

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**HODNOCENÍ EXPRESE VYBRANÝCH ABC TRANSPORTÉRŮ V  
PLACENTĚ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Lenka Ťupová, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Veronika Kučerová

**Prohlášení:**

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

V Hradci Králové 15.5.2021

Veronika Kučerová

**Poděkování:**

V první řadě patří velké díky vedoucí mé diplomové práce, doc. PharmDr. Martině Čěčkové, Ph.D., bez níž by tato práce nemohla být realizována. Také moc děkuji PharmDr. Lence Ťupové, Ph. D., která mi byla velkou oporou a pomocnou rukou při práci a zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji mému manželovi Lukáši Kučerovi a celé své rodině za velkou podporu, jak při psaní této práce, tak po celou dobu studia.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Veronika Kučerová

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

Konzultant: PharmDr. Lenka Ťupová, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení exprese vybraných ABC transportérů v placentě

Placenta je dočasný orgán, skrz který probíhá zásobování plodu živinami a kyslíkem z mateřské krve, a naopak dochází k odvodu odpadních látek do mateřské krve v průběhu těhotenství. Přestup látek přes placentu je komplexní proces řízený řadou fyziologických mechanismů, mezi které je zahrnuta pasivní difúze, facilitovaná difúze či aktivní transport, jenž probíhá pomocí membránových transportérů za spotřeby energie. Přítomnost aktivních ABC efluxních transportérů v placentě je známá již dlouhou dobu a jejich funkce je spojována především s limitací vstupu škodlivých látek do placenty a dále do plodu, čímž přispívají k jeho ochraně. Mezi nejlépe popsané transportéry spadající do této skupiny řadíme p-glykoprotein (MDR1/*ABCB1*), „protein nádorové rezistence prsu“ (BCRP/*ABCG2*) a „protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí 2“ (MRP2/*ABCC2*), jejichž exprese byla potvrzena na apikální membráně placentárního syncytiotrofoblastu omývaného mateřskou krví a dále „protein asociovaný s mnohočetnou lékovou rezistencí 1“ (MRP1/*ABCC1*) lokalizovaný na opačné bazální membráně. Patří sem ale i méně známé transportéry jako „proteiny asociované s mnohočetnou lékovou rezistencí 4 a 5“ (MRP4/*ABCC4*, MRP5/*ABCC5*). Exprese ABC transportérů v placentě je velmi variabilní a může se lišit jak z hlediska vývoje placenty (rozdílná kvantitativní exprese v průběhu 1. – 3. trimestru), tak z hlediska lokalizace transportérů v různých typech placentárních buněk. V této práci jsme se zaměřili na porovnání změny genové exprese šesti výše uvedených ABC transportérů mezi vzorky získanými z placent po ukončení nechtěných těhotenství v prvním trimestru a placent získaných po ukončení fyziologického těhotenství na konci třetího trimestru. Signifikantní změna genové exprese mezi trimestry byla pozorována u MDR1, MRP1 a MRP2 transportérů. Naopak za stabilní v průběhu těhotenství lze považovat expresi BCRP, MRP4 a MRP5 transportérů. Dále

byla porovnána exprese daných transportérů mezi buňkami izolovaných trofoblastů a fetálních endoteliálních buněk z terminálních placent po porodu. Vyšší exprese v trofoblastech byla detekována pro MDR1, BCRP, MRP2 a MRP5 transportéry. MRP1 a MRP4 byly naopak ve vyšší míře detekovány v endoteliálních buňkách. Tyto výsledky mohou přispět k lepšímu pochopení přestupu, ale i distribuce endogenních i exogenních látek skrz a uvnitř placenty v průběhu jejího vývoje.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Veronika Kučerová

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

Consultant: PharmDr. Lenka Ťupová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study on expression of selected ABC transporters in placenta

The placenta is a temporary organ through which the fetus is supplied with nutrients and oxygen from the mother's blood and conversely waste substances are transferred into the mother's blood during pregnancy. Substance transfer through the placenta is a complex process controlled by a number of physiological mechanisms, including passive diffusion, facilitated diffusion or active transport, which is realized by activity of membrane transporters with energy consumption. Presence of active ABCs efflux transporters in the placenta has been known for a long time and their function is associated primarily with limiting the entry of harmful substances into the placenta and further into the fetus, thus contributing to its protection. Among the best described transporters belong P-glycoprotein (MDR1/*ABCB1*), breast cancer resistance protein (BCRP/*ABCG2*) and multidrug resistance protein 2 (MRP2/*ABCC2*), whose expression has been confirmed in the apical membrane of the placental syncytiotrophoblast facing maternal blood, and further multidrug resistance protein (MRP1/*ABCC1*) located on the opposite basal membrane. Nevertheless, it also includes less described transporters such as multidrug resistance proteins 4 and 5 (MRP4/*ABCC4*, MRP5/*ABCC5*). Expression of ABC transporters in the placenta is very variable and may vary both in terms of placental development (differential quantitative expression during the 1st - 3rd trimester), so in terms of localization of transporters in different types of placental cells. In this thesis, we focused on comparing gene changes expression of the six ABC transporters mentioned above between samples obtained from the placentas after the termination of unwanted pregnancies in the first trimester and placentas obtained after terminating of physiological pregnancy at the end of the third trimester. Significant change of gene expression between trimesters was observed within MDR1, MRP1 and MRP2 transporters. On the contrary, the expression of BCRP, MRP4 and MRP5

transporters can be considered stable during pregnancy. Furthermore, we compared the expression of the given transporters between the cells of isolated trophoblasts and fetal endothelial cells from terminal placenta after delivery. Higher expression in trophoblasts was detected for MDR1, BCRP, MRP2 and MRP5 transporters. On the other hand, MRP1 and MRP4 were detected in the higher rate in endothelial cells. These results can contribute to a better understanding of transfer as well as distribution of endogenous and exogenous substances through and within the placenta during its development.

# OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	9
2. ÚVOD .....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. Placenta a její role v těhotenství .....	12
3.2. Vývoj placenty .....	12
3.3. Struktura placenty .....	15
3.4. Transport přes placentu (Obr. 6) .....	16
Transport látek přes membrány .....	18
Rodina ABC efluxních transportérů .....	19
ABC transportéry v placentě.....	20
Změny exprese transportérů v placentě v průběhu těhotenství.....	25
4. CÍLE PRÁCE .....	26
5. PRAKTICKÁ ČÁST .....	27
5.1. Materiál a metodika.....	27
5.2. Statistická analýza.....	32
6. VÝSLEDKY .....	33
7. DISKUZE.....	37
8. ZÁVĚR.....	40
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	41



## 1 SEZNAM ZKRATEK

<b>ABC</b>	ATP – vázající transportéry
<b>BCRP/<i>ABCG2</i></b>	protein nádorové rezistence prsu/ kódující gen
<b>API</b>	voda pro přípravu injekcí
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>cGMP</b>	cyklický guanosinmonofosfát
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>MDR1/<i>ABCB1</i></b>	p-glykoprotein/ kódující gen
<b>MRP1-5/<i>ABCC1-5</i></b>	proteiny asociované s mnohočetnou lékovou rezistencí 1-5/ kódující gen
<b>NBD (NBF)</b>	nukleotidy vázající doména
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>SLC</b>	transportéry solutů
<b>YWHAZ</b>	tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide

## 2 ÚVOD

V roce 2020 se v České republice narodilo 110,2 tisíce dětí, z čehož přibližně 8 tisíc se narodilo předčasně. Rovněž bylo zaznamenáno 30,3 tisíc potratů. V 56 % se jednalo o potraty vyvolané, 40 % bylo samovolných a ve 4 % se jednalo o ukončení mimoděložního těhotenství (Český statistický úřad, 2020). Fyziologické těhotenství s nekomplikovaným průběhem je klíčové pro správný vývoj plodu zakončený porodem v 38. – 40. týdnu od oplodnění (Nedoklubko, 2021). Samovolným potratem se rozumí spontánní ukončení těhotenství převážně v prvním trimestru (do 12. týdne) z důvodu poškození či nesprávného vývoje plodu. Pozdější potraty jsou spíše indukované při odhalení vývojového problému během těhotenského screeningu (Kovář Petr, 2021). Od 24. týdne těhotenství již nemluvíme o potratu, ale o předčasném porodu (Nedoklubko, 2021).

Těhotenství ovlivňuje celý organismus ženy a je regulováno řadou fyziologických mechanismů. Velmi důležitou roli zde hraje placenta, jakožto dočasný orgán vznikající na začátku těhotenství za účelem zajištění komunikace mezi vyvíjejícím se plodem a matkou. Zásadní úlohou placenty je mimo jiné obousměrná kontrola a řízení přestupu živin, kyslíku, hormonů, odpadních látek i xenobiotik aj. mezi krví matky a plodu (Hájek Zdeněk et al., 2014). Důležitým mechanismem přestupu je přenos pomocí membránových transportérů, jejichž hojná přítomnost byla popsána především v placentárním syncytiotrophoblastu, jehož apikální membrána je v přímém kontaktu s mateřskou krví. V posledních letech se však začíná diskutovat i významnost transportérů přítomných v endoteliálních buňkách plodových kapilár protkávajících placentu, v nichž proudí fetální krev (Azzaroli et al., 2007; Walker et al., 2017).

Membránové transportéry řadíme do dvou velkých nadrodin, které se nazývají transportéry solutů (SLC) a ATP (adenosintrifosfát)-vázající (ABC) transportéry, které jsou schopny přenášet širokou škálu endogenních i exogenních substrátů (Walker et al., 2017). V této práci jsme se zaměřili na 6 členů spadajících do skupiny ABC efluxních transportérů, které jsou schopné odčerpávat své substráty ven z buněk do mimobuněčných prostor a pro svoji funkci získávají energii prostřednictvím hydrolýzy ATP (Trejtnar František, 2016; Vasiliou et al., 2009). Konkrétně se jedná o P-glykoprotein (*MDR1/ABCB1*), protein nádorové rezistence prsu (*BCRP/ABCG2*) a proteiny asociované s mnohočetnou nádorovou rezistencí 1, 2, 4 a 5 (*MRP1, 2, 4, 5/ABCC1, 2, 4, 5*). Přítomnost ABC transportérů v placentě se může lišit s postupujícím těhotenstvím a rovněž může být rozdílná v jednotlivých typech placentárních buněk (Joshi et al., 2016). Znalosti o proměnlivé expresi těchto transportérů mohou vést k lepšímu pochopení transplacentárního přestupu jejich substrátů a též jejich role v udržení fyziologického

těhotenství. Z tohoto důvodu jsme se v této práci zaměřili na popsání genové exprese uvedených transportérů mezi placentami prvního a třetího trimestru a dále mezi izolovanými buňkami trofoblastů a endoteliálních buněk fetálních cév.

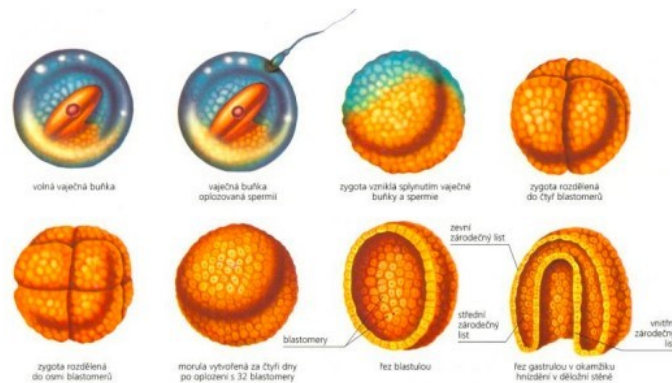
## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Placenta a její role v těhotenství

Placenta je dočasný orgán, který hraje zásadní roli ve vývoji plodu (Burton & Jauniaux, 2015). Jejím hlavním úkolem je zejména výměna metabolitů a plynů mezi krví matky a plodu zajišťující optimální přívod živin a odvod odpadních látek (Hájek Zdeněk et al., 2014). Zjednodušeně tak je možné konstatovat, že placenta plní během těhotenství pro plod roli plic, jater, střev i ledvin. Slouží také jako bariéra bránící přestupu škodlivých látek a jako orgán, který zajišťuje produkci hormonů (Burton & Jauniaux, 2015). Důležitou roli pro plod hraje též z hlediska imunity, kde zajišťuje přenos imunoglobulinů z matky do plodu (Burton & Fowden, 2015). V průběhu jednotlivých trimestrů prochází placenta výraznými změnami, co se týče funkce i struktury (Burton & Jauniaux, 2015).

### 3.2 Vývoj placenty

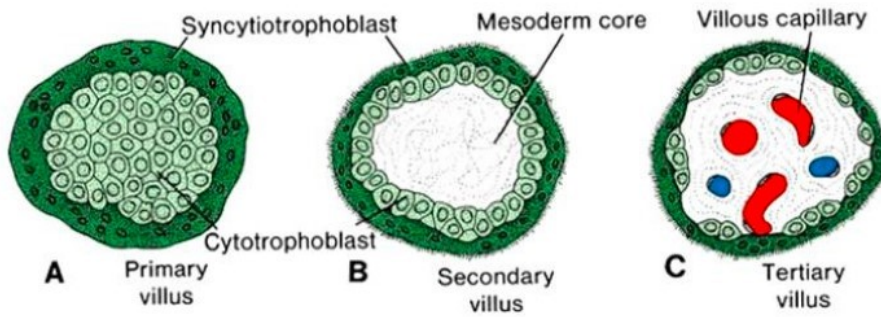
Vzniku placenty předchází několik kroků: oplodnění vajíčka ve vejcovodu spermii, vznik zygoty a následné rýhování oplozeného vajíčka. Rýhováním vzniká morula (Obr. 1), která se dále dělí za vzniku blastocysty. Ta se poté dostává do dělohy (Hájek Zdeněk et al., 2014). Postupně vývoj vede ke gastrule a další diferenciaci za vzniku embrya (Tonar, 2021). Po vstupu blastocysty do dělohy se vyloučí *zona pellucida*, která chrání vajíčko a dochází k zahnízdění blastocysty v děloze a k následnému vystavení trofoblastu endometriu (Benirschke, 2004). Ten se nachází na povrchu blastocysty (Hájek Zdeněk et al., 2014). Od vystavení trofoblastu endometriu dochází k výživě přes mateřskou krev (Benirschke, 2004). Dochází k tomu tak, že trofoblast vstupuje do decidua basalis a ničí endotel mateřských cév. Tímto způsobem se mateřská krev dostává do kontaktu s choriem. Odtud také název hemichoriální placenta (Hájek Zdeněk et al., 2014).



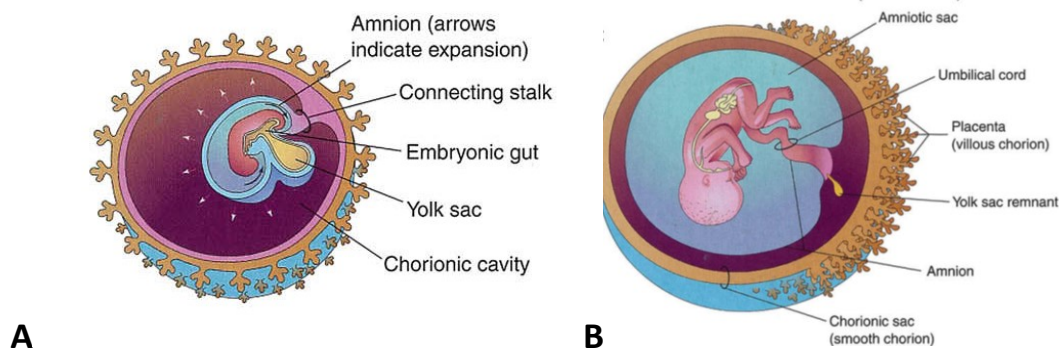
Obr. 1 - Vznik gastruly. Rýhující se vajíčko dává vznik morule, následně blastocystě, která se uhnízdí do dělohy a konečné gastrule (Převzato z: Rambousek, 2021).

Trofoblasty tvoří spojitou síť buněk složenou z cytotrofoblastů, které jsou kryté syncytiotrofoblastem. Tyto klky patří mezi počáteční vývojové stádium a řadí se mezi klky primární. (Obr. 2 A) Postupujícím vývojem dochází k vrůstání mezodermu, což jsou tzv. klky sekundární (Obr. 2 B) a následný vývoj cév a kapilár v oblasti mezodermu a vznik klků terciárních (Obr. 2 C) (Hájek Zdeněk et al., 2014; Tonar, 2021). Choriové klky vybíhají do intervilózního prostoru, což je prostor placentární. Klky se dělí na volné a úponové. Úponové (placentární) klky pevně vrůstají do decidua basalis a dochází k jejich větvení. Tyto větve, které nezasahují až do *decidua basalis* a nacházejí se v intervilózním prostoru se nazývají klky volné neboli terminální a jsou omývány v mateřské krvi. Tím dochází k přestupu živin, kyslíku a odvodu zplodin (Sadler W. Thomas, 2010). Při vývoji klků dochází k jejich rozvětvení a současnému rozvětvení cév. Arterie vznikají z pupečnickových tepen a větví se na kapiláry do jednotlivých klků. V nich dochází k okysličení krve po předchozím omývání klků v mateřské krvi a přechod do venózního systému klku – *vena umbilicalis*. Choriové klky se nacházejí na celém povrchu plodu. (Obr. 3 A). *Decidua capsularis*, která je zmíněna níže ubývá, dochází k atrofii klků v této části a vzniká takzvaný *chorion leve* (Obr. 3 B). Oproti tomu na povrchu směrem k části *decidua basalis*, což je maternální strana dochází k zmožnění klků a vytváření placenty. (Obr. 4)

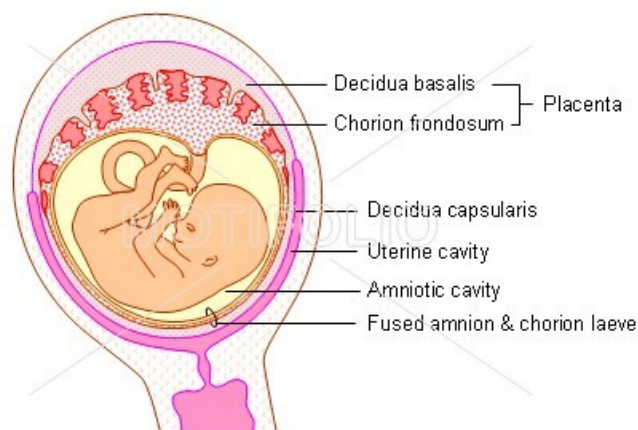
Pro upřesnění je decidua zevní vrstva obalů plodu. Dělí se na *decidua parietalis*, která slouží jako děložní výstelka a *decidua capsularis*, která kryje povrch plodu (Hájek Zdeněk et al., 2014).



Obr. 2 - Vývoj placenty – vznik klků. Část **A** - znázorňující cytotrofoblast a syncytiotrofoblast, část **B** - vrůstající mezoderm a **C** - vznik cév (Převzato z: Slideplayer, 2021b).



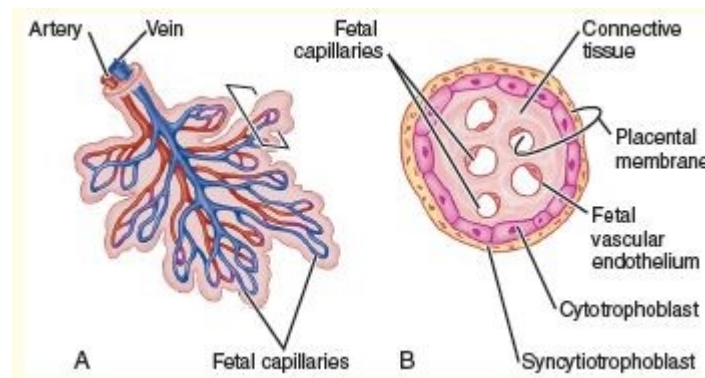
Obr.3 - Vývoj placenty. **A** - znázorňuje přítomnost klků okolo celého plodu. **B** - oproti tomu vznik *chorion leve* a *chorion frondosum* (Převzato z: Ilancheran et al., 2009)



Obr. 4 - Vývoj placenty. Srůstání *decidua basalis* s *chorion frondosum* za vzniku placenty. (Převzato z: Lim Rebecca, 2015)

### 3.3 Struktura placenty

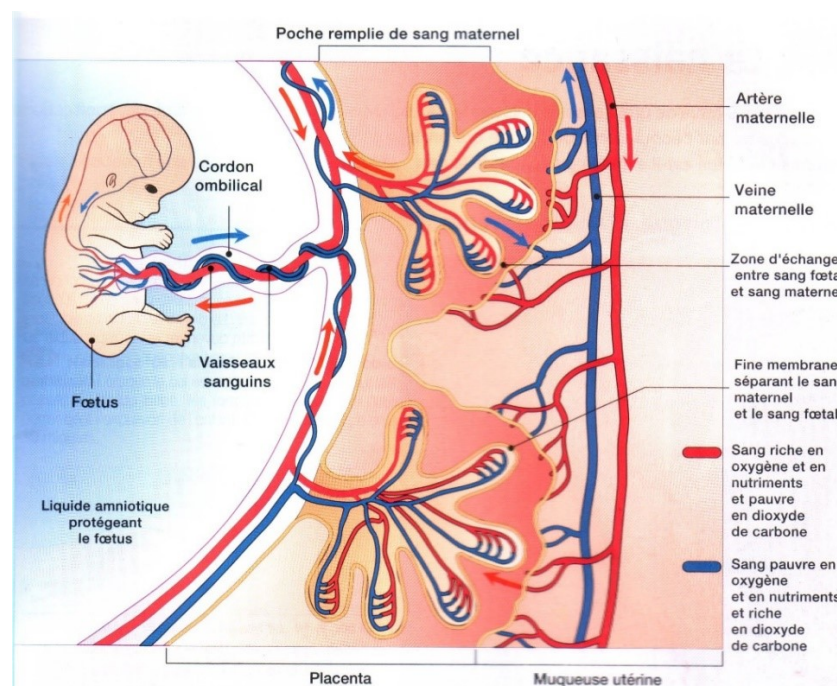
Placenta má zpravidla kulovitý tvar a je houbovitě konzistence. Je dělena na část fetální, která je obrácená k plodové části a mateřskou část, která je směrem k děloze. Na straně plodu je placenta krytá modrošedou blánou neboli amniem. Pod touto plochou se nalézá pletěň pupečnickových cév, které se rozbíhají v celé placentě. Důležitými oběhovými jednotkami jsou kotyledony, které se nacházejí na povrchu placenty. Kotyledonů je 15 – 20 a jsou od sebe navzájem odděleny přepážkami. Jsou složeny z lobulů, jejichž počet odpovídá množství uteroplacentárních cév, které pronikají do intervilozního prostoru. Cévy se rozvětvují až na terminální klky. Klky mají na povrchu vrstvu trofoblastů, větví se z choriové desky a vstupují do intervilozního prostoru, kde jsou následně omývány mateřskou krví. Díky tomuto mechanismu jsou přiváděny živiny, kyslík a další potřebné faktory k plodu a odváděny zplodiny metabolismu. V tomto přívodu a odvodu hrají zásadní roli pupečnickové cévy a to vena umbilicalis a pupečnicková tepna (Obr. 5) U plodu odvádějí tepny krev odkysličenou a žíly přivádějí tu okysličenou. Strana placenty přivrácená k děloze má naředlou barvu a na jejím povrchu se nachází *decidua basalis*. Z mateřské části přitéká krev pomocí spirálních arterií, které narušují deciduální vrstvu a pronikají do intervilozního prostoru, kde dochází k omývání klků. Poté se vrací odkysličená krev zpět k *decidua basalis* a proudí mateřskými vénami znovu do místa okysličení (Hájek Zdeněk et al., 2014).



Obr. 5 - **A** - Klk který vede okysličenou krev do plodu pomocí *vena umbilicalis* a odvádí odkysličenou krev pupečnickovou tepnou. **B** – Průřez klkem, kde jsou znázorněny trofoblasty a endoteliální buňky, které jsou důležité pro přestup živin (Převzato z: Medical dictionary, 2011).

### 3.4 Transport přes placentu (Obr. 6)

Plod je propojen s placentou pomocí pupeční šňůry, v níž se nachází pupečnicková žíla (*vena umbilicalis*), do které se sbíhají cévy z choriových klků s okysličenou krví a 2 pupečnickové tepny (*arteria umbilicalis*), které vedou odkysličenou krev ze srdce plodu zpět do placenty. Tyto cévy se směrem k placentárním klkům větví na stále drobnější větvy a artérie a ve formě drobných kapilár se splétají do terminálních klků. Mateřská krev bohatá na kyslík i živiny je ze spirálních arterií děložní strany placenty vstřikovávána do intervilózních prostorů, kde dochází k omývání choriových klků (Šípek Antonín, 2021). Na jejich povrchu, ve vrstvě syncytiotrofoblastu pak dochází k vlastní výměně plynů i živin a jejich přestupu do drobných kapilár sbíhajících se do pupečnickové žíly (Hájek Zdeněk et al., 2014). V opačném směru je z pupečnickových tepen přes větvené tepénky přivedena do terminálních klků odkysličená krev bohatá na zplodiny metabolismu, kde tyto látky opět přechází vrstvu syncytiotrofoblastu a vrací se do krevního oběhu matky pomocí maternálních vén (Šípek Antonín, 2021).

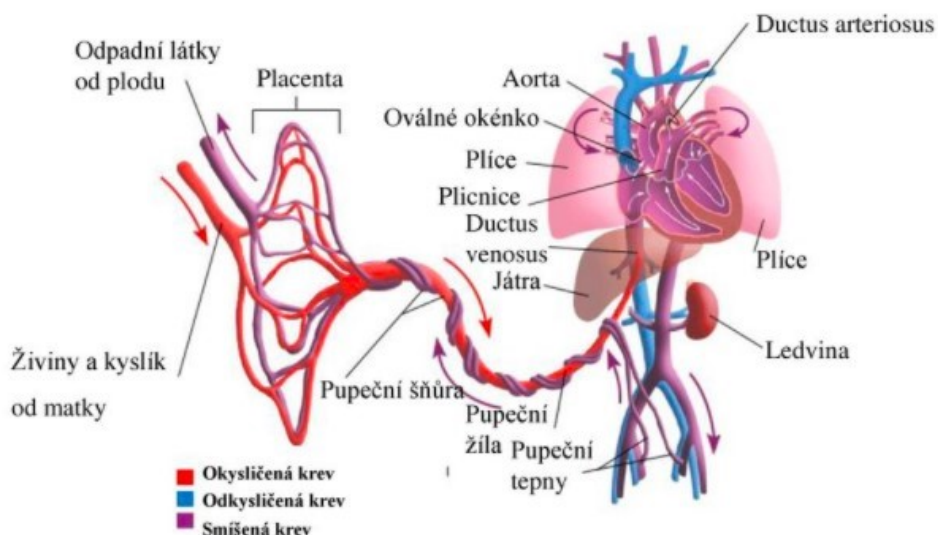


Obr. 6 - Znázorňuje výše popsany transport přes placentu od matky k plodu a od plodu k matce (převzato z: Soubhana Allah, 2015).

Živiny a kyslík, přestupující z matky do plodu směřují k fetálním játrům (Obr.7). Zde se *vena umbilicalis* větví na dvě části. Krev může procházet přímo játry, která by ale živiny strávila a nedovedla v dostatečném množství na potřebné místo jako je mozek a další orgány. Proto jsou fetální játra z části obcházena pomocí spojky *ductus venosus*, což je spojení vena umbilicalis a



vena cava inferior. Do jater vstupuje okysličená krev a následně se mísí s venózní krví plodu, takže následuje krev smíšená. Část krve jde do pravé předsíně a následně prochází přes *foramen ovale* do levé předsíně. Takto se vyhne krev plicím. Poté jde do levé komory a odtud vstupuje do *aorta ascendens*, která zásobuje krví hlavu a vrchní části těla. Touto cestou je také zajištěno zásobení krví ve spodní části těla pomocí *aorta descendens*. Krev z vrchní části těla se dále sbíhá pomocí vena cava superior, jde do pravé předsíně, dále do pravé komory a poté do *arteria pulmonalis*. Z tohoto místa přechází pomocí spojky *ductus arteriosus Botalli* přímo do aorty descendens. Odtud jde krev do pupečnickových arterií a zpět do krevního oběhu matky. Do plic vstupuje jen malé množství krve a to kvůli vysokému odporu plic, které jsou naplněné tekutinou (Hájek Zdeněk et al., 2014). Krevní řečiště matky a plodu se vzájemně nemísí (Šípek Antonín, 2021).



Obr. 7 - Zásobení plodu kyslíkem a živinami – krevní oběh plodu. (Převzato z: Slideplayer, 2021a)

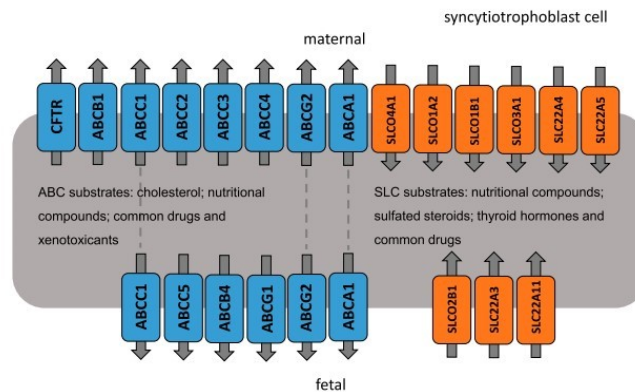
Pro přestup mezi matkou a plodem musí látky procházet skrz buněčnou vrstvu trofoblastu a endotel fetálních kapilár. Transport skrz tyto části je zprostředkováván základními mechanismy, a to pasivní difuzí, pinocytózou, fagocytózou, usnadněným transportem a aktivním transportem pomocí přenašečů – transportérů (Walker et al., 2017). Přes placentu přechází řada endogenních i exogenních látek. Mezi ty endogenní patří malé molekuly, jako je glukóza, dále esenciální aminokyseliny, vitamíny rozpustné ve vodě, vápník, sodík, hořčík, proteiny, volné mastné kyseliny, krevní plyny, vysokomolekulární látky jako jsou fosfolipidy

a další látky důležité pro plod a jeho vývoj. Z exogenních látek k plodu může pronikat řada potenciálně toxických látek, ke kterým se řadí i léčiva (Hájek Zdeněk et al., 2014).

### **Transport látek přes membrány**

Látky přecházejí přes membránu placenty v závislosti na velikosti molekuly dané látky, elektrickém náboji, rozpustnosti a pH (Hájek Zdeněk et al., 2014). Např. za běžných podmínek je pH plodu nižší než pH matky, kvůli tomu se kumulují v plodu slabé báze. Látky vázané na proteiny mají také nižší transport (Průnik Látek Placentou, 2021). Látky lipofilní jsou schopné přecházet přes membrány prostou pasivní difuzí bez spotřeby energie. Oproti tomu látky hydrofilní jsou odkázány na přenos pomocí transportérů (Trejtnar František, 2016). Transport přes membrány tedy dělíme na aktivní a pasivní. Mezi pasivní transport patří prostá a usnadněná difuze. Tento typ transportu není závislý na dodávce energie. Aktivním transportem se myslí transport proti koncentračnímu gradientu za dodání energie (Wikiskripta, 2020a). Sem se řadí primární aktivní transport a sekundární aktivní transport. Směr transportu může být orientován buď dovnitř nebo vně buněk, dle toho rozlišujeme transport influxní a efluxní (Trejtnar František, 2016). Významnými transportními systémy lidského organismu jsou ABC a SLC transportéry (GollaBala et al., 2019) (Obr. 8). Mezi první důležitý transport tedy patří prostá difuze, která umožňuje transport molekul po koncentračním gradientu z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Tento děj probíhá u malých molekul a plynů (Hájek Zdeněk et al., 2014). Molekuly mohou také přecházet pomocí endocytózy a exocytózy. Tento transport probíhá pomocí vezikul. Endocytóza je proces, kdy se látka přichytí na buněčnou membránu, dojde k vychlípění membrány a následnému vytvoření vezikuly a prostupu přes membránu. Opačný děj, kdy dochází k přechodu z vnitřku buňky do vnějšího prostředí je nazýván exocytóza (Trejtnar František, 2016). Další možnosti přechodu jsou pomocí membránových přenašečů – proteinů. Tyto přenašeče fungují na několika principech jako je facilitovaná difuze, primární aktivní transport a sekundární aktivní transport. Facilitovaná neboli usnadněná difuze je typ pasivního přestupu, kde je využito k transportu přes membránu transportních proteinů. Zde se látka nekovalentně naváže a dochází k jejímu přenosu. Tato difuze se může také spojit s transportem další látky v protisměru, což se potom nazývá antiport. Při primárním aktivním transportu je využito energie ve formě ATP, která je rozložena na ADP a  $P_i$ . Získaná energie se potom využije pro přenos dané molekuly transportérem přes membránu. Na tomto principu fungují již zmiňované ABC transportéry. U sekundárního aktivního transportu neboli co-transportu je také využito energie ve formě ATP,

ale ne přímo. energii ve formě ATP využije jiný přenašeč k přenosu jiné látky za vniku gradientu, který následně popohání přenos příslušné látky daným přenašečem (Wikiskripta, 2020a). Hlavním úkolem transportérů je především přívod, distribuce a odvod endogenních složek po celém organismu. Mají tedy základní funkci při udržování buněčné homeostázy. Mimo to transportují i řadu složek exogenních, u nichž většinou limitují vstup do organismu nebo urychlují jejich odchod z těla, jako je tomu i u léčiv (Liu, 2019).

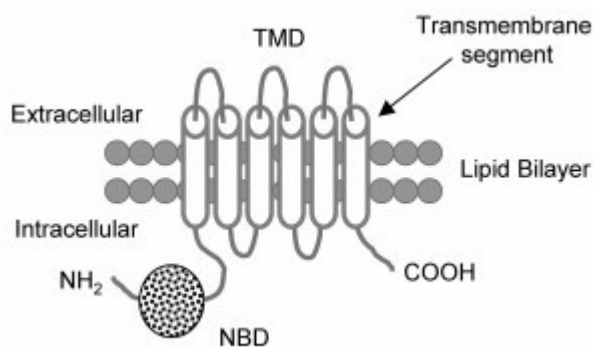


Obr. 8 - Znárodnění ABC a SLC transportérů v placentě (Převzato z práce: Walker et al., 2017).

## Rodina ABC efluxních transportérů

ABC transportéry (ATP-binding cassette transporters) se vyskytují v prokaryotických buňkách, rostlinách i u savců včetně lidí (DrugAgency, 2021). Patří mezi primárně aktivní transportéry, závislé na spotřebě energii ve formě ATP. V lidském genomu je celkem 49 genů ABC, které jsou řazeny do 8 podskupin (Vasiliou et al., 2009). Obecné rysy struktury těchto membránových proteinů byly objasněny na základě studie MDR1, prvního identifikovaného a dosud nejlépe popsaného transportéru. Typicky je transportér složen ze dvou polovin, které mají vysokou sekvenční podobnost. Každá polovina je z jedné hydrofobní transmembránové domény, tzv. TMD a jedné hydrofilní nukleotidy vázající domény, tzv. NBD (NBF) (Obr. 9). Celý protein tedy obsahuje čtyři domény, dvě hydrofobní a dvě hydrofilní (Choudhuri & Klaassen, 2006). Tyto transportéry mají schopnost odčerpávat substráty ven z buňky, a to i proti koncentračnímu gradientu. Jejich exprese je vysoká především v játrech, střevech, hematoencefalické bariéře, ledvinách a také v placentě. Transportují celou řadu endogenních substrátů, anorganických aniontů, iontů kovu, peptidů, aminokyselin, cukrů, hydrofobních sloučenin a metabolitů, cholesterol a fosfolipidy. Mutací některých těchto genů dochází k závažným dědičným onemocněním. Hlavní fyziologickou funkcí připisovanou MDR1 i

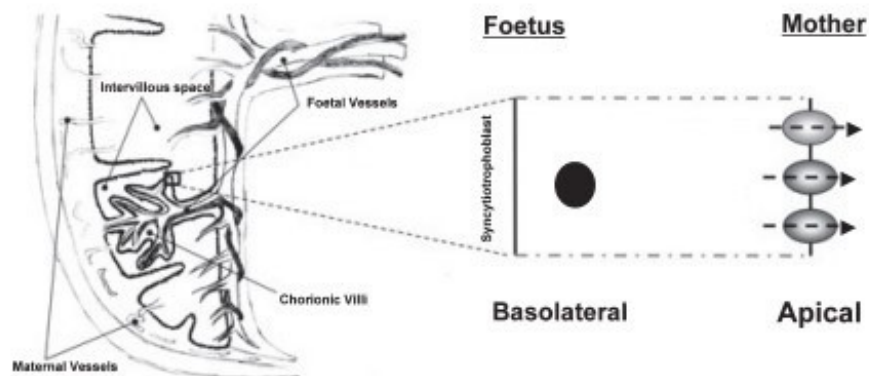
dalším ABC transportérům je ochrana organismu a jeho citlivých tkání před potenciálně toxickými látkami a produkty metabolismu (Vasiliou et al., 2009). Podobně jsou některé ABC transportéry rozpoznány i jako mechanismy navození rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům a jako markery negativní prognózy, např. u pacientů s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (Joshi et al., 2016). S ohledem na roli v transportu řady endogenních sloučenin i signálních molekul (cytokinů a prostaglandinů) je zřejmé, že minimálně někteří zástupci rodiny ABC transportérů plní i další důležité, byť dosud ne jednoznačně popsané funkce (Vasiliou et al., 2009).



Obr. 9 - ABC transportér – jeho složení z transmembránových a nukleotidy vázajících domén (Převzato z práce: Walker et al., 2017)

### ABC transportéry v placentě

Přítomnost a exprese ABC transportérů v placentě je často diskutovaným tématem. Dlouhou dobu se pozornost upínala především na transportéry lokalizované směrem k mateřské krvi na apikální membráně syncytiotrofoblastu, jakožto ochranné bariéry limitující přestup potenciálně škodlivých látek k plodu. Mezi tyto transportéry patří MDR1, BCRP a MRP2, které jsou považovány za nejvýznamnější zástupce ABC rodiny transportérů v placentě. Mimo to je v placentě hojně zastoupen i MRP1 transportér, jehož funkce však není stále zcela pochopena, pravděpodobně i z důvodu jeho opačné lokalizace na bazální membráně směrem k plodu (Obr. 10). A v neposlední řadě byla v placentě potvrzena přítomnost i méně prozkoumaných transportérů, jako jsou např. MRP4 nebo MRP5 (Walker et al., 2017). Exprese ABC transportérů v placentě není rovnoměrně rozprostřená a může se významně lišit mezi individuálními placentárními jednotkami a rovněž dochází ke změnám exprese v jednotlivých fázích těhotenství, či v závislosti na různých typech patologií provázejících komplikovaná těhotenství (Joshi et al., 2016).



Obr. 10 – Rozdělení membrány na část basální, což je směrem k plodu a část apikální, směrem k matce (Převzato z práce: Azzaroli et al., 2007).

**V naší studii jsme se zaměřili na následující ABC transportéry:**

- P-glykoprotein, MDR1 (kódovaný genem *ABCB1*)
- BCRP, (kódovaný genem *ABCG2*)
- MRP1, (kódovaný genem *ABCC1*)
- MRP2, (kódovaný genem *ABCC2*)
- MRP4, (kódovaný genem *ABCC4*)
- MRP5, (kódovaný genem *ABCC5*)

## **MDR1**

P-glykoprotein patří do podrodiny ABCB transportérů a je jedním z nejlépe prostudovaných ABC transportérů kvůli jeho zapojení do lékové rezistence (Walker et al., 2017). Jeho hlavní fyziologické funkce jsou bariérová a exkretční. Pro bariérovou funkci je důležité umístění transportéru na tzv. biologických bariérách, jako jsou hematoencefalická a testikulární bariéra a také placenta (DrugAgency, 2021). Svou efluxní aktivitou brání přenosu řady lipofilních látek z krve do citlivých tkání, jako neuronální tkáň, zárodečný epitel či vyvíjející se plod, a tyto tím chrání. Většina substrátů MDR1 je kationtová a lipofilní, ale je i pár substrátů, které jsou aniontové nebo neutrální (Joshi et al., 2016). Mezi fyziologické substráty se řadí přírodní lipofilní xenobiotika, která jsou v potravě, dále různé endogenní sloučeniny látek jako steroidy a zánětlivé cytokiny (DrugAgency, 2021). Mezi konkrétní příklady patří například konjugáty estrogenu, endorfin, glutamát, beta-amyloid, steroidy a PAF (faktor aktivující destičky) (Medalová Jiřina, 2016). MDR1 je velice důležitý pro placentu, a to proto, že se zde nachází ve velké míře. Proto se také MDR1 říká „ABC placenta transportér“, který byl objeven jako první, jenž poskytuje ochranu proti toxickým látkám (Walker et al., 2017). MDR1 se nachází na apikální membráně syncytiotrofoblastu, kde působí jako pumpa, která zabraňuje vstupu potenciálně toxických látek do placentární tkáně a tím směrem k plodu a vrací je zpět do mateřského krevního oběhu (Staud et al., 2012). Počet molekul transportérového proteinu se zvyšuje vystavením nejen xenobiotikům, ale například i hypoxii, tepelnému šoku a ionizačnímu záření (DrugAgency, 2021). Změny exprese MDR1 a jeho kódujícího *ABCB1* genu nastávají i fyziologicky v průběhu těhotenství (Walker et al., 2017).

## **BCRP**

BCRP patří mezi transportéry ABCG rodiny a popsán byl pro svou vysokou expresi v placentě jako placentární ABC transportér. Tento transportér, je často spojován s lékovou rezistencí (Mao, 2008). Je to oproti ostatním ABC transportérům poloviční, tzv. half transportér, který obsahuje 6 transmembránových segmentů a jeden NBD na N-terminálním konci (Choudhuri & Klaassen, 2006). BCRP je lokalizován především na apikální membráně syncytiotrofoblastů (Evseenko et al., 2007). Je také považován za tzv. placentární „faktor přežití“ během dozrávání placenty a zajišťuje ochranu proti cytokiny indukované apoptóze (Walker et al., 2017). BCRP může transportovat jak hydrofobní, tak hydrofilní substráty, které jsou nebo nejsou konjugované. Mezi konjugované substráty patří sulfátované a glukuronidované konjugáty

(Mao, 2008). Příklady fyziologických substrátů jsou vitamíny jako je riboflavin a biotin, porfyriny a konjugáty estrogenu (Medalová Jiřina, 2016). Placenta je orgán, který zajišťuje syntézu steroidních hormonů v průběhu těhotenství. Mezi tyto hormony patří progesteron a estrogen. Dehydroepiandrosteron a jeho sulfátovaný konjugát jsou důležité prekurzory pro syntézu estrogenu a dále estron – 3 sulfát je estrogenový metabolit. Bylo zjištěno, že BCRP může regulovat syntézu placentárního estrogenu úpravou koncentrace estronu – 3 sulfátu a dehydroepiandrosteronového konjugátu (Mao, 2008). Distribuce BCRP v tkáni se výrazně překrývá s distribucí MDR1, což nasvědčuje tomu, že mají podobnou, jak roli při ochraně citlivých tkání a celého organismu před toxiny, tak farmakologickou funkci (Liu, 2019).

### **MRP1**

Podrodina ABCC obsahuje 7 proteinů asociovaných s MDR, které transportují konjugované a nekonjugované organické ionty a současně působí jako efluxní pumpy léků. Transportér MRP1 je kódován genem *ABCC1*. Tento transportér je hojně zastoupen v placentě (Walker et al., 2017). Nachází se na bazální membráně a v endoteliálních buňkách a z menší části i na apikální membráně syncytiotrofoblastů (St-pierre et al., 2000). MRP1 také pomáhá vylučovat látky obsahující žluč z jater plodu do krevního oběhu matky, díky čemuž dochází k zabránění hromadění škodlivin. Důležitým substrátem ABCC rodiny transportérů je také folát, který je nezbytný proto, aby bylo zabráněno defektu neurální trubice u plodu. Při doporučené suplementaci těhotné ženy kyselinou listovou je to pak zejména MRP1 spolu s MRP2, které hrají významnou roli při transportu folátů přes placentu. Zatím však není jejich funkce úplně jasná (Walker et al., 2017). Pojem gestační věk znázorňuje dobu, jakou dítě stráví v děloze před narozením (Co Je to Malý Gestační Věk?, 2021). Expres MRP1 se může měnit v závislosti na gestačním věku (Walker et al., 2017). Je dokládáno, že exprese MRP1 je vyšší ve třetím trimestru oproti prvnímu (Pascolo et al., 2003). Fyziologické substráty MRP1 transportéru jsou například konjugáty glutationu a glukuronidu s leukotrienem C4, bilirubinem a žlučovými solemi (Medalová Jiřina, 2016). Mezi další substráty patří také mimo jiné léky a různé toxiny. Dále bylo zjištěno, že vysoká exprese MRP1 ve fetálních endoteliálních buňkách může také vytvářet místní buněčnou ochranu před oxidativním stresem pomocí exportu glutathionu disulfidu (Joshi et al., 2016).

### **MRP2**

MRP2, kódovaný genem *ABCC2* má velmi podobnou selektivitu substrátů jako MRP1, avšak liší se v tkáňové distribuci (Liu, 2019). Je umístěn především na apikální straně membrány

placentárních syncytiotrofoblastů, podobně jako MDR1 a BCRP (St-pierre et al., 2000). Substrátová selektivita MRP2 je odlišná oproti MDR1 a BCRP. Zde je nejvyšší selektivita pro aniontové substráty, které jsou hydrofilnější díky tvorbě glukuronidových, glutathionových a sulfátových konjugátů. Funkce MRP2 je poskytnout ochranu pro plod, a to před škodlivými látkami, xenobiotiky a endogeními látkami, které jsou pro plod toxické. Tyto škodlivé látky jsou odváděny z plodu do krevního oběhu matky. MRP2 stejně tak jako MRP1 se podílí na transportu bilirubinu a konjugovaných žlučových kyselin, čímž je zapojen do přenosu endogenních sloučenin, které jsou syntetizované fetálními játry placentálního syncytiotrofoblastu. Je tak ukázána významná role MRP2 v exkreci konjugátů žlučových kyselin v placentě. Dále může i zánět negativně ovlivnit expresi MRP2 v placentě. Při chorioamnionitidě je zvýšena exprese MRP2 mRNA v placentě (Liu, 2019).

#### **MRP4**

MRP4, který je kódovaný genem *ABCC4*, se nachází na apikální membráně placentárních syncytiotrofoblastů (Azzaroli et al., 2007). MRP4 je také důležitý transportér pro odtok žlučových solí, cyklických nukleotidů jako je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), urátů, steroidních konjugátů, nukleosidových analogů – adefovir, tenofovir a prostaglandinů. Je potřeba ještě dalších výzkumů, pro zjištění přesnějšího významu MRP4 u člověka (Liu, 2019). Nemoci, které jsou spojeny s defektem genu *ABCC4* jsou onemocnění žlučových cest a Dubinův-Johnsonův syndrom (Weizmann Institute of Science, 2021). Tento syndrom patří mezi geneticky podmíněné poruchy spojené se žloutenkou. Dochází k mutaci genu, který je důležitý pro přenos bilirubinu z jater do žluče (Štefánek Jiří, 2021).

#### **MRP5**

MRP5, který je kódovaný genem *ABCC5* je protein o velikosti 190 kDa a nachází se u myši a v lidských placentách (Liu, 2019). MRP5 je umístěn z největší části v bazální membráně a z části i v apikální membráně syncytiotrofoblastů (H. E. U. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005). K jeho detekci došlo také poblíž cévy plodu a na povrchu amniotického epitelu lidí. Množství těchto transportních proteinů postupně klesá s narůstajícím gestačním věkem. Expres MRP5 proteinů klesá u placent dětí narozených v termínu oproti předčasně narozeným dětem. MRP5 protein je zapojen do transportu cyklických nukleových analogů závislých na ATP. Má také význam v přenosu signálu, který je zprostředkovaný cGMP, v exportu



organických aniontů a nukleosidových monofosfátů a dále v protinádorové a antivirové terapii (Liu, 2019).

### **Změny exprese transportérů v placentě v průběhu těhotenství**

Placenta prodělává změny během jednotlivých fází těhotenství a s tím se také mění požadavky na transportní funkci. V závislosti na tom se mění i exprese jednotlivých transportérů během těhotenství (Joshi et al., 2016).

MDR1 v placentě byl hodnocen v některých studiích, které se shodují že dochází k poklesu exprese na mRNA i proteinové úrovni od prvního trimestru směrem k porodu (Gil et al., 2005; Sun et al., 2006). Možným důvodem proč dochází během těhotenství ke snižování placentárního MDR1 by mohla být jeho časná potřeba odvádět toxiny (léky, chemikálie) především během období, které je kritické při organogenezi, a to tedy ze začátku těhotenství (Walker et al., 2017), zatímco v období blízkém porodu, už je plod sám vybaven svou expresí MDR1 a potenciálně toxické látky, které by případně přestoupily přes placentu, je schopný rychleji eliminovat a omezit i jejich intestinální absorpci a distribuci do svých citlivých tkání (van Kalken et al., 1992).

Změny exprese BCRP v placentě jsou sporné. Jedna ze studií udává, že BCRP je v placentě v průběhu těhotenství nižší v raných fázích těhotenství a s přibližujícím se porodem exprese těchto transportérů roste. Jejich rozsáhlá exprese v placentě v dřívějších fázích těhotenství dokládá, že mají významný ochranný mechanismus pro vyvíjející se plod (Hahnova-Cygalova et al., 2011).

Expresí MRP1 transportérů se mění v závislosti na gestačním věku (Walker et al., 2017). Je dokládáno, že exprese s gestačním věkem roste (Pascolo et al., 2003). Stejně tak u MRP2 bylo zjištěno, že jejich exprese roste se zvyšujícím se gestačním věkem (H. E. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005).

MRP4 se nachází na apikální membráně terminálních placentárních syncytiotrofoblastů (Azzaroli et al., 2007). Informace o změně exprese během gestačního věku se zatím neví.

MRP5 transportér je na straně přivrácené k plodu a má se tedy za to, že nehraje roli v ochraně plodu před přichozími látkami (Walker et al., 2017). Expresí tohoto transportéru během těhotenství postupně klesá (H. E. U. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005).

## **4 CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo (1) porovnání genové exprese šesti nejvýznamnějších ABC efluxních transportérů v prvotrimestrálních a terminálních placentách získaných po fyziologickém porodu či císařském řezu. Dalším cílem (2) bylo identifikovat a porovnat v rámci terminálních placent expresi těchto transportérů v izolovaných trofoblastech a ve fetálních endoteliálních buňkách, jakožto hlavních místech výměny látek a přestupu živin přes placentu.

# 5 PRAKTICKÁ ČÁST

## 5.1 Materiál a metodika

### Odběry placent

Třináct vzorků prvotrimestrálních placent bylo získáno pro vědecké účely z Porodnicko-gynekologické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové po provedení plánovaného ukončení fyziologického těhotenství (na žádost těhotné).

Patnáct vzorků bylo odebráno z mikrovilózní části placent do 30 minut po spontánním porodu nebo císařském řezu na konci třetího trimestru. Všechny placenty přitom pocházely z fyziologického těhotenství bez komplikací a bez medikace.

Odběry placentárních vzorků proběhly na základě udělení informovaného souhlasu v souladu s platným schválením etickou komisí č. 201706 S17P.

Odebrané vzorky byly do zpracování uchovávány v hluboko mrazícím boxu (-80°C).

### Vzorky mRNA trofoblastů a endoteliálních buněk

Pět vzorků izolované mRNA z endoteliálních buněk fetálních cév a dvou trofoblastů bylo poskytnuto pro vědecké účely z laboratoře Assoc. Prof. Christiana Wadsacka z Gynekologického ústavu na Lékařské Univerzitě v Grazu. Další dva vzorky trofoblastů (a následně mRNA) byly vyizolovány na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (Tupova et al., 2020).

### Chemikálie

- fosfátový pufr, PBS (Lonza, Basilej, Švýcarsko)
- TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)
- chloroform (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 2-propanol (Sigma Aldrich)
- čistý ethanol (Sigma Aldrich)
- voda pro injekce – API (B. Braun Medical, Melsungen, Německo)
- Gb Basic Reverse Transcription kit (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
- TaqMan® Universal Master Mix II (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)
- Taq Man® Real Time Expression PCR assays (ThermoFisher Scientific)

- *ABCB1* (Hs00184500\_m1)
- *ABCG2* (Hs01053790\_m1)
- *ABCC1* (Hs01561483\_m1)
- *ABCC2* (Hs00960488\_m1)
- *ABCC4* (Hs00988721\_m1)
- *ABCC5* (Hs00981089\_m1)

## **Homogenizace tkáně**

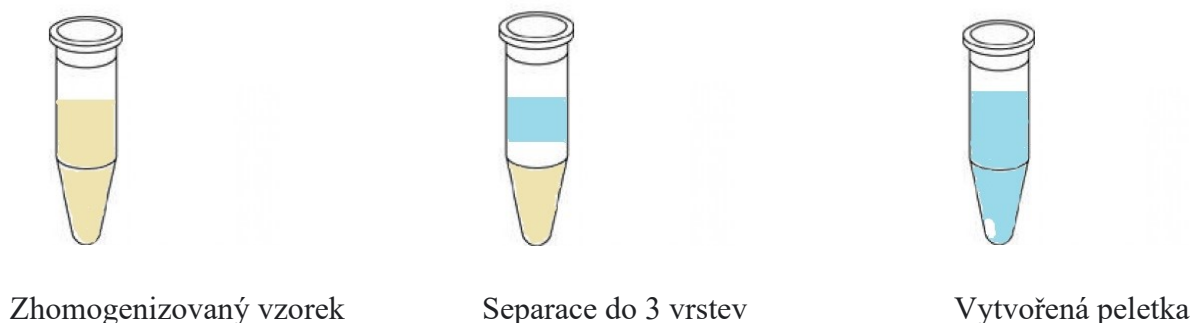
Z každé terminální placenty byl odebrán ze tří odlišných míst vzorek vilózní tkáně. Tkáň byla nejprve omyta od zbytkové krve pomocí ledového PBS a následně rozstříhána na drobné kousky do čisté 2 ml mikrozkušavky. Zpracování tkáně probíhá na ledu, aby se zabránilo degradaci RNA. Výsledné kousky vzorků pak byly spojeny („poolovány“) a následně z nich bylo použito cca 80 – 100 mg pro izolaci RNA. Ke tkáni byl přidán 1 ml TRI Reagentu, poté byla směs zhomogenizována pomocí tyčového homogenizátoru (TRI REAGENT®, 2017).

## **Postup izolace RNA z homogenizované tkáně**

Izolace RNA (Obr. 11) je založena na principu fenol-chloroformové extrakce. Ke zhomogenizovanému vzorku byl přidán chloroform (200 ul/1 ml), se kterým byl vzorek promísen. Následně byly vzorky centrifugovány na 12 000 otáček při 8°C po dobu 15 minut, díky čemuž byly v mikrozkušavce vytvořeny 3 vrstvy. V horní čiré vodné vrstvě se nachází rozpuštěná RNA, spodní organická fáze obsahuje proteiny a lipidy a mezi nimi se nachází bílý prstenec, v němž je zachycena deoxyribonukleová kyselina (DNA). Pro náš pokus byla získávána čistá RNA tak, aby nedošlo k narušení vrstvy DNA. K získávání RNA byla použita mikropipeta, pomocí které bylo odebíráno co největší množství vodné vrstvy s rozpuštěnou RNA do další mikrozkušavky. Při narušení vrstvy byl vzorek opět centrifugován.

Získaná RNA byla smíšena s 2-propanolem (500 ul/1 ml TRI Reagentu) pro následnou precipitaci RNA (inkubace 10 minut při laboratorní teplotě). Po zvortexování byl vzorek vložen do centrifugy, která byla opět nastavena na 8°C, 12 000 otáčkách, 5 minut. Během toho procesu vytváří RNA bílou peletku. Supernatant byl odstraněn pomocí pipety a peletka RNA opláchnuta pomocí 75% ethanolu (1ml/1ml TRI Reagentu) s kterým byla centrifugována opět při 12000 otáčkách po dobu 5 minut při 8°C. Čištění RNA pomocí ethanolu bylo prováděno dvakrát pro

zvýšení čistoty a jeho zbytky byly odpařeny na vzduchu. Následně byla peletka rozpuštěna ve 20  $\mu$ l API (TRI REAGENT®, 2017).



Obr. 11 – Princip izolace RNA z homogenizované tkáně (Převzato a přepracováno dle: Medplus, 2021).

### Měření čistoty RNA

Koncentrace a čistota izolované mRNA byla měřena pomocí přístroje nanodrop (ND 1000, Thermo Fisher Scientific), který pracuje na principu spektrofotometrie. Nejprve byly očištěny kontaktní plochy nanodropu, na které se nanáší vzorek (1  $\mu$ l), a také API, která současně slouží jako slepý vzorek. Na tomto přístroji měříme koncentraci RNA v ng/ $\mu$ l na základě absorbance při vlnové délce 260 nm a absorpční poměr 260 nm/ 280 nm, který znázorňuje čistotu daného vzorku. Absorbance při vlnové délce 260 nm znázorňuje koncentraci RNA a při 280 nm je znázorněna její čistota. (Barbas et al., 2007). Absorpční poměr a tudíž čistota RNA by měla být přibližně rovna 2. Nižší absorpční poměr naznačuje kontaminaci vzorku proteiny nebo fenoly. Po zjištění koncentrací jednotlivých vzorků byly tyto vyředěny na výslednou koncentraci RNA 500 ng/ $\mu$ l a uchovány při -80 °C (Thermo Fisher Scientific, 2010).

### Reverzní transkripce

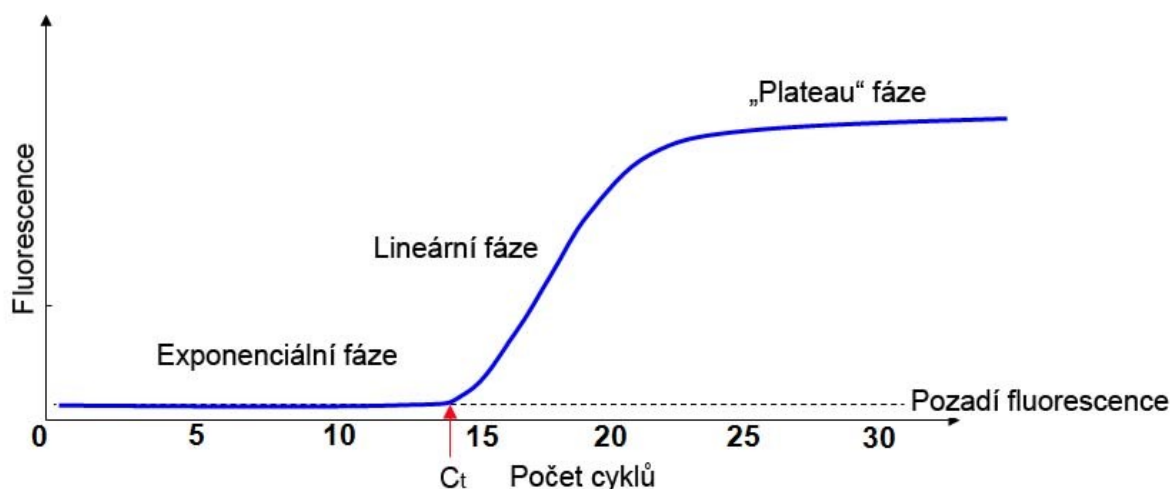
Pro umožnění kvantifikace genové exprese pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je nutné získanou RNA přepsat do podoby komplementární DNA (cDNA). K tomuto dochází pomocí enzymu reverzní transkriptázy, tzv. RNA-dependentní DNA polymerázy. Sekvence RNA zde slouží jako šablona pro reverzní transkriptázu, vzniklá cDNA, je pak využita jako templát pro PCR. Reverzní transkriptáza nasedá na jednořetězcový úsek RNA. Aby mohl přepis

začít, je třeba, aby byl přítomen náhodný primer (ve formě oligonukleotidu poly(dt) a/nebo hexameru), který je komplementárně navázán na daný řetězec RNA a také nukleotidy sloužící jako stavební kameny nově vznikajícího vlákna. Díky komplementaritě je pak syntetizována cDNA (LabGuide, 2021b; Thermo Fisher Scientific, 2014).

## Real-time PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda umožňující exponenciální amplifikaci specifické nukleové kyseliny. Amplifikace DNA pomocí PCR je docílena po několika cyklech replikace DNA *in vitro* (Kuslich et al., 2019). V této klasické PCR dochází k detekci a kvantifikaci amplifikované DNA až na konci reakce (Thermo Fisher Scientific, 2014). PCR se skládá z cyklicky se opakující denaturace, annealingu a elongace. Denurací se rozumí oddělení vláken dvoušroubovice DNA působením tepla. Následným krokem je annealing, díky kterému dochází na základě komplementarity k připojení primerů k DNA. A posledním, klíčovým krokem je elongace, při které dochází k prodloužení primerů pomocí DNA polymerázy (Zdeňková Kamila, 2014).

Její modifikací tedy vzniká Real-time PCR, což je tedy klasická PCR, ale oproti ní zde dochází ke kvantifikaci DNA v každém cyklu. Pro tuto reakci je důležitý fluorescenční substrát, který se naváže na DNA a následně vyzařuje fluorescenci (Obr.12). Je zde také detektor, který zaznamenává fluorescenci, a tím nám umožňuje zjistit množství DNA v našich vzorcích (LabGuide, 2021a). Námí prováděný pokus byl prováděn na destičkách s 384 jamkami. Jako zdroj fluorescence zde byly použity TaqMan sondy (=oligonukleotidy). Do reakce se vkládají primer a oligonukleotid, který je na jednom konci fluorescenčně označen a na druhém konci má zhášeč. PCR reakce probíhá vždy běžným způsobem, dokud DNA polymeráza syntetizující nový řetězec nenarazí na tento oligonukleotid. Poté ho vytěsňuje z templátu a štěpí ho. Díky tomu už není fluorescenční sonda ve zkumavkách vázána čímž je umožněno změřit fluorescenci v jednotlivých zkumavkách (Wikiskripta, 2020b). Se zvyšujícím se počtem opakování daných cyklů se zvyšuje fluorescenční signál (LabGuide, 2021c).



Obr.12 - PCR soustava - V exponenciální fázi dochází k nárůstu DNA a s ním taky spojené fluorescence, ale ten není ještě tak velký, aby mohl být zachycen detektorem. Postupně dochází ke zvýšení intenzity fluorescence a současně i DNA a následnému strmému vzestupu – tzv. lineární fáze, což už je detektorem zachyceno. Poslední fází je tzv. „plateau“ fáze. Zde je velké množství DNA, ale postupně dochází k vyčerpávání a zpomalování reakce. Proto se už tato fáze nepoužívá pro vyhodnocování množství DNA (Převzato z: LabGuide, 2021a).

### Výpočet vlastní genové exprese

Pro tento výpočet je významná  $C_t$  hodnota, což je takzvaná prahová hodnota. (Obr. 11) Zachycuje, v kterém cyklu dojde k nárůstu fluorescence do takové míry, že je možno ji zachytit detektorem. Čím je  $C_t$  hodnota nižší, tím více je v reakci templátové DNA a čím je hodnota  $C_t$  vyšší, tím méně DNA se v reakci nachází. Abychom mohli reakci kvantifikovat, potřebujeme tzv. vnitřní kontrolu. Díky ní jsme schopni říci, jestli bylo použito u jednotlivých vzorků srovnatelné množství vstupního materiálu. Vnitřní kontrola je vždy nějaký gen, jehož množství by mělo být u všech vzorků, které testujeme stejné (LabGuide, 2021a). Jako vnitřní kontrolu jsme užívali tzv. referenční „housekeeping“ gen YWHAZ.

U každého genu byl spočítán průměr z  $C_t$  hodnot, které byly zjištěny při real-time PCR. Na plato byly vzorky pipetovány v duplikátech, takže byl průměr stanovován ve většině případů ze dvou hodnot. Následně došlo k výpočtu  $\Delta C_t = C_{ct} \text{ vzorku} - C_{ct} \text{ YWHAZ}$ . Tento výsledek byl

poté použit při dalším výpočtu:  $2^{-\Delta ct}$ . Posledním krokem byl přepočet na placentu 50 dle vzorce:  $2^{-\Delta ct}$  vzorku/ $2^{-\Delta ct}$  vz. Ctrl50. Tyto hodnoty byly následně využity pro grafické znázornění a stanovení statistické významnosti.

## 5.2 Statistická analýza

Pro zpracovávání výsledků byl použit program GraphPad Prism, verze 9.1.

Pro určení statistické významnosti byl v případě porovnání genové exprese mezi prvním a třetím trimestrem použit neparametrický nepárový test Man Whitney:  $P^* \leq 0,05$ ;  $P^{**} \leq 0,01$ ;  $P^{***} \leq 0,001$ . Pro nedostatek vzorků izolovaných trofoblastů nebylo možné pro geny *ABCC2*, *ABCC4* a *ABCC5* určit statistickou významnost mezi genovou expresí v buňkách trofoblastu a endoteliálními buňkami.



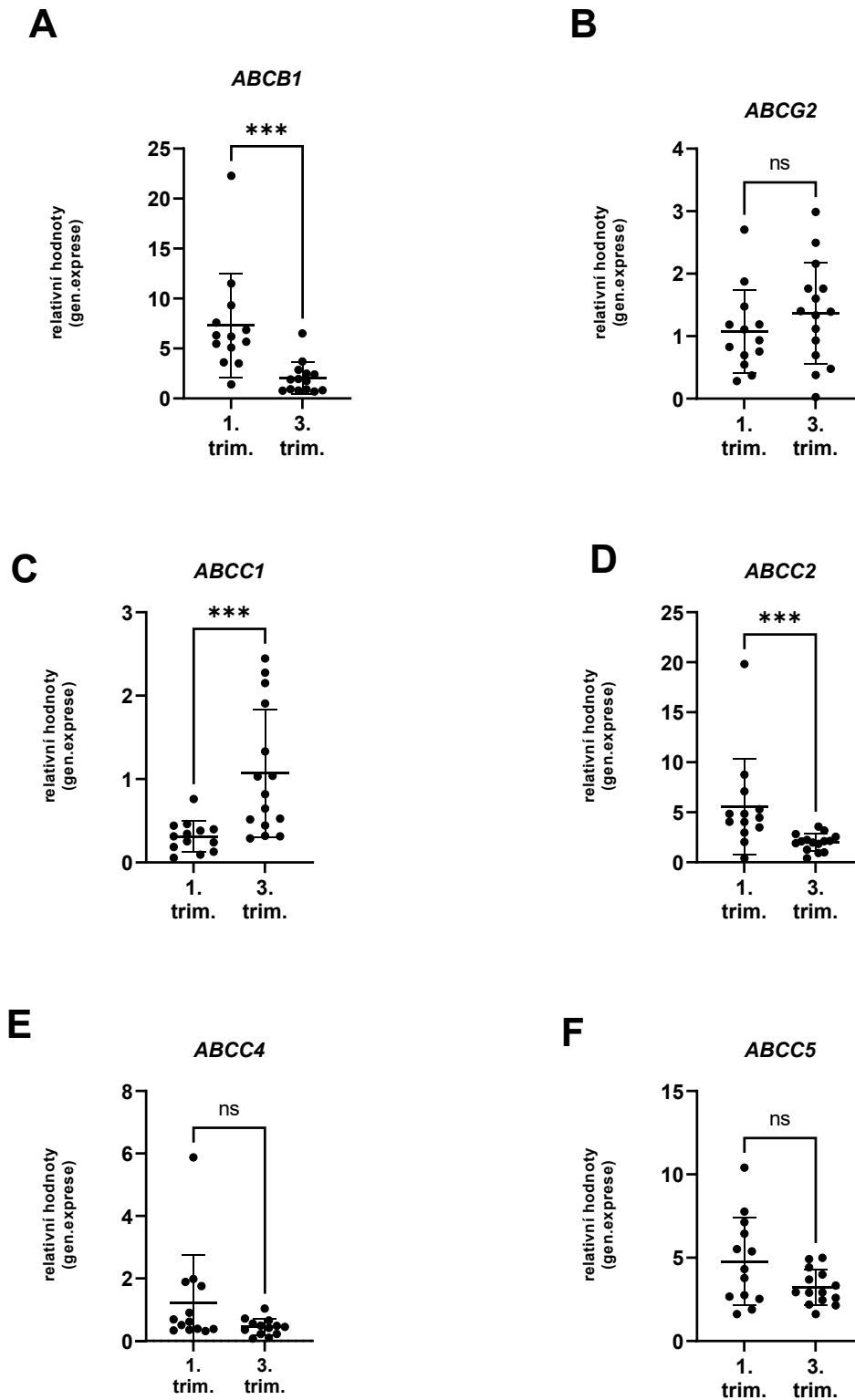
## 6 VÝSLEDKY

### 1. Genová exprese ABC transportérů v placentách prvního a třetího trimestru

Po vyhodnocení dat jsme pozorovali signifikantně rozdílnou genovou expresi mezi placentami prvního ( $n = 13$ ) a třetího trimestru ( $n = 15$ ) celkem u tří testovaných genů.

Vyšší exprese v prvním trimestru byla detekována pro *ABCB1* (3,6 krát,  $P^{***} \leq 0,001$ ) a *ABCC2* (2,8 krát,  $P^{***} \leq 0,001$ ). Tento trend byl pozorován i pro *ABCC4* (2,8 krát, ns.), z důvodu vysokého rozptylu však nebylo dosaženo statistické významnosti. Naopak exprese *ABCC1* byla signifikantně zvýšená ve třetím trimestru (3,4 krát,  $P^{***} \leq 0,001$ ).

Poměr genové exprese (první/třetí trimestr) pro *ABCG2* (0,8) a *ABCC5* (1,5) byl blízko jedné a expresi lze pokládat za stabilní v průběhu těhotenství (Obr. 13).



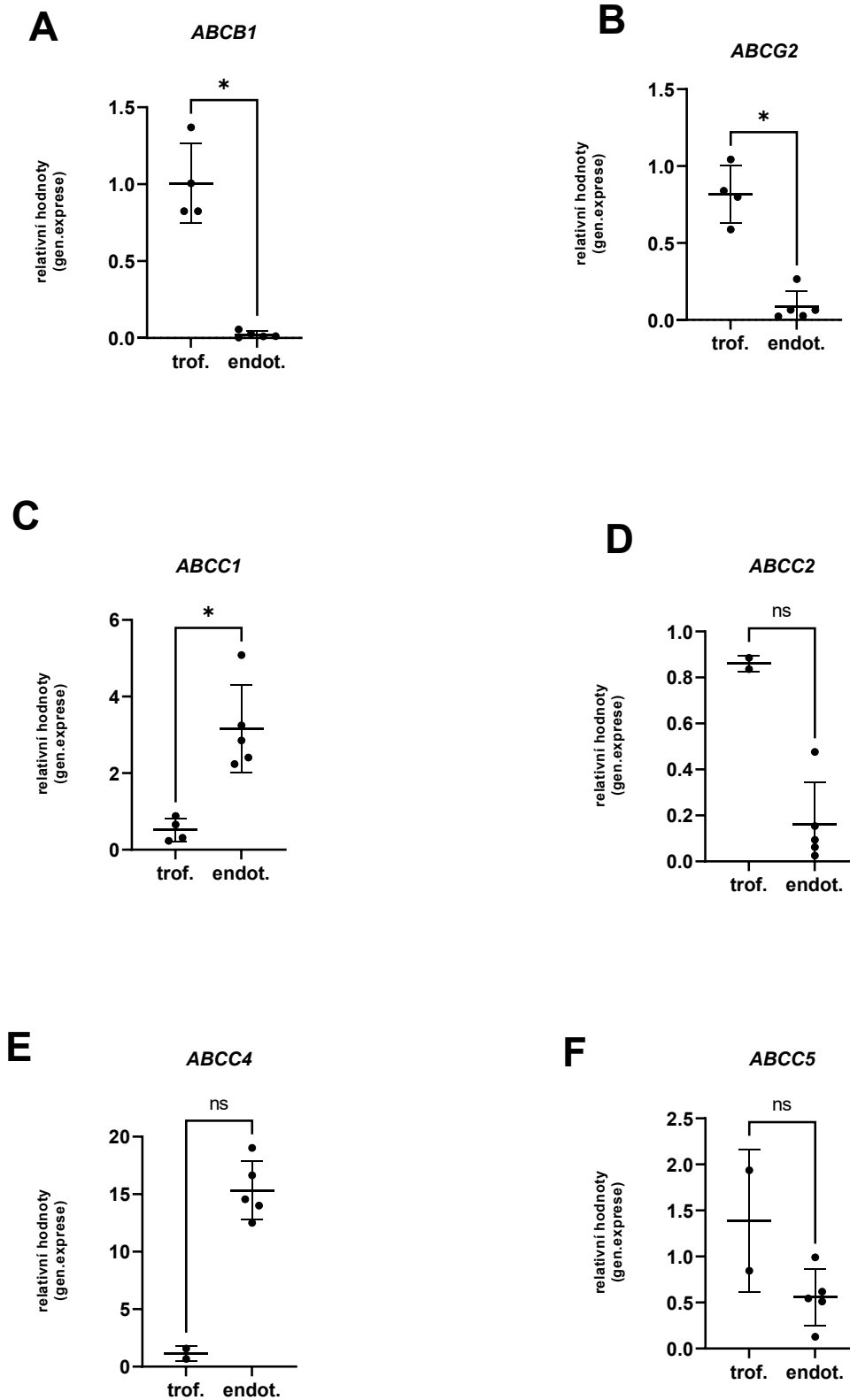
Obr. č. 13 - Porovnání genové exprese ABC transportérů v placentách prvního a třetího trimestru. Výsledky byly hodnoceny pomocí neparametrického nepárového Man Whitney testu,  $P^{***} \leq 0,001$ ).

## 2. Genová exprese ABC transportérů v trofoblastech a endoteliálních buňkách

Statistickou významnost pro porovnání genové exprese transportérů mezi buňkami trofoblastu ( $n = 4$ ) a endoteliálními buňkami fetálních cév ( $n = 5$ ) bylo možné hodnotit pouze pro tři geny: *ABCB1*, *ABCG2* a *ABCB1*. Ve všech případech bylo dosaženo statisticky významné rozdílnosti.

Expres *ABCB1* byla 48,9 krát ( $P^* \leq 0,05$ ) a expres *ABCG2* 18,1 krát ( $P^* \leq 0,05$ ) vyšší v buňkách trofoblastu než endoteliálních buňkách. Naopak expres *ABCCI* byla vyšší (6,5 krát,  $P^* \leq 0,05$ ) v endoteliálních buňkách.

Statistickou významnost nebylo možné hodnotit u genů *ABCC2*, *ABCC4* a *ABCC5* z důvodu nedostatečného počtu vzorků izolovaných trofoblastů ( $n = 2$ ). Nicméně byla pozorována vyšší expres *ABCC2* (5,2 krát) v buňkách trofoblastu a vyšší expres *ABCC4* (13,8 krát) v endoteliálních buňkách. Expresi pro *ABCC5* není možné hodnotit z důvodu velkého rozptylu dat mezi dvěma vzorky trofoblastů, jež byly ke studii použity (Obr. 14).



Obr. č. 14 - Porovnání genové exprese ABC transportérů v izolovaných buňkách trofoblast a endoteliálních buněk z fetálních cév. Výsledky byly hodnoceny pomocí neparametrického nepárového testu Man Whitney,  $P^* \leq 0,05$ ).

## 7 DISKUZE

Placenta je orgán, který je důležitý pro plod z hlediska jeho vývoje. Klíčovou funkcí je zásobení plodu živinami, kyslíkem a odvod odpadních látek (Hájek Zdeněk et al., 2014). Placenta se mění během jednotlivých trimestrů jak z hlediska struktury, tak i funkce (Burton & Jauniaux, 2015). Transport látek přes placentu je zprostředkován mnoha mechanismy, přičemž velmi důležitý je transport pomocí proteinových přenašečů (Walker et al., 2017). Expres těchto transportérů se může měnit v závislosti na fázi těhotenství a rovněž se liší dle lokalizace v jednotlivých typech placentárních buněk (Joshi et al., 2016). V rámci naší práce jsme se zaměřili na variabilitu exprese šesti ABC efluxních placentárních transportérů: MDR1, BCRP, MRP1, MRP2, MRP4 a MRP5 s cílem porovnat jejich genovou expresi mezi placentami prvního ( $\leq 13$  tt.,  $n = 13$ ) a třetího ( $\geq 38$  tt.,  $n = 15$ ) trimestru a mezi buňkami trofoblastů a fetálních endoteliálních kapilár izolovaných rovněž z placent třetího trimestru.

MDR1 kódovaný genem *ABCB1* je nejdéle známým a dosud nejlépe popsáným ABC transportérem (Joshi et al., 2016). Jeho zvýšená placentární exprese v prvním trimestru s postupným poklesem směrem k porodu na genové i proteinové úrovni byla popsána již mnoho let zpátky (Gil et al., 2005; Sun et al., 2006; Mathias et al., 2005). Podobný trend jsme vyhodnotili i v naší práci, kdy jsme pozorovali 3,5násobné snížení exprese *ABCB1* v terminálních placentách oproti prvotrimestrálním, čímž jsme též nepřímě ověřili náš správný přístup a metodiku pro hodnocení studované problematiky (Obr. 13 A)

Expres BCRP transportéru kódovaného genem *ABCG2* je v rámci lidského organismu nejvyšší právě v placentě (Mao, 2008). Přestože případné změny v průběhu těhotenství byly často studovány, výsledky jsou dosud nejednotné a ve svých závěrech se rozcházejí. Snižující se expresi BCRP transportéru směrem k porodu popsal např. (Petrovic et al., 2015; Williams et al., 2012), jejich závěry však částečně vychází z porovnávání zdravých terminálních placent a placent získaných po předčasných porodech komplikovaných např. bakteriálním zánětem či pre-eklamsií, což jsou situace, které rovněž mohou přispět k ovlivnění exprese (Petrovic et al., 2015). Naopak Yeboah et al., 2006 popsal zvýšenou expresi v třetím trimestru, avšak beze změn na úrovni mRNA. Zcela stabilní expresi BCRP v průběhu těhotenství pak pozoroval Mathias et al., 2005, což se shoduje i s našimi daty (Obr. 13 B).

Z podrodiny MRP transportérů patří mezi nejlépe popsané na placentě především MRP1 a MRP2 transportér (Pascolo et al., 2003; H. E. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005; St-pierre et al., 2000). Zatímco MRP2 transportér je ko-lokalizován a často spojován především

s obdobnou protektivní funkcí placenty jako MDR1 a BCRP (Leslie et al., 2005), naopak lokalizace MRP1 byla již několikrát potvrzena na bazálních membránách s protichůdným směrem transportu (Evseenko et al., 2006; Nagashige et al., 2003). Z hlediska gestačního věku jsme pozorovali signifikantní změny v genové expresi jak pro MRP1 (kódovaný *ABCC1*), tak pro MRP2 (kódovaný *ABCC2*) transportér. V případě MRP1 se naše výsledky ukazující vyšší genovou expresi v placentách třetího trimestru shodují s již dříve publikovanou studií (Pascolo et al., 2003) (Obr. 13 C). Pro expresi MRP2 byl v dřívější studii popsán podobný trend, tedy zvyšující se genová exprese MRP2 směrem k porodu. Nicméně terminální placenty byly porovnávány s placentami z předčasných porodů (23 – 37 tt.) (H. E. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005), nikoliv s placentami prvního trimestru jako v naší studii, kdy jsme naopak pozorovali vyšší genovou expresi MRP2 v prvním oproti třetímu trimestru (Obr. 13 D).

Dosavadní znalosti o expresi a funkci MRP4 a MRP5 transportérů jsou oproti výše diskutovaným zástupcům značně prořídlé, což může souviset například i s nižším potenciálem těchto transportérů pro interakce s léčivými látkami (Giacomini et al., 2021). Avšak stále se rozvíjející poznatky o zapojení ABC transportérů i do řady fyziologických a patofyziologických procesů obrací pozornost i k těmto dosud méně studovaným členům. V naší studii jsme pozorovali pokles genové exprese obou transportérů směrem k porodu (2,8 -krát pro *ABCC4* a 1,5 -krát pro *ABCC5*), avšak vzhledem k vysokému rozptylu výsledků nebylo ani v jednom případě dosaženo statistické významnosti. Zatímco podobná tendence byla pro MRP5 popsána i ve dvou předchozích studiích (Pascolo et al., 2003; H. E. U. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005) v případě MRP4 se jedná o první porovnání genové exprese v lidské placentě v průběhu gestačního věku (Obr. 13 E, F).

Ve druhé části této práce jsme se zaměřili na porovnání genové exprese zde studovaných ABC transportérů mezi buňkami trofoblastu ( $n = 4$ ) a fetálních endoteliálních buněk ( $n = 5$ ) izolovaných z terminálních placent. Zatímco buňky trofoblastu se nachází na pomyslném vrcholu choriových klků a v podobě mnohojaderného syncytiotrofoblastu jsou v přímém kontaktu s mateřskou krví (Hájek Zdeněk et al., 2014), endoteliální buňky tvoří výstelku fetálních kapilár, ve kterých proudí krev plodu (Blaschitz' et al., 1997). Za velmi zajímavé, avšak v celku logické lze považovat zjištění, že genová exprese ABC transportérů v trofoblastech je v podstatě srovnatelná s genovou expresí detekovanou ze vzorků odebraných z vilózní tkáně placenty, která je z velké míry tvořena právě trofoblasty (Benirschke, 2004). Avšak endoteliální buňky zaujímají v celkové hmotě placenty pouze nepatrnou část a míra

zastoupení jednotlivých ABC transportérů se projevila, až při porovnání genové exprese vycházející z mRNA izolované a přeepsané přímo z vyzolovaných endoteliálních buněk.

Za velmi zanedbatelnou lze v endoteliálních buňkách považovat genovou expresi *ABCB1* a *ABCG2*, jelikož jejich zastoupení v trofoblastech bylo 48,9-krát vyšší v případě *ABCB1* (Obr. 14 A) a 18,1-krát vyšší pro *ABCG2* (Obr. 14 B). Naopak exprese *ABCC1* (6,5-krát) byla signifikantně vyšší v endoteliálních buňkách (Obr. 14 C). Bohužel z důvodu nedostatečného množství izolované mRNA máme údaje o expresi *ABCC2*, *ABCC4* a *ABCC5* stanovené u trofoblastů izolovaných pouze ze dvou různých placent, a proto jsme nebyli schopni v době kompletace diplomové práce stanovit u těchto genů statistickou signifikanci. Nicméně pilotní data naznačují významnější expresi *ABCC2* v buňkách trofoblastu (5,2-krát vyšší) (Obr. 14 D) a pro *ABCC4* naopak v endoteliálních buňkách (13,9-krát) (Obr. 14 E). Vzhledem k vysokému rozptylu v pilotních datech nelze hodnotit genovou expresi *ABCC5* pro jednotlivé buňky (Obr. 14 F). Ačkoliv naše výsledky reflektují pouze poměr genové exprese ABC transportérů v trofoblastech a endoteliálních buňkách a nikoliv jejich lokalizaci, na základě řady odborných publikací můžeme předpokládat lokalizaci MDR1, BCRP, MRP2 a MRP4 transportéru spíše na apikálních membránách (Staud et al., 2012; Evseenko et al., 2007; St-pierre et al., 2000; Azzaroli et al., 2007) a naopak MRP1 a MRP5 na membránách bazálních (St-pierre et al., 2000; H. E. U. Meyer Zu Schwabedissen et al., 2005). V tomto kontextu nám mohou naše data přispět k lepšímu pochopení významu funkcí jednotlivých ABC transportérů v konkrétních částech placenty a vzhledem k proměnlivé expresi v průběhu gestačního věku i k lepšímu pochopení jejich zapojení do fyziologického řízení těhotenství.

## 8 ZÁVĚR

ABC transportéry přispívají významnou měrou k regulaci a řízení přestupu látek přes placentu, čímž napomáhají správnému průběhu těhotenství. Kromě ochranné funkce, kdy odčerpávají z placentárních buněk cizorodé a potenciálně škodlivé látky, jsou zapojeny i do odvodu odpadních látek směrem z plodu do mateřské krve a dále pomáhají regulovat přestup a distribuci řady endogenních látek. V případě nutnosti farmakoterapie mohou též ovlivňovat materno-fetální farmakokinetiku podávaných léčiv během těhotenství (Hájek Zdeněk et al., 2014; Walker et al., 2017).

Expres ABC transportérů v placentě je proměnlivá s postupujícím těhotenstvím a rovněž se liší mezi jednotlivými typy buněk formujících placentu, což je nutné brát v úvahu při hodnocení přestupu jednotlivých látek přes placentu (Joshi et al., 2016).

V této práci jsme popsali a porovnali genovou expresi šesti ABC transportérů mezi placentami prvního a třetího trimestru a dále mezi izolovanými buňkami trofoblastu a endoteliálních buněk fetálních kapilár. Za stabilní v průběhu těhotenství lze považovat expresi BCRP, MRP4 a MRP5 transportérů. Naopak signifikantní změny byly pozorované v genové expresi MDR1, MRP1 a MRP2 transportérů, přičemž exprese transportérů lokalizovaných primárně na apikální membráně trofoblastu, MDR1 a MRP2 se ke konci těhotenství výrazně snižuje. Naopak, exprese MRP1 lokalizovaného na membráně bazální s dozráváním placenty stoupá. Význam těchto změn pro distribuci xenobiotik a případně konjugátů látek přes placentu zůstává otázkou.

Genová exprese detekovaná v buňkách izolovaných trofoblastů korelovala s hodnotami získanými po vyhodnocení mRNA exprese ze vzorků plných placent třetího trimestru. Naše práce dále odhaluje poměrně vysokou expresi MRP1 a MRP4 ve fetálních endotelových buňkách ve srovnání s buňkami trofoblastu. Role této vyšší exprese a funkce uvedených MRP transportérů pro přestup látek z matky do plodu, či v opačném směru přitom není zřejmá a pro plné pochopení transportních funkcí placenty by měly být tyto proteiny předmětem dalších studií.



## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Azzaroli, F., Mennone, A., Feletti, V., Simoni, P., Baglivo, E., Montagnani, M., Rizzo, N., Pelusi, G., de Aloysio, D., Lodato, F., Festi, D., Colecchia, A., Roda, E., Boyer, J. L., & Mazzella, G. (2007). Clinical trial: Modulation of human placental multidrug resistance proteins in cholestasis of pregnancy by ursodeoxycholic acid. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(8), 1139–1146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03462.x>
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.ip47>
- Benirschke, K. (2004). *The Placenta: Structure and Function*. <https://doi.org/10.1542/neo.5-6-e252>
- Blaschitz', A., Lenfant', F., Mallef, V., Hartmann', M., Bensussan3, A., Geraghw, D. E., le Bouteille8, P., & Dohrl, G. (1997). Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. In *Eur. J. Immunol* (Vol. 27).
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: A multifaceted, transient organ. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 370, Issue 1663). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4), S6.e1-S6.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>
- Český statistický úřad. (2020, April 24). *Pohyb obyvatelstva - rok 2020*. <https://www.czso.cz/csu/czso/cri/pohyb-obyvatelstva-rok-2020>
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. In *International Journal of Toxicology* (Vol. 25, Issue 4, pp. 231–259). <https://doi.org/10.1080/10915810600746023>
- Co je to malý gestační věk?* (2021, April 25). <http://www.vyrostu.cz/D%C4%9Bti/Mal%C3%BD-na-gesta%C4%8Dn%C3%AD-v%C4%9Bk-SGA>
- DrugAgency. (2021, April 25). *P-glykoprotein*. <http://www.drugagency.cz/soubory/549958915450464.pdf>
- Evseenko, D. A., Murthi, P., Paxton, J. W., Reid, G., Emerald, B. S., Mohankumar, K. M., Lobie, P. E., Brennecke, S. P., Kalionis, B., & Keelan, J. A. (2007). The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *The FASEB Journal*, 21(13), 3592–3605. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8688com>
- Evseenko, D. A., Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2006). ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast.

- American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 290(5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00630.2005>
- Giacomini, K. M., Galetin, A., & Huang, S. M. (2021). *Office of Clinical Pharmacology, Food and Drug Administration*. 301–796. <https://doi.org/10.1002/cpt.01224>
- Gil, S., Saura, R., Forestier, F., & Farinotti, R. (2005). P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta*, 26(2–3), 268–270. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.05.013>
- GollaBala, A., Abdul Ahad, H., Chintaginjala, H., Reddy Chapidi, S., & Kodi, K. (2019). *A technical view on transporters-the drug pharmacokinetics dictators*. <https://doi.org/10.15406/mojbb.2019.06.00134>
- Hahnova-Cygalova, L., Ceckova, M., & Staud, F. (2011). Fetoprotective activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2): Expression and function throughout pregnancy. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 43, Issue 1, pp. 53–68). <https://doi.org/10.3109/03602532.2010.512293>
- Hájek Zdeněk, Čech Evžen, & Maršál Karel. (2014). *Porodnictví, 3. zcela přepracované a doplněné vydání*. Grada.
- Ilancheran, S., Moodley, Y., & Manuelpillai, U. (2009). Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? *Placenta*, 30(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.009>
- Joshi, A. A., Vaidya, S. S., St-Pierre, M. v., Mikheev, A. M., Desino, K. E., Nyandege, A. N., Audus, K. L., Unadkat, J. D., & Gerck, P. M. (2016). Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 33, Issue 12, pp. 2847–2878). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2028-8>
- Kovář Petr. (2021, May 14). *Potrat a potrácení*. <https://www.gynprenatal.cz/potrat-a-potraceni>
- Kuslich, C. D., Chui, B., & Yamashiro, C. T. (2019). Overview of PCR. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 18(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.27>
- LabGuide. (2021a, April 25). *Real-time PCR*.
- LabGuide. (2021b, April 25). *Syntéza cDNA*. <https://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>
- LabGuide. (2021c, April 25). *TaqMan sondy*.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 204, Issue 3, pp. 216–237). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>

- Lim Rebecca. (2015, May 13). *World's 1st Trial of Amnion Stem Cells for Premature Babies* .  
<https://parentsguidecordblood.org/en/news/worlds-1st-trial-amnion-stem-cells-premature-babies>
- Liu, X. (2019). ABC Family Transporters. In *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2)
- Mao, Q. (2008). BCRP/ABCG2 in the placenta: Expression, function and regulation. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 25, Issue 6, pp. 1244–1255). Springer New York LLC.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-008-9537-z>
- Mathias, A. A., Hitti, J., & Unadkat, J. D. (2005). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, 963–969. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00173.2005.-Placental>
- Medalová Jiřina. (2016, April 25). „ABC“ o ABC transportérech.  
[https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi5611c/um/ABC\\_transportery2016.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi5611c/um/ABC_transportery2016.pdf)
- Medical dictionary. (2011, May 13). *Placental membrane*. [https://medicine.encyclopedia.com/139719/placental\\_membrane](https://medicine.encyclopedia.com/139719/placental_membrane)
- Medplus. (2021, May 13). *Mikrozkumavka EPPENDORF*. <https://www.medplus.cz/doprodej-mikrozkumavka-1-5ccm-eppendorf-s-uzaverem-200-ks/>
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Jedlitschky, G., Gratz, M., Haenisch, S., Linnemann, K., Fusch, C., Cascorbi, I., & Kroemer, H. K. (2005). Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: Influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(7), 896–904.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.104.003335>
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E. U., Grube, M., Heydrich, B., Linnemann, K., Fusch, C., Kroemer, H. K., & Jedlitschky, G. (2005). Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: Effects of gestational age and cellular differentiation. *American Journal of Pathology*, 166(1), 39–48. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62230-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62230-4)
- Nagashige, M., Ushigome, F., Koyabu, N., Hirata, K., Kawabuchi, M., Hirakawa, T., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., & Sawada, Y. (2003). Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta*, 24(10), 951–958. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(03\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(03)00170-X)
- Nedoklubko. (2021, May 14). *Předčasný porod*. <https://www.nedoklubko.cz/predcasny-porod/>
- Pascolo, L., Ferneti, C., Pirulli, D., Crovella, S., Amoroso, A., & Tiribelli, C. (2003). Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human

- placenta and in BeWo cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(1), 259–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00327-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00327-9)
- Petrovic, V., Kojovic, D., Cressman, A., & Piquette-Miller, M. (2015). Maternal bacterial infections impact expression of drug transporters in human placenta. *International Immunopharmacology*, 26(2), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.020>
- Průnik látek placentou . (2021, April 24). PORODNICE.CZ. <http://lekari.porodnice.cz/prunik-latek-placentou>
- Rambousek. (2021, May 13). *Oplození*. [http://www.giobio.tode.cz/dokumenty/rambousek/biologie/oplozeni\\_ont\\_vyvoj.pdf](http://www.giobio.tode.cz/dokumenty/rambousek/biologie/oplozeni_ont_vyvoj.pdf)
- Sadler W. Thomas. (2010). *Langmanova lékařská embryologie* . Grada.
- Šípek Antonín. (2021, April 24). *Průběh těhotenství*. Genetika - Biologie. <http://genetikabiologie.cz/prubeh-tehotenstvi>
- Slideplayer. (2021a, May 13). *Placentární oběh*. <https://slideplayer.cz/slide/13011309/>
- Slideplayer. (2021b, May 13). *Výživa zárodku a plodu*. <https://slideplayer.cz/slide/3401649/>
- Soubhana Allah. (2015, May 13). *Placentární transport*. <http://islamiates.e-monsite.com/blog/articles-divers/soubhana-allah-des-cellules-f-tales-viennent-a-la-rescousse-de-la-mere-en-cas-de-maladie.html>
- Staud, F., Cervený, L., & Cecková, M. (2012). Pharmacotherapy in pregnancy; Effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. In *Journal of Drug Targeting* (Vol. 20, Issue 9, pp. 736–763). <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>
- Štěfánek Jiří. (2021, April 25). *Dubin-Johnsonův syndrom*. <https://www.stefajir.cz/dubin-johnsonuv-syndrom>
- St-pierre, M. v, Serrano, M. A., R Macias, R. I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P. J., & G Marin, J. J. (2000). *Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta*. <http://www.ajpregu.org>
- Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., & Gibb, W. (2006). Expression of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the Human Placenta Decreases with Advancing Gestation. *Placenta*, 27(6–7), 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.05.007>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual*. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Real-time PCR handbook*.

- Tonar, K. S. (2021). *2 blastogeneze\_gastrulace*.  
[http://histologie.lfp.cuni.cz/education/doc/outlines/2\\_blastogeneze\\_gastrulace.pdf](http://histologie.lfp.cuni.cz/education/doc/outlines/2_blastogeneze_gastrulace.pdf)
- Trejtnar František. (2016, April 24). *Základní mechanismy transportu léčiv v organismu*.  
<http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakologie-pro-klinika/Zakladni-mechanismy-transportu-leciv-v-organismu/6-1GB-2ah.magarticle.aspx>
- TRI REAGENT®. (2017). *PRODUCT: TRI REAGENT®-RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT*.
- Tupova, L., Hirschmugl, B., Sucha, S., Pilarova, V., Székely, V., Bakos, É., Novakova, L., Özvegy-Laczka, C., Wadsack, C., & Ceckova, M. (2020). Interplay of drug transporters P-glycoprotein (MDR1), MRP1, OATP1A2 and OATP1B3 in passage of maraviroc across human placenta. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 129.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110506>
- van Kalken, C. K., Giaccone, G., van der Valk, P., Kuiper, C. M., Hadisaputro, M. M. N., Bosma, S. A. A., Scheper, R. J., Meijer, C. J. L. M., & Pinedot, H. M. (1992). Multidrug Resistance Gene (P-Glycoprotein) Expression in the Human Fetus. In *American Journal of Pathology* (Vol. 141, Issue 5).
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. <http://nutrigene.4t.com:80/humanabc.htm>
- Walker, N., Filis, P., Soffientini, U., Bellingham, M., O'Shaughnessy, P. J., & Fowler, P. A. (2017). Placental transporter localization and expression in the human: The importance of species, sex, and gestational age difference. In *Biology of Reproduction* (Vol. 96, Issue 4, pp. 733–742). Society for the Study of Reproduction.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox012>
- Weizmann Institute of Science. (2021, April 25). *GeneCards Summary for ABCC4 Gene*.  
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCC4>
- Wikiskripta. (2020a, April 24). *Selektivní transport*.  
[https://www.wikiskripta.eu/w/Selektivn%C3%AD\\_transport](https://www.wikiskripta.eu/w/Selektivn%C3%AD_transport)
- Wikiskripta. (2020b, April 25). *Polymerázová řetězová reakce*.  
[https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1\\_reakce#TaqMan\\_PCR](https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce#TaqMan_PCR)
- Williams, P. J., Mistry, H. D., & Morgan, L. (2012). Folate transporter expression decreases in the human placenta throughout pregnancy and in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 2(2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2011.12.001>
- Yeboah, D., Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., & Gibb, W. (2006). Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(12), 1251–1258. <https://doi.org/10.1139/Y06-078>

Zdeňková Kamila. (2014, April 25). *Metody detekce a identifikace MO se zaměřením na PCR a její variace*. VŠCHT.