA

4. fáza = plateau – prítomné je veľké množstvo templátovej DNA, ale kinetika reakcie sa spomalí, pretože dochádza ku spotrebovaniu niektorých zložiek reakcie.



Obr. 6: Štyri fázy v priebehu PCR

Výsledkom PCR sú hodnoty Ct (cycle of threshold), odrážajúci cyklus, v ktorom dôjde k nárastu fluorescence nad prah pozadia, pričom je možné ju detekovať. Obecne platí, že čím je hodnota Ct vyššia, tým menej templátovej DNA bolo v reakcii.

Rôzne vzorky sa dajú porovnávať pomocou hodnôt Ct, výsledkom je ΔCt ($Ct_{\text{vzorka č.1}} - Ct_{\text{vzorka č.2}}$). Za použitia vhodného referenčného génu (tzv. „housekeeping gén“, ktorého transkripcia je približne rovnaká u všetkých testovaných vzoriek) ako kontroly, sa ΔCt vypočíta ako $Ct_{\text{vzorka}} - Ct_{\text{referenčný gen}}$ a následne sa táto hodnota vloží do vzorca $2^{-\Delta Ct}$.

Aby sa dali jednotlivé vzorky medzi sebou porovnávať, vyberie sa jedna referenčná vzorka, na ktorú sa vztiahnu všetky ostatné vzorky za použitia vzorca $2^{-\Delta Ct_{\text{vzorka}}/2^{-\Delta Ct_{\text{referenčná vzorka}}}$ (*LAB Guide*).

K jednotlivým cDNA (1 μl) boli pridávané tieto zložky:

- 5 μl TaqMan™ Universal Master Mix II
- 0.5 μl PCR genová expresní esej 3.5 μl API

Všetky vzorky boli analyzované v triplikátoch, a profil PCR amplifikácie bol nasledujúci: 95 °C 10 minút, následne 40 cyklov pri 95 °C na 15 s, a 60 °C po dobu 60 s. Pre každý gén sa použili negatívne kontroly, obsahujúce API bez cDNA, a náhodne vybraná referenčná vzorka placenty (kalibrátor), opakovaná pri všetkých analýzach.

Expresia jednotlivých génov sa stanovila pomocou komparatívnej Ct metódy. Analyzovaná bola expresia celkom 8 génov pre membránové transportéry (ABCB1, ABCG2, OATP1B3, OATP1A2, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1) a 5 tzv. housekeeping génov (ubikvitín, YWHAZ, B2M, GAPDH, HPRT).

Pri každom géne boli spočítané Ct hodnoty, ktoré sa porovnali s housekeeping génami, s výsledkom ΔCt . Finálna hodnota bola vypočítaná pomocou vzorca $2^{-\Delta Ct}$, a následne porovnaná s referenčnou vzorkou (kalibrátorom).

5.3 ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Ku grafickému spracovaniu a vyhodnoteniu štatistickej analýzy bol použitý program GraphPad Prism 8. Štatistická významnosť bola hodnotená pomocou neparametrického Kruskal-Wallis testu a Dunnovho post testu, popr. Mann-Whitney testu.

Za štatisticky významné sa považujú hodnoty, u ktorých je $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****). Hodnoty, u ktorých je $p \geq 0,05$, sú štatisticky nevýznamné.

6 VÝSLEDKY

6.1 STANOVENIE VHODNÉHO REFERENČNÉHO GÉNU

Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia je účinným nástrojom na stanovenie hladiny génovej expzie na úrovni mRNA. Vytvorenie spoľahlivých výsledkov si však vyžaduje niekoľko krokov, ktoré musia byť dodržané. Dôležitým krokom je výber stabilných referenčných génov mRNA, aby bola dosiahnutá presná normalizácia. Nesprávny výber referenčného génu by mohol viesť ku nepresným výsledkom.

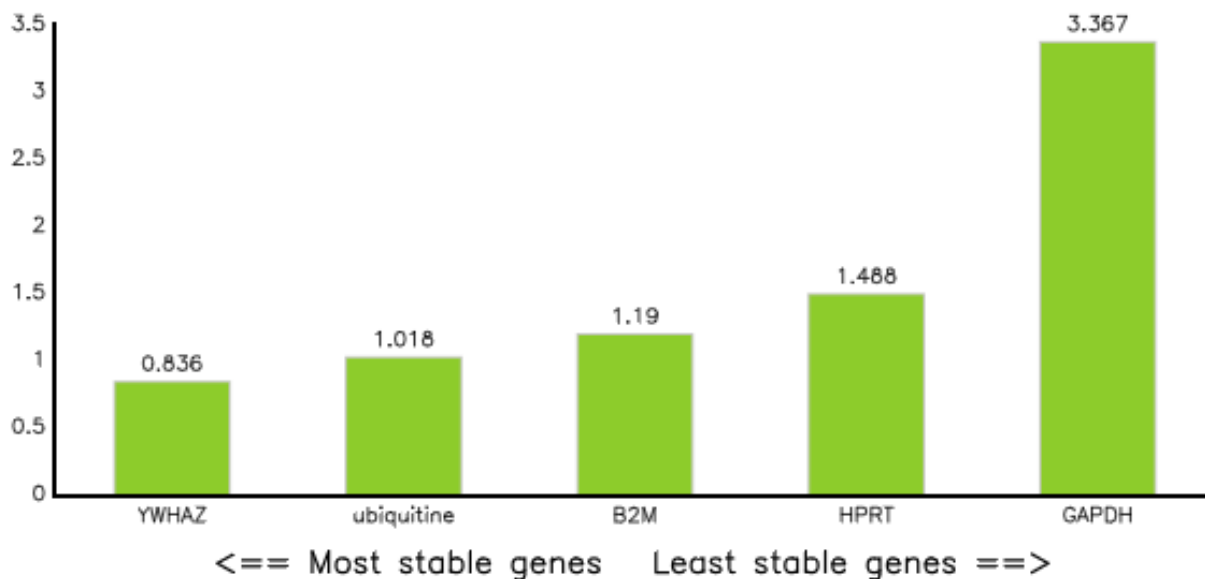
Referenčné gény sú nevyhnutné pre normálnu funkciu buniek. Očakáva sa, že tieto gény budú mať stabilnú úroveň expzie mRNA vo všetkých testovaných typoch buniek a podmienkach (*St-Pierre et al., 2017*). Stabilita referenčného génu je však relatívna, a úroveň expzie použitého referenčného génu môže byť za rôznych podmienok nestabilná (*Gutierrez et al., 2008*).

Na vyhodnotenie variability referenčných génov sa používa niekoľko softvérových možností ako BestKeeper, geNorm, NormFinder či Delta Ct. V tejto práci bol použitý internetový nástroj RefFinder, ktorý kombinuje všetky spomínané metódy, a umožňuje tak vyhodnotiť najstabilnejší gén.

6.1.1 Stanovenie vhodného referenčného génu metódou BestKeeper

Metóda BestKeeper odhaduje stabilitu expzie referenčných génov výpočtom a porovnaním odchýlok, použitím variačného koeficientu (CV) a štandardnej odchýlky (SD). Najstabilnejší referenčný gén sa vyberie na základe veľkosti SD hodnoty. Hodnoty SD referenčných génov boli negatívne korelované so stabilitou génu, čo naznačuje, že najnižšia hodnota SD vykazuje najvyššiu stabilitu (*Pfaffl et al., 2004; Wang et al., 2017*).

Pri porovnávaní génov YWHAZ, ubikvitín, B2M, HPRT, GAPDH metódou BestKeeper, vyšiel ako najstabilnejší gén YWHAZ, za ním nasledoval ubikvitín, B2M, HPRT, a ako najmenej stabilný gén sa ukázal gén GAPDH (Obr. 7).

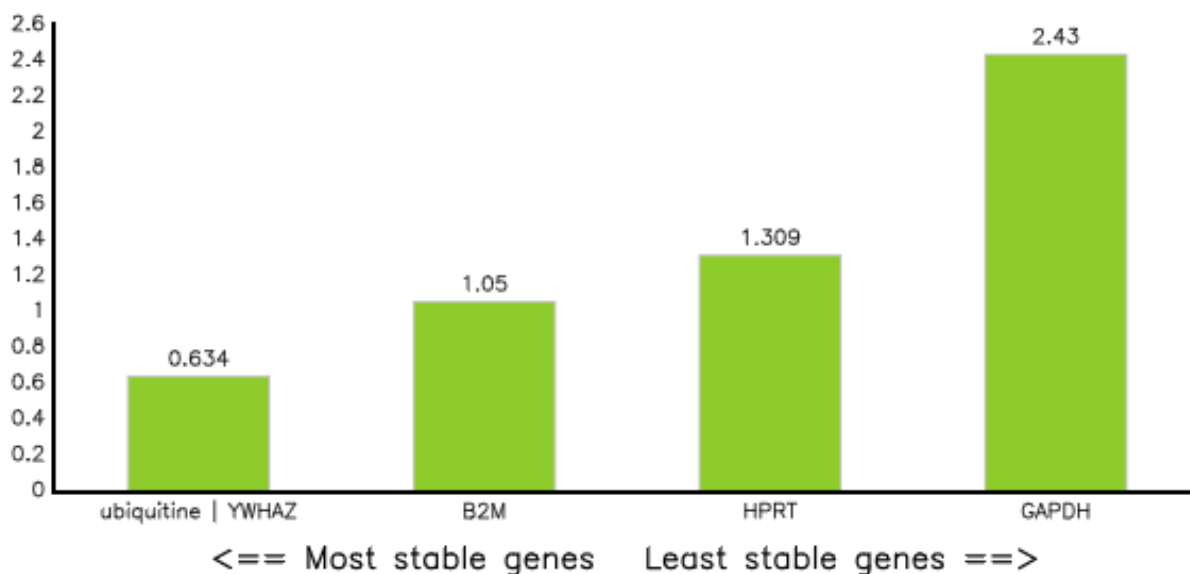


Obr. 7: Stanovenie vhodného referenčného génu pomocou metódy BestKeeper

6.1.2 Stanovenie vhodného referenčného génu metódou geNorm

Ďalšou metódou na určenie vhodného referenčného génu bola metóda geNorm. Táto metóda určuje najstabilnejší gén pomocou porovnania normalizačného faktoru každého génu. geNorm definoval hodnotu M , ako mieru stability expresie, ktorá opisuje priemernú párovú variáciu jedného vybraného génu, vzhľadom na všetky ostatné študované gény. Testovaný gén vzorky s najnižšou hodnotou M vykazuje najstabilnejšiu expresiu a naopak (Vandesompele et al., 2002; Wang et al., 2017).

V prípade génov, študovaných v rámci tejto práce, vyšli ako najstabilnejšie gény hneď dva, a to YWHAZ a ubikvitín. Za nimi nasledoval B2M, HPRT a nakoniec GAPDH (Obr. 8).

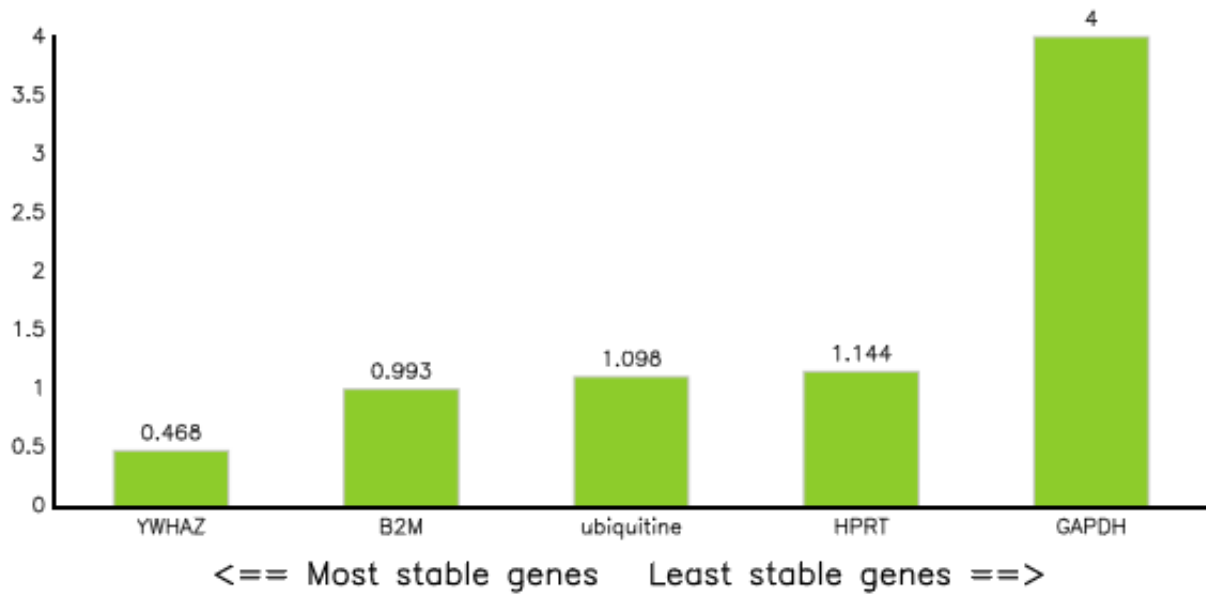


Obr. 8: Stanovenie vhodného referenčného génu pomocou metódy GeNorm

6.1.3 Stanovenie vhodného referenčného génu metódou NormFinder

NormFinder metóda bola treťou metódou v poradí, ktorá bola použitá na stanovenie vhodného referenčného génu. Je založená na odhade intra- a inter-skupinových variácií. Predpokladá sa, že gén s najnižšou hodnotou stability vykazuje najstabilnejšiu expresiu a naopak (Andersen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2018).

Táto metóda považovala za najstabilnejší gén YWHAZ, rovnako, ako to stanovili ostatné metódy. Zmena nastala na druhom a treťom mieste, kde si vymenili poradie B2M a ubikvitín. Medzi najmenej stabilné gény patrili HPRT a GAPDH (Obr. 9).

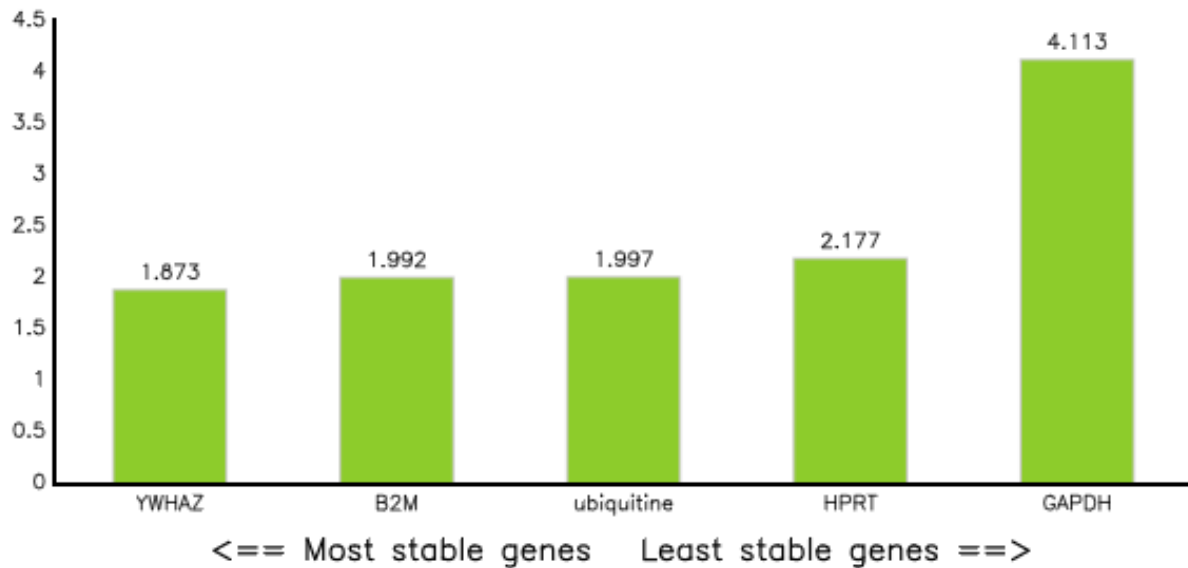


Obr. 9: Stanovenie vhodného referenčného génu pomocou metódy NormFinder

6.1.4 Stanovenie vhodného referenčného génu metódou Delta Ct (ΔCt)

Porovnávacia metóda ΔCt identifikuje optimálne referenčné gény porovnaním relatívnej expzie páru génov v každej vzorke. Ak hodnota ΔCt medzi týmito dvoma génmi zostáva konštantná, potom sú oba gény stabilné. Ak však hodnota ΔCt kolíše, potom jeden, alebo oba gény majú nestabilnú expresiu (*Silver et al., 2006; Wang et al., 2018*).

Porovnávacia metóda ΔCt vyhodnotila za najstabilnejší gén YWHAZ, za ním B2M, ubikvitín, HPRT a nakoniec GAPDH (Obr. 10). Výsledky boli rovnaké ako u predchádzajúcej NormFinder metódy.

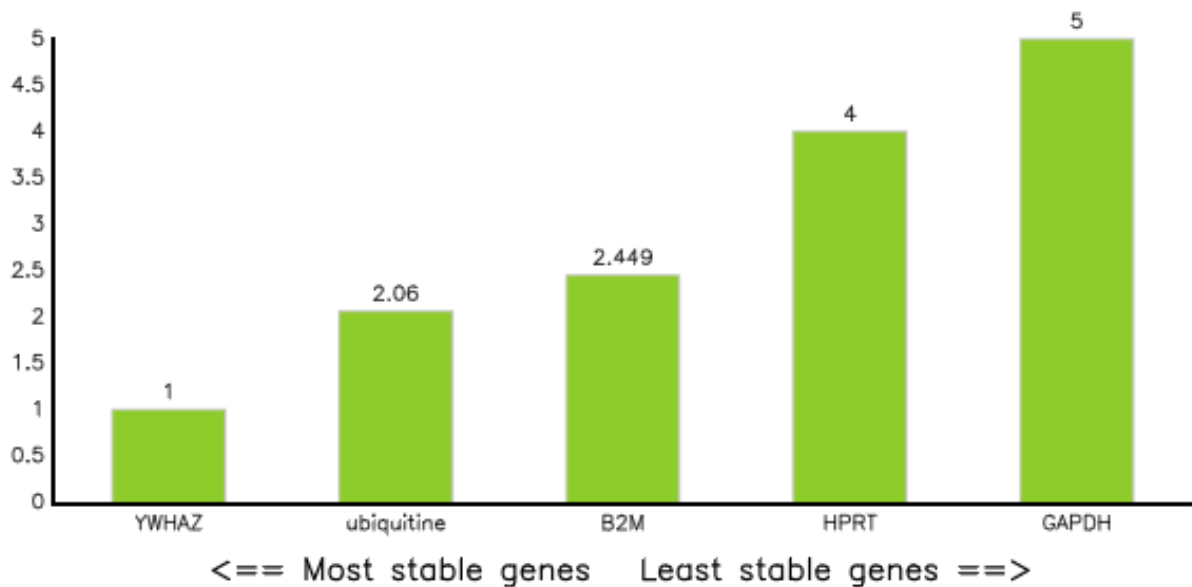


Obr. 10: Stanovenie vhodného referenčného génu pomocou metódy ΔC_t

6.1.5 Komplexné hodnotenie vhodného referenčného génu

Komplexné hodnotenie referenčných génov využíva výsledky poradi z predchádzajúcich štyroch metód (BestKeeper, geNorm, NormFinder a komparatívna ΔC_t metóda), a z týchto výsledkov pomocou geometrického priemeru určí vlastné poradie (*Chen et al., 2011; Wang et al., 2018*).

Zo všetkých meraní vyšiel najlepšie YWHAZ. Na ďalšom mieste bol ubikvitín, nasledoval B2M, HPRT, a za najmenej stabilný gén je považovaný GAPDH (Obr. 11).



Obr. 11: Stanovenie vhodného referenčného génu pomocou komplexného hodnotenia

Na základe jednotlivých výsledkov z použitých metód, bol za vhodný referenčný gén vybraný YWHAZ.

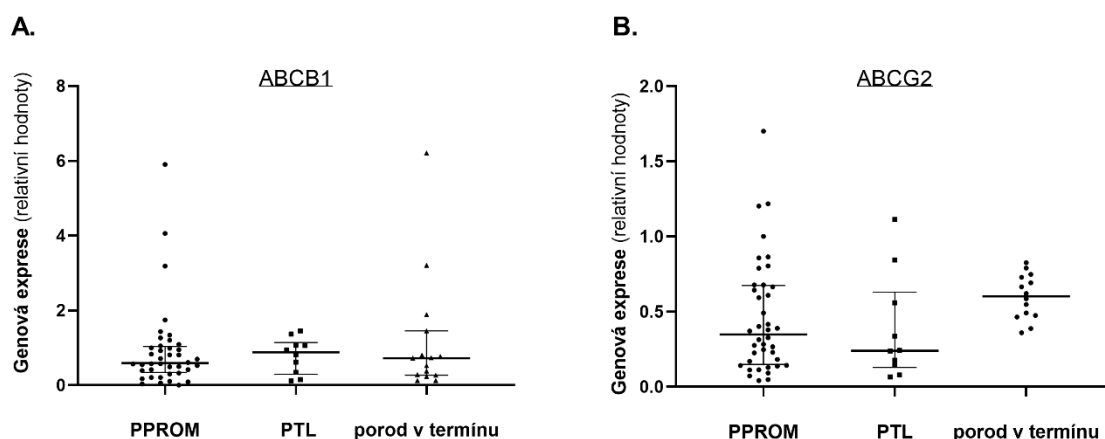
6.2 VÝSLEDKY EXPRESIE JEDNOTLIVÝCH TRANSPORTÉROV

Pri hodnotení expresie jednotlivých génov bola použitá metóda qRT-PCR. Výsledky získané z tejto metódy, Ct hodnoty, sa prepočítali na referenčný gén (YWHAZ), a následne boli vzťahované na referenčnú vzorku, aby ich bolo možné medzi sebou porovnávať.

Placenty boli rozdelené do skupín podľa toho, či boli získané z PTL, PPRM, alebo to boli placenty zdravých rodičiek, ktoré rodili v termíne. Celkovo bolo hodnotených 41 placent pre PPRM, 10 placent pre PTL a 15 termínových placent.

6.2.1 Výsledky expresie ABC transportérov

Expresia *ABCB1* bola detekovaná vo všetkých vzorkách placent, PPRM, PTL aj placent z pôrodu v termíne. Obdobne sme pozorovali vo všetkých vzorkách analyzovaných placent aj expresiu *ABCG2*. Medzi jednotlivými hodnotenými skupinami však nebola pozorovaná žiadna štatistická významnosť v expresii *ABCB1* ani *ABCG2* (viz Obr. 12).



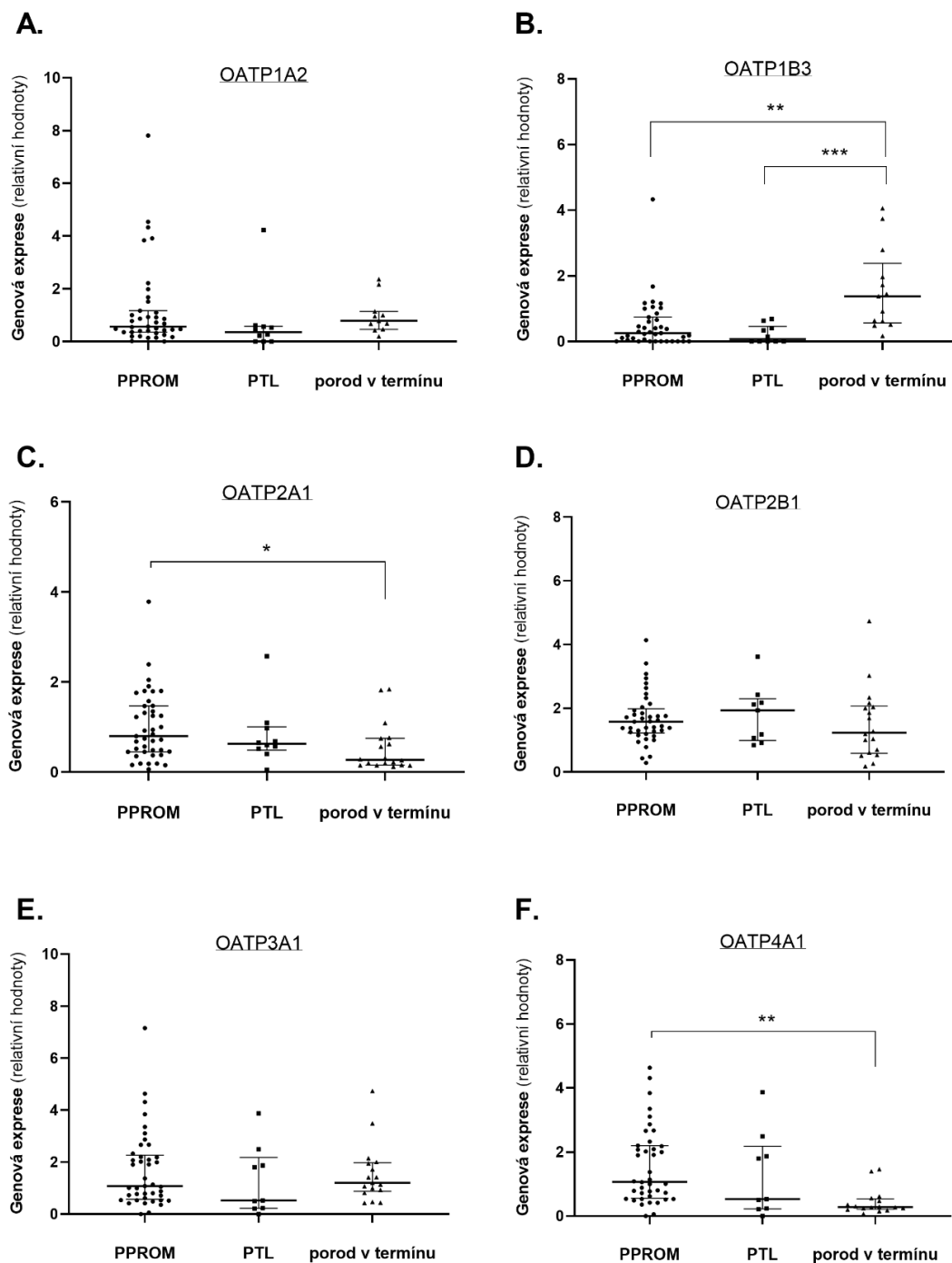
Obr. 12: Grafické spracovanie výsledkov expresie ABC transportérov, rozdelených do troch skupín PPROM, PTL a pôrod v termíne. PPROM – predčasná ruptúra plodových obalov, PTL – spontánny predčasný pôrod. Štatistická významnosť bola zhodnocovaná pomocou neparametrického Kruskal-Wallis testu, nasledovaný Dunnovým testom.

6.2.2 Výsledky expresie OATP transportérov

Pri hodnotení expresie OATP transportérov bol použitý rovnaký postup, ako u hodnotenia expresie ABC transportérov. Expresia *OATP1A2* bola detekovaná vo všetkých placentách termínových pôrodov, u predčasných pôrodov bola pozorovaná u 7 z 10 vzoriek PTL, a u 40 z 41 vzoriek PPROM. Transkripty pre *OATP1B3* boli tiež prítomné vo všetkých placentách odoberaných na konci 3. trimestru, u predčasných pôrodov však neboli detekované u piatich, tj. polovice placent z PTL, a u 10 placent z PPROM. Expresia *OATP2A1* aj *OATP2B1* potom bola nájdená vo všetkých hodnotených placentách predčasných i termínových pôrodov. Transkripty pre *OATP3A1* i *OATP4A1* sme potom detekovali vo všetkých placentách pôrodov v termíne, a chýbali vždy po jednom zo vzoriek PTL a PPROM.

Zároveň sme pozorovali rozdielnú expresiu troch zo šiestich OATP medzi placentami PPROM a z termínových pôrodov. Konkrétne u *OATP2A1* a *OATP4A1*, bola výraznejšia expresia v placentách na konci tehotenstva oproti PPROM, zatiaľ čo u transportéru *OATP1B3* bola naopak vyššia expresia v terminálnych placentách oproti PTL i PPROM (Obr. 13). U zvyšných troch OATP transportérov, konkrétne *OATP1A2*,

OATP2B1 a *OATP3A1* nebol pozorovaný žiadny rozdiel v expresii medzi jednotlivými skupinami placent (Obr. 13).



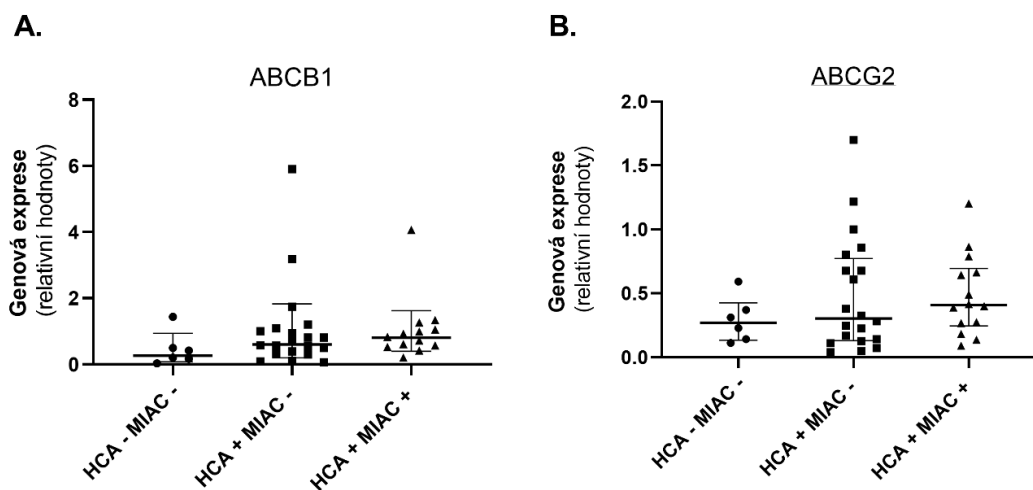
Obr. 13: Grafické spracovanie výsledkov expresie *OATP* transportérov, rozdelených do troch skupín PPROM, PTL a pôrod v termíne. PPROM – predčasná ruptúra plodových obalov, PTL – spontánny predčasný pôrod. Štatistická významnosť bola zhodnocovaná pomocou neparametrického Kruskal-Wallis testu, nasledovaná Dunnovým testom. Za štatisticky významné sa považovali hodnoty, u ktorých $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

6.3 VÝSLEDKY EXPRESIE JEDNOTLIVÝCH TRANSPORTÉROV V RÁMCI PODSKUPINY PPRM

6.3.1 Výsledky expresie ABC transportérov

Expresia jednotlivých transportérov získaných z placent, pri ktorých nastala predčasná ruptúra plodových obalov, sa navyše hodnotila aj v rámci troch skupín podľa toho, či bol prítomný zápal alebo nie, a či bola detekovaná aj mikrobiálna infekcia alebo nie.

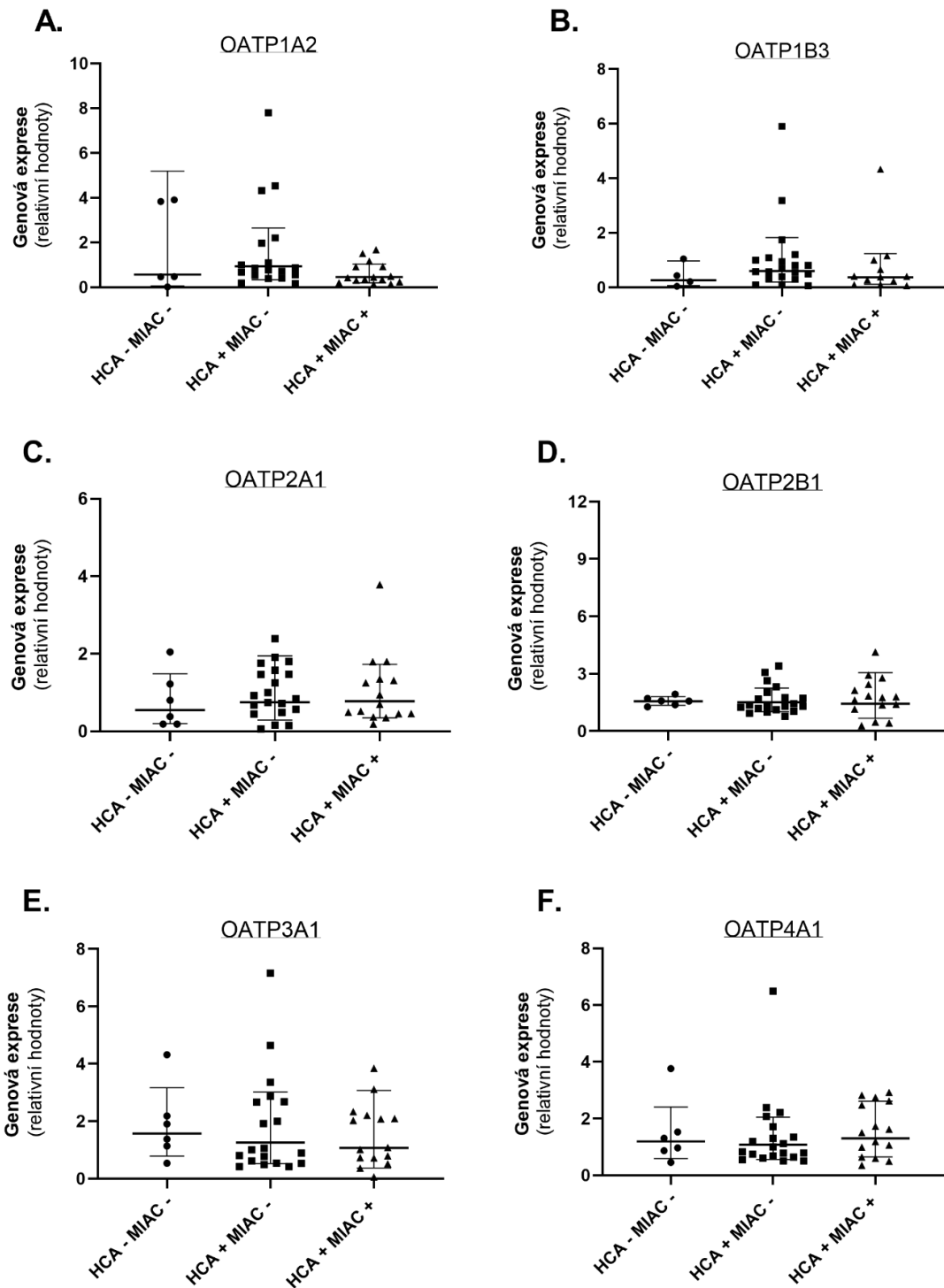
Postup celého hodnotenia expresie ABC transportérov bol rovnaký, ako v predošlých dvoch prípadoch. U expresie transportérov *ABCB1* a *ABCG2* sme nepozorovali medzi jednotlivými skupinami žiadnu štatistickú významnosť (Obr. 14).



Obr. 14: Grafické spracovanie výsledkov expresie ABC transportérov, rozdelených do troch skupín podľa prítomnosti zápalu plodových obalov a mikrobiálnej invázie plodovej vody. HCA-MIAC-, HCA+MIAC-, HCA+MIAC+. HCA – histologická chorioamnionitída, MIAC – mikrobiálna invázia amniotickej dutiny. Štatistická významnosť bola zhodnocovaná pomocou neparametrického Kruskal-Wallis testu, nasledovaná Dunnovým testom.

6.3.2 Výsledky expresie OATP transportérov

Rovnaký postup bol zopakovaný aj u experimentu s OATP transportérmi. Opäť sa nepreukázala žiadna významnosť medzi zmenou expresie u jednotlivých skupín OATP transportérov za pomoci neparametrického Kruskal-Wallis testu a Dunnovho testu (Obr. 15).



Obr. 15: Grafické spracovanie výsledkov exprese OATP transportérov, rozdelených do troch skupín podľa prítomnosti zápalu plodových obalov a mikrobiálnej invázie plodovej vody. HCA-MIAC-, HCA+MIAC-, HCA+MIAC+, HCA – histologická chorioamnionitída, MIAC – mikrobiálna invázia amniotickej dutiny. Štatistická významnosť bola zhodnocovaná pomocou neparametrického Kruskal-Wallis testu, nasledovaná Dunnovým testom

7 DISKUSIA

Placenta, a jej náležitá funkcia, je pre správny vývoj plodu nevyhnutná. Medzi jednu z jej kľúčových funkcií patrí transportná funkcia, ktorá má zabezpečovať výmenu látok medzi matkiným organizmom a organizmom plodu (*Smith et al., 1992; Ganapathy et al., 2000*). Tento dej sa uskutočňuje pomocou niekoľkých mechanizmov, pričom jedným z najvýznamnejších je prestup s pomocou membránových transportných proteínov. Zatiaľ čo ABC transportéry plnia predovšetkým ochrannú úlohu plodu pred potenciálne škodlivými látkami prítomnými v krvi matky, SLC transportéry sú pokladané za kľúčovú cestu pre detoxikáciu plodu od látok povahy organických aniontov, a transport steroidných hormónov, prostaglandínov i tyroidálnych hormónov cez placentu.

Membránové transportéry sú vo všeobecnosti ovplyvňované a regulované radou vnútorných a vonkajších faktorov, čo znamená, že ich expresia sa počas tehotenstva môže meniť. Tieto zmeny môžu odrážať fyziologické prispôbenie sa organizmu na meniace sa požiadavky voči ochrane plodu, najmä na začiatku tehotenstva (*Staud and Ceckova, 2015; St-Pierre et al., 2004*).

Miera expresie a funkcie placentárnych transportérov sa mení v závislosti na gestačnom veku. Pokým expresia *ABCB1*, a ním kódovaného P- glykoproteínu, viditeľne klesá na konci tehotenstva (*Mathias et al. 2005; Sun et al., 2006*), štúdie na *ABCG2* nie sú úplne jednotné a naznačujú, že by sa množstvo *ABCG2* transportérov počas tehotenstva nemalo nijako príliš meniť, a na konci tehotenstva by malo byť vyššie ako u *ABCB1* (*Mathias et al., 2005; Yeboah et al., 2006*). Naopak, jeho proteín sa vyskytoval na konci tehotenstva vo väčšej miere ako na začiatku, čo *Yeboah et al. (2006)* pripísal posttranskripčným zmenám, kde hlavnú úlohu zohrávajú estrogén a progesterón. Iná štúdia ale ukázala, že expresia *ABCG2* sa gestačným vekom znižuje (*Meyer et al., 2006*). Taktiež u OATP transportérov boli pozorované zmeny v priebehu gestácie v závislosti na rozvoji expresie priamo v tkanivách plodu (*St-Pierre et al., 2004*).

Na zmene expresie membránových transportérov sa vo všeobecnosti podieľajú aj patofyziologické zmeny v organizme. To platí aj u placenty. Dôvodom prečo to tak je, môže byť samotná patológia, ktorá spôsobí zmenu vnútorného prostredia, alebo je to kvôli liekom, používaných na liečbu týchto patológií (*Staud and Ceckova, 2015*). Expresia transportérov,

a tým aj transportná funkcia placenty, tak môže byť ovplyvnená faktormi, ako je hypoxia, v priebehu preeklampsie, či intrauterínnej rastovej restriktie (*Han et al., 2018; Staud and Ceckova, 2015; Javam et al., 2014; Lye et al., 2013*). Ďalšie patológie, ktoré by mohli ovplyvniť expresiu sú gestačný diabetes mellitus (*Ruchat et al., 2013; Anger et al., 2012*), intrahepatálna cholestáza (*Cui et al., 2009*), HIV (*Camus et al., 2006*), či nádorové ochorenia (*Staud and Ceckova, 2015*).

Predčasný pôrod je problém, ktorý sa objavuje u 5-18 % tehotenstiev a predstavuje jeden z hlavných dôvodov perinatálnej mortality i morbidity. Intrauterínne infekcie, či chorioamnionitída, sú zodpovedné až za 40 % všetkých prípadov predčasných pôrodov (*Koucký et al., 2014, Challis at al, 2009*). Zápal a infekcie pritom predstavujú jeden z faktorov, ktoré by mali mať schopnosť ovplyvniť expresiu predovšetkým ABC transportérov v placente (*Bloise et al., 2016*).

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium expresie ABC transportérov a OATP transportérov v placentách predčasných pôrodov, a to na úrovni mRNA expresie analyzovanej pomocou kvantitatívnej RT-PCR. Jej základom je aj voľba vhodného referenčného génu. Preto jedným z hlavných cieľov bolo tiež porovnanie expresie piatich často používaných houskeeping génov v celej kohorte študovaných vzoriek. Pomocou metód BestKeeper, geNorm, NormFinder či Delta Ct sme identifikovali ako najstabilnejší gén YWHAZ, naopak, ako najmenej stabilný (s najvyššou variabilitou) sa ukázal gén GAPDH. Tieto údaje sú v súlade s nedávnou štúdiou *Imperio et al. (2018)*.

Hlavný faktor, ktorý bol sledovaný bol zápal. Placenty získané z predčasných pôrodov boli rozdelené na základe toho, či bola u nich preukázaná histologická chorioamnionitída, mikrobiologická invázia amniotickej dutiny, obe uvedené alebo ani jedna. *Mason et al. (2011)* pozoroval relatívne vyššiu expresiu ABCB1 a ABCG2 u placent získaných z predčasných pôrodov, ako u tých, ktoré pochádzali z pôrodov v termíne. My sme na rozdiel od nej, nepozorovali významnú zmenu v expresii ABCB1 a ABCG2 transportérov medzi týmito skupinami placent. Podobne táto práca nepotvrdila, že by dochádzalo ku zmenám expresie počas uvedených stavov. Jedným z dôvodov, prečo mohlo dôjsť k odlišnostiam vo výsledkoch, je napríklad spôsob, akým boli placenty diagnostikované a získavané. O týchto údajoch nemáme presné informácie. Mohlo dôjsť k tomu, že došlo k odtoku plodovej vody, kedy boli odobraté aj vzorky pre zistenie

prítomnosti infekcie, ale nepreukázala sa bakteriálna infekcia, a tak pôrod nemusel byť vyvolaný. Následne po pôrode (kedy sa získala placenta) sa už nemuseli nadobudnuté výsledky zhodovať s realitou. Ďalším dôvodom by mohol byť napríklad rozdiel v použítom referenčnom géne, ktorý sa využil pre výpočet expresie. *Mason et al. (2011)* vo svojej štúdiu použili 18s rRNA. Ďalším dôležitým faktorom môže byť závislosť na gestačnom veku a tiež na pohlaví dieťaťa, ktorú sme v našej štúdiu nezohľadnili, a tiež celkový, relatívne nízky, počet analyzovaných vzoriek.

O membránových prenášačoch zo skupiny OATP v súvislosti s placentou toho veľa nevieme. Vie sa, že sú vo veľkej miere prítomné v tkanivách ako hepatocyty, enterocyty či hematoencefalická bariéra, a že sa jedná o influxné transportéry, ktorých úlohou je transport, najmä endogénnych látok, cez membrány smerom do vnútra (*Kalliokoski et al., 2009*). V placente sa oproti ABC transportérom nachádzajú v menšej miere. Ich expresia je ovplyvňovaná aktiváciou jadrových receptorov FXR, PXR, CAR a ďalších (*Staud and Ceckova, 2015*). *Petrovic et al. (2008)* skúmal OATP2B1 a OATP4A1 u potkanov v súvislosti so zmenou ich expresie v prítomnosti zápalu spôsobeného endotoxínom. Jeho výsledkom bolo, že sa ich expresia znižuje. V našom prípade ku zmene došlo u transportéru OATP4A1 a OATP3A1, kde ale bola expresia u skupiny PPRM vyššia, no nepotvrdilo sa, že by to súviselo so zápalom. V súvislosti s preukázanou fyziologickou funkciou oboch OATP transportérov (*Lofthouse et al., 2018*), tento výsledok naznačuje možnosť zmeny v transporte tyroidných aj steroidných hormónov v priebehu predčasných ruptúr plodových obalov. V prípade nižšej expresie OATP1B3 u predčasných pôrodov, bez ohľadu na prítomnosť zápalu či infekcie, môžeme hypotetizovať skôr o úlohe gestačného veku, než patofyziologického faktoru. Avšak pre získanie validných záverov bude nevyhnutné rozšíriť počet hodnotených vzoriek, a zohľadniť tiež ďalšie faktory prispievajúce k interindividuálnej variabilite expresie.

8 ZÁVER

Membránové transportéry v placente plnia dôležitú úlohu pri transporte endogénnych a exogénnych substrátov, a tiež zastávajú funkciu ochrannú, v podobe efluxných transportérov.

Táto diplomová práca sa zaoberá najmä štúdiom membránových transportérov zo skupiny ABC a OATP, a ich možnou zmenou expresie v placente u predčasného pôrodu. V predloženej práci boli zhrnuté základné poznatky o týchto transportéroch, spoločne s problematikou predčasných pôrodov.

Z výsledkov, ktoré boli získané pomocou metódy predloženej v tejto práci, sa dá domnievať, že počas predčasných pôrodov nedochádza ku zmene expresie vybraných ABC membránových transportérov. Zmena, ktorá nastala u jednotlivých skupín placent, bola štatisticky nevýznamná, čím sa nepotvrdili výsledky získané štúdiou *Mason et. al. (2011)*, ktoré preukázali zmenu expresie ABCB1 a ABCG2 transportéru. Taktiež u membránových transportérov OATP1A2, OATP2B1 a OATP3A1 nebol pozorovaný signifikantný rozdiel v ich expresii. Avšak, u transportérov OATP2A1 a OATP4A1 dochádza ku zmene expresie v placentách zo skupiny PPRM. Naopak, u OATP1B3 bola vyššia expresia u placent z termínových pôrodov oproti PPRM, a aj oproti PTL, čo by mohlo znamenať, že expresia OATP1B3 sa zvyšuje gestačným vekom. Výsledky zmeny expresie OATP transportérov nebolo možné porovnať s výsledkami iných štúdií, pretože sa touto problematikou podľa dostupných zdrojov zatiaľ nikto nezaoberal.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, et al. *LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers*. Gastroenterology. 2001,120:1689–1699.

Ahmadimoghaddam D, Zemankova L, Nachtigal P, et al. *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. 2013,88(3):55.

Ananth CV, Vintzileos AM. *Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes*. J Matern Fetal Neonatal Med. 2006,19:773-82.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. Cancer research. 2004,6.4:5245-5250.

Anger GJ, Cressman AM, Piquette-Miller M. *Expression of ABC Efflux transporters in placenta from women with insulin-managed diabetes*. PLoS One. 2012;7(4),e35027.

Azzaroli F, Mennone A, Feletti V, et al. *Clinical trial: modulation of human placental multidrug resistance proteins in cholestasis of pregnancy by ursodeoxycholic acid*. Aliment Pharmacol Ther. 2007,26(8):1139-46.

Azzaroli F, Raspanti ME, Simoni P, et al. *High doses of ursodeoxycholic acid up-regulate the expression of placental breast cancer resistance protein in patients affected by intrahepatic cholestasis of pregnancy*. PLoS One 2013,8(5):e64101.

Balkovetz DF. *Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability*. Am J Physiol Renal :physiol. 2006,290:572-9.

Bossuyt X, Müller M, Meier PJ. *Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver.* J Hepatol. 1996,25:733–738.

Bloise E, Ortiga-Carvalho TM, Reis FM, Lye SJ, Gibb W, Matthews SG. *ATP-binding cassette transporters in reproduction: a new frontier.* Human Reproduction Update. 2015,Vol.0, No.0:1–18.

Callaghan R, Crowley E, Potter S, Kerr ID. *P-glycoprotein: so many ways to turn it on.* J Clin Pharmacol. 2008,48(3):365-78.

Camus M, Delomenie C, Didier N, et al. *Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women.* Placenta. 2006,27(6-7):699-706.

Ceckova-Novotna M, Pávek P, Štaud F. *P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function.* Reproductive Toxicology. 2006,22(3):400-10.

Cole LA. *Biological functions of hCG and hCG-related molecules.* Reprod Biol Endocrinol. 2010;8:102. Published 2010 Aug 24. doi:10.1186/1477-7827-8-102.

Coussons-Read ME, Okun ML, Schmitt MP, Giese S. *Prenatal stress alters cytokine levels in a manner that may endanger human pregnancy.* Psychosom Med. 2005,67(4):625–631.

Coussons-Read ME, Okun ML, Nettles CD. *Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy.* Brain Behav Immun. 2007,21(3):343–350.

Crane JM, Hutchens D. *Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review.* Ultrasound Obstet Gynecol. 2008,31 (5):579-87. doi: 10.1002/uog.5323.

Cui T, Liu Y, Men X, et al. *Bile acid transport correlative protein mRNA expression profile in human placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy.* Saudi Med J. 2009,30(11):1406-10.

Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. *Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6.* J Biol Chem. 2001, 276(13):9626-30.

Čech, Evžen et al. *Porodnictví. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2006. [2] s. barev. obr. příl. ISBN 80-247-1303-9.

Čečková, Martina. *Role membránových transportérů ve farmakokinetice a mnohočetné lékové rezistenci.* Hradec Králové, 2017. Habilitačná práce (Doc.). Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie, 2017-10-10.

Ebert B, Seidel A, Lampen A. *Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists.* Carcinogenesis. 2005,26(10):1754-1763.

Ee PL, Kamalakaran S, Tonetti D, He X, Ross DD, Beck WT. *Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene.* Cancer Res. 2004,64(4):1247-1251.

Evain-Brion D, Malassine A. *Human placenta as an endocrine organ.* Growth Horm IGF Res. 2003,13:S34-7.

Flint APF, Anderson ABM, Steele PA, et al. *The mechanism by which fetal cortisol controls the onset of parturition in the sheep.* Bioch Soc Trans. 1975,3:1189-94.

Franke RM, Scherkenbach LA, Sparreboom A. *Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2.* Pharmacogenomics. 2009,10(3):339-44.

Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, et al. *Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner.* Endocrinology. 2001,142:2005–2012.

Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Remé C, et al. *Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium*. Exp Eye Res. 2005,80:61–72.

Ganapathy V, Prasad PD, Ganapathy ME, Leibach FH. *Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface*. J Pharmacol Exp Ther. 2000,294(2):413-20.

Gibbs RS, Duff P. *Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection*. Am J Obstet Gynecol. 1991,164:1317-26.

Gil S, Saura R, Forestier F, Farinotti R. *P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy*. Placenta. 2005,26(2-3):268-70.

Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. *Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans*. Clin Pharmacol Ther. 2007,81(3):362-70.

Grube M, Köck K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, et al. *Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart*. Clin Pharmacol Ther. 2006,80:607–620.

Gude, Neil M, et al. *Growth and function of the normal human placenta*. Thromb Res. 2004,114(5-6):397-407.

Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O. *The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants*. Plant Biotechnol J. 2008,6(6):609-18.

Hahnova-Cygalova L, Ceckova M and Staud F. *Fetoprotective activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2): expression and function throughout pregnancy*. Drug Metab Rev. 2011,43:53-68.

Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. *Births:Preliminary data for 2005*. Health E-Stats. Natl Vital Stat Rep. 2005,54:1-17.

Han LW, Gao C, Mao Q. *An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2018,14(8):817-829. doi: 10.1080/17425255.2018.1499726. Epub 2018 Aug 3.

Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, et al. *Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: A systematic review of controlled studies*. BMJ. 2004,328:261.

Huber RD, Gao B, Sindler Pfandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, Folkers G, Meier PJ, Stieger B. *Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007,292:C795-C806.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. *Inflammation and pregnancy*. Reprod Sci. 2009,16:206-215.

Chan HS, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeager H, Ling V. *P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma*. N Engl J Med. 1991,325(23):1608-14.

Chen D, Pan X, Xiao P, Farwell MA, Zhang B. *Evaluation and identification of reliable reference genes for pharmacogenomics, toxicogenomics, and small RNA expression analysis*. J Cell Physiol. 2011,226(10):2469-77.

do Imperio GE, Bloise E, Javam M, Lye P, Constantino A, Dunk C, Dos Reis FM, Lye SJ, Gibb W, Ortiga-Carvalho TM, Matthews SG. *Chorioamnionitis Induces a Specific Signature of Placental ABC Transporters Associated with an Increase of miR-331-5p in the Human Preterm Placenta*. Cell Physiol Biochem. 2018,45(2):591-604. doi: 10.1159/000487100. Epub 2018 Jan 29.

Iqbal M, Audette MC, Petropoulos S, et al. *Placental drug transporters and their role in fetal protection*. Placenta. 2012,33(3):137-42.

Ismair MG, Stieger B, Cattori V, Hagenbuch B, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. *Hepatic uptake of cholecystokinin octapeptide by organic anion-transporting polypeptides OATP4 and OATP8 of rat and human liver*. Gastroenterology. 2001,121(5):1185-90.

Javam M, Audette MC, Iqbal M, et al. *Effect of oxygen on multidrug resistance in term human placenta*. Placenta. 2014,35(5):324-30.

Kalliokoski A, Niemi M. *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics*. Br J Pharmacol. 2009,158(3):693-705.

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

Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. *Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane*. J Pharmacol Exp Ther. 2003, 306(2):703-8.

Koucký, Michal a kol., *Spontánní předčasný porod*. Praha: Maxdorf, ©2014. 155 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-416-6.

König J, Seithel A, Gradhand U, et al. *Pharmacogenomics of human OATP transporters*. Naunyn Schmied Arch Pharmacol. 2006,372(6):432-43.

König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. *Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide*. J Biol Chem. 2000, 275(30):23161-8.

Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. *The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme*. J. Biol. Chem. 2004,279(23):24218-24225.

Křemen, Jaromír a Stříbrná, Jana. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 117 s. ISBN 80-7184-504-3.

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, et al. *Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver*. *Gastroenterology*. 2001,120:525–533.

Lee N, Hebert MF, Prasad B, et al. *Effect of gestational age on mRNA and protein expression of polyspecific organic cation transporters during pregnancy*. *Drug Metab Dispos*. 2013,41(12):2225-32.

Liggins GC, Thornburn GD. *Initiation of parturition*. In: Lamming GE: *Marshall's Physiology of Reproduction*. London: Chapman and Hall; 1994.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 15.2, *Overview of Membrane Transport Proteins*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21592/>.

Lofthouse EM, Cleal JK, O'Kelly IM, Sengers BG, Lewis RM. *Estrone sulphate uptake by the microvillous membrane of placental syncytiotrophoblast is coupled to glutamate efflux*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018,506(1):237-242. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.074. Epub 2018 Oct 19.

Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL. *Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT)*. *J Clin Invest*. 1996, 98(5):1142-9.

Lye P, Bloise E, Dunk C, et al. *Effect of oxygen on multidrug resistance in the first trimester human placenta*. *Placenta*. 2013,34(9):817-23.

Lye P, Bloise E, Javam M, Gibb W, Lye SJ, Matthews SG. *Impact of bacterial and viral challenge on multidrug resistance in first- and third-trimester human placenta*. *The American Journal of Pathology*. 2015,185(6):1666-1675.

Mason CW, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Dong Y, Weiner CP, Swaan PW. *ATP-binding cassette transporter expression in human placenta as a function of pregnancy condition*. Drug Metab Dispos. 2011,39(6):1000-7.

Mathias AA, Hitti J, Unadkat JD. *P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005,289(4):R963-9.

Meis P, Goldenberg R, Mercer B, et. al. *The Preterm Prediction Study: Risk factors for indicated preterm births*. Am J Obstet Gynecol. 1998,178:562-7.

Meis P, Michielutte R, Peters T, etl. al. *Factors associated with preterm birth in Cardiff, Wales*. Am J Obstet Gynecol. 1995,173:597-602.

Meyer zu Schwabedissen HE, Grube M, Dreisbach A, et al. *Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP)*. Drug Metab Dispos. 2006,34(4):524-33.

Meyer zu Schwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, et al. *Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation*. Drug Metab Dispos. 2005,33(7):896-904.

Nakanishi, Takeo & Tamai, Ikumi. *Roles of Organic Anion Transporting Polypeptide 2A1 (OATP2A1/SLCO2A1) in Regulating the Pathophysiological Actions of Prostaglandins*. The AAPS Journal. 2018,20:13. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0163-8>.

Papp E, Gadawski I, Cote HC. *Longitudinal effects of thymidine analogues on mtDNA, mtRNA and multidrug resistance (MDR-1) induction in cultured cells*. J Antimicrob Chemother. 2008,61(5):1048-52.

Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF, Jr, Goodman A, Seiden MV. *Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples*. Gynecol Oncol. 2004,93(1):98-106.

Petrovic V, Wang JH, Piquette-Miller M. *Effect of endotoxin on the expression of placental drug transporters and glyburide disposition in pregnant rats*. Drug Metab Dispos. 2008,36(9):1944-50.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnology letters. 2004,26:509-515.

Polin RA, Abman SH, Rowitch D, Benitz WE. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Elsevier. 2017,5:145. ISBN 978-323-35214-7.

Rajabi M, Solomon S, Poole AR. *Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig*. Endocrinology. 1991,128:863-71.

Ritchie DM, Hahn DW, McGuire JL. *Smooth muscle contraction as a model to study the mediator role of endogenous lipoxygenase products of arachidonic acid*. Life Sci. 1984,34:509-13.

Romero R, Gomez R, Ghezzi F, et al. *A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition*. Am J Obstet Gynecol. 1998,179:186-93.

Romero R, Mazor M, Munoz H, et al. *The preterm labor syndrome*. Ann N Y Acad Sci 1994,734:414-29.

Roztočil, Aleš a kol. *Moderní porodnictví.*, 1. vyd. Praha: Grada, 2008. 164 s. ISBN 978-80-247-1941-2.

Ruchat SM, Houde AA, Voisin G, et al. *Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases*. Epigenetics. 2013,8(9):935-43.

Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. *Dynamics of immunoglobulins at the foeto-maternal interface*. Rev Reprod. 1999,4(2):81-9.

Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. *Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta*. *Placenta*. 2003,24:144–148.

Shields AD, Wright J, Paonessa DJ, et al. *Progesteron modulation of inflammatory cytokine production in fetoplacental artery explant model*. *Am J Obstet Gynecol*. 2005,193:1144-8.

Schneider H. *Placental transport function*. *Reprod Fertil Dev*. 1991,3(4):345-53.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. *Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR*. *BMC molecular biology*. 2006,7:33.

Smith LK, Draper ES, Manktelow BN, et al. *Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Educ*. 2007,92:F11-F14.

Smith CH, Moe AJ, Ganapathy V. *Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta*. *Annu Rev Nutr*. 1992,12:183-206.

Staud F, Pavek P. *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005,37(4):720-5.

Staud F, Ceckova M. *Regulation of drug transporter expression and function in the placenta*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015,11(4):533-55.

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*. *Journal of Drug Targeting*. 2012,20(9):736-763.

St-Pierre J, Grégoire JC, Vaillancourt C. *A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex*. *Scientific Reports*. 2017,7:Article number: 16923.

St-Pierre MV, Stallmach T, Freimoser Grundschober A, Dufour JF, Serrano MA, Marin JJ, Sugiyama Y, Meier PJ. *Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004,287(6):R1505-16.

Sun M, Kingdom J, Baczyk D, et al. *Expression of the multidrug resistance Pglycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation.* Placenta. 2006,27(6-7):602-9.

Svoboda M, Riha J, Wlcek K, et al. *Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function.* Curr Drug Metab. 2011,12(2):139-53.

Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox).* Drug Discov Today. 2008,13(9-10):379-93.

Šmarda, Jan et al. *Metody molekulární biologie.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family.* Biochem Biophys Res Commun. 2000,273(1):251-60.

Tchirikov M, et al. *Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome.* J. Perinat. Med. 2018,46(5):465–488.

Trejtner F. *Základní mechanismy transportu léčiv v organismu.* Remedia. 2016,26:460-463.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.* Genome biology 3:RESEARCH0034.

van Herwaarden AE, Schinkel AH. *The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins*. Trends Pharmacol Sci. 2006,27(1):10-6.

Vogel JP, et al., *The global epidemiology of preterm birth*, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003>.

Wang H, Wen H, Li Y, Zhang K, Liu Y. *Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) under normal and salinity stress conditions*. PeerJ. 2018;6:e5631. Published 2018 Sep 19. doi:10.7717/peerj.5631.

Wang H, Wu X, Hudkins K, Mikheev A, Zhang H, Gupta A, Unadkat JD, Mao Q. *Expression of the breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in tissues from pregnant mice: effects of pregnancy and correlations with nuclear receptors*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006,291(6):E1295-1304.

Wang JH, Scollard DA, Teng S, et al. *Detection of P-glycoprotein activity in endotoxemic rats by 99mTc-sestamibi imaging*. J Nucl Med. 2005,46(9):1537-45.

Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Introduction. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53251/>.

Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 4, Cell Types of the Placenta. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53245/>.

Yeboah D, Sun M, Kingdom J, et al. *Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor*. Can J Physiol Pharmacol. 2006,84(12):1251-8.

Yuen RK, Chen B, Blair JD, et al. *Hypoxia alters the epigenetic profile in cultured human placental trophoblasts*. *Epigenetics*. 2013,8(2):192-202.

INTERNETOVÉ ZDROJE

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 20.1.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/73/the-hiv-life-cycle>.

ČNeoS. (2017). *Výsledky Neonatologické péče v ČR v jednotlivých hmotnostních kategoriích 2017*. Retrieved January 3, 2019, from <http://www.neonatology.cz/2017>.

Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP. (2017). *Spontánní předčasný porod*. Retrieved January 13, 2019, from <http://www.gynultrazvuk.cz/data/clanky/6/dokumenty/p-2017-spontanni-predcasny-porod.pdf>.

LAB Guide, *Real-time PCR*, retrieved January 19, 2019 from <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>.

NIH, U.S. National Library of Medicine. (2019). *ABCB1 gene*. Retrieved March 5, 2019, from <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCB1#conditions>.

WHO. (2018). *Preterm birth*. Retrieved January 14, 2019, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.