**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmakologie a toxikologie

# Studie ontogeneze enzymů zahrnutých v *de novo* syntéze nukleotidů a jejich záchranných reakcích v placentě

Diplomová práce

Jakub Tomek

V Hradci Králové 2024

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

Konzultant práce: MSc. Mohammed Naji Husaen Ali

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

V Hradci Králové Jakub Tomek

# Poděkování

Tímto bych chtěl vřele poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za příležitost podílet se na jedinečném výzkumu placenty, možnost vyzkoušet si práci v profesionálním vědeckém týmu pod jeho vedením, práci a čas, který věnoval na společné konzultace a kompletaci této diplomové práce. Velké díky patří i neobyčejně laskavému MSc. Mohammedu Naji Husaen Alimu, který mi pomohl s laboratorními pracemi, vyhodnocováním výsledků a mnohé mě naučil. Jako poslední bych chtěl poděkovat i mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia, včetně psaní diplomové práce.

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

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

Konzultant: MSc. Mohammed Naji Husaen Ali

Autor: Jakub Tomek

Název diplomové práce: Studie ontogeneze enzymů zahrnutých v *de novo* syntéze nukleotidů a jejich záchranných reakcích v placentě

Placenta je vysoce komplexní, multifunkční orgán, jehož správný růst a vývin je stěžejní pro nekomplikovaný průběh těhotenství, vývin a programování plodu. Nukleos(t)idy hrají zásadní roli v různých buněčných procesech, včetně biosyntetických reakcí, stavby a funkcí koenzymů a signálních mechanismů. Tyto mechanismy jsou obzvláště významné ve tkáních s vysokou proliferační aktivitou, jako je placenta. Nicméně naše porozumění dynamickým změnám v homeostáze nukleos(t)idů v různých fázích gestace a v průběhu diferenciace trofoblastu zůstává omezené.

V této studii jsme zkoumali expresi genů zapojených do *de novo* syntézy a záchranných drah purinů/pyrimidinů, adenosinového metabolismu a signalizaci u prvotrimestrálních placent, placent ze spontánních předčasných porodů, placent z donošeného těhotenství a u *in vitro* buněčných modelů – izolovaných primárních buněk trofoblastu a buněčné linie BeWo. Pro zjištění exprese definovaných skupin genů jsme použili laboratorní metodu qRT-PCR. Naše výsledky ukázaly zvýšenou expresi genů kódující enzymy zapojené do *de novo* syntézy a záchranných reakcí purinových a pyrimidinových nukleos(t)idů, stejně tak adenosinového metabolismu v placentách z donošených těhotenství. Zajímavé zjištění je, že placenty ze spontánních předčasných porodů vykazovaly zvýšenou expresi genů *de novo* syntézy pyrimidinů, purinových záchranných drah, adenosinového metabolismu, transportu a adenosinových receptorů. U diferenciovaných primárních buněk trofoblastu jsme pozorovali posun v expresi genů týkajících se zejména adenosinového metabolismu. Naše výsledky naznačují, že metabolismus nukleos(t)idů je v průběhu vývinu placenty regulován a že dysregulace tohoto dynamického procesu může být spojena s předčasným porodem, a to i ve smyslu kompenzačních mechanismů. Dále změny adenosinového metabolismu a signalizace, které jsme v naší studii pozorovali, poukazují na klíčovou fyziologickou roli tohoto nukleosidu. Je zapotřebí provést další výzkum k plnému objasnění mechanismů metabolismu nukleos(t)idů v lidské placentě a také jakým způsobem je placentární metabolismus nukleos(t)idů ovlivňován v potravě běžně přijímanými methylxantiny (např. kofein), či antiretrovirálními léčivy (např. abakavir) odvozenými od nukleos(t)idů, které se v těhotenství využívají ve farmakoterapii HIV.

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Supervisor: assoc. Prof. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Consultant: MSc. Mohammed Naji Husaen Ali

Author: Jakub Tomek

Title of the thesis: Study of ontogenesis of enzymes involved in *de novo* synthesis and salvage pathways of nucleotides in the placenta

The placenta is a highly complex, multifunctional organ, whose proper growth and development are crucial for an uncomplicated pregnancy, fetal development, and programming. Nucleos(t)ides play a fundamental role in various cellular processes, including biosynthetic reactions, the structure and function of coenzymes, and signaling mechanisms. These mechanisms are particularly significant in tissues with high proliferative activity, such as the placenta. However, our understanding of these dynamic processes, even during trophoblast differentiation, remains limited.

In this study, we investigated the expression of genes involved in the *de novo* synthesis and salvage pathways of purines/pyrimidines, adenosine metabolism, and signaling in first-trimester placentas, placentas from spontaneous preterm births, term placentas, and in vitro cell models – isolated primary trophoblast cells and the BeWo cell line. To determine the expression of defined gene groups, we used the qRT-PCR laboratory method. Our results showed increased expression of genes encoding enzymes involved in *de novo* synthesis and salvage pathways of purine and pyrimidine nucleos(t)ides, as well as adenosine metabolism, in term placentas. An interesting finding was that placentas from spontaneous preterm births exhibited increased expression of genes involved in pyrimidine *de novo* synthesis, purine salvage pathways, adenosine metabolism, transport, and adenosine receptors. In differentiated primary trophoblast cells, we observed a shift in the expression of genes particularly related to adenosine metabolism. Our results suggest that nucleos(t)ide metabolism is regulated during placental development and that dysregulation of this dynamic process may be associated with preterm birth mainly with the compensatory mechanism. Furthermore, the changes in adenosine metabolism and signaling observed in our study point to the critical physiological role of this nucleoside. Further research is needed to fully elucidate the mechanisms of nucleos(t)ide metabolism in the human placenta and how placental nucleos(t)ide metabolism is influenced by commonly ingested methylxanthines (e.g., caffeine) or nucleos(t)ide-derived antiretroviral drugs (e.g., abacavir) used in HIV pharmacotherapy during pregnancy.

# Obsah

Poděkování ... 3
Abstrakt ... 4
Abstract ... 5
Obsah ... 6
1. Seznam zkratek ... 8
2. Úvod práce ... 11
3. Teoretická část ... 12
3.1. Placenta ... 12
3.2. Vývin a stavba placenty ... 12
3.2.1. Implantace a invaze trofoblastu ... 12
3.2.2. Placentární bariéra ... 13
3.3. Funkce placenty ... 14
3.3.1. Transportní funkce ... 14
3.3.1.1. Transport dýchacích plynů ... 14
3.3.1.2. Transport sacharidů ... 14
3.3.1.3. Transport aminokyselin ... 15
3.3.1.4. Transport lipidů ... 15
3.3.1.5. Transport nukleosidů ... 15
3.3.1.6. Transport vody, iontů a minerálů ... 16
3.3.1.7. Transport železa ... 16
3.3.2. Metabolické funkce ... 16
3.3.3. Humorální funkce ... 17
3.3.4. Imunologická funkce ... 17
3.3.5. Ochranné funkce placenty ... 18
3.4. Patofyziologie a onemocnění placenty ... 19
3.4.1. Preeklampsie ... 19
3.4.2. IUGR, SGA ... 19
3.4.3. Předčasný porod (PTB) ... 20
3.5. Nukleosidy ... 21
3.5.1. Metabolismus a funkce adenosinu ... 22
3.6. Syntéza a metabolismus nukleos(t)idů ... 23
3.6.1. Syntéza purinů *de novo* ... 23
3.6.2. Záchranné dráhy purinů ... 24
3.6.3. Syntéza pyrimidinů *de novo* ... 27

3.6.4. Záchranné dráhy pyrimidinů ..... 27
3.7. Placentární modely ..... 30
4. Hypotéza ..... 31
5. Cíl práce ..... 31
6. Experimentální část ..... 32
6.1. Chemikálie a reagencie ..... 32
6.1.1. Systémy pro kvantifikaci genové exprese ..... 32
6.1.2. Klinické parametry dárkyň a příslušných placent a plodů ..... 34
6.1.3. Reagencie pro qRT-PCR ..... 35
6.2. Přístroje ..... 35
6.3. Kultivace buněčné linie BeWo ..... 36
6.4. Izolace RNA ..... 36
6.5. Reverzní transkripce RNA do cDNA ..... 37
6.6. qPCR ..... 37
6.7. Analýza dat ..... 37
7. Výsledky ..... 39
7.1. Porovnání exprese zkoumaných genů v prvotrimestrální placentě (FT) s placentou z donošeného těhotenství (TERM) ..... 39
7.2. Porovnání exprese zkoumaných genů v placentě ze spontánního předčasného porodu (PTB) s placentou z donošeného těhotenství (TERM) ..... 43
7.3. Porovnání exprese zkoumaných genů v lidském primárním trofoblastu (CTB) a syncytiotrofoblastu (STB) ..... 47
7.4. Porovnání exprese zkoumaných genů v BeWo buňkách kultivovaných v přítomnosti forskolinu (FSK) a dimethylsulfoxidu (DMSO) ..... 51
8. Diskuse ..... 55
9. Závěr ..... 58
10. Reference ..... 59

# 1. Seznam zkratek

| | |
|---|---|
| ABC | ATP-binding cassette transporters |
| ADA | Adenosin deamináza |
| ADP | Adenosindifosfát |
| AMK | Aminokyseliny |
| AMP | Adenosin-monofosfát |
| API | Voda pro injekci (z angl. *Aqua pro injectione*) |
| AR | Adenosinový receptor |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BM | Bazální membrána |
| C | Cytidin |
| cAMP | Cyklický adenosinmonofosfát |
| CDP | Cytidindifosfát |
| CD 39 | Ekto-nukleosid Trifosfát Difosfohydroláza |
| CD 73 | Ekto-5'-nukleotidáza |
| cGMP | Cyklický guanosimonofosfát |
| CMP | Cytidinmonofosfát |
| CNT | Koncentrační nukleosidový transportér |
| CTB | Cytotrofoblast |
| CTP | Cytosintrifosfát |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ENT | Ekvilibrační nukleosidový transportér |
| EVT | Extravilózní cytotrofoblast |
| eEVT | Endovaskulární EVT |
| FFA | Volné mastné kyseliny (z angl. *Free fatty acids*) |
| FSK | Forskolin |

| | |
|---|---|
| FT | První trimestr (z angl. *First trimester*) |
| GLUT-1 | Glukózový transportér |
| GMP | Guanosinmonofosfát |
| GTP | Guanosintrifosfát |
| hCG | Lidský choriový gonadotropin (z angl. *Human chorionic gonadotropin*) |
| HLA | Lidský leukocytární antigen (z angl. *Human leukocyte antigen*) |
| iEVT | Intersticiální EVT |
| IGF-1 | Inzulínový růstový faktor 1 (z angl. *Insulin like grow factor 1*) |
| IgG | Imunoglobulin G |
| IMP | Inosinmonofosfát |
| LAT | L-typ amino-transportéru |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin |
| MVM | Mikrovilózní membrána (z angl. *Microvillous-membrane*) |
| NT | Nukleotid(y) |
| NTP | Nukleosid trifosfát |
| PBS | Fosfátový pufr |
| P-Gp | P-glykoproteein |
| PE | Preeklamsie |
| PRPP | 5-fosforibosil-1-pyrofosfát |
| PTB | Spontánní předčasný porod |
| RNR | Ribonukleotid reduktáza |
| SLC | *Solute carrier* |
| SNAT | A-typ amino-transportéru |
| STB | Syncytiotrofoblast |
| TAG | Triacylglyceroly |
| TERM | Donošené těhotenství |

| | |
|---|---|
| U | Uridin |
| VEGFR-1 | Vaskulární endoteliální regulační růstový faktor 1 (z angl. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*) |
| UDP | Uridindifosfát |
| UMP | Uridinmonofosfát |
| UTP | Uridintrifosfát |
| XMP | Xanthosinmonofosfát |

# 2. Úvod práce

Placenta je multifunkční orgán poskytující plodu optimální podmínky pro jeho růst, vývoj a fetální programování. Jako kontinuálně vyvíjející se orgán prochází strukturálními, epigenetickými a transkriptomickými změnami, aby se přizpůsobil svým vlastním, mateřským a fetálním požadavkům. V souladu s tím je během gestace ovlivněno velké množství biologických procesů a molekulárních a metabolických drah včetně syntézy a recyklace nukleos(t)idů (21).

Nukleos(t)idy jsou nepostradatelné biomolekuly pro širokou škálu biologických procesů, jako je syntéza nukleových kyselin DNA a RNA, energetický metabolismus, imunitní funkce, komunikace mezi plodem a matkou, tvorba kofaktorů (CoA, $NAD^+$) a mnoho dalších (17). Rozlišujeme purinové (adenosin, guanosin) a pyrimidinové (cytidin, thymidin, uridin) nukleosidy jejichž fosforylací získáme příslušné mono-fosfát až tri-fosfátnukleosidy, tedy nukleotidy.

Biosyntéza nukleos(t)idů může probíhat dvěma metabolickými dráhami. Energeticky náročnější syntézou *de novo* a syntézou pomocí záchranných drah (z angl. *salvage pathways)*. Syntéza *de novo* je preferována proliferujícími rostoucími tkáněmi, zatímco v diferenciovaných tkáních jsou převážně využívány záchranné dráhy. Placenta a nádory jako rychle rostoucí tkáně, sdílejí řadu podobností včetně metabolických nároků. Placenta na rozdíl od nádorových tkání roste kontrolovaně a jakákoliv odchylka od tohoto procesu může ohrozit vývin a zdraví plodu. Nádory často upřednostňují *de* novo syntézu nukleotidů, ale kvůli vysokým energetickým nárokům této biosyntetické cesty mohou přepnout na energeticky šetrnější záchranné reakce. U placenty doposud nebylo zjištěno, jakou metabolickou dráhu, či dráhy v průběhu gestace využívá a zmapování metabolismu nukleos(t)idů by mohlo přispět k lepšímu pochopení dějů, ke kterým v placentě během těhotenství dochází. Tyto informace by mohly pomoci při řešení těhotenských komplikací v klinické praxi (54, 60).

# 3. Teoretická část

## 3.1. Placenta

Placenta je vysoce specializovaný orgán, který se vyvíjí, roste a následně zaniká, a to během pouhých 9 měsíců. Sehrává zásadní roli pro správný růst a vývin plodu a také tzv. fetální programování *(fetal programing)*, což je předpokladem dobrého zdraví novorozence a nekomplikovaného průběhu těhotenství (1). Jakékoliv narušení fyziologického vývinu placenty může vést k ovlivnění plodu, ať ve smyslu přímého ohrožení (preeklampsie, omezení intrauterinního růstu, předčasný porod, potrat), nebo zvýšením rizika propuknutí kardiovaskulárních onemocnění, psychických onemocnění či diabetu mellitu II později během života (2). Po porodu se placenta stává nepotřebnou, a proto jako jediný lidský orgán zaniká a je během třetí doby porodní z těla matky vyloučena (3).

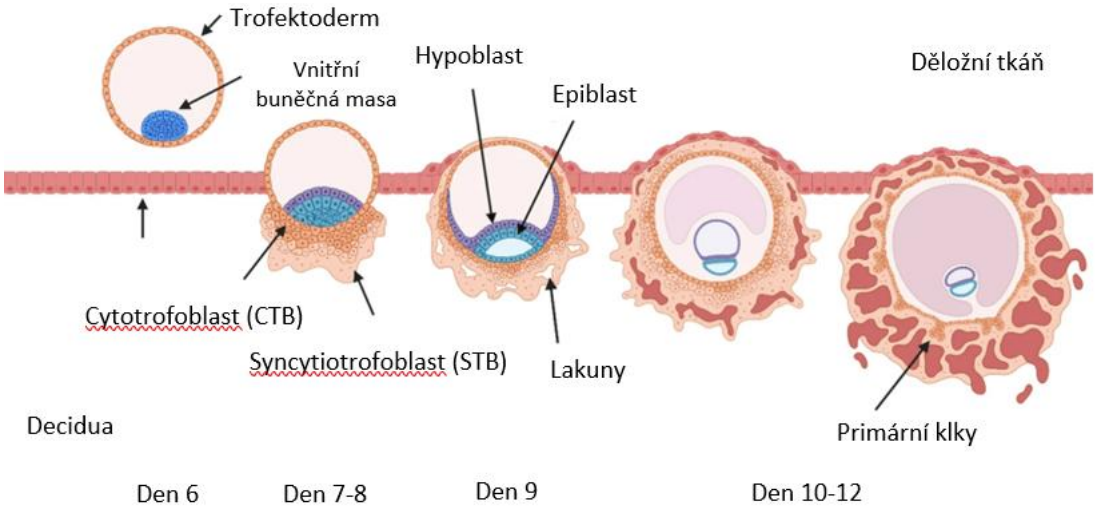
## 3.2. Vývin a stavba placenty

### 3.2.1. Implantace a invaze trofoblastu

Vývin placenty je vysoce komplexní a regulovaný proces. Samotný vývin placenty započíná pátý den po vzniku zygoty, a to vznikem blastocysty. Tento útvar je tvořen 32–64 embryonálními buňkami, které se diferenciují na vnitřní buněčnou masu a vnější trofektoderm, z kterého vzniká trofoblast, základní struktura pro vznik placenty (4). Šestý den po oplození dochází k rozpadu zona pellucida, trofoblast interaguje s buňkami pokrývající povrch endometria a dochází k nidaci blastocysty do děložní sliznice. Osmý den buňky trofektodermu dávají vznik vnější vrstvě polynukleárního syncytiotrofoblastu (STB) a vnitřní vrtsvě tvořené mononukleárními cytotrofoblasty (CTB), které aktivně proliferují (5). Od devátého do třináctého dne CTB měnící se na STB dále proniká do děložní sliznice, kde formuje lakuny, které okolo 13. dne splývají a vytváří intervilózní prostor, do něhož bude přiváděna matčina krev a bude omývat klky pokryté vrstvou trofoblastu tvořeným proliferujícím CTB, který fúzuje a diferenciuje do vnější vrstvy STB (6, 7).

Na konci prvního trimestru se EVT uskupuje v buněčné sloupce, jejichž bazální část je tvořena z proliferativního EVT a distální část z invazivního EVT. Invazivní EVT pronikající do decidua nazýváme intersticiální EVT (iEVT), je základem pro vznik úponových klků a komunikuje i s imunitním systémem matky. Druhým typem invazivního EVT je endovaskulární EVT (eEVT), který migruje do spirálních artérií matky, kde se spolupodílí na transformaci hladkého svalstva a endotelu spirálních artérií. Výsledkem je remodelace spirálních artérií s vysokým krevním odporem na uteroplacentární artérie se zvýšenou propustností a kapacitou (8, 9). Remodelace artérií paradoxně zamezuje vylévání mateřské krve do intervilózního prostoru, a to z důvodu ochrany proti kyslíkovým radikálům. V prvním trimestru se placenta vyvíjí v hypoxickém prostředí díky uzavřeným spirálním artériím a přísun nutrientů je zajišťován endometriální sekrecí neboli

hystotrofní výživou. Koncem prvního trimestru se plně rozvíjí uteroplacentární krevní oběh a choriové klky jsou omývané mateřskou krví (10).




**Obr. 1 Implantace blastocysty a časná placentace ukazující vývoj prvních linií trofoblastu (11).** *Znázornění implantace blastocysty na počátku gestace. Z buněk trofektodermu vzniká trofoblast (CTB a STB), jež dál roste, vyvíjí se a postupně formuje placentu. Vnitřní buněčná masa se diferenciuje na hypoblast a epiblast, ze kterých později vzniká embryo.*

### 3.2.2. Placentární bariéra

Od konce prvního trimestru je placenta složena z monovrstvy STB naléhající na kontinuální vrstvu CTB, pod kterou už je vaskularizovaný mesoderm. STB je vysoce specializovaný polynukleární buněčný útvar, který pokrývá povrch choriových klků, na něž se vylévá matčina krev. STB tvoří bariéru mezi krevními cirkulacemi matky a plodu, umožňuje transport dýchacích plynů, nutrientů a odpadních produktů, syntetizuje řadu peptidů a steroidních hormonů, jež ovlivňují vývoj placenty, plodu a ovlivňují metabolismus matky a plodu. Apikální membrána vyvinutého STB směřující do intervilózního prostoru nazýváme mikrovilózní (MVM) a na opačném pólu je bazální membrána (BM) (8, 5, 9). Vrstva CTB není po celou dobu gestace kompaktní, směrem ke konci gestace se poměr CTB/STB zmenšuje. Úbytek CTB umožňuje lepší transport potřebných látek přes placentární bariéru po započnutí proudění matčiny krve do intervilózního prostoru (2).

Po vyvinutí HEB a střevní bariéry plodu se snižuje integrita STB usnadňuje průchod látek přes placentu. Na konci těhotenství naopak můžeme pozorovat snížení transportu přes placentu, a to kvůli vazivovatění klků a choriové plotny, zesilování stěn fetálních kapilár a celkovému připravování placenty na porod a následné odloučení (5).

## 3.3. Funkce placenty

Placenta představuje bariéru mezi matkou a plodem, která na jedné straně odděluje jejich krevní oběhy a na straně druhé představuje vitální funkční spojení. Zprostředkovává výměnu či přechod nutrientů, metabolitů, dýchacích plynů, odpadních látek a zároveň plní funkci metabolickou, imunitní, humorální a ochrannou. Významnou roli zde sehrává vrstva STB (12).

### 3.3.1. Transportní funkce

Mezi základní funkce placenty patří transportní funkce. V prvním trimestru vyvíjející se placenta tvořená trofoblasty transportuje up-takem produkty endometriální sekrece, jako je glykogen, glykoproteiny a lipidové kapénky (13, 14). V tomto období je většina nutrientů využívána samotnou placentou pro její růst a vývoj. Okolo 10–12 týdne těhotenství jsou už dostatečně vyvinuté choriové klky pokryté souvislou vrstvou STB, který obsahuje mnoho transportérů (GLUT-1, NTs, FATPs, LATs, ad.) na MVM a BM, dochází k uvolnění spirálních artérií a je již zajištěn dostatečný přísun matčiny krve do intervilózního prostoru. Díky těmto přirozeným změnám je placenta schopna na plno převzít transportní funkce (1, 8).

#### 3.3.1.1. Transport dýchacích plynů

Placenta je vysoce propustná pro dýchací plyny a k jejich difuzi dochází velice snadno. Kyslík přechází z matčiny krve do krve plodu a oxid uhličitý naopak. Děje se tak díky tomu, že fetální hemoglobin má vyšší afinitu ke kyslíku, a naopak nižší afinitu k oxidu uhličitému, než matka (1).

#### 3.3.1.2. Transport sacharidů

Glukóza je hlavním sacharidem, který musí být transportován z matky do plodu, protože plod nemá dostatečnou glukoneogenezi (1). Maternální glukóza je tak pro plod primárním zdrojem energie a participuje v řadě anabolických procesů. K jejímu transportu dochází prostřednictvím facilitované difúze, kdy klíčovou roli sehrávají glukózové transportéry (GLUTs) (4). GLUTs jsou exprimovány na obou pólech placenty po celou dobu gestace. Na začátku těhotenství přenos glukózy z matky do plodu zajišťuje většina podtypů GLUTs transportérů (GLUT 1, 3, 4, 12), zatímco na konci gestace tuto funkci plní již jen GLUT1. Expresi těchto přenašečů a tím i transport Glu ovlivňuje inzulin, IGF-1, mTOR a leptin (1, 3, 8).

#### 3.3.1.3. Transport aminokyselin

Aminokyseliny (AMK) jsou prekurzory pro syntézu proteinů plodu a zdrojem energie jak pro placentu, tak i plod (3). Koncentrace AMK je v oběhu plodu okolo 12. – 17. týdne gestace vyšší než u matky, a proto dochází k jejich transportu z matky do plodu prostřednictvím specifických přenašečů, jejichž syntézu ovlivňují některé hormony (růstový hormon, TSH), cytokiny, leptin a mTOR (3, 8). Důležitým faktorem pro expresi AMK transportérů je kaskáda mTOR. Při její abnormální funkci může dojít k patologickým stavům, jako je obezita matky, makrosomie plodu, gestační diabetes při hyperaktivitě kaskády, hypoxie, malnutrice, či IUGR při inhibici kaskády. (8, 15). Mezi tyto transportéry řadíme Systém L = LAT (L-type amino-transporter), zodpovídající za sodík-independentní přenos velkých neutrálních AMK a Systém A = SNAT (A-type amino-transporter), který zajišťuje sodík-dependentní přenos malých neutrálních AMK (6, 8).

#### 3.3.1.4. Transport lipidů

Mezi lipidy řadíme volné mastné kyseliny (FFAs), triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol a jeho deriváty (1). Jsou důležité pro růst plodu, správný vývoj mozku, jsou zdrojem energie a slouží jako prekurzory pro syntézu prostanoidů a steroidních hormonů (3).

Mastné kyseliny mohou procházet přes placentu následujícími způsoby. Pokud se vyskytují v podobě lipoproteinů, je nutné, aby nejdříve došlo k jejich hydrolýze na FFAs prostřednictvím placentární lipázy (8, 15). Poté snadno prochází přes STB prostou difúzí. Dále jsou transportovány pomocí FFAs transportních proteinů, nicméně převážně přechází difúzí. Mezi tyto přenašeče řadíme membránové a cytosolické transportní proteiny FFAs (1). Jejich exprese a aktivita je ovlivňována insulinem, IGF-1, mTOR a leptinem (8). Ačkoliv placenta je schopna syntézy vlastního cholesterolu, za normálních podmínek je jeho zdrojem matka. Pomocí LDL receptorů na povrchu STB dochází k vychytávání cholesterolu a následné utilizaci (3).

#### 3.3.1.5. Transport nukleosidů

Buňky STB exprimují na MVM ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs), konkrétně ENT1 a na BM transportéry ENT2. Placenta obsahuje mRNA koncentračních nukleosidových transportérů (CNTs), ale proteiny oproti BeWo buňkám nejsou detekovatelné (16). Nicméně je zřejmé, že se podílejí na farmakokinetice léčiv odvozených od nukleosidů (protinádorová léčiva, některá antivirotika) (8).

#### 3.3.1.6. Transport vody, iontů a minerálů

Přechod vody přes placentu závisí na hydrostatickém a osmotické tlaku. Předpokládáme, že voda prochází pasivně pomocí water channel-forming integral protein, které jsou exprimovány v trofoblastu. Koncentrace sodných a chloridových iontů jsou v cirkulaci matky a plodu podobné, zatímco hladiny draselných, vápenatých a fosfátových iontů jsou u plodu ve vyšší koncentraci. K transportu iontů dochází převážně aktivním transportem, a to pomocí Na+/K+ ATPázy, Ca2+ ATPázy, Na+/H+ výměníky ad (1).

#### 3.3.1.7. Transport železa

Železo je přenášeno z oběhu matky do krevního řečiště plodu endocytózou. V krvi matky je železo navázáno na transferin, který interaguje s transferinovým receptorem (TfR1) na MVM a dochází k uzavření komplexu do endosomu. Uvnitř buněk STB se železo uvolňuje z vazby na transferin a endosomu a může být uloženo v podobě feritinu, využito pro buněčné potřeby, nebo je pomocí ferroportinu transportováno přes BM do oběhu plodu (3, 6, 13).

### 3.3.2. Metabolické funkce

Placenta je metabolicky velmi aktivní orgán a má vysoké energetické nároky. Terminální placenta spotřebuje denně i přes 2,5 kg ATP. Musí zajistit mnoho energeticky náročných úkolů, jako je transport živin, biosyntéza nukleových kyselin a proteinů, na kterou je spotřebováno okolo 50 % vytvořeného ATP. Glukóza je hlavním zdrojem pro tvorbu energie v placentě, přičemž 50 % glukózy je využito samotnou placentou a pouhých 20 % je přeneseno do plodu (17). V porovnání s jinými tkáněmi placenta potřebuje velké množství kyslíku, který je v mitochondriích využíván pro oxidativní fosforylací. Metabolismus placenty se v průběhu gestace proměňuje a musí být schopen reagovat na požadavky a stresové situace u matky i plodu (množství živin, přísun kyslíku, ad.). Klíčovou roli zde sehrává hlavní regulátor energetické homeostázy adenosinmonofosfát-kináza (AMPK). AMPK katalyzuje přímou fosforylaci metabolických enzymů, fosforylaci transkripčních faktorů, koaktivátorů a korepresorů. Aktivuje se při zvýšení poměru AMP k ATP (18, 19, 17).

Vrstva STB produkuje během gestace řadu látek včetně steroidních hormonů, jež jsou vylučovány do krevního řečiště matky, čímž ovlivňují fyziologii matky, a i do krevního oběhu plodu, kde se podílejí na regulaci správného vývoje a fetálního programování. Placenta syntetizuje progesteron a estrogeny, zatímco fetální orgány jsou zdrojem androgenů a kortikosteroidů. Nejnovější výzkumy naznačují, že metabolicky aktivní je i CTB, ne-li aktivnější než vrstva STB, což zvyšuje pozornost na fyziologický význam CTB pro celkový metabolismus placenty (20).

Dalším příkladem metabolické aktivity placenty je syntéza tryptofanu. Tato aminokyselina je nezbytná pro syntézu proteinů a také je prekurzorem několika biologicky aktivních metabolitů. Tryptofan je placentou syntetizován prostřednictvím serotoninové, nebo kynureninové metabolické

dráhy a mezi jeho biologicky aktivní metabolity řadíme např. melatonin, který se podílí na řízení cirkadiánního rytmu, růstu plodu a regulaci placentární funkce. Během těhotenství má tryptofan s jeho metabolity zásadní význam pro placentaci, vývoj plodu a imunitní regulaci (21).

### 3.3.3. Humorální funkce

Další funkcí, kterou má placenta je funkce endokrinní. Během těhotenství zajišťuje energeticky a nutričně náročnou syntézu široké škály hormonů, a to – estrogenů, progesteronu, lidského choriového gonadotropinu (hCG), placentárního růstového hormonu, růstových faktorů (epidermální růstový faktor, *insulin-like growth factors* (IGF)), cytokinů, chemokinů, prostanoidů, vazoaktivních látek a mnoho dalších. Udržují těhotenství, modulují metabolismus matky i plodu a na konci gestace indukují porod (6).

Progesteron je vylučován do krve plodu i matky a mezi jeho hlavní účinky patří antikonvulzivní účinek na dělohu a lokálně imunosupresivní účinek. Umožňuje správnou implantaci embrya díky podpoře výživy a tím i přípravě buněk decidua (15).

Placenta se také stává hlavním zdrojem estrogenů – estron, estradiol, estriol. Estradiol podporuje růst matčiných pohlavních orgánů, moduluje expresi genů, které ovlivňují vývoj a diferenciaci endometria. Navozuje vazodilataci placentárních i děložních cév a tím upravuje průtok krve těmito orgány (3, 15).

Lidský choriový gonadotropin (hCG) je dimerický glykoprotein syntetizovaný buňkami STB. Je vylučován převážně do matčiny cirkulace, kde ho můžeme detekovat osm dní od oplození vajíčka, čehož využíváme pro detekci těhotenství (22). hCG stimuluje sekreci progesteronu žlutým tělískem a později i placentou, angiogenezi, formaci vrstvy STB společně s celými choriovými klky a podílí se na modulaci imunotolerance matky (15, 22).

Placenta je během těhotenství také zdrojem leptinu, jež ovlivňuje hematopoetický, reproduktivní, neuroendokrinní, imunitní funkce a v neposlední řadě i placentární funkce. Leptin se účastní regulace implantace vajíčka, embryogeneze, proliferace a diferenciace placenty, správného vývoje trofoblastu, lokální imunosuprese pro ochranu plodu (3, 23).

### 3.3.4. Imunologická funkce

Placenta je komplexní orgán složený z různých typů buněk, který je důležitý z pohledu prevence rejekce plodu a ochraně plodu proti infekcím. Trofoblast sehrává esenciální roli ve smyslu modulace imunitní reakce matky vůči plodu a samotné placentě (24). Produkuje peptidy, exozomy obsahující miRNA specifické pro placentu, interleukiny, chemokiny a cytokiny, pomocí kterých komunikuje s imunitními buňkami matky (NK buňky, makrofágy, T-lymfocyty) a buňkami decidua, reguluje komplement a apoptózu a tím udržuje materno-fetální imunotoleranci. V případě narušení

či neúplné imunotoleranci se zvyšuje riziko preeklampsie, předčasného porodu, potratu a dalších komplikací (25).

Plod je pro matčin imunitní systém cizí kvůli odlišnosti lidského leukocytárního antigenu (HLA, z angl. *human leukocyte antigen*). Buňky EVT exprimují povrchové molekuly HLA-C, E, G, které snižují imunitní odpověď např. inhibicí receptorů pro NK buňky. Pokud by neexistoval protektivní mechanismus zprostředkovaný HLA-G a dalšími molekulami, plod by byl matkou eliminován (24, 26, 27, 28).

### 3.3.5. Ochranné funkce placenty

Placenta představuje ochrannou bariéru proti přestupu některých xenobiotik, bakterií, virů a prvoků. Mnoho malých molekul xenobiotik ovšem přes placentu volně přechází pasivní difúzí nebo transcelulárně pomocí přenašečů a mohou působit jako teratogeny (ethanol, warfarin, thalidomid, isotretionin, některá antiepileptika) (1). Na druhou stranu buňky STB obsahují některé protektivní efluxní transportní systémy, které za spotřeby energie omezují přechod řadě látek a tím chrání plod (29). Důležitou skupinou efluxních transportérů jsou ATP vázající transportéry (ABC transportéry). Hlavním zástupcem je produkt P-glykoprotein, který je lokalizovaný na MVM a transportuje léčiva (např. digoxin, saquinavir) a další látky z intracelulárního prostoru STB do intervilózního prostoru. Dalšími důležitými efluxními transportéry jsou *breast cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2) a *multi-drug resistance-associated proteins* (MRP/ABCC) (8, 30).

MRP také zodpovídají za odstraňování odpadních produktů metabolismu placenty a plodu. Placenta vedle těchto transportérů obsahuje také enzymy z rodiny cytochromu P450 (CYP1A2, 2E1, 2D6, ad.), které metabolizují xenobiotika prošlé přes placentární bariéru v první fázi metabolismu (1, 29).

Proteiny normálně přes placentu neprochází, ovšem výjimkou jsou imunoglobuliny IgG. Molekuly IgG jsou v matčině krvi ve vyšších koncentracích (10-20 mg/ml), ta omývá choriové klky a buňky STB pomocí endocytózy uzavírají IgG molekuly do endosomů. V endosomech se za mírně kyselého pH = 6,0 vážou pomocí Fc fragmentů na příslušné Fc receptory (FcRn). Poté jsou tyto vezikuly transportovány transcytózou k BM, kde se endosom rozpadá, dochází ke změně pH na fyziologické (pH = 7,4), což vede k uvolnění IgG molekul z jejich vazby na FcRn a přechodu do fetální cirkulace. Imunoglobuliny IgG novorozenci poskytují pasivní imunitní ochranu do té doby, než jeho imunitní systém začne tvořit vlastní protilátky (31).

## 3.4. Patofyziologie a onemocnění placenty

Jakékoliv odchýlení od fyziologického vývoje placenty zvyšuje riziko vzniku těhotenských komplikací jako např. preeklampsie, či spontánní potrat. Dalším rizikem tohoto odchýlení je negativní ovlivnění fetálního programování plodu, což se může projevit později během života daného jedince propuknutím DOHaD (*developmental origins of health and disease*) jako např. kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus II, psychická onemocnění, ADHD a CNS poruchy. Mezi rizikové faktory patří kouření, alkohol, chronický stres, vyšší věk matky, arteriální hypertenze u matky, některé léčivé látky a další (2).

### 3.4.1. Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je závažné onemocnění postihující celosvětově 5–7 % těhotných žen. Mezi hlavní projevy patří hypertenze s proteinúrií objevující se okolo 20. týdne těhotenství a multiorgánová hypoperfúze v důsledku systémového zánětu, endoteliální dysfunkce a generalizované vazokonstrikce. Tyto procesy vedou ke sníženému zásobování plodu a placenty potřebnými nutrienty, což se mnohdy projevuje sníženým růstem plodu. Pokud se toto onemocnění neodhalí včas, může dojít k vážným doživotním komplikacím, či smrti plodu/matky/obou (32). Etiopatogeneze zatím není zcela objasněna. Nicméně víme, že dochází ke vzniku silně hypoxického prostředí (1 % $O_2$), remodelaci spirálních artérií, zvýšené tvorbě a neschopnosti odstraňovat reaktivní formy kyslíku (ROS) a ischemii placenty díky nadměrné vaskularizaci. Aktivuje se integrovaná dráha stresové odpovědi (UPR), čímž placenta reaguje na hypoxii, nedostatek AMK a další stresory (33). Lze pozorovat zvýšené hladiny adenosinu a vyšší expresi VEGFR-1. Také dochází ke snížení exprese transkripčního faktoru ovlivňující invazi trofoblastu (FOXM1) z důvodu výrazně hypoxického prostředí (34). Některé studie poukazují na korelaci mezi zvýšenými hladinami adenosinu v mateřské/fetální cirkulaci a závažností PE. Hladiny adenosinu a VEGFR-1 se používají k diagnostice PE. Léčba PE spočívá v kontrole hypertenze a udržování krevního průtoku placentou (35, 36).

### 3.4.2. IUGR, SGA

Snížený růst plodu pozorujeme přibližně u 10 % těhotenství. U většiny případů se jedná o konstitučně malý plod (*Small for Gestational Age*), který je na svůj věk menší, než by mělo být. Nicméně u těchto plodů nepozorujeme přítomnost jakýchkoliv patologií a jejich prognóza je oproti plodům s IUGR podstatně lepší (37). IUGR (z angl. *intrauterine growth restriction*) je patologická růstová restrikce plodu, která je spjata se zvýšenou perinatální a neonatální morbiditou a mortalitou (až 10x vyšší). Častou predispozicí IUGR je preeklampsie, při které se plodu nedostává dostatku živin. Při IUGR placenta vykazuje řadu abnormalit – neadekvátní remodelace spirální artérie, snížené větvení choriových klků, menší kapilární síť v terminálních klcích, tvorba fibrinoidních

plaků. Zároveň je prokazatelně snížen objem trofoblastu a dochází k narušení rovnováhy mezi tvorbou a zánikem buněk trofoblastu díky zvýšené expresi proapoptických proteinů p53, p21 a Bax zejména ve vrstvě STB. Předčasné stárnutí/senescence se také podílí na IUGR. Senescentní buňky jsou vysoce metabolicky aktivní, což vede ke zvýšení buněčného AMP, které prokazatelně vyvolává předčasné stárnutí, zvýšené sekreci metaloproteináz a prozánětlivých cytokinů. Tento proces pozorujeme hlavně u vrstvy STB, která nemá buněčné hranice, což představuje riziko velmi rychlého šíření stárnutí syncytia (33, 38). Při IUGR dochází u plodu k centralizaci oběhu kvůli hypoxii, což vede k ischemii střev, ledvin a nedovyvinutí plic. Rovněž dochází k disregulaci žilního návratu u plodu tím, že narůstá průtok *ductus venosus*, což k poklesu průtoku krve játry, narušení jaterních funkcí, snížené tvorbě glykogenu a může vyústit až v srdeční selhání a smrt. Změny krevního průtoku lze efektivně diagnostikovat pomocí Dopplerovského ultrazvukového vyšetření, ale léčba zatím není zcela známa (39, 37).

### 3.4.3. Předčasný porod (PTB)

Za předčasný porod považujeme porod před 37. týdnem těhotenství a jeho původ je multifaktoriální. Patogeneze PTB je spojována hlavně se zánětem, jež je způsoben narušením komunikace mezi plodem a matkou prostřednictvím signálních molekul – hormonů (progesteron), cytokinů, nukleových kyselin a extracelulárních vezikul. Narušením dojde k aktivaci receptorů TLR (*toll-like receptors)*, které představují základní iniciační složku zánětlivé dráhy a indukují produkci prozánětlivých cytokinů (TNFα, IL1β, IL6, ad.), volné cirkulující (cf)DNA indukující zánět a porod a dalších mediátorů zánětu. Spekuluje se, že špatná imunitní adaptace od počátku gestace, neschopnost vybudovat si imunitní toleranci nebo utlumit nadměrný zánět může vést k PTB. Stres matky, infekce, endokrinní dysfunkce, či metabolické dysregulace zhoršují zánětlivou zátěž a zvyšují pravděpodobnost PTB (40). Předčasný porod je hlavním rizikovým faktorem pro úmrtí plodu a platí nepřímá úměra mezi věkem plodu a mortalitou (průměrně mortalita u 75 % případů). Pokud plod přežije, hrozí u něj propuknutí neurologických, respiračním a gastrointestinálních komplikací (41). Jakmile je porod neodvratný je nutné ho oddálit. K tomuto účelu slouží tokolytika – ritodrin, atosiban, nifedipin, glycerol-trinitrát, magnesium sulfát a indometacin, které mohou porod oddálit maximálně o 72 h. Během této doby je důležité, aby byly systémově podány kortikosteroidy pro dovyvinutí dýchací soustavy plodu. V případě, že plod porod přežije je nutné mu následně věnovat speciální péči (42, 43).

## 3.5. Nukleosidy

Nukleosidy po jejich fosforylaci na nukleotidy tvoří základní stavební jednotky nukleových kyselin – DNA, RNA. Zároveň plní důležité funkce na buněčné úrovni, a to funkci energetickou (ATP), signální (cGMP, cAMP) a jsou součástí různých kofaktorů ($NAD^+$, CoA). V poslední době se zjistilo, že nukleos(t)idy získané z každodenní výživy vstupující do krevního oběhu jsou využívány jako nový zdroj energie ve tkáních s omezeným přísunem glukózy, např. v místech infekce, nebo nádorových tkáních. Pomocí nukleosidfosforyláz se z nukleos(t)idů uvolňuje ribózová cukerná skupina, která vstupuje jako substrát do pozdějších fází glykolýzy. Získaná energie může být využívána např. buňkami imunitního systému v místě infekce/tumoru (44, 45). Nukleosidy se skládají z aromatické báze a cukerné složky, kterou je buď ribóza (pro RNA), nebo redukovaná deoxyribóza (pro DNA). Na základě aromatické báze rozlišujeme purinové nukleosidy – adenosin, guanosin, inosin a pyrimidinové nukleosidy – cytidin, thymidin a uridin. Nukleosidy je možné fosforylovat na mono- (NMP), di- (NDP) a trifosfáty (NTP) a reakce může probíhat i opačným směrem pomocí specifického enzymatického aparátu. Nejznámějším NTP je molekula ATP, která obsahuje makroergní vazbu, jež je základním zdrojem energie. Mezi další NTP řadíme GTP, CTP, UTP a ITP (44, 46).

Fundamentální rolí pyrimidinových nukleosidů je stavba nukleových kyselin. Zároveň se podílí na biosyntéze a metabolismu sacharidů např. molekula UMP je štěpena uridinfosforylázou na nukleobázi a ribosu-1-fosfát, která je metabolizována na ribosu-5-fosfát a následně vstupuje do pozdější fáze glykolýzy. Uridin je nezbytný pro signalizaci TLR (*toll-like receptor)*, přičemž tyto receptory rozpoznávají cizí nukleové kyseliny a vyvolávají prozánětlivou reakci při infekci. Pyrimidinové nukleosidy jsou také využívány pro syntézu a metabolismus a lipidů (syntéza glycerofosfolipidů pomocí CDP-diacylglycerolu) (47, 45).

Purinové nukleosidy se také podílí na tvorbě DNA/RNA a v podobě příslušných nukleotidů interagují s purinovými receptory patřícími do rodiny P2, které můžeme rozdělit na 2 hlavní podtypy – P2X a P2Y. Receptory $P2X_{1-7}$ jsou selektivně aktivovány ATP a jsou spřažené s iontovými kanály. Receptory P2Y jsou metabotropní spřažené buď s $G_i$ nebo $G_q$. Tento typ receptorů může být aktivován molekulami ATP, ADP, UTP a UDP (48, 49). Aktivací receptorů P2X a P2Y dochází k regulaci mnoha buněčných dějů, jako např. proliferace, diferenciace a buněčná smrt. Vyskytují se a spolupodílí se na regulaci funkcí mozku, plic, ledvin, imunitní odpovědi, jsou součástí vaskulárního systému, a ovlivňují agregaci (49, 50).

Adenosin má své metabotropní receptory z rodiny P1 (49). Rozlišujeme celkem 4 typy AR – $A_1$, $A_{2A}$, $A_{2B}$, $A_3$, které jsou kódovány geny **ADORA**. Receptory $A_1$ a $A_3$ jsou spřažené s $G_i$-proteinem (inhibice adenylátyklázy a snížení cAMP), zatímco $A_{2A}$ a $A_{2B}$ s $G_s$-proteinem (aktivace adenylátcyklázy a zvýšení cAMP). Všechny receptory mají vysokou afinitu k adenosinu kromě podtypu $A_{2B}$, který vyžaduje pro svou aktivaci hladiny adenosinu v řádech μM, jak tomu je při

zmíněných patologiích. Aktivace AR vede ke snížení zánětlivých procesů, aktivaci imunitního systému, angiogenezi, snížení nároků na kyslík a zároveň zvýšení jeho přísunu. Všechny čtyři podtypy AR se vyskytují ve většině tkání, včetně placenty (36, 51, 52).

### 3.5.1. Metabolismus a funkce adenosinu

Adenosin je nukleosid, který je přítomný v extracelulárním i intracelulárním prostoru téměř všech tkání našeho těla. Koncentrace adenosinu v plasmě se za fyziologickým podmínek pohybují mezi 20–300 nM, ale při buněčném stresu spjatém s nedostatkem energie, hypoxií, zánětem a poškozením tkáně se jeho koncentrace přechodně zvyšují až na desítky μM (51, 52). Z toho plyne, že adenosin má protektivní účinky na mnoho typů buněk např. neurony, kardiomyocyty, či buňky trofoblastu, a to prostřednictvím interakcí s adenosinovými receptory (AR) (52).

Adenosin může vznikat extracelulárně a intracelulárně. Ke vzniku extracelulárního adenosinu dochází defosforylací jeho prekurzorů – ATP, ADP a AMP. Defosforylaci ATP na ADP/AMP katalyzuje **ekto-nukleosidtrifosfátdifosfohydrolázou (CD39)**[1] a následnou přeměnu AMP na adenosin **ekto-5´-nukleotidáza CD73** (36). Hladiny extracelulárního adenosinu jsou udržovány v rovnováze pomocí **(ADA) adenosindeaminázy**, která katalyzuje přeměnu adenosinu na inosin. Na pomezí extracelulárního a intracelulárního prostoru se nachází přenašeče CNTs a ENTs. ENTs umožňují přesun nukleosidů včetně adenosinu do i z buněk, na základě aktuální potřeby a koncentračního gradientu adenosinu. CNTs zajišťují aktivní influx nukleosidů za využití sodíkových iontů (51).

Uvnitř buněk je hladina adenosinu udržována třemi enzymy – **ADA**, **AHCY (S-adenosylhomocysteinhydroláza)** konvertuje adenosin na S-adenosylhomocystein a **ADK (adenosinkináza)**, která katalyzuje navázání gama-fosfátu ATP na adenosin za vzniku AMP a udržuje tím nukleotidovou rovnováhu. Molekula AMP může přecházet na ADP pomocí enzymu **AK (adenylátkináza)** a na ATP za přítomnosti **NDPK (nukleosiddifosfátkináza)**. I uvnitř buněk se AMP přeměňuje zpět na adenosin. Děje se tak za katalýzy intracelulárních nukleotidáz, mezi které řadíme např. **NT5C (cytosolová 5´,3´-nukleotidáza)** (36).

[1] *V této kapitole jsou **enzymy** zvýrazněny tučně.*

## 3.6. Syntéza a metabolismus nukleos(t)idů

Hladiny purinových a pyrimidinových nukleotidů jsou udržovány dvěma způsoby. Prostřednictvím syntézy *de novo* a pomocí recyklačních záchranných drah. Záchranné dráhy jsou oproti syntéze *de novo* energeticky méně náročné (53).

### 3.6.1. Syntéza purinů *de novo*

Syntéza purinů *de novo* probíhá ve dvou fázích. První fází je jedenáctistupňová biosyntéza inosin-monofosfátu (IMP) [2] za spotřeby 6 molekul ATP a přítomnosti aminokyselin aspartátu s glutaminem, jako donorů dusíkových heteroatomů. Výchozí sloučeninou je ribosa-5-fosfát z pentosového cyklu, která je v prvním kroku za degradace ATP na AMP aktivována enzymem **PRPSAP** (**fosforibosylpyrofosfátsyntetáza)** na 5-fosforibosil-1-pyrofosfát (PRPP). Následuje druhý a zcela zásadní regulační krok specifický pro syntézu purinů, a to zavedení purinového atomu $N_9$. Klíčovou roli sehrává enzym **PPAT (amidofosforibosyltransferása)**, který katalyzuje substituci difosfátové skupiny PRPP amidovým dusíkem glutaminu za vzniku 5-fosforibosylaminu. Třetí, čtvrtý a šestý krok katalyzuje trifunkční enzym **trifGART**. Ve třetím kroku z 5-fosforibosylaminu za katalýzy **GARS (fosforibosylglycinamidformylsyntáza)** vzniká GAR (glycinamin ribonukleotid) zavedením atomu $C_4$, $C_5$ a $N_7$. Čtvrtý krok spočívá v zavedení formylu jako atomu $C_8$ do molekuly GAR za katalýzy **GART (fosforibosylglycinamidformylsyntáza)** a vzniku FGAR (fosforibosyl-N-formylglycinamid). V pátém kroku dochází k navázání atomu N3 a konverzi FGAR na FGAM (5-fosforibosylformylglycinamid) za přítomnosti enzymu **PFAS (fosforibosylformylglycinamidinsyntáza)**. Šestý krok má na starosti enzym **AIR-synthetase (fosforibosylformylglycinamidincykloligáza)**, která katalyzuje cyklizaci a vznik purinového imidazolového kruhu v podobě AIR (5-aminoimidazolribotid). Sedmý krok spočívá v přeměně AIR na CAIR (karboxyaminoimidazolribotid) za katalýzy multifunkčním enzymem **PAICS (fosforibosylaminoimidazolkarboxyláza)** a tím zavedení atomu $C_6$. V osmém kroku se v přítomnosti enzymu **PAICS** podjednotkou, a to **SACAIR synthase (fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamidsyntáza)** připojuje na CAIR atom N1 za vzniku SACAIR (fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamid). Devátý krok má na starost enzym **ADSL (adenylosukcinátlyáza)**, jež katalyzuje oddělení fumarátu, jako zbytku po aspartátu a vzniku ACAIR (5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid). Desátý a jedenáctý krok katalyzuje bifunkční enzym **ATIC (inosinmonofosfátsyntáza)**. Skládá se z **ACAIR transformylázy**, která

[2] *V této a i v následujících kapitolách jsou **enzymy** zvýrazněny tučně a metabolity jsou podtržené pro snadnější orientaci v textu.*

katalyzuje konverzi ACAIR na FAICAIR (5-formaminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid) a **IMPcyklohydrolázy**, jež za odloučení molekuly vody katalyzuje vznik IMP (46, 48, 53, 54).

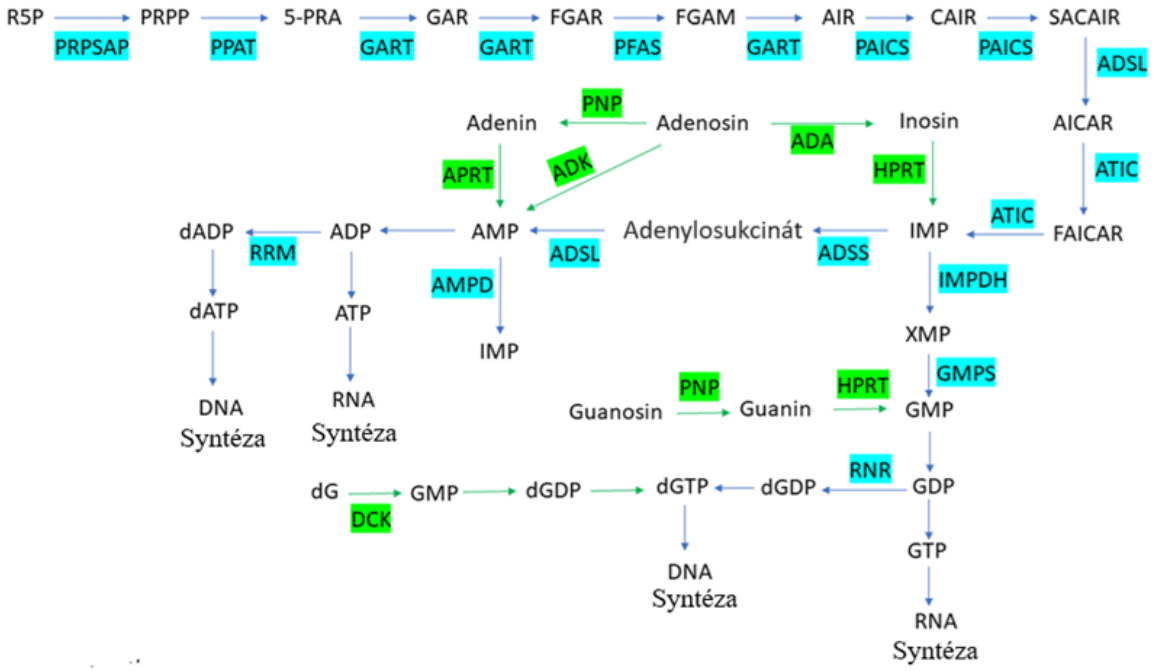
Druhou fází je syntéza AMP a GMP z nichž obě jsou dvoustupňové. Vzniklá molekula IMP se za přítomnosti aspartátu, GTP a katalýzy **ADSS (adenylosukcinátsyntetáza)** mění na adenylosukcinát a ten za přítomnosti **ADSL** a odloučení fumarátu utváří molekulu AMP. Molekula AMP může za katalýzy **AMPD2/3 (adenosinmonofosfátdeaminázа)** přecházet zpět na IMP. Syntéza GMP také začíná u molekuly IMP. Ta je za katalýzy **IMPDH1/2 (inosinmonofosfátdehydrogenáza)** a přítomnosti kofaktoru $NAD^+$ konvertována na XMP (xantosinmonofosfát). Následně je molekula XMP konvertována na GMP za katalýzy **GMPS (guanosinmonofosfátsyntáza)** a přítomnosti glutaminu a ATP. Z těchto ribonukleotidů v podobě difosfátu pomocí enzymu **RNR (ribonukleotidreduktáza)** mohou vznikat příslušné deoxyribonukleotidy, které poté slouží pro syntézu DNA (46, 48, 53, 54).

Z purinových NMP vznikají NDP pomocí specifických nukleosidmonofosfát kináz např. **AK (adenylátkináza)** (AMP+GTP → ADP+GDP). Vznik NTP je katalyzován nespecifickými **NDPK (nukleosiddifosfátkináza)** (GDP+ATP → GTP+ATP) jako např. **ATPsyntáza**. První fáze, syntéza IMP je zpětně regulována ve svých dvou prvních krocích, přičemž ADP a GDP inhibují ribosafosfát-difosfokinázu a AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP inhibují PPAT. V druhé fázi GTP stimuluje syntézu AMP a ATP stimuluje syntézu GMP (46, 54, 55).

### 3.6.2. Záchranné dráhy purinů

Purinové nukleosidy adenosin, guanosin jsou méně často přímo transformovány na příslušné NMP. Proto musí nejdříve dojít k jejich katalýze na příbuzné báze adenin, guanin za katalýzy **PNP (purinnukleosidfosforyláza)**. Formování daných NMP probíhá prostřednictvím PRPP-dependentní reakce. AMP vzniká transferem PRPP na adenin pomocí **APRT (adeninfosforibosyltransferáza)**. Ke vzniku IMP, kterému předchází přeměna adenosinu na inosin pomocí **ADA (adenosindeaminázа)** a GMP dochází taktéž přenosem PRPP za katalýzy **HPRT (hypoxantinguaninfosforibosyltransferáza)** (46, 53, 54).

Purinové deoxyribonukleosidy dA a dG mohou být přímo transformovány na příslušné dNMPs. Tuto přeměnu katalyzuje **DCK (deoxycytidinkináza)**, jak pro dAMP, tak i pro dGMP. Zároveň katalyzuje vznik dCMP z dC v záchranných drahách pyrimidinů. Tyto dNMPs jsou fosforylovány na dNTP a následně využity pro syntézu DNA (46, 53).




**Obr. 2** ***De novo*** **syntéza a záchranné dráhy purinů (53).** *Enzymy purinové syntézy de novo jsou značeny modře a zeleně jsou označeny enzymy záchranných reakcí purinů. Prvních jedenáct kroků de novo syntézy vede ke vzniku molekuly IMP, která je prekurzorem pro vznik AMP, XMP a GMP. V záchranných drahách jsou nukleosidy adenosin a guanosin za katalýzy PNP přeměněny na příslušné báze adenin a guanin a následně konvertovány na AMP pomocí APRT a GMP za katalýzy HPRT. Adenosin může být přeměněn na AMP za katalýzy ADK, nebo pomocí PNP na hypoxantin a za katalýzy ADA na inosin, ze kterého vzniká IMP v přítomnosti HPRT. Purinové deoxyribonukleotidy dA a dG jsou recyklovány pomocí DCK na dAMP a dGMP.* ***De novo syntéza purinů:*** *Ribóza-5-fosfát (R5P), fosforibosylpyrofosfátsyntetáza (PRPSAP), fosforibosylpyrofosfát (PRPP), amidofosforibosyltransferáza (PPAT), 5-fosforibosylamin (5-PRA), fosforibosylglycinamidformyltransferáza (GART), glycinamid ribonukleotid (GAR), fosforibosyl-N-formylglycinamid (FGAR), fosforibosylformylglycinamidinsyntáza (PFAS), 5-fosforibosylformylglycinamidin (FGAM), 5-aminoimidazol ribotid (AIR), 5-fosforibosylaminoimidazolkarboxyláza (PAICS), 5-fosforibosyl-4-karboxy-5-aminoimidazol (CAIR), fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamid (SAICAR), adenylosukcinátlyáza (ADSL), 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR), 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid formyltransferáza/IMP cyklohydroláza (ATIC), inosinmonofosfát (IMP), inosinmonofosfátdehydrogenáza (IMPDH), xanthosinmonofosfát (XMP), guaninmonofosfátsyntáza (GMPS), guanosinmonofosfát (GMP), guanosindifosfát (GDP), guanosintrifosfát (GTP), ribonukleotidreduktáza (RNR), deoxyguanosindifosfát (dGDP), deoxyguanosintrifosfát (dGTP), adenylosukcinátsyntáza (ADSS), adenosinmonofosfát (AMP), adenosinmonofosfátdeamináza (AMPD), adenosinkináza (AK), adenosindifosfát (ADP), adenosintrifosfát (ATP), deoxyadenosindifosfát (dADP), deoxyadenosintrifosfát (dATP).* ***Záchranné dráhy pruinů:*** *purin*

*nukleosid fosforyláza (PNP), adeninfosforibosyltransferáza (APRT), adenosinkináza (ADK), adenosindeaminázа (ADA), hypoxanthinfosforibosyltransferáza (HPRT), deoxycytidinkináza (DCK).*

### 3.6.3. Syntéza pyrimidinů *de novo*

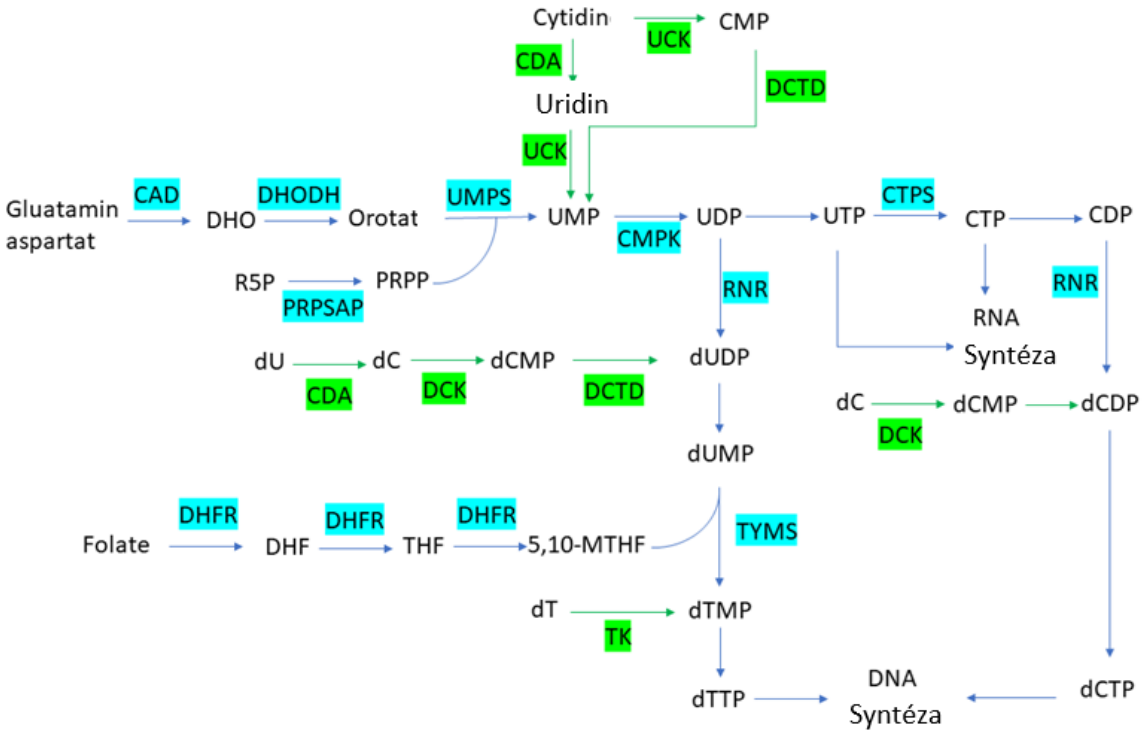
Syntéza pyrimidinů *de novo* narozdíl od purinů začíná sestavením pyrimidinového cyklu a až poté se na něj napojuje ribosa v podobě PRPP. Společným a fundamentálním rysem syntézy *de novo* purinů a pyrimidinů je účast aminokyselin aspartátu a glutaminu. První, druhý a třetí krok katalyzuje trifunkční klíčový enzymový **komplex CAD**, jehož expresi zvyšuje mTOR (53). Prvním krokem je biosyntéza karbamoylfosfátu za přítomnosti 2 ATP, glutaminu a molekuly $HCO_3^-$ za katalýzy **CPSII (karbamoylfosfátsyntetáza II)**. V druhém kroku dochází k navázání aspartátu a vzniku karbamoylaspartátu pomocí **ATCase (aspartáttranskarbamoyláza)**. Následně se uzavírá heteroaromatický kruh v přítomnosti **DHOase (dihydroorotáza)** a vzniku dihydroorotátu. V dalším kroku za katalýzy **DHODH (dihydroorotátdehydrogenáza)** vzniká orotát. Následující dva kroky katalyzuje bifunkční enzym **UMPS (uridinmonofosfátsyntetáza)**. V prvním z nich dochází PRPP-dependentní reakci, a to navázání fosforibosilu vzniklého z ribózy-5-fosfát pomocí enzymu **PRPSAP (fosforibosylpyrofosfátsyntetáza)**, který je společný pro *de novo* syntézu purinů a pyrimidinů. V dalším kroku, jež katalyzuje **UMPS** dochází k dekarboxylaci a vzniku uridinmonofosfátu (UMP). Následuje konverze UMP na UDP za přítomnosti **CMPK (cytidin/uridinmonofosfátkináza)**. Syntéza UTP probíhá pomocí **NDPK (nukleosiddifosfátkináza)** a zapojuje se do utváření RNA (46, 47). Molekula UTP může být konvertována na CTP pomocí **CTPS (cytidintrifosfátsyntáza)** v ATP dependentní reakci, za přítomnosti glutaminu jako donoru dusíku a podílet se na RNA syntéze (47, 53, 54).

UDP a CDP mohou být za katalýzy **RNR (ribonukleotidreduktáza)** převedeny na dUDP a dCDP. Molekula dCDP je převedena pomocí **NDPK** na dCTP a slouží pro syntézu DNA. dUDP je degradováno pomocí **dUDPázy** na dUMP, který je substrátem pro enzym **TYMS (thymidylátsyntáza)**, který umožňuje zformování deoxythymidinmonofosfátu (dTMP). Enzym **TYMS** je závislý na **DHFR (dihydrofolátreduktáza)**, který obnovuje 5, 10 MTHF (5, 10-methylentetrahydrofolát) z něhož **TYMS** napojuje methyl a dva vodíky na dUMP za vzniku dTMP. Molekula dTMP je fosforylována na dTDP za katalýzy **TK (thymidinkináza)** a následně pomocí **NDPK** na dTTP pro následnou syntézu DNA (46, 47, 54).

### 3.6.4. Záchranné dráhy pyrimidinů

Molekuly UMP a CMP vzniklé RNA katabolismem mohou být rovnou konvertovány za katalýzy CMPK (cytidin/uridinmonofosfátkináza) a NDPK (nukleosiddifosfátkináza) na UTP a CTP. Nukleosid cytidin může být transformován na uridin pomocí CDA (cytidindeamináza). Oba tyto nukleosidy jsou substráty UCK (uridincytidinkináza), jež katalyzuje vznik UMP a CMP. Molekula UMP je poté katalyzována stejnými enzymy jako v de novo syntéze a umožňuje vznik UTP, CTP a dCTP, zatímco CMP je přeměněno na UMP enzymem DCTD (deoxycytidilátdeamináza), jež zároveň katalyzuje přeměnu dCMP na dUDP (46, 47).

Záchranné dráhy pyrimidinových deoxyribonukleosidů dU, dC a dT se probíhají následovně. Molekula dU je konvertována na dC pomocí **CDA**. Molekula dC je přeměněna na dCMP pomocí **DCK** a poté existují dvě možnosti. V první se dCMP mění na dUMP v přítomnosti **DCTD** a v druhé je dCMP fosforylováno na dCDP a následně dCTP. Poslední z deoxypyrimidinů dT je transformován na dTMP za katalýzy **TK (thymidinkináza)**. Poté je fosforylován enzymy ze syntézy *de novo* na dTTP a společně s dCTP slouží pro syntézu DNA (46, 47).




**Obr. 3 *De novo* syntéza a záchranné dráhy pyrimidinů (53).** *Enzymy pyrimidinové de novo syntézy jsou značeny modře a záchranné dráhy pyrimidinů jsou označeny zeleně. V rámci de novo syntézy je nukleosid UMP syntetizován z glutaminu, aspartátu a ribózy-5-fosfát za pomocí CAD, DHODH, PRPSAP a UMPS. Enzym CMPK katalyzuje vznik UDP. UDP může být fosforylováno na UPT a pomocí enzymu CTPS dochází k transformaci na CTP, které společně s UTP slouží pro syntézu RNA. Ribonukleotidy UDP a CDP mohou být přeměněny za katalýzy na deoxyribonukleotidy dUDP a dCDP. dUMP je v přítomnosti TYMS a kofaktoru 5, 10-MTHF, přeměněno na dTMP, které po fosforylaci na dTTP slouží s dCTP pro syntézu DNA. Klíčový kofaktor 5, 10-MTHF je regenerován pomocí enzymu DHFR. U záchranných drah pyrimidinů je cytidin přeměněn na uridin pomocí CDA. Cytidin a uridin je transformován na CMP a UMP za katalýzy UCK. CMP se mění na UMP pomocí enzymu DCTD. dT je recyklován na dTMP pomocí TK. dC je přeměnen na dCMP enzymem DCK a následně na dCDP. dU je transformován na dC za katalýzy CDA a dC na dCMP pomocí DCK. dCMP je přeměněn na dUDP pomocí DCTD.* ***De novo syntéza pyrimidinů:*** *Karbamoylfosfátsyntetáza 2, aspartáttranskarbamoyláza a dihydroorotáza (CAD), dihydroorotát (DHO), dihydroorotátdehydrogenáza (DHODH), ribóza-*

*5-fosfát (R5P), fosforibosylpyrofosfátsyntetáza (PRPSAP), fosforibosylpyrofosfát (PRPP), uridinmonofosfátsyntetáza (UMPS), uridinmonofosfát (UMP), cytidin/uridinmonofosfátkináza (CMPK), uridindifosfát (UDP), uridintrifosfát (UTP), cytidintrifosfátsyntáza (CTPS), cytidintrifosfát (CTP), cytidindifosfát (CDP), ribonukleotidreduktáza (RNR), deoxycytidindifosfát (dCDP), deoxycytidintrifosfát (dCTP), deoxyuridindifosfát (dUDP), deoxyuridinmonofosfát (dUMP), thymidylátsyntáza (TYMS), deoxythymidinmonofosfát (dTMP), deoxythymidintrifosfát (dTTP), dihydrofolátreduktáza (DHFR), dihydrofolát (DHF), tetrahydrofolát (THF), 5,10-methylentetrahydrofolát (5,10-MTHF).* ***Záchranné dráhy pyrimidinů:*** *cytidindeaminázа (CDA), uridin-cytidinkináza (UCK), cytidinmonofosfát (CMP), deoxycytidylátdeaminázа (DCTD), deoxyuridin (dU), cytidindeaminázа (CDA), deoxycytidin (dC), deoxycytidinkináza (DCK), deoxycytidinmonofosfát (dCMP), deoxythymidin (dT), thymidinkináza (TK).*

## 3.7. Placentární modely

Placentární modely jsou důležité, protože studovat lidskou placentu v průběhu těhotenství není z etických důvodů možné nebo jen velmi obtížně (56).

*In vivo* lze placentu zkoumat na zvířecích modelech. Hlavní nevýhodou této metody je etická stránka (snaha o redukci počtu pokusných zvířat) a fakt, že placenta je mezidruhově nejvíce rozdílný orgán z pohledu své morfologie a molekulárního metabolismu. Z tohoto důvodu jsou pro základní i aplikovaný výzkum důležité *in vitro* metodiky (57).

Mezi *in vitro* modely trofoblastu se řadí izolované primární buňky trofoblastu a buněčné linie odvozené od placentárních nádorů. Primární buňky trofoblastu se získávají izolací z placenty z donošeného těhotenství a kultivují se v monovrstvách nebo konvenčních plátech. Používají pro výzkum trofoblastu ve stádiu CTB a STB. Stádium CTB je reprezentováno primárními buňkami trofoblastu, které jsou kultivovány po dobu 8 h, zatímco stádium STB vzniká spontánní fúzí po 72 – 96 h kultivace. (104, 105).

Dalším často používaným *in vitro* modelem je buněčná linie BeWo. Buňky BeWo jsou schopny v přítomnosti aktivátoru adenylátcyklázy a forskolinu fúzovat a diferenciovat do jednolité vrstvy napodobující vrstvu STB. Jsou vhodným *in vitro* modelem pro výzkum transcelulárních distribuce nutrientů a léčiv přes placentární trofoblast a humorální funkce typické pro STB, jako produkce např. hCG, progesteronu (58).

Další využívanou metodou je výzkum vilózních explantátů. Je časově náročná, jelikož po získání placenty je nutné okamžitého použití buněk v experimentu. Její výhodou je, že umožňuje zkoumání placenty již od prvního trimestru. Naopak nevýhody jsou spjaté s procesem odběru placenty od dárců a jejich heterogenitou (59).

# 4. Hypotéza

Placenta je komplexní rychle rostoucí orgán zajišťující fyziologický vývoj a růst plodu. Samotný vývoj placenty je spjat s mnoha metabolickými procesy, z nichž některé jsou podobné procesům v nádorových tkáních, přičemž hlavním rozdílem mezi vývojem placenty a nádoru je, že růst placenty je vysoce regulovaný a řízený děj. Placenta od prvního do třetího trimestru hospodaří s nukleos(t)idy, které si je schopna sama syntetizovat *de novo*, nebo je recykluje v záchranných reakcí nukleos(t)idů. Doposud přesně nevíme, zda v nějaké fázi těhotenství převládá daná metabolická dráha a zda dochází ke změnám v potřebách nukleos(t)idů v placentách ze spontánních předčasných porodů.

# 5. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je stanovení rozdílů exprese genů enzymů podílejících se na syntéze *de novo* a záchranných drahách purinů a pyrimidinů a adenosinového metabolismu v průběhu ontogeneze placenty. Bude porovnávána exprese daných genů u vzorků placent z prvního a posledního trimestru a také z placent předčasných porodů a opět placent z posledního trimestru. Zároveň se budeme snažit stanovit změny exprese genů během diferenciace cytotrofoblastu (CTB) na syncytiotrofoblast (STB) pomocí primárních buněk izolovaných z trofoblastu a také prostřednictvím simulace tohoto děje buňkami BeWo.

# 6. Experimentální část

## 6.1. Chemikálie a reagencie

### 6.1.1. Systémy pro kvantifikaci genové exprese

| | Gene symbol | Gene name | Gene code | | Gene symbol | Gene name | Gene code |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | *PRPSAP1* | *Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase associated protein 1* | Hs01048899_m1 | **17** | *AK1* | *Adenylate kinase 1* | Hs00176119_m1 |
| **2** | *PRPSAP2* | *Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase associated protein 2* | Hs00160482_m1 | **18** | *AK2* | *Adenylate kinase 2* | Hs01650722_m1 |
| **3** | *PPAT* | *Phosphoribosyl pyr ophosphate amidotransferase* | Hs00601264_m1 | **19** | *GART* | *Phosphoribosylgl ycinamide formyltransferase* | Hs00894582_m1 |
| **4** | *DHFR* | *Dihydrofolate reductase* | Hs00758822_s1 | **20** | *PFAS* | *Phosphoribosylfo rmylglycinamidin e synthase* | Hs00389822_m1 |
| **5** | *AMPD2* | *Adenosine monophosphate deaminase 2* | Hs00187821_m1 | **21** | *PAICS* | *Phosphoribosyla minoimidazole carboxylase* | Hs00935017_gH |
| **6** | *AMPD3* | *Adenosine monophosphate deaminase 3* | Hs00983048_m1 | **22** | *PAICS* | *Phosphoribosyla minoimidazole carboxylase* | Hs00272390_m1 |
| **7** | *PNP* | *Purine nucleoside phosphorylase* | Hs00165367_m1 | **23** | *ASL* | *Adenylosuccinate lyase* | Hs01075807_m1 |
| **8** | *GDA* | *Guanine deaminase* | Hs00393722_m1 | **24** | *ATIC* | *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/ IMP cyclohydrolase* | Hs00269671_m1 |
| **9** | *HPRT1* | *Hypoxanthine phosphoribosyltran sferase 1* | Hs02800695_m1 | **25** | *ADSS 2* | *Adenylosuccinate synthase 2* | Hs00765651_m1 |
| **10** | *CAD* | *Carbamoyl-phosphate synthetase 2* | Hs00983188_m1 | **26** | *ADSSL1* | *Adenylosuccinate synthase like 1* | Hs00411846_m1 |
| **11** | *DHODH* | *Dihydroorotate dehydrogenase* | Hs00361406_m1 | **27** | *CDA* | *Cytidine deaminase* | Hs00156401_m1 |
| **12** | *UMPS* | *Uridine monophosphate synthetase* | Hs00923517_m1 | **28** | *DCTD* | *dCMP deaminase* | Hs01126095_m1 |
| **13** | *CTPS1* | *CTP synthase 1* | Hs01041851_m1 | **29** | *DCK* | *Deoxycytidine kinase* | Hs01040726_m1 |
| **14** | *CTPS2* | *CTP synthase 2* | Hs00219845_m1 | **30** | *TK1* | *Thymidine kinase 1* | Hs01062125_m1 |
| **15** | *CMPK1* | *Cytidine/Uridine monophosphate kinase 1* | Hs01074420_g1 | **31** | *TK2* | *Thymidine kinase 2* | Hs01013364_m1 |
| **16** | *CMPK2* | *Cytidine/Uridine monophosphate kinase 2* | Hs01013364_m1 | **32** | *TYMS* | *Thymidilate synthetas* | Hs00176119_m1 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **33** | *IMPDH1* | *Inosine monophosphate dehydrogenase 1* | Hs01650722_m1 | **46** | *ADORA1* | *Adenosine receptor A1* | Hs00181231_m1 |
| **34** | *IMPDH1* | *Inosine monophosphate dehydrogenase 1* | Hs00357247_g1 | **47** | *ADORA2A* | *Adenosine receptor A2A* | Hs00169123_m1 |
| **35** | *IPDH2* | *Inosine monophosphate dehydrogenase 2* | Hs00269500_m1 | **48** | *ADORA2B* | *Adenosine receptor A2B* | Hs00386497_m1 |
| **36** | *RRM1* | *Ribonucleotide reductase regulatory subunit M1* | Hs00274359_m1 | **49** | *ADORA3* | *Adenosine receptor 3A* | Hs00181232_m1 |
| **37** | *RRM2* | *Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2* | Hs00357247_g1 | **50** | *ENT-1* | *Equilibrative nucleoside transporter-1* | Hs01085704_g1 |
| **38** | *GMPS* | *Guanine monophosphate synthase* | Hs00269500_m1 | **51** | *ENT-2* | *Equilibrative nucleoside transporter-2* | Hs00155426_m1 |
| **39** | *NT5C* | *5', 3'-nucleotidase, cytosolic* | Hs00274359_m1 | **52** | *CNT-1* | *Concentrative nucleoside transporter-1* | Hs00984391_m1 |
| **40** | *NT5C2* | *5'-nucleotidase, cytosolic II* | Hs01056741_m1 | **53** | *CNT-2* | *Concentrative nucleoside transporter-2* | Hs00188407_m1 |
| **41** | *NT5C3b* | *5'-nucleotidase, cytosolic IIIB* | Hs00369454_m1 | **54** | *CNT-3* | *Concentrative nucleoside transporter-3* | Hs00223220_m1 |
| **42** | *ADK* | *Adenosine kinase* | Hs00417073_m1 | **Referenční** geny | | | |
| **43** | *ADA* | *Adenosine deaminase* | Hs01110945_m1 | **55** | *BM2* | *Beta-2 microglobulin* | Hs00187842_m1 |
| **44** | *AHCY* | *Adenosylhomocysteinase* | Hs00898137_g1 | **56** | *GAPDH* | *Glcyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* | Hs02758991_g1 |
| **45** | *AHCY* | *Adenosylhomocysteinase* | Hs00898135_gH | **57** | *YWHAZ* | | Hs00755072_m1 |

### 6.1.2. Klinické parametry dárkyň a příslušných placent a plodů

| | Věk matky | Výška [cm] | Hmotnost matky [kg] před těhotenstvím | Hmotnost matky [kg] před porodem | BMI před těhotenstvím | BMI před porodem | Hmotnost [g] plodu | Pohlaví plodu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Prvotrimestrální placenty** | | | | | | | | |
| 1 | 35 | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 38 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 41 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 21 | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 25 | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 36 | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | 26 | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | 21 | 159 | 55,00 | - | - | - | - | - |
| 9 | 20 | 161 | 73,00 | - | - | - | - | - |
| 10 | 19 | 165 | 64,00 | - | - | - | - | - |
| **Kohorta pro porovnání prvotrimestrálních placent a přirozeně porozených placent** | | | | | | | | |
| 1 | 39 | 183 | 95 | 110 | 28 | 33 | 3300 | M |
| 2 | 39 | 173 | 71 | 90 | 24 | 30 | 3000 | M |
| 3 | 31 | 170 | 59 | 71 | 20 | 25 | 3060 | Ž |
| 4 | 39 | 166 | 59 | 72 | 21 | 26 | 4160 | Ž |
| 5 | 38 | 170 | 65 | 75 | 22 | 26 | 3270 | Ž |
| 6 | 38 | 164 | 71 | 86 | 26 | 32 | 3610 | M |
| 7 | 31 | 174 | 81 | 93 | 27 | 31 | 3280 | Ž |
| 8 | 35 | 168 | 110 | 125 | 39 | 44 | 3850 | Ž |
| 9 | 38 | 172 | 65 | 82 | 22 | 28 | 3090 | M |
| 10 | 37 | 165 | 54 | 71 | 20 | 26 | 3790 | M |
| **Placenty spontánního předčasného porodu** | | | | | | | | |
| 1 | | 162 | 51 | 57 | 19,43 | 21,72 | 1100 | M |
| 2 | | 166 | 67 | 77 | 24,31 | 27,94 | 1000 | Ž |
| 3 | | 168 | 85 | 85 | 30,12 | 30,12 | 1850 | M |
| 4 | | 158 | 54 | 62 | 21,63 | 24,84 | 1640 | Ž |
| 5 | | 160 | 64 | 72 | 25,00 | 28,13 | 2730 | M |
| 6 | | 168 | 60 | 71 | 21,26 | 25,16 | 1890 | M |
| 7 | | 170 | 72 | 81 | 24,91 | 28,03 | 2280 | Ž |
| 8 | | 162 | 51 | 63 | 19,43 | 24,01 | 1890 | M |
| 9 | | 168 | 51 | 55 | 18,07 | 19,49 | 620 | Ž |
| 10 | | 165 | 55 | 63 | 20,20 | 23,14 | 1600 | Ž |
| **Kohorta pro porovnání placent spontánního předčasného porodu a přirozeně porozených placent** | | | | | | | | |
| 1 | 33 | 158 | 67 | 80 | 27 | 32 | 3430 | M |
| 2 | 38 | 179 | 70 | 82 | 22 | 26 | 2200 | Ž |
| 3 | 31 | 167 | 102 | 102 | 37 | 37 | 4120 | M |
| 4 | 33 | 164 | 64 | 73 | 24 | 27 | 3650 | M |
| 5 | 33 | 164 | 64 | 73 | 24 | 27 | 2560 | Ž |
| 6 | 36 | 165 | 63 | 74 | 23 | 27 | 2800 | Ž |
| 7 | 36 | 168 | 55 | 79 | 19 | 28 | 4180 | M |
| 8 | 30 | 154 | 48 | 65 | 20 | 27 | 3280 | Ž |
| 9 | 30 | 168 | 100 | 104 | 35 | 37 | 3710 | M |
| 10 | 35 | 170 | 94 | 110 | 33 | 38 | 3060 | M |

### 6.1.3. Reagencie pro qRT-PCR

- 2-propanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Aqua pro injectione (API) (Braun, Melsungen, Německo)
- Dimethyl-sulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Dulbecco's Phosphste Buffered Saline (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Ethanol (Merck, USA)
- Glycogen (Mannheim, Německo)
- Chloroform (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- iScriptTM Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-PCR
- Isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- FBS (fosfátový oufr) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- TaqMan ® Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- TRI REAGENT ® RT (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

## 6.2. Přístroje

- Laminární box (Joujan SA, St. Herblain, France)
- Thermal Cycler Bio-Rad T-100 (Hercules, Kalifornie, USA)
- QuantStudio ™ 5 Real-Time PCR Instrument (Industrial Estate Road 3, Singapur)
- Centrifuga: HERMLE Labortechnik GmbH, typ: Z 326 K (Wehingen, Německo)
- Spektrofotometr: NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)

## 6.3. Kultivace buněčné linie BeWo

Buňky BeWo (buňky odvozené od lidského choriokarcinomu) byly získány z ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, UK). BeWo buňky byly kultivovány v médiu Ham F-12 obohaceným o s 10 % FBS za těchto podmínek – 37 °C, 5 % CO2, 95 % N2 s každodenní výměnou média. Pro zahájení diferenciace buněk a tím simulace vzniku STB byly buňky buněčné linie BeWo vystaveny forskolinu (FSK, 50 µM) po dobu 48 h. Jako kontrolu a simulaci CTB byly BeWo buňky vystaveny dimethyl-sulfoxidu (DMSO) v koncentraci 0,05 %.

## 6.4. Izolace RNA

RNA byla izolována z prvotrimestrálních a poporodních placent ze spontánních předčasných porodů a placent z donošeného těhotenství, nediferenciovaných (CTB) a diferenciovaných (STB) buněk primárního trofoblastu a buněčné linie BeWo. Nejprve byla tkáň (cca 1cm$^3$)/buňky omyty pufrem PBS a následně homogenizovány v přítomnosti TRI REAGENT®RT (*Molecular Research*) za vzniku buněčných lyzátů s následnou chloroformovou extrakcí a precipitací isopropanolem.

Lyzáty byly rozmraženy a centrifugovány při teplotě 4 °C. V dalším kroku bylo přidáno k homogenizovanému vzorku 200 µl chloroformu a po dobu 15 vteřin byl vzorek intenzivně protřepáván. Následně byl vzorek centrifugován za podmínek 12 000 g, 4 °C, 15 min. Centrifugací byl vzorek rozdělen na tři viditelné fáze, přičemž v dalších krocích jsme pracovali pouze se svrchní vodnou vrstvou obsahující RNA.

Pro precipitaci RNA z odebrané svrchní vrstvy bylo použito 500 µl isopropanolu. Po přidání precipitačních agens byly vzorky dobře protřepány a poté se nechaly ustálit (10 min) při pokojové teplotě s následnou centrifugací (12 000 g, 4 °C, 10 min).

Supernatant byl odsán a peleta byla omyta 1 ml 75 % ethanolu pro kvalitnější precipitaci. Vzorky se poté znovu centrifugovali při 12 000 g, 4 °C po dobu 5 min. Tento krok byl pro dosažení čisté pelety opakován dvakrát. V posledním kroku se nechala peleta vysušit při laboratorní teplotě.

Peleta RNA byla rozpuštěna ve 20 µl API. Čistota a koncentrace izolované RNA byla zjištěna poměrem A260/280 a rezidua organických solventů poměrem A260/230 za použití ND-1000 spektrofotometru.

## 6.5. Reverzní transkripce RNA do cDNA

Vzorky po izolaci obsahovali 5 µg RNA v 20 µl. Pro reverzní transkripci bylo použito pro každý vzorek 4 µl 5x iScript Advanced Reaction Mix (obsahující dNTPs, oligo(dT) plus primery) a 1 µl iScript Advanced Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza), která umožnila vytvoření cDNA. Po promísení reverzní transkripce probíhala v přístroji Thermal Cycler Bio-Rad T-100 s následujícím protokolem 20 min při teplotě 46 °C a ihned poté byla na 1 min teplota zvýšena na 95 °C, aby došlo k zastavení funkce enzymu. cDNA byla skladována při -20 °C a vzorky byly následně ředěny API v takovém poměru, abychom získali koncentraci cDNA 12,5 ng/µl.

## 6.6. qPCR

Pomocí této metody qPCR (kvantitativní PCR) jsme se snažili zjistit genovou expresi enzymů účastnících se komplexního metabolismu nukleos(t)idů v placentě, primárních buňkách trofoblastu a BeWo buňkách. Pro samotnou analýzu qPCR byla použita destička se 384 jamkami. Do každé jamky bylo přidáno 5 µl reakční směsi. Ta byla připravena smísením z 2,5 µl TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, 1,25 µl API, 0,25 µl systémem pro kvantifikaci genové exprese a 1 µl cDNA. Celkové množství cDNA v reakci bylo 12,5 ng. Po naplnění jamek byla destička centrifugována a přesunuta do přístroje QuantStudio ™ 5 Real-Time PCR Instrument. Nastavení PCR teplotního profilu: (1) polymerázová aktivace 20s při teplotě 95 °C; (2) následuje 40 cyklů, kdy byla střídána teplota 95 °C po dobu 3 s (denaturace) a 60 °C po dobu 30 s (elongace). Změřená data byla normalizována na expresi třech referenčních genů – GAPDH, B2M a YWHAZ (101).

## 6.7. Analýza dat

Pro analýzu dat bylo rozdělení genů do definovaných skupin následující. *De novo* syntéza purinů/pyrimidinů, záchranné dráhy purinů/pyrimidinů, adenosinový metabolismus, adenosinové receptory, geny účastnící se *de novo* syntézy purinů a pyrimidinů označené jako nezařazené, transportéry a referenční geny. Adenosin, jeho metabolismus a receptory jsme v naší studii analyzovali separátně kvůli jeho významné roli v řadě patofyziologických (preeklampsie) a fyziologických procesů, jako regulace krevního tlaku a modulace funkcí některých orgánů a tkání včetně placenty (52).

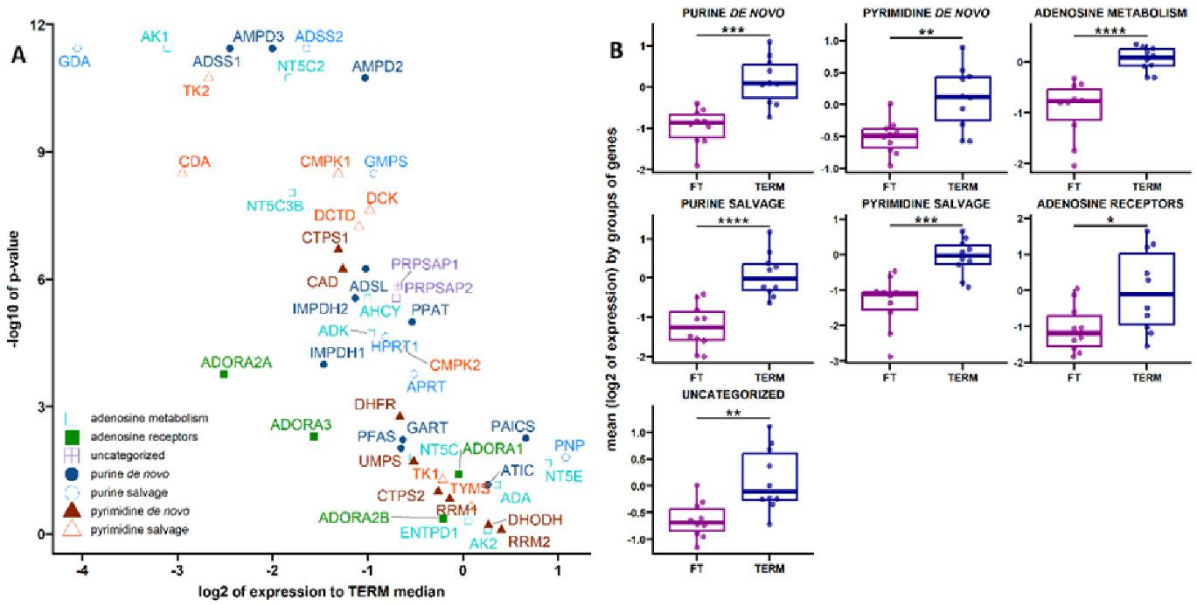
Data byla analyzována pomocí pomocí statistického softwaru R a funkcí programu *tidyverse*. Grafy byly vytvořeny pomocí programů *ggplot2*, *ggbeeswarm*, *ggpubr*, *ggprism*, *ggrepel* a *ggtext*. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí funkcí *R stat* nebo programu *rstatix*. Data genové exprese byla zpracována pomocí *delta-delta Ct metody*. Tzv. interplate kalibrace byla analyzována v každém běhu ve trojím opakování a průměrná hodnota byla odečtena od hodnot Ct ve všech analýzách, čímž byly generovány hodnoty *dCt*. Pro normalizaci byl použit průměr hodnot *dCt* exprese referenčních genů *B2M*, *GAPDH* a *YWHAZ*. Normalizované hodnoty *dCtNORM* byly získány

odečtením hodnoty *dCt* cílového genu od hodnoty *dCt* referenčního genu. Tyto hodnoty byly vztaženy na medián referenční skupiny a tím se získali hodnoty *ddCt*. Hodnoty *ddCt* mezi skupinami vzorků byly hodnoceny Wilcoxonovým testem (*Mann-Whitney*). Statistické testy v programu *rstatix* byly použity v R. p-hodnoty byly vypočteny pomocí funkcí *rstatix* a výsledky byly vykresleny pomocí funkce *ggheatmap* z programu *heatmaply*. Za statisticky signifikantní jsou považovány hladiny významnosti *($p \leq 0,05$), **($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$), ****($p \leq 0,0001$).

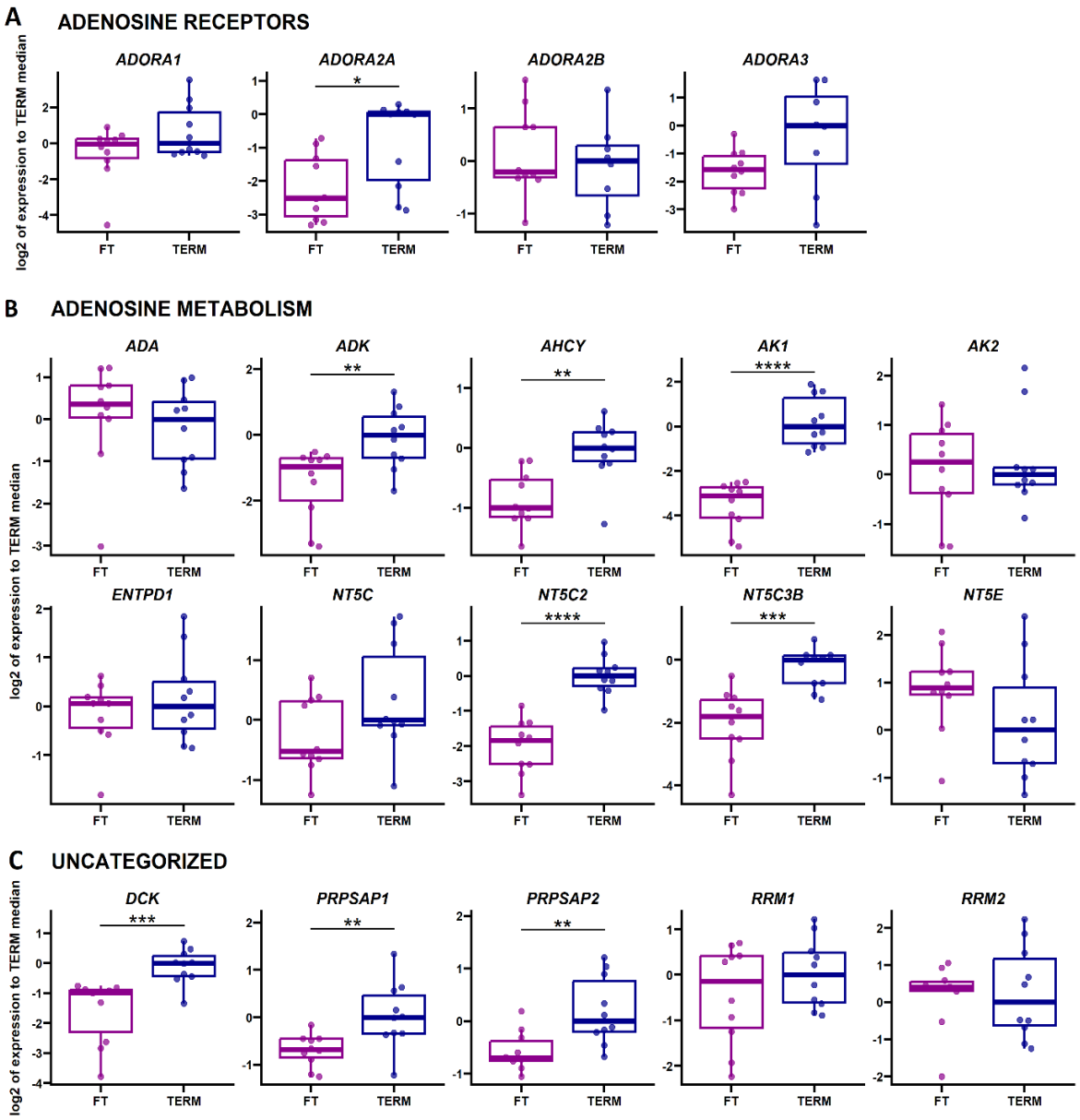
# 7. Výsledky

## 7.1. Porovnání exprese zkoumaných genů v prvotrimestrální placentě (FT) s placentou z donošeného těhotenství (TERM)

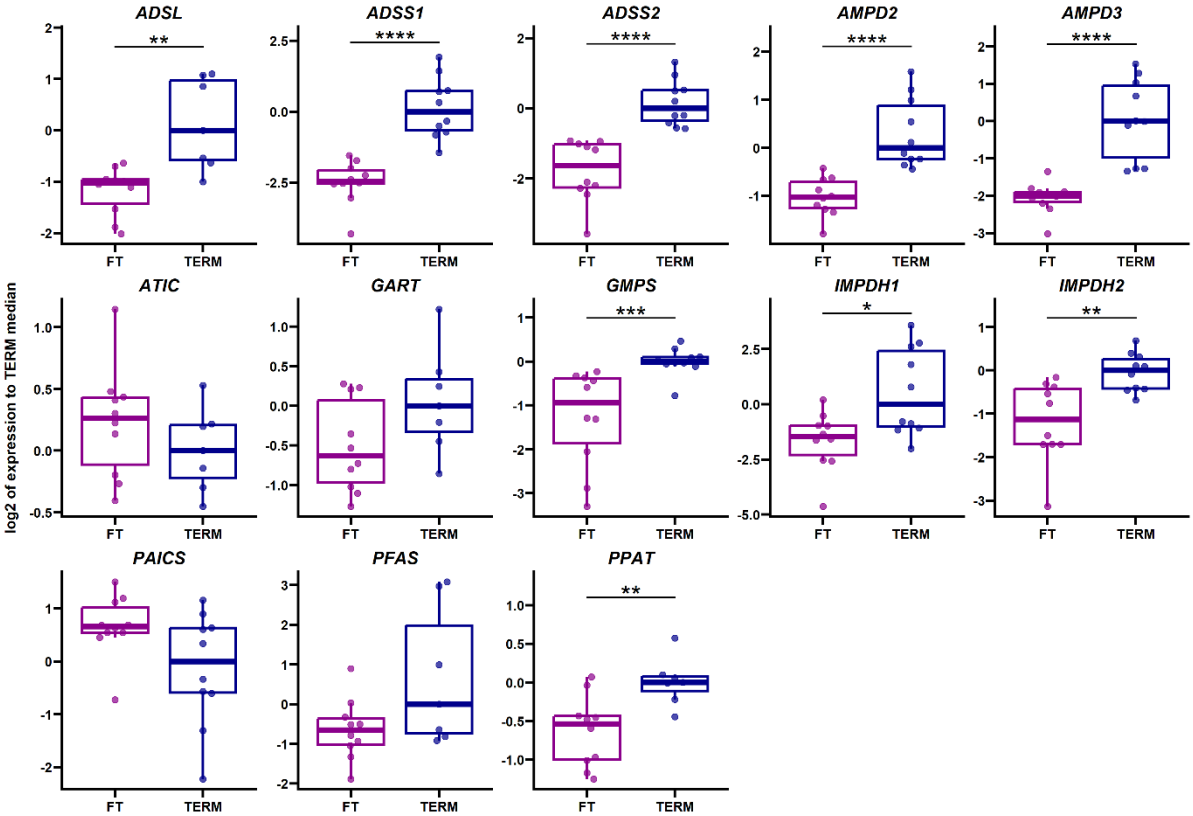
Zpočátku naší studie jsme se zaměřili na změny genové exprese mezi placentou z prvního trimestru a placentou z donošeného těhotenství. Pomocí Wilcoxonova *rank-sum* testu jsme zjistili, že exprese všech definovaných skupin genů byla snížena v FT placentě ve srovnání s TERM placentou (*Obrázek 4A, 4B*). Konkrétně byly sníženy geny pro adenosinové receptory (*ADORA2A*) (*Obrázek 5A*), adenosinový metabolismus (*ADK*, *AHCY*, *AK1*, *NT5C2* a *NT5C3B*) (*Obrázek 5B*), geny označené jako nezařazené (*PRPSAP1*, *PRPSAP2* a *DCK*) (*Obrázek 5C*), *de novo* syntézu purinů (*ADSL*, *ADSS1*, *ADSS2*, *AMPD2*, *GMPS*, *AMPD3*, *IMPDH1*, *IMPDH2* a *PPAT*) (*Obrázek 5D*), záchranné dráhy purinů (*APRT*, *GDA* a *HPRT1*) (*Obrázek 5E*), *de novo* syntézu pyrimidinů (*CAD*, *CMPK1* a *CTPS*) (*Obrázek 5F*) a záchranné dráhy pyrimidinů (*CMPK2*, *DCTD* a *TK2*) (*Obrázek 5G*).



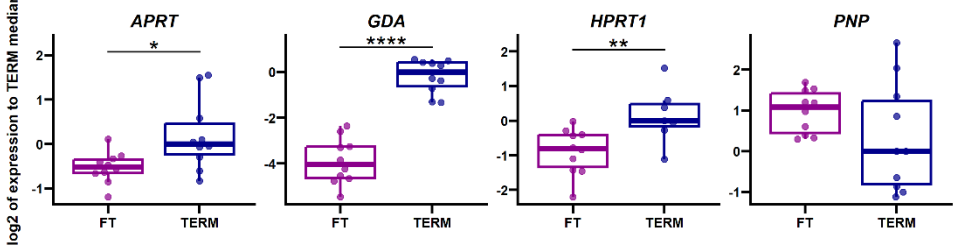

**Obr. 4 Srovnávací analýza genové exprese mezi prvotrimestrální placentou (FT) a placentou z donošeného těhotenství (TERM).** *Volcano graf (A) znázorňuje srovnání genové exprese provtrimestrální placenty (FT) s placentou z donošeného těhotenství (TERM). Krabicové grafy (B) popisují rozdíly genové exprese definovaných skupin mezi FT a TERM placentou. Hodnoty log2 exprese pro všechny definované skupiny byly zprůměrovány a prezentovány jako průměr log2 exprese ve srovnání k mediánu TERM. Statistická analýza byla provedena pomocí Wilcoxonova rank-sum testu (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 ve srovnání s TERM).*


A
ADENOSINE RECEPTORS
log2 of expression to TERM median
ADORA1
ADORA2A
ADORA2B
ADORA3
*
FT
TERM
B
ADENOSINE METABOLISM
ADA
ADK
AHCY
AK1
AK2
ENTPD1
NT5C
NT5C2
NT5C3B
NT5E
**
****
***
C
UNCATEGORIZED
DCK
PRPSAP1
PRPSAP2
RRM1
RRM2

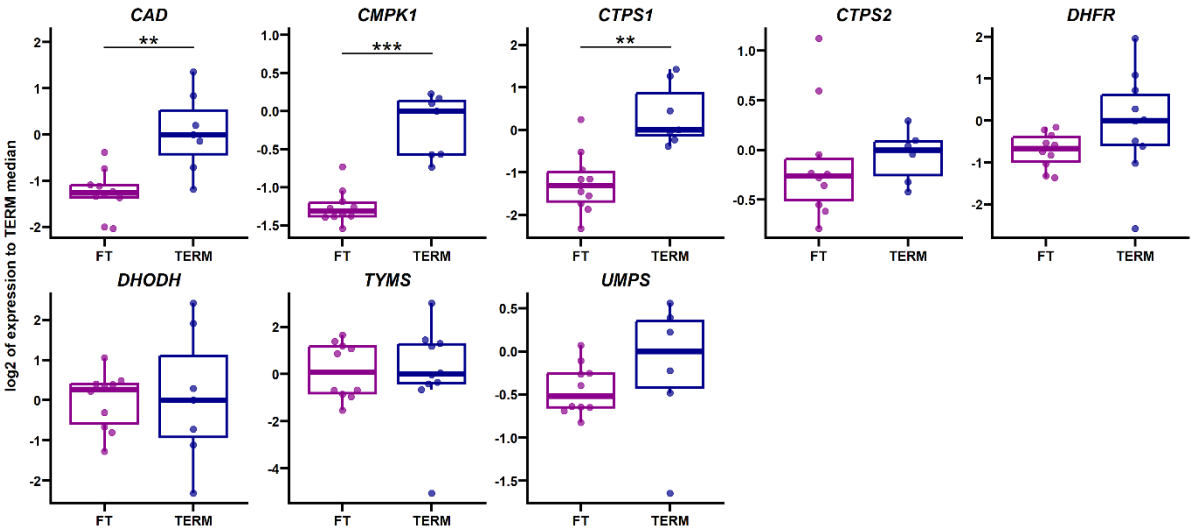
**D PURINE *DE NOVO***

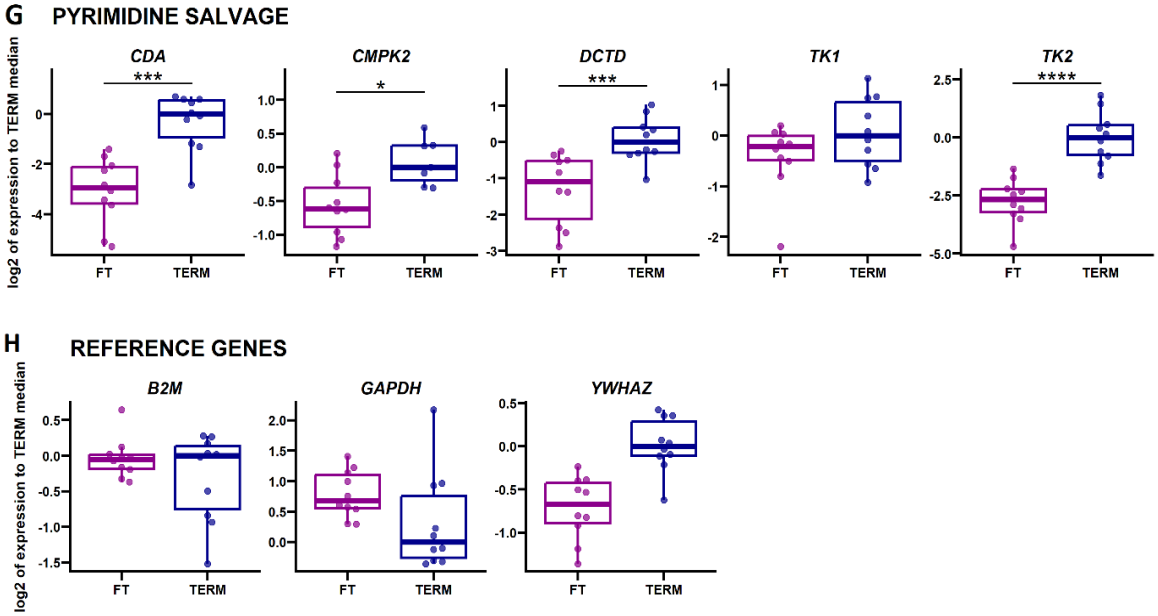



**E PURINE SALVAGE**




**F PYRIMIDINE *DE NOVO***

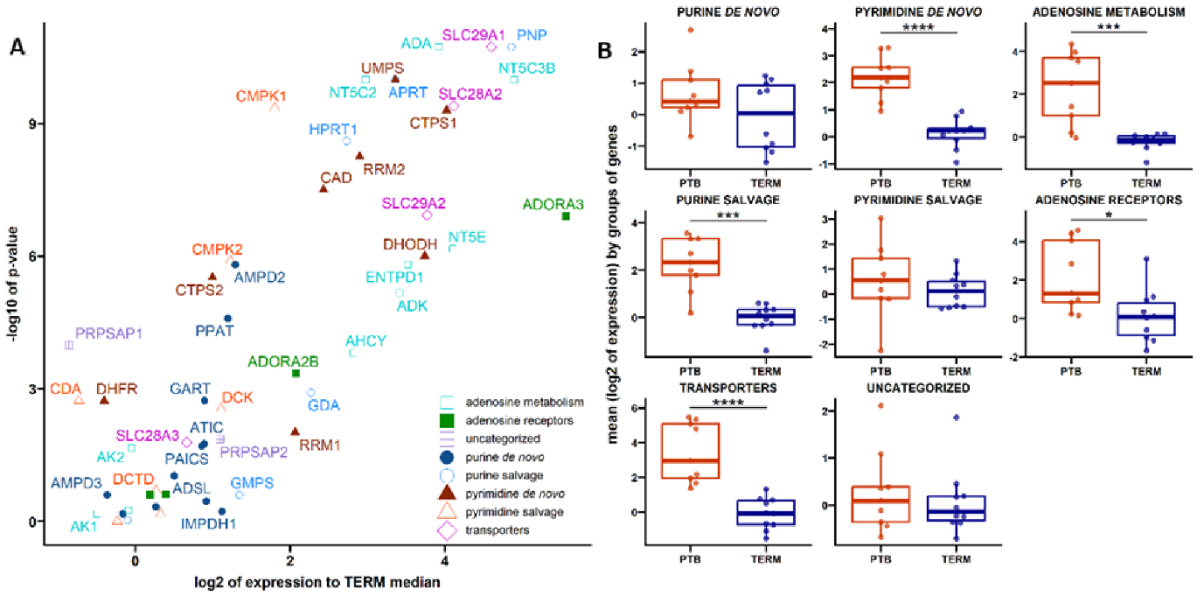




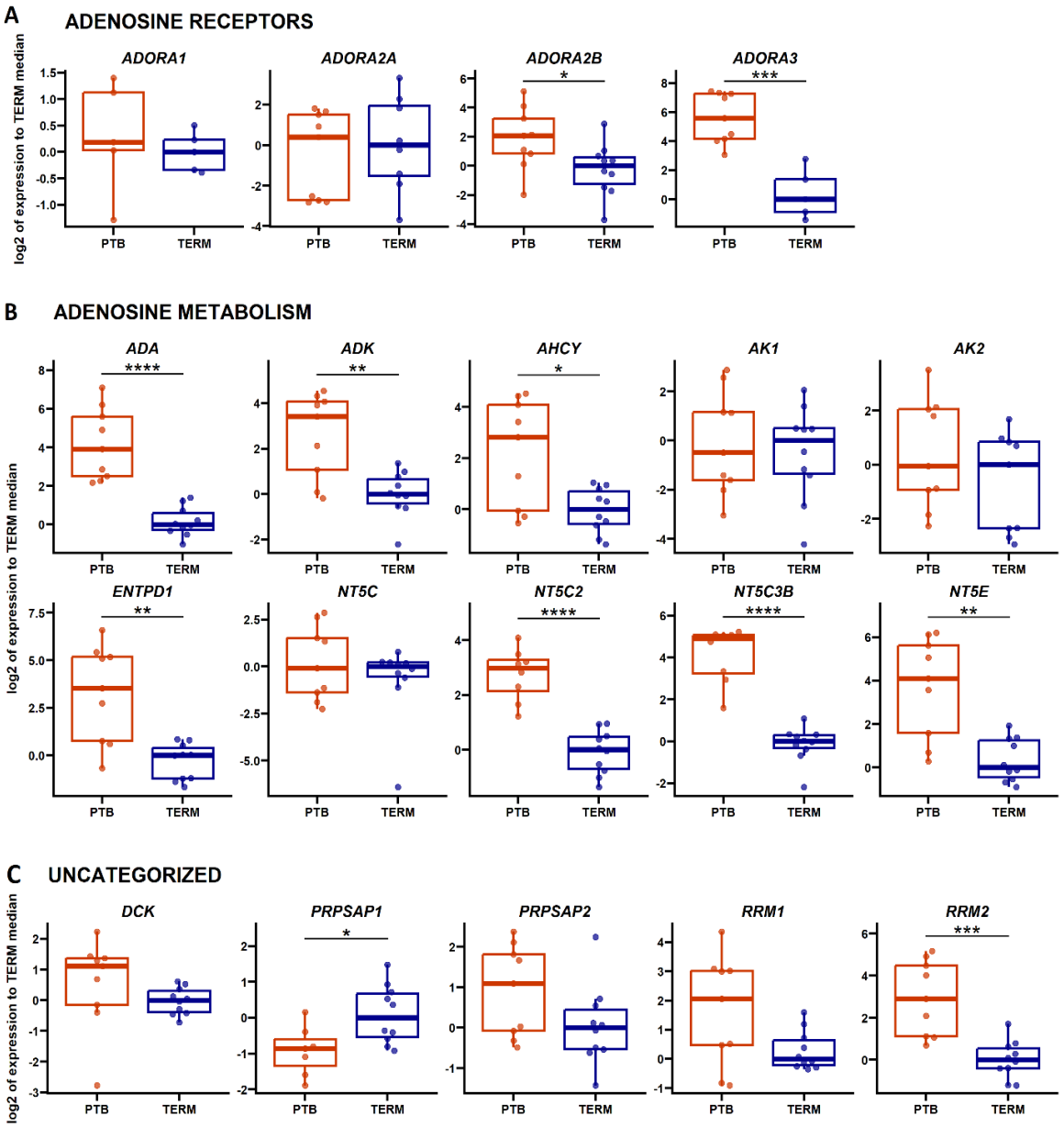

**Obr. 5 Porovnání genové exprese u FT a TERM placenty centralizované na medián TERM.** *Jednotlivé geny byly zařazeny do skupin – adenosinové receptory (A), adenosinový metabolismus (B), nezařazené geny (C), de novo syntéza purinů (D), záchranné dráhy purinů (E), de novo syntéza pyrimidinů (F), záchranné dráhy pyrimidinů (G), referenční geny (H). Data jsou prezentována pomocí krabicových grafů jako log2 exprese průměru TERM. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového dvouvýběrového Wilcoxonova testu (Mann-Whitney), (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 ve srovnání s TERM).*

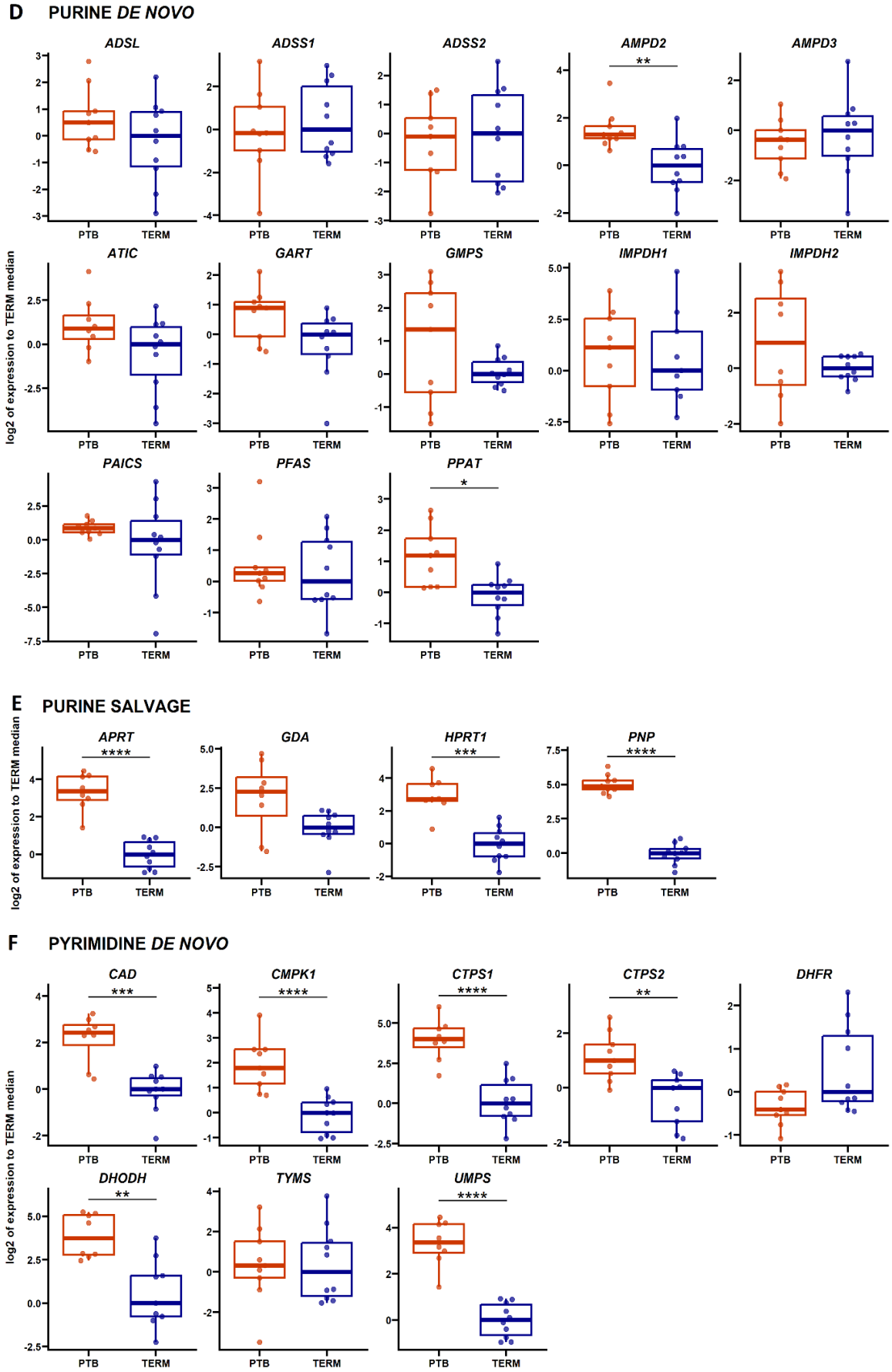
## 7.2. Porovnání exprese zkoumaných genů v placentě ze spontánního předčasného porodu (PTB) s placentou z donošeného těhotenství (TERM)

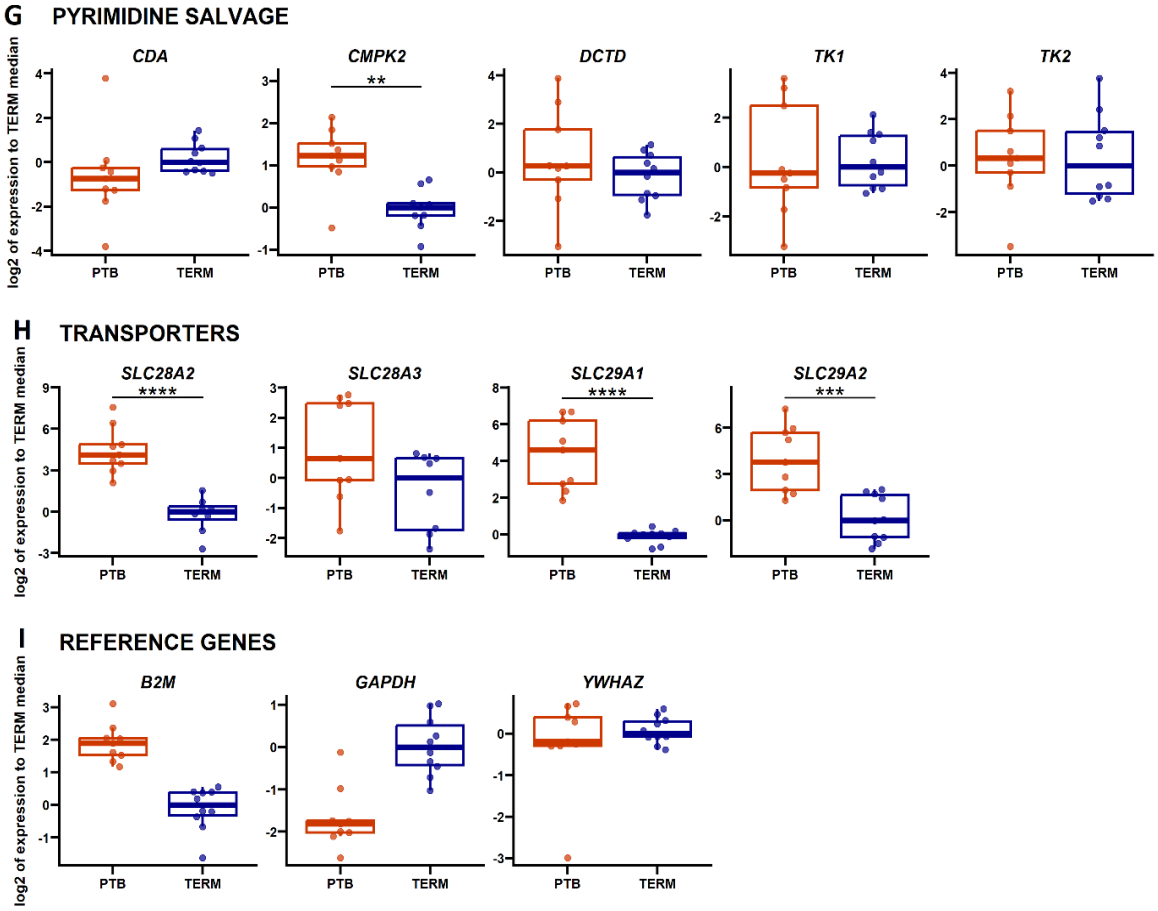
V následujícím kroku jsme porovnávali expresi stejné sady genů v PTB a TERM placentě. Pomocí Wilcoxonova *rank-sum* testu jsme zjistili, že exprese genů kódující proteiny zapojené do homeostázy nukleos(t)idů byla zvýšena v PTB placentě ve srovnání s TERM placentou (*Obrázek 6A*), exprese většiny definovaných skupin genů byla zvýšena v PTB placentě (*Obrázek 6B*). To platí konkrétně pro geny adenosinových receptorů (*ADORA2B* a *ADORA3*) (*Obrázek 7A*), adenosinového metabolismu (*ADA*, *ADK*, *AHCY*, *ENTPD1*, *NT5C2*, *NT5C3B* a *NT5E*) (*Obrázek 7B*). Ze skupiny nezařazených genů byla exprese *RRM2* v PTB placentě zvýšena, a naopak u *PRPSAP1* byla snížena (*Obrázek 7C*). Dále zvýšenou expresi v PTB placentě prokazovali geny purinové syntézy *de novo* (*AMPD2* a *PPAT*) (*Obrázek 7D*), záchranných drah purinů (*APRT, HPRT* a *PNP*) (*Obrázek 7E*), pyrimidinové syntézy *de novo* (*CAD*, *CMPK1*, *CTPS1*, *CTPS2*, *DHODH* a *UMPS*) (*Obrázek 7F*), pyrimidinových záchranných drah (*CMPK2*) (*Obrázek 7G*) a transportérů (*SLC28A2*, *SLC29A1* a *SLC29A2*) (*Obrázek 7H*).




**Obr. 6 Srovnávací analýza genové exprese mezi PTB placentou a TERM placentou.** *Volcano graf (A) znázorňuje srovnání genové exprese placenty ze spontánního předčasného porodu (PTB) s placentou z donošeného těhotenství (TERM). Krabicové grafy (B) popisují rozdíly genové exprese definovaných skupin mezi PTB a TERM placentou. Hodnoty log2 exprese pro všechny definované skupiny byly zprůměrovány a prezentovány jako průměr log2 exprese ve srovnání k mediánu TERM. Statistická analýza byla provedena pomocí Wilcoxonova rank-sum testu (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 ve srovnání s TERM).*


A
ADENOSINE RECEPTORS
log2 of expression to TERM median
ADORA1
ADORA2A
ADORA2B
*
ADORA3
***
PTB
TERM
B
ADENOSINE METABOLISM
ADA
****
ADK
**
AHCY
*
AK1
AK2
ENTPD1
**
NT5C
NT5C2
****
NT5C3B
****
NT5E
**
C
UNCATEGORIZED
DCK
PRPSAP1
*
PRPSAP2
RRM1
RRM2
***

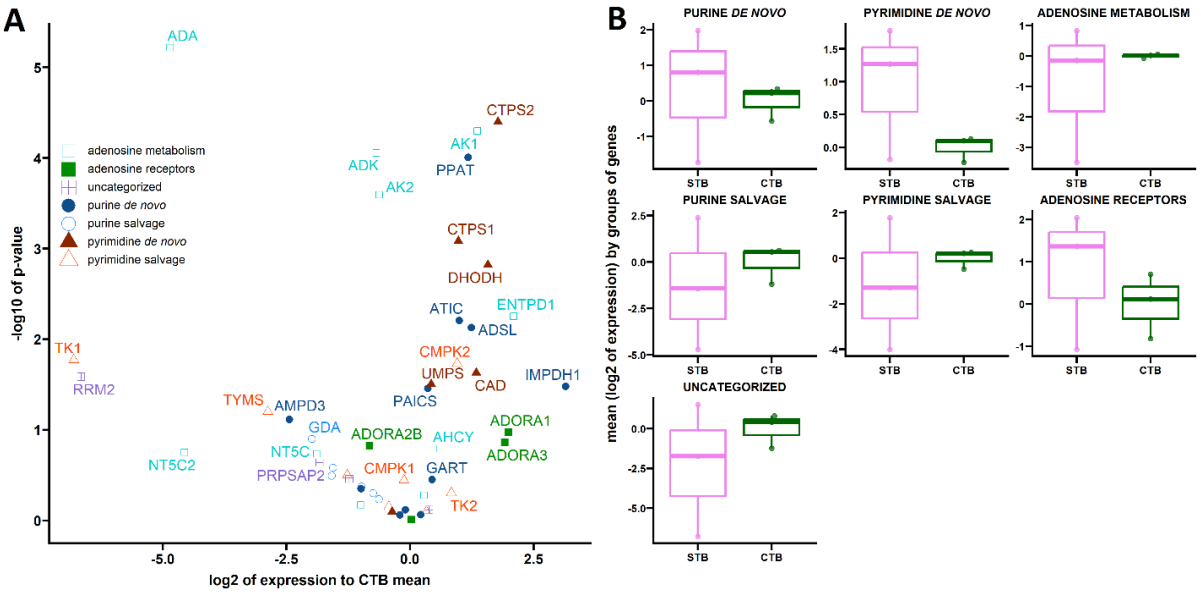

D PURINE DE NOVO
ADSL
ADSS1
ADSS2
AMPD2
AMPD3
ATIC
GART
GMPS
IMPDH1
IMPDH2
PAICS
PFAS
PPAT
log2 of expression to TERM median
PTB
TERM
E PURINE SALVAGE
APRT
GDA
HPRT1
PNP
F PYRIMIDINE DE NOVO
CAD
CMPK1
CTPS1
CTPS2
DHFR
DHODH
TYMS
UMPS



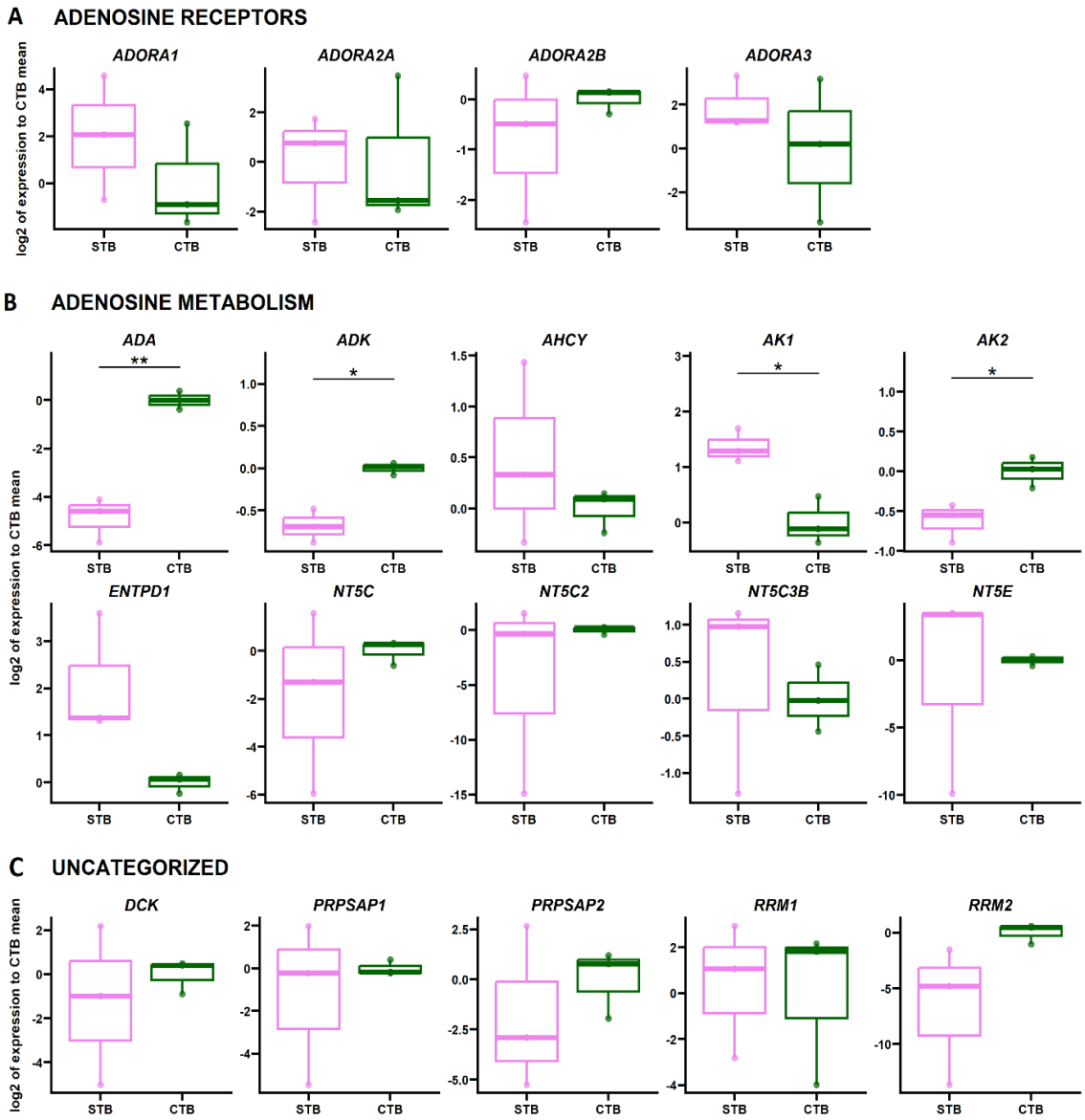

**Obr. 7 Porovnání genové exprese u PTB a TERM placenty centralizované na medián TERM.** *Jednotlivé geny byly zařazeny do skupin – adenosinové receptory (A), adenosinový metabolismus (B), nezařazené geny (C), de novo syntéza purinů (D), záchranné dráhy purinů (E), de novo syntéza pyrimidinů (F), záchranné dráhy pyrimidinů (G), transportéry (H), referenční geny (I). Data jsou prezentována pomocí krabicových grafů jako log2 exprese průměru TERM. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového dvouvýběrového Wilcoxonova testu (Mann-Whitney), (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 ve srovnání s TERM).*

## 7.3. Porovnání exprese zkoumaných genů v lidském primárním trofoblastu (CTB) a syncytiotrofoblastu (STB)

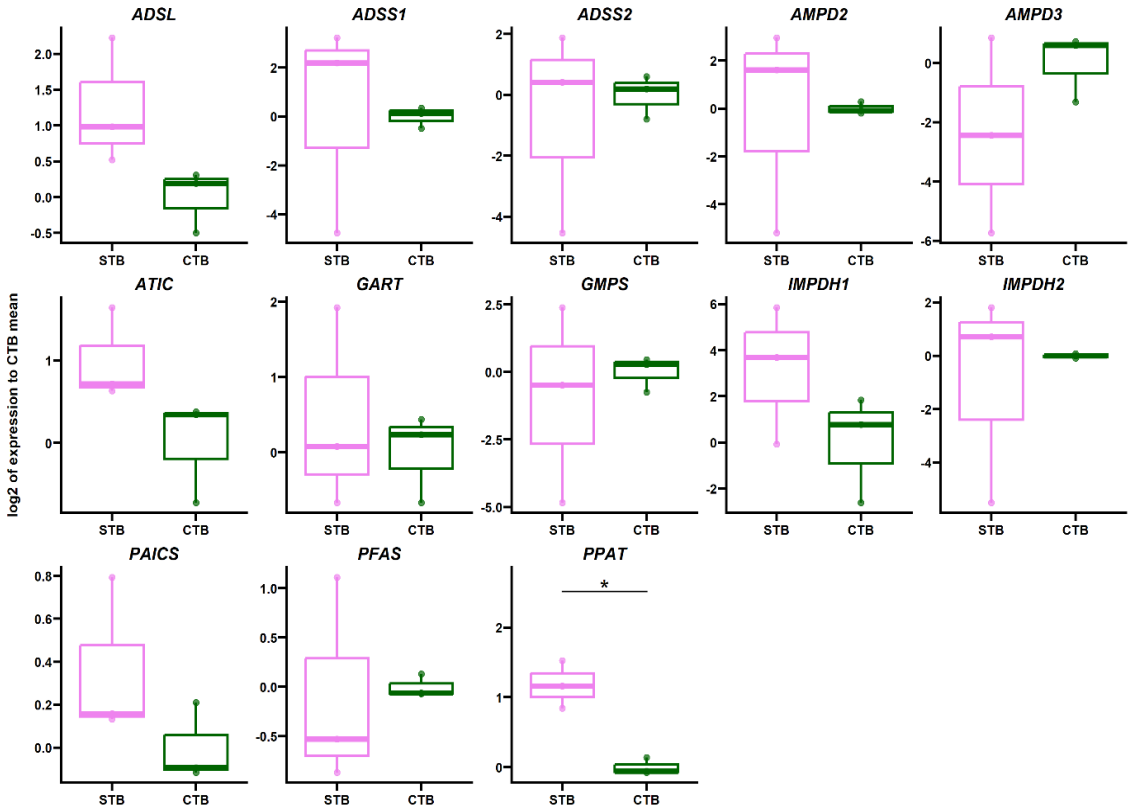
Jelikož jsme předpokládali posun v expresním profilu během přechodu kmenových buněk podobných CTB na fúzovaný, diferenciovaný stav STB, provedli jsme analýzu genové exprese u čerstvě izolovaných buněk trofoblastu (CTB) a u buněk po čtyřech dnech spontánní diferenciace (STB). Naše analýza neprokázala žádné změny v expresi daných skupin genů (*Obrázek 8B*) až na sníženou expresi (*ADA*, *ADK* a *AK2*) a zvýšenou expresi (*AK1*) genů adenosinového metabolismu (*Obrázek 9B*). To poukazuje na dynamické změny v průběhu procesu diferenciace. Dále byly v STB zvýšeny geny *de novo* syntézy purinů (*PPAT*) (*Obrázek 9D*) a pyrimidinů (*CTPS1* a *CTPS2*) (*Obrázek 9F*). Exprese jednotlivých genů souhrnně znázorněny na *Obrázku 8A*.



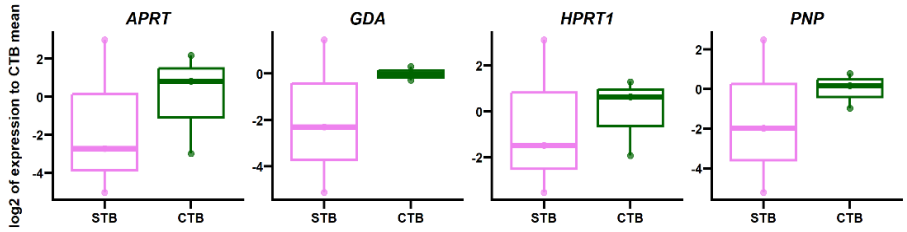

**Obr. 8 Porovnání genové exprese mezi STB a CTB stádiem lidského primárního trofoblastu.** *Volcano graf (A) znázorňuje geny vykazující výrazné změny v genové expresi při porovnání primárních buněk CTB a STB. Krabicové grafy (B) zobrazují porovnání genové exprese definovaných skupin mezi primárními buňkami CTB a STB. Data genové exprese jsou centralizována na průměr genové exprese CTB a jsou prezentována jako průměr log2 exprese. Statistická analýza byla provedena pomocí nepárového t-testu. Nebyla zjištěna žádná statistická významnost.*


A ADENOSINE RECEPTORS
ADORA1
ADORA2A
ADORA2B
ADORA3
log2 of expression to CTB mean
STB
CTB
B ADENOSINE METABOLISM
ADA
ADK
AHCY
AK1
AK2
ENTPD1
NT5C
NT5C2
NT5C3B
NT5E
C UNCATEGORIZED
DCK
PRPSAP1
PRPSAP2
RRM1
RRM2

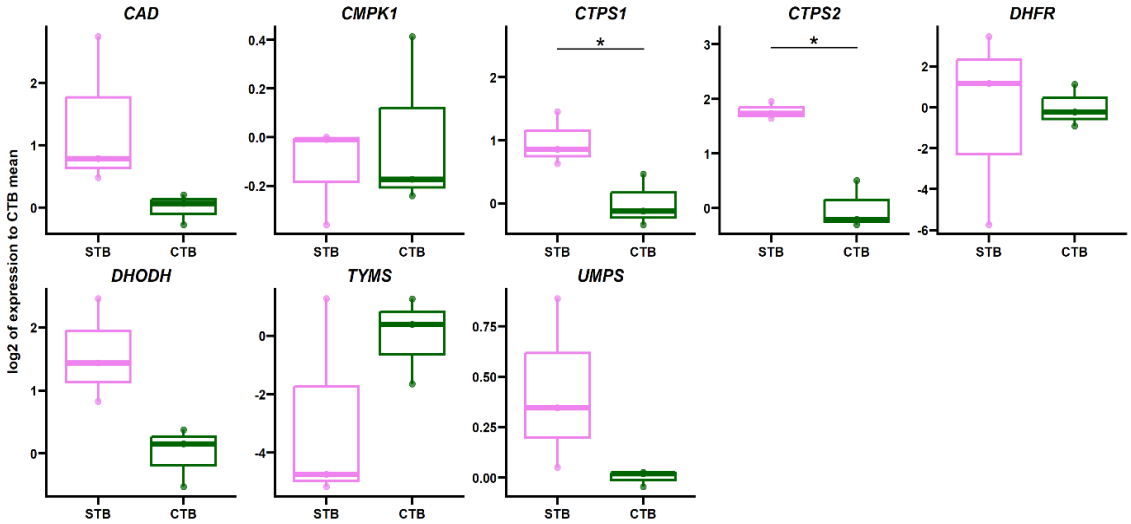
**D PURINE *DE NOVO***

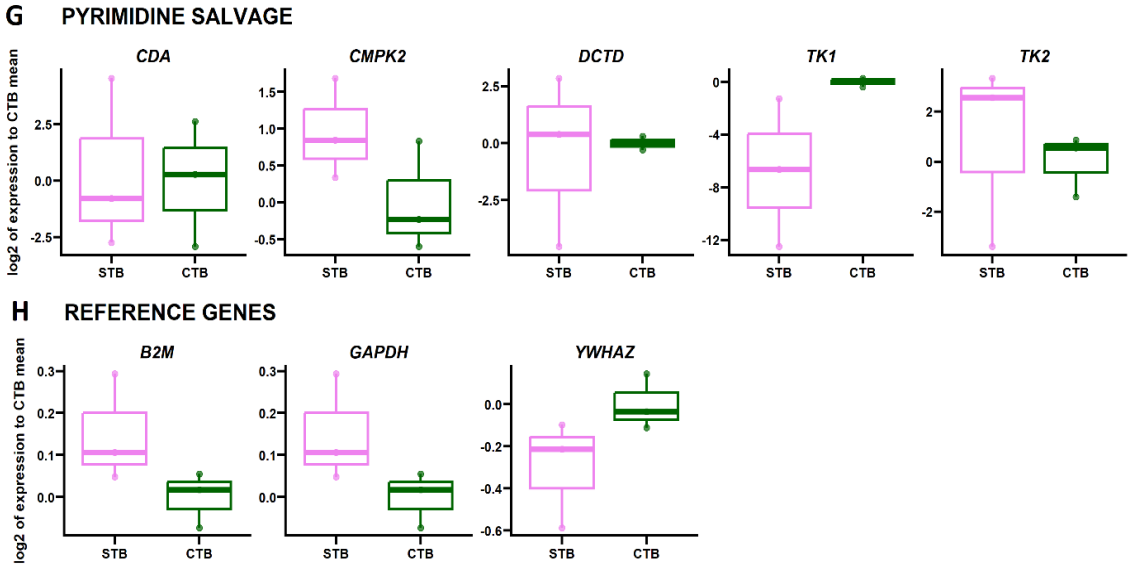



**E PURINE SALVAGE**




**F PYRIMIDINE *DE NOVO***

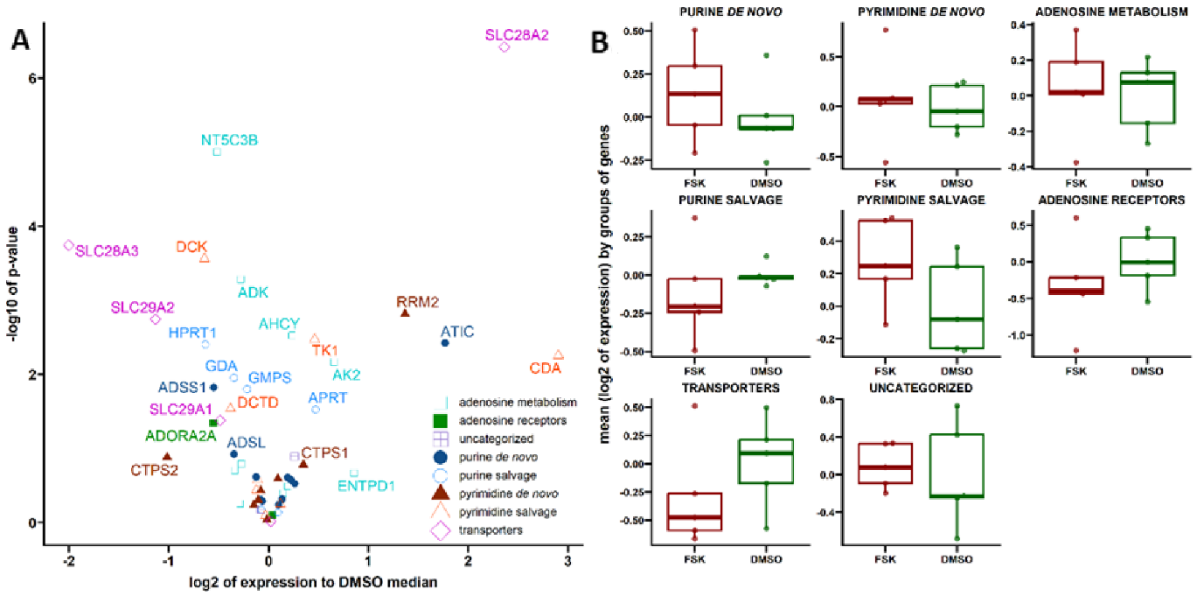




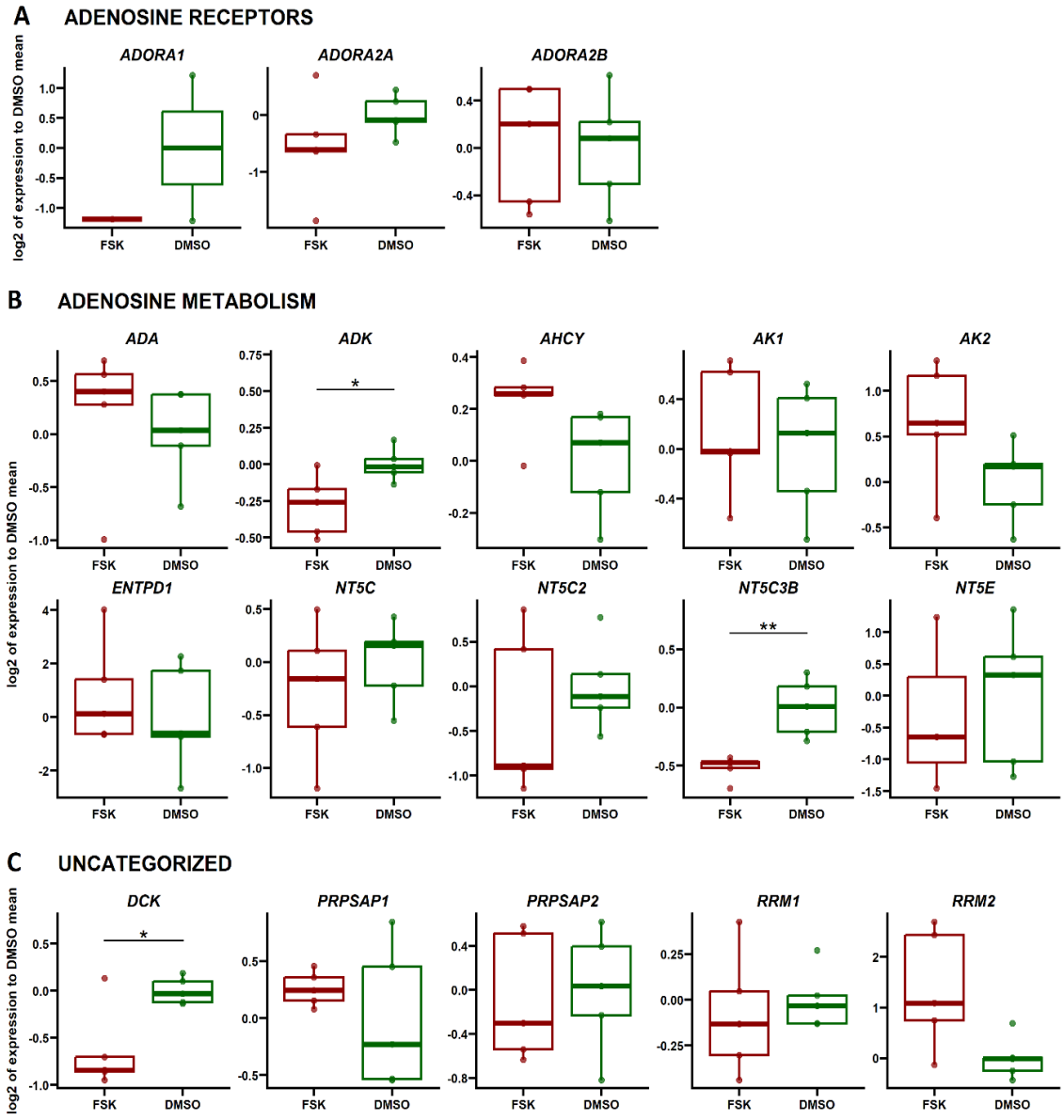

**Obr. 9 Porovnání genové exprese u CTB a STB primárních buněk trofoblastu centralizované na průměr CTB.** *Jednotlivé geny byly zařazeny do skupin – adenosinové receptory (A), adenosinový metabolismus (B), nezařazené geny (C), de novo syntéza purinů (D), záchranné dráhy purinů (E), de novo syntéza pyrimidinů (F), záchranné dráhy pyrimidinů (G), referenční geny (H). Data jsou prezentována pomocí krabicových grafů jako log2 exprese průměru CTB. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu, (*p < 0.05; **p < 0.01, ve srovnání s CTB).*

## 7.4. Porovnání exprese zkoumaných genů v BeWo buňkách kultivovaných v přítomnosti forskolinu (FSK) a dimethylsulfoxidu (DMSO)

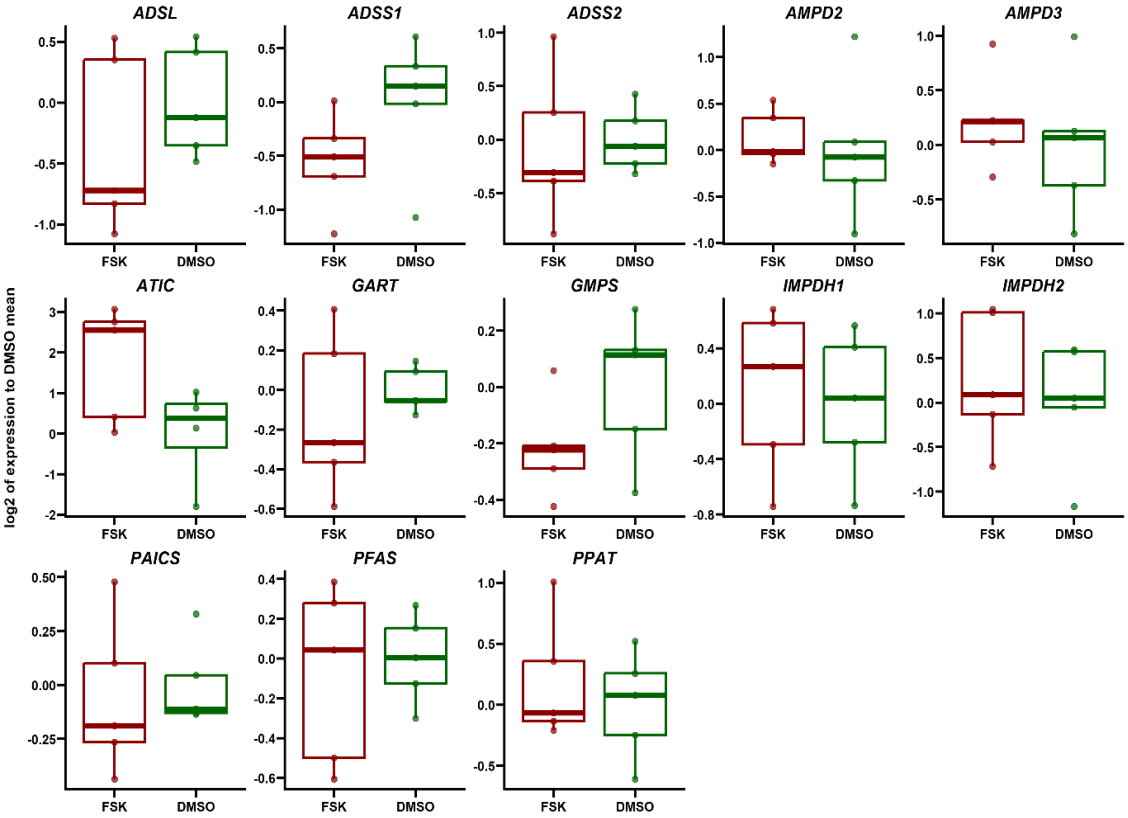
Kultivace BeWo buněk v DMSO (nediferenciovaný stav) a FSK (diferenciovaný stav) stejně jako u primárních buněk trofoblastu nepřináší změny v genové expresi všech skupin genů (*Obrázek 10B*). Jednotlivě sníženou expresi jsme pozorovali v diferenciovaných BeWo buňkách u genů adenosinového metabolismu (*ADK* a *NT5C3B*) (*Obrázek 11B*) a nezařazených genů (*DCK*) (*Obrázek 11C*). U transportérů byly v diferenciovaných BeWo buňkách snížené hladiny *SLC28A3*, a naopak zvýšené hladiny *SLC28A2* (*Obrázek 11H*). Exprese jednotlivých genů znázorněny na *Obrázku 10A*.



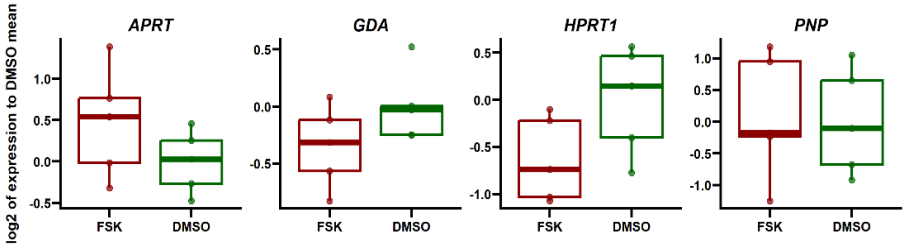

**Obr. 10 Porovnání genové exprese mezi BeWo buňkami v přítomnosti FSK (µM) a DMSO (0,05 %).** *Volcano graf (A.) znázorňuje geny vykazující výrazné změny v genové expresi při porovnání BeWo buněk ve FSK a DMSO. Krabicové grafy (B.) zobrazují porovnání genové exprese definovaných skupin mezi BeWo buňkami v přítomnosti FSK a DMSO. Data genové exprese jsou centralizována na průměr genové exprese DMSO a jsou prezentována jako průměr log2 exprese. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu. Nebyla zjištěna žádná statistická významnost.*


A
ADENOSINE RECEPTORS
ADORA1
ADORA2A
ADORA2B
log2 of expression to DMSO mean
FSK
DMSO
B
ADENOSINE METABOLISM
ADA
ADK
AHCY
AK1
AK2
ENTPD1
NT5C
NT5C2
NT5C3B
NT5E
C
UNCATEGORIZED
DCK
PRPSAP1
PRPSAP2
RRM1
RRM2

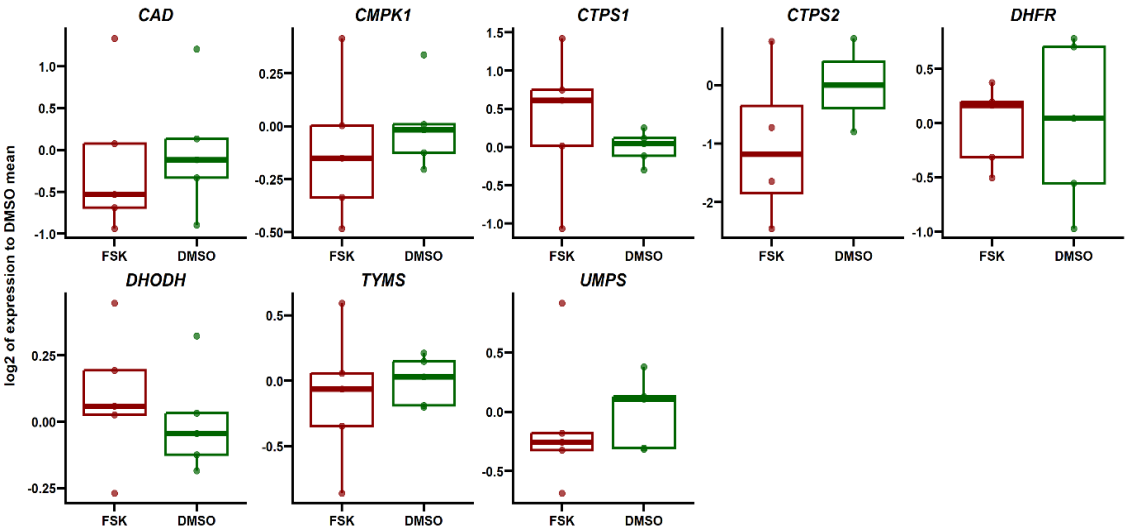
**D** PURINE *DE NOVO*

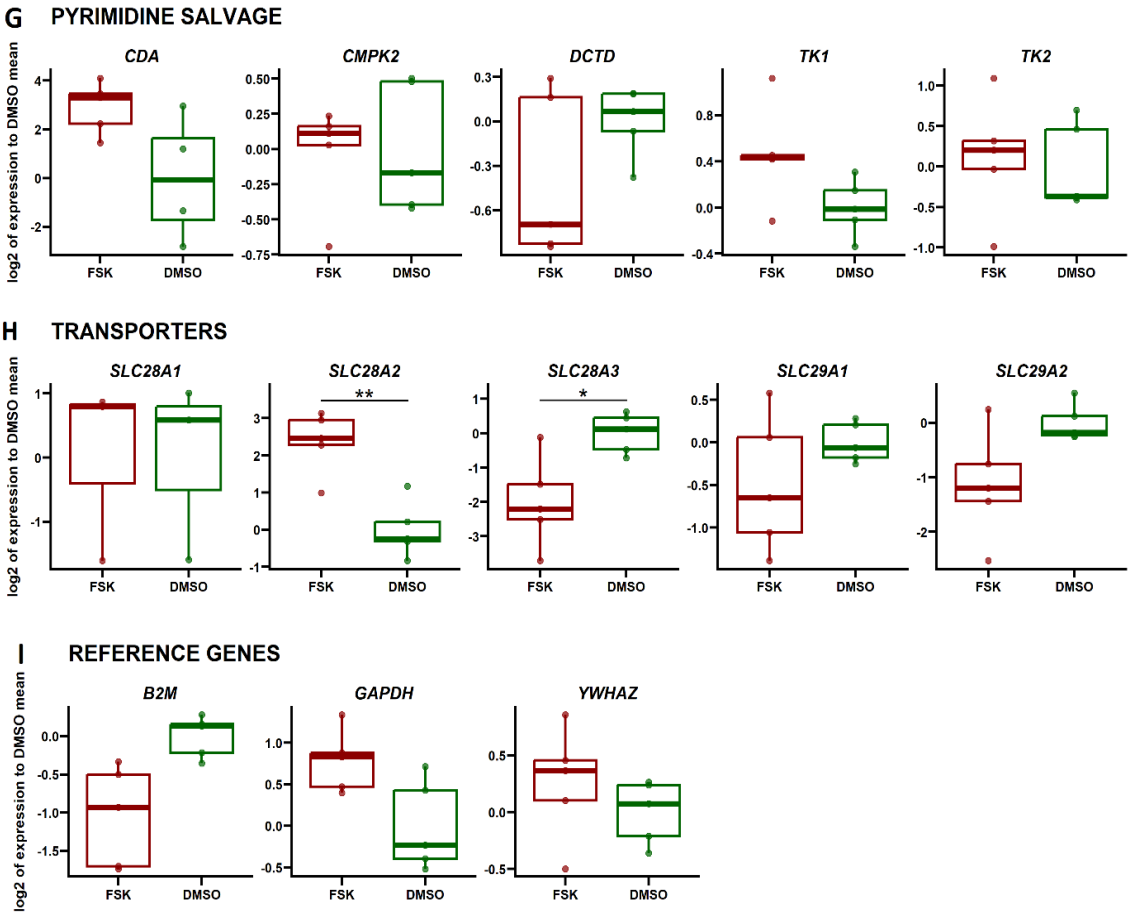



**E** PURINE SALVAGE




**F** PYRIMIDINE *DE NOVO*



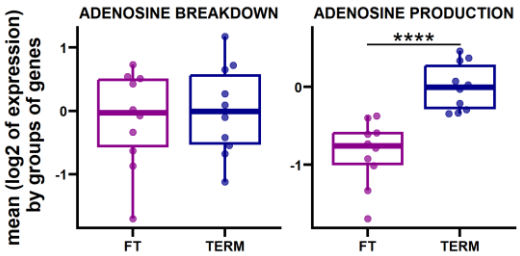



**Obr. 11 Porovnání genové exprese u BeWo buněk kultivovaných v přítomnosti FSK (50 µM) a DMSO (0,05 %) centralizované na průměr DMSO.** *Jednotlivé geny byly zařazeny do skupin – adenosinové receptory (A), adenosinový metabolismus (B), nezařazené geny (C), de novo syntéza purinů (D), záchranné dráhy purinů (E), de novo syntéza pyrimidinů (F), záchranné dráhy pyrimidinů (G), transportéry (H), referenční geny (I). Data jsou prezentována pomocí krabicových grafů jako log2 exprese průměru DMSO. Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu, (*p < 0.05; **p < 0.01, ve srovnání s DMSO).*

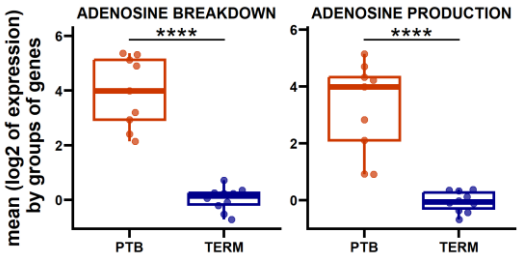
# 8. Diskuse

Nukleos(t)idy jsou základní biomolekuly, které hrají zásadní roli v buněčných procesech, jako je syntéza nukleových kyselin, funkce koenzymů, prevence senescence a signální dráhy. Enzymy zapojené do regulace těchto molekul, například ty v *de novo* a záchranných drahách, jsou nezbytné pro růst buněk (54, 61, 62). Vysoká potřeba těchto metabolických cest v rychle se dělících buňkách, jako jsou rakovinné buňky, zdůrazňuje jejich význam pro růst a vývoj. Podobnost placenty s nádorovými buňkami a její rychlý růst naznačují, že nároky na nukleos(t)idy budou zvýšené i v této tkáni (63-65). Nedávno jsme demonstrovali, že hladiny nukleos(t)idů v placentách předčasně narozených dětí jsou odlišné od placent z porodů donošených těhotenství (66). Cílem této studie bylo studium ontogeneze biochemických cest zapojených v homeostáze nukleos(t)idů během gestace a diferenciace trofoblastů. Zkoumáním tohoto procesu můžeme lépe pochopit jedinečné metabolické požadavky a mechanismy adaptace placenty během těhotenství.

Placenta kontinuálně roste až do konce těhotenství (67). Lze tedy předpokládat zvýšenou aktivitu metabolických procesů směrem ke konci gestace (13, 68). Zralá placenta na konci gestace vykazuje zvýšenou genovou expresi ve všech metabolických drahách nukleos(t)idů a signálních drahách adenosinu, jak ukazuje *Obrázek 4 A-B*. Zvláště výrazné je zvýšení placentárních enzymů, které produkují adenosin ve zralé placentě na konci gestace, zatímco degradace adenosinu zůstává konzistentní, což může přispívat ke zvýšeným hladinám adenosinu pozorovaným v plazmě těhotných žen po porodu (69).



I když placenta obvykle roste konzistentním tempem (67), naše zjištění překvapivě odhalují, že placenty ze spontánních předčasných porodů vykazují zvýšené hladiny genů pro klíčové složky homeostázy nukleos(t)idů, adenosinového metabolismu a adenosinových receptorů (podrobnosti na *Obrázku 6 A-B*). Jak syntetické, tak i rozkladné dráhy adenosinu byly up-regulovány ve srovnání s placentou z donošeného těhotenství, což naznačuje na intenzivně probíhající adenosinový metabolismus v placentě spontánního předčasného porodu (23).




Absence kontrolní skupiny se stejným gestačním věkem nám brání v přímém propojení pozorovaných změn v genové expresi s přirozeným průběhem patologie předčasného porodu (70, 71). Nicméně, zvýšené hladiny genů zapojených do homeostázy nukleos(t)idů byly dříve spojeny s patologickými procesy v různých orgánech, včetně placenty. Zvýšené ADORA2B, ADORA3 a NT5E v placentách s preeklampsií (72-74) a zvýšené hladiny ADA a AHCY byly pozorovány v séru při výskytu preeklampsie (75, 76). Enzym ADA metabolizuje adenosin na inosin, na rozdíl od NT5E a AHCY, které jsou zapojeny do produkce adenosinu (78, 72). Epigenetické modifikace placenty, jako je metylace DNA a modifikace histonů, ovlivňují fetální programování, které může vyústit v onemocněním objevující se později během života (79, 80). Enzym AHCY hraje klíčovou roli v produkci S-adenosylmethioninu (SAM), donoru methylové skupiny, která ovlivňuje methylaci v placentě. V naší studii jsme pozorovali vyšší hladiny mRNA *AHCY* v placentách z předčasných porodů, což je v souladu s předchozím výzkumem. To naznačuje možnou změněnou methylační kapacitu, která může ovlivnit zásadní placentární procesy (81). Dále byly hladiny SAM spojeny s velikostí novorozence, což dále podtrhuje důležitost tohoto enzymu pro fetální vývoj (81). Enzym AMPD2, jehož exprese byla také zvýšena, deaminuje AMP a tím může bránit tvorbě protizánětlivého adenosinu, ale zvyšuje protizánětlivý IMP (82).

Většina změn expresí enzymů kódovaných analyzovanými geny byla objevena v kontextu nádorů. Například ADSL a PPAT byly nadměrně exprimované u kolorektálního karcinomu a karcinomu štítné žlázy. ADSL je zapojen do syntézy a reparace DNA, zatímco oba enzymy ADSL i PPAT modulují buněčnou proliferaci, migraci a invazi (83, 84). To naznačuje, že jejich zvýšené hladiny v placentě mohou být součástí širší buněčné odpovědi k udržení buněčných funkcí za nepříznivých podmínek. Dále je nadprodukce CAD nezbytná pro karcinogenezi a tvorbu metastáz (85). Inhibice *CTPS1* v buněčných liniích mnohočetného myelomu (MM) zastavuje proliferaci, což zdůrazňuje její klíčovou roli v růstu buněk (86). CTPS2 se podílí na odpovědi na poškození DNA interakcí s proteinem *Breast Cancer 1* při

chronické lymfocytární leukémii, což naznačuje jeho zapojení do stabilizace a reparace genomu (87). Nadměrná exprese RRM2 byla nalezena jako příčina špatných výsledků pacientů s rakovinou prostaty, jelikož je to limitující enzym účastnící se reparace a syntézy DNA (88). Dále, inhibice *DHODH* narušuje proliferaci nádoru *in vitro* (89). Vysoká exprese UMPS v tkáni maligního pleurálního mezoteliomu zdůrazňuje významnou roli při podpoře rychlého růstu buněk prostřednictvím zvýšené biosyntézy pyrimidinů (90). V dřívějších studiích bylo zjištěno, že exprese *APRT* koreluje s citlivostí rakovinných buněk na 5-fluorouracil (5-FU) a zvýšené hladiny aktivity *APRT*, který katalyzuje záchranné reakce, čímž je omezena potřeba *de novo* syntézy purinů v rakovinných buňkách (91). Dále je HPRT nadměrně exprimován na povrchu nádorových buněk prostaty a hraje klíčovou roli v regulaci imunitního systému a produkci adenosinu a guanosinu (92, 93). Nedávné *in silico* analýzy ukázaly, že exprese *PNP* je významně vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem a rakovinou prsu ve srovnání se zdravými jedinci. Tato nadměrná exprese není jen charakteristickým znakem těchto karcinomů, ale je také spojena s úrovněmi agresivity a špatné prognózy u pacientů s těmito onemocněními. Pyrimidinové nukleosidy mohou sloužit jako alternativní zdroj energie v případě nedostatečného přísunu živin (45, 94). Navíc inhibice CMPK1 snižuje proliferaci a migraci buněk (95) a genové exprese *CMPK1* a *CMPK2* byly spojeny se špatnou prognózou u triple negativního karcinomu prsu a karcinomu děložního čípku (96, 97). Posun směrem k záchranným purinovým drahám je také pozorován v placentách při předčasném porodu (*Obrázky 6 A-B*), což naznačuje možnou mitochondriální dysfunkci (98).

V posledním kroku naší studie jsme se zaměřili na otázku, zda existuje posun v expresním profilu zkoumaných genů mezi izolovanými buňkami trofoblastu CTB a fúzovanými diferencovanými buňkami STB v primárních buňkách trofoblastu (*Obrázek 8 A-B*). Kvůli tomu, že primární buňky CTB neproliferují, využili jsme posléze ještě další *in vitro* model placenty, a to BeWo buňky ošetřené forskolinem, který indukuje fúzi a diferenciaci BeWo buněk za vzniku vrstvy podobné STB (*Obrázek 10 A-B)* (99). Navzdory obecnému přesvědčení, že proliferující buňky spoléhají na *de novo* syntézu a diferencované tkáně spoléhají na záchranné dráhy (61, 100), jsme pozorovali jen malé změny během přechodu CTB/STB v primárních a BeWo buňkách. To naznačuje, že nukleos(t)idy jsou důležité pro jak proliferující, tak diferencované buňky. V obou modelech jsme pozorovali snížení hladin *ADK*, která je nezbytná pro regulaci koncentrace extracelulárního adenosinu a intracelulárních adeninových nukleotidů, a tím hraje důležitou roli v homeostáze buněčné energetické a různých fyziologických procesech. Snížené hladiny *ADA* v primárních STB také signalizují nižší schopnost přeměny adenosinu na inosin, což může nakonec vést ke zvýšení buněčných/extracelulárních hladin adenosinu. Údaje také naznačují možné zvýšení produkce purinů a pyrimidinů, o nichž se uvádí, že mají ochranné funkce, nebo mohou sloužit jako zdroj energie (70, 102, 103).

# 9. Závěr

Exprese genů kódujících enzymy klíčové pro adenosinový metabolismus, purinové a pyrimidinové dráhy se zvyšují směrem ke konci těhotenství. Důležité je, že placenty ze spontánních předčasných porodů vykazují zvýšenou expresi některých genů ve srovnání s placentami z donošeného těhotenství a mnoho z těchto genů je spojeno s patologickými a/nebo reparačními procesy, což naznačuje, že placenta aktivuje nukleos(t)idové metabolické dráhy pro růst, opravu nukleových kyselin, imunitní mechanismy a případně zpomalení senescence buněk. Síť drah pro syntézu *de novo* a záchranu nukleotidů je úzce propojena a expresní hladiny genů mezi sebou pozitivně korelují, pravděpodobně s cílem udržení nukleos(t)idové rovnováhy a pokrytí potřeb placentární tkáně. Adenosin je všestranný a fyziologicky důležitý nukleosid ovlivňující funkce některých orgánů a tkání včetně placenty. V placentě ze spontánního předčasného porodu dochází k významnější degradaci adenosinu oproti placentě z donošeného těhotenství, z čehož můžeme usuzovat, že ho jeho hladiny budou překvapivě v placentě předčasného porodu nižší. Deplece placentárního adenosinu může přispívat k rozvoji předčasného porodu, zatímco zvýšená exprese genů purinových záchranných drah (*IMPDH*, *PNP*, *APRT*, *HPRT1*) může sloužit jako ochranný mechanismus placenty. Genová exprese sledovaných genů se zásadně nemění v průběhu přeměny izolovaných lidských primárních buněk trofoblastu CTB na STB, nicméně exprese genů podílejících se na metabolismu adenosinu jsou snížené a dráha pro syntézu purinů je posílená, což naznačuje potenciálně zvýšenou potřebu adenosinu. Závěrem lze říci, že tato studie poukazuje na význam nukleos(t)idů pro správný vývoj placenty, ale na druhé straně také na potřebu dalšího výzkumu, který by přinesl podrobné poznatky o nukleos(t)idech a jejich plném významu pro dobro placenty. To se týká i dalšího výzkumu vlivu antiretrovirálních látek odvozených od nukleos(t)idů (např. abakavir či tenofovir), které jsou během těhotenství chronicky využívané ve farmakoterapii HIV, či kofeinu jako antagonisty adenosinových receptorů a obsahové látky běžně užívaných potravin. Vzhledem k důkazům popisujícím negativní vliv těchto látek na placentu, vyvíjející se plod a porod, lze dosud jen spekulovat, že tyto láky negativně interferují s homeostázou nukleos(t)idů v placentě.

# 10. Reference


1. **GUDE, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONIS, B. a KING, R. G.** Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*. 2004, č. 114(5-6), s. 397-407.

2. **KNÖFLER, M.; HAIDER, S.; SALEH, L.; POLLHEIMER, J.; GAMAGE, T. K. J. B. et al.** Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell and Molecular Life Sciences*. 2019, č. 76(18), s. 3479–3496.

3. **NICHOLSON, R.** *Placenta Development Functionand Diseases*. Nova Science Publishers, 2013. ISBN 9781626182479.

4. **KOJIMA, J.; ONO, M.; KUJI, N. a NISHI, H.** Human Chorionic Villous Differentiation and Placental Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 8003, č. 23(14).

5. **SPELLER, J.** Placental development. Online. *UpToDate*. 2024. Dostupné z: https://teachmephysiology.com/reproductive-system/fetal-physiology/placental-development/. [cit. 2024-06-17].

6. **ROBERTS, V. a MYATT, L.** Placental development and physiology. Online. *UpToDate*. 2023. Dostupné z: https://www.uptodate.com/contents/placental-development-and-physiology. [cit. 2024-06-17].

7. **TURCO, M. Y. a MOFFETT, A.** Development of the human placenta. *Development*. 2019, č. 146(22).

8. **ŠTAUD, F.; KARAHODA, R. a SEGURA-EGEA, J. J.** Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2018, č. 105, s. 35-40.

9. **DIETRICH, B.; MEINHARDT, G.; POLLHEIMER, J. a KNÖFLER, M.** WNT and NOTCH signaling in human trophoblast development and differentiation. *Cell and Molecular Life Sciences*. 2022, roč. 292, č. 79(6).

10. **MALTEPE, E. a FISHER, S. J.** Placenta: the forgotten organ. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2015, č. 31, s. 523-552.

11. **JAMES, J. L.; LISSAMAN, A.; NURSALIM, Y. N. S. a CHAMLEY, L. W.** Modelling human placental villous development: designing cultures that reflect anatomy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022, č. 79 (384).

12. **COCUCCI, E.; KIM, J. Y. a PABLA, N.** Role of Passive Diffusion, Transporters, and Membrane Trafficking-Mediated Processes in Cellular Drug Transport. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2017, č. 101(1), s. 121-129.

13. **O'BRIEN, K. a WANG, Y.** The Placenta: A Maternofetal Interface. *Annual Review of Nutrition*. 2021, č. 43, s. 301-325.

14. **BURTON, G. J.; CINDROVA-DAVIES, T, a TURCO, M. Y**. Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy. *Placenta*. 2020, č. 102, s. 21-26.

15. **COSTA, M. A.** The endocrine function of human placenta: an overview. *Reproductive BioMedicine*. Online. 2016, č. 32(1), s. 14-43.

16. **ČERVENÝ, L.; KARBANOVA, S.; KARAHODA, R.; HORÁČKOVÁ, H.; JIRÁSKOVÁ, L. et al**. Assessment of the role of nucleoside transporters, P-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in the placental transport of entecavir using in vitro, ex vivo, and in situ methods. *Journal of Applied Toxicology*. 2023, roč. 116427, č. 463…..

17. **L. M. H. AYE PHD, Irving; E. AIKEN MD, PHD, C.; STEPHEN CHARNOCK-JONES PHD, a D.; C.S. SMITH MD, PHD, G**. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022, č. 226 (2), s. S928-S944.

18. **VAUGHAN, O. R. a FOWDEN, A. L**. Placental metabolism: substrate requirements and the response to stress. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016, č. 51 (52), s. 25-35.

19. **BURTON, G. J. a FOWDEN, A. L**. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2015, roč. 20140066, č. 370(1663).

20. **KARAHODA, R.; KALLOL, S.; GROESSL, M.; ONTSOUKA, E.; ANDERLE, P. et al.** Revisiting Steroidogenic Pathways in the Human Placenta and Primary Human Trophoblast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 1704, č. 22 (4).

21. **KARAHODA, R.; ABAD, C.; HORÁČKOVÁ, H.; KASTNER, P.; ZAUGG, J. et al.** Dynamics of Tryptophan Metabolic Pathways in Human Placenta and Placental-Derived Cells: Effect of Gestation Age and Trophoblast Differentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, roč. 574034, č. 8.

22. **FOURNIER, T.** Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Annales d'Endocrinologie*. 2016, č. 77(2), s. 75-81.

23. **PÉREZ-PÉREZ, A.; VILARIÑO-GARCÍA, T.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J. a SEGURA-EGEA, J. J.** Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2017, č. 35, s. 71-84.

24. **MADANI, J.; AGHEBATI-MALEKI, L.; GHARIBEH, N.; POURAKBARI, R. a YOUSEFI, M. Fetus**, as an allograft, evades the maternal immunity. *Transplant Immunology*. 2022, roč. 101728, č. 75.

25. **WANG, Xiao-Qiu a LI, Da-Jin.** The mechanisms by which trophoblast-derived molecules induce maternal–fetal immune tolerance. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020, č. 17 (11), s. 1204–1207.

26. **TANTENGCO, O. A. G.; RICHARDSON, L.; LEE, A.; KAMMALA, A.; SILVA, M. C. et al.** Histocompatibility Antigen, Class I, G (HLA-G)'s Role during Pregnancy and Parturition: A Systematic Review of the Literature. *Life (Basel)*. 2021, č. 11(10), s. 1061.

27. **REEVES, E.; JAMES, E.** Tumour and placenta establishment: The importance of antigen processing and presentation. *Placenta*. 2017, č. 56, s. 34-39.

28. **MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; FAVIER, B.; LEMAOULT, J.; MOREAU, P. et al.** Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. *Tissue Antigens*. 2010, č. 75(3), s. 201-206.

29. **MYLLYNEN, P.; PASANEN, M. a VÄHÄKANGAS, K.** The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2007, č. 3(3), s. 331-346.

30. **HAN, L. W.; GAO, C. a MAO, Q.** An update on expression and function of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 in the placenta and fetus. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2018, č. 14(8), s. 817-829.

31. **PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; ZAGO, C. A. a CARNEIRO-SAMPAIO, M.** IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012, roč. 2012, č. 1.

32. **MELCHIORRE, K.; GIORGIONE, V. a THILAGANATHAN, B.** The placenta and preeclampsia: villain or victim? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2022, č. 226(2S), s. 2954-S962.

33. **BURTON, G. J. a JAUNIAUX, E.** Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2018, č. 218 (2), s. S745-S761.

34. **TOSSETTA, G.** Special Issue “Physiology and Pathophysiology of the Placenta.” *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, roč. 3594, č. 25 (7).

35. **JENA, M. K.; SHARMA, N. R.; PETITT, M.; MAULIK, D. a NAYAK, N. R.** Pathogenesis of Preeclampsia and Therapeutic Approaches Targeting the Placenta. *Biomolecules*. 2020, roč. 953, č. 10(6).

36. **LIU, H. a XIA, Y.** Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *Journal of Applied Physiology*. 2015, č. 119(10), s. 1173–1182.

37. **NARDOZZA, N. M.; CAETANO, A. C.; ZAMARIAN, A. C.; MAZZOLA, J. B.; SILVA, C. P et al**. Fetal growth restriction: current knowledge. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 2017, č. 295(5), s. 1061-1077.

38. **SUN, Ch.; GROOM, K. M.; OYSTON, Ch.; CHAMLEY, L. W.; CLARK, A. R. et al**. The placenta in fetal growth restriction: What is going wrong? *Placenta*. 2020, č. 96, s. 10-18.

39. **ALBU, A. R.; ANCA, A. F.; HORHOIANU, V. V.; COOMARASAMY, A. a HORHOIANU, I. A.** Predictive factors for intrauterine growth restriction. *Journal of Medicine and Life*. 2014, č. 7(2), s. 165-171.

40. **GREEN, E. S. a ARCK, P. C.** Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. *Seminars in Immunopathology*. 2020, č. 42, s. 413–429.

41. **GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F.; IAMS, J. D. a ROMERO, R.** Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*. 2008, č. 371(9606), s. 75–84.

42. **SCHOENMAKERS, S.; AAGAARD, K.; BORENSTEIN-LEVIN, L.; KAWAZA, K.; VAN DER MEEREN, L. E. et al.** Editorial: Preterm birth and placental pathology. *Frontiers in Endocrinology*. 2023, roč. 1168185, č. 14.

43. **WILSON, A.; HODGETTS-MORTON, V. A.; MARSON, E. J.; MARKLAND, A. D.; LARKAI, E. et al.** Tocolytics for delaying preterm birth: a network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2022, roč. CD014978, č. 8(8).

44. **LEDVINA, M.; STOKLASOVÁ, A. a CERMAN, J.** *Biochemie pro studující medicíny*. 3. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2020. ISBN 978-802-4647-470.

45. **STREFELER, A.; BLANCO-FERNANDEZ, J. a JOURDAIN, A. A.** Nucleosides are overlooked fuels in central carbon metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2024, č. 35 (4), s. 290-299.

46. **CHANDEL, N. S.** Nucleotide Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2021, roč. a040592, č. 13(7).

47. **OKESLI, A.; KHOSLA, C. a BASSIK, M.** Human pyrimidine nucleotide biosynthesis as a target for antiviral chemotherapy. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, č. 48, s. 127-134.

48. **HUANG, Z.; XIE, N.; ILLES, P.; DI VIRGILIO, F.; ULRICH, H. et al.** From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021, roč. 162, č. 6(1).

49. **LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; VERKHRATSKY, A. a DAHL, G.** Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. *Annual Review of Immunology*. 2019, č. 37, s. 325-347.

50. **YEGUTKIN, G. G. a DAHL, G.** Nucleotide and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 2008, č. 1783(5), s. 673-694.

51. **BOREA, P. A.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; VINCENZI, F. a VARANI, K.** Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*. 2018, č. 98(3), s. 1591-1625.

52. **FREDHOLM, B. B.** Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death & Differentiation*. 2007, č. 14(7), s. 1315-1323.

53. **MULLEN, N. J. a SINGH, P. K.** Nucleotide metabolism: a pan-cancer metabolic dependency. *Nature Reviews Cancer*. 2023, č. 23(5), s. 275-294.

54. **LANE, A. N. a FAN, T. W.** Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research.* 2015, č. 43(4), s. 2466-2485.

55. **GUO, H. a RUBINSTEIN, J. L.** Structure of ATP synthase under strain during catalysis. *Nature Communications.* 2022, roč. 2232, č. 13(1).

56. **PASTUSCHEK, J.; NONN, O.; GUTIÉRREZ-SAMUDIO, R. N.; MURRIETA-COXCA, J. M. a MÜLLER, J.** Molecular characteristics of established trophoblast-derived cell lines. *Placenta.* 2021, č. 108, s. 122-133.

57. **GONÇALVES, B. M.; GRACELI, J. B.; DA ROCHA, P. B.; TILLI, H. P.; VIEIRA, E. M. et al.** Placental model as an important tool to study maternal-fetal interface. *Reproductive Toxicology.* 2022, č. 112, s. 7-13.

58. **BODE, C. J.; JIN, H.; RYTTING, E.; SILVERSTEIN, P. S.; YOUNG, A. M. et al.** In vitro models for studying trophoblast transcellular transport. *Methods in Molecular Medicine.* 2006, č. 122, s. 225-239.

59. **ŠTAUD, F. a ČEČKOVÁ, M.** Regulation of drug transporter expression and function in the placenta. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2015, č. 11(4), s. 533-555.

60. **WALTER M, HERR P.** Re-Discovery of Pyrimidine Salvage as Target in Cancer Therapy. Cells. 2022;11(4):739. PubMed PMID: doi:10.3390/cells11040739.

61. **MIZUKOSHI, T.; YAMADA, S. a SAKAKIBARA, S. I.** Spatiotemporal Regulation of De Novo and Salvage Purine Synthesis during Brain Development. *ENeuro*. 2023, č. 10 (10).
62. **DELFARAH, A.; PARRISH, S.; JUNGE, J. A.; YANG, J.; SEO, F. et al.** Inhibition of nucleotide synthesis promotes replicative senescence of human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2019, č. 294 (27), s. 10564-10578.
63. **OLIVEIRA, M. M. S.; SALGADO, C. M.; VIANA, L. R. a GOMES-MARCONDES, M. C. C.** Pregnancy and Cancer: Cellular Biology and Mechanisms Affecting the Placenta. *Cancers*. 2021, č. 13 (7), 1667.
64. **HOSSAIN, S. M.; LYNCH-SUTHERLAND, C. F.; CHATTERJEE, A.; MACAULAY, E. C. a ECCLES, M. R.** Can Immune Suppression and Epigenome Regulation in Placenta Offer Novel Insights into Cancer Immune Evasion and Immunotherapy Resistance? *Epigenomes*. 2021, roč. 16, č. 5 (3).
65. **LALA, P. K.; NANDI, P.; HADI, A. a HALARI, C. A** crossroad between placental and tumor biology: What have we learnt? *Placenta.* 2021, č. 116, s. 12-30.
66. **CIFKOVA, E.; KARAHODA, R.; STRANIK, J.; ABAD, C.; KACEROVSKY, M. et al.** Metabolomic analysis of the human placenta reveals perturbations in amino acids, purine metabolites, and small organic acids in spontaneous preterm birth. *EXCLI.* 2024, č. 23, s. 264–282.
67. **DE PAULA, C. F. S.; RUANO, R.; CAMPOS, J. A. a ZUGAIB, M.** Placental Volumes Measured by 3-Dimensional Ultrasonography in Normal Pregnancies From 12 to 40 Weeks' Gestation. *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2008, č. 27 (11), s. 1583-1590.
68. **SFERRUZZI-PERRI, A. N.; LOPEZ-TELLO, J. a SALAZAR-PETRES, E.** Placental adaptations supporting fetal growth during normal and adverse gestational environments. *Experimental Physiology.* 2022, č. 108 (3), s. 371-397.
69. **YONEYAMA, Y.; SUZUKI, S.; SAWA, R.; TAKEUCHI, T.; KOBAYASHI, H. et al.** Changes in plasma adenosine concentrations during normal pregnancy. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2000, č. 50 (3), s. 145-148.
70. **COUTURE, C.; BRIEN, M. E.; BOUFAIED, I.; DUVAL, C.; SOGLIO, D. D. et al.** Proinflammatory changes in the maternal circulation, maternal-fetal interface, and placental transcriptome in preterm birth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2023, č. 228 (3), s. e1-e17.
71. **BROCKWAY, H. M.; KALLAPUR, S. G.; BUHIMSCHI, I. A.; BUHIMSCHI, C. S.; ACKERMAN, W. E. et al.** Unique transcriptomic landscapes identified in idiopathic spontaneous and infection related preterm births compared to normal term births. *PLOS ONE*. 2019, č. 14 (11).
72. **IRIYAMA, T.; SUN, K.; PARCHIM, N. F.; LI, J.; ZHAO, C. et al.** Elevated placental adenosine signaling contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Circulation*. 2015, č. 132 (18), s. e222-e223.

73. **KIM, Y. H.; HWANG, H. S.; KIM, Y. T.; KIM, H. S. a PARK, Y. W.** Modulation of Matrix Metalloproteinase Secretion by Adenosine A3 Receptor in Preeclamptic Villous Explants. *Reproductive Sciences*. 2008, č. 15, s. 939-949.
74. **SONG, G.; ZHANG, D.; ZHU, J.; WANG, A.; ZHOUS, X. et al**. The metabolic role of the CD73/adenosine signaling pathway in HTR-8/SVneo cells: A Double-Edged Sword? *Heliyon*. 2024, č. 10 (3).
75. **GAIDAY, A.; TUSSUPKALIYEV, A.; BERMAGAMBETOVA, S.; SAKHANOVA, S. a DINETS, A**. Prognostic role of increased serum homocysteine concentration in preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*. 2021, č. 40 (2), s. 118-123.
76. **JADHAV, A. A. a JAIN, A.** Adenosine deaminase activity in normal pregnancy and pregnancy associated disorders. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2013, č. 119 (2), s. 88-91.
77. **BOISON, D. a YEGUTKIN, G. G.** Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 2019, č. 36 (6), s. 582-596.
78. **BELUŽIĆ, L.; GRBEŠA, I.; BELUŽIĆ, R.; PARK, J. H.; KONG, H. K. et al**. Knock-down of AHCY and depletion of adenosine induces DNA damage and cell cycle arrest. *Scientific Reports*. 2018, č. 8 (1), 14012.
79. **MACCANI, M. A. a CARMEN J MARSIT, C. J.** Epigenetics in the placenta. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009, č. 62 (2), s. 78-89.
80. **VO, T. a HARDY, D. B.** Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2012, č. 6 (3), s. 139–153.
81. **KHOT, V. V.; CHAVAN-GAUTAM, P.; MEHENDALE, S. a JOSHI, S. R**. Variable Methylation Potential in Preterm Placenta: Implication for Epigenetic Programming of the Offspring. 2017, č. 24 (6), s. 891-901.
82. **EHLERS, L.; KUPPE, A.; JOSHI, S. R.; WILANTRI, S.; KIRCHNER, M. et al. Surface** AMP deaminase 2 as a novel regulator modifying extracellular adenine nucleotide metabolism. *The Faseb Journal*. 2021, č. 35 (7).
83. **TAHA-MEHLITZ, S.; BIANCO, G.; COTO-LLERENA, M.; KANCHERLA, V.; BANTUG, G. R. et al.** Adenylosuccinate lyase is oncogenic in colorectal cancer by causing mitochondrial dysfunction and independent activation of NRF2 and mTOR-MYC-axis. *Theranostics*. 2021, č. 11 (9), s. 4011-4029.
84. **LIU, B.; SONG, M.; QIN, H.; ZHANG, B.; LIU, Y. et al.** Phosphoribosyl Pyrophosphate Amidotransferase Promotes the Progression of Thyroid Cancer via Regulating Pyruvate Kinase M2. *OncoTargets and Therapy*. 2020, č. 13, s. 7629–7639.
85. **LI, G.; LI, D.; WANG, T. a HE, S.** Pyrimidine Biosynthetic Enzyme CAD: Its Function, Regulation, and Diagnostic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, č. 22 (19), 10253.

86. **PFEIFFER, C.; GRANDITS, A. M.; ASNAGLI, H.; SCHNELLER, A.; HUBER, J. et al.** CTPS1 is a novel therapeutic target in multiple myeloma which synergizes with inhibition of CHEK1, ATR or WEE1. *Leukamia.* 2024, č. 38 (1), s. 181-192.
87. **HU, X.; HAN, Y.; LIU, J.; WANG, H.; TIAN, Z. et al.** CTP synthase 2 predicts inferior survival and mediates DNA damage response via interacting with BRCA1 in chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*. 2023, č. 12 (1).
88. **MAZZU, Y. Z.; ARMENIA, J.; CHAKRABORTY, G.; YOSHIKAWA, Y.; COGGINS, S. A. A. et al**. A Novel Mechanism Driving Poor-Prognosis Prostate Cancer: Overexpression of the DNA Repair Gene, Ribonucleotide Reductase Small Subunit M2 (RRM2). *Clinical Cancer Research*. 2019, č. 25 (14), s. 4480-4492.
89. **BOUKALOVA, S.; HUBACKOVA, S.; MILOSEVIC, M.; EZROVA, Z.; NEUZIL, J. et al.** Dihydroorotate dehydrogenase in oxidative phosphorylation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020, č. 1866 (6), 165759.
90. **HAMAMOTO, Y.; TAKEOKA, S.; MOURI, A.; FUKUSUMI, M; WAKUDA, K. et al.** Orotate phosphoribosyltransferase is overexpressed in malignant pleural mesothelioma: Dramatically responds one case in high OPRT expression. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2016, č. 4 (1).
91. **SAIDAK, Y.; LOUANDRE, C.; DAHMANI, S.; SAUZAY, C.; GUEDDA, S. et al.** A pan-cancer study of the transcriptional regulation of uricogenesis in human tumours: pathological and pharmacological correlates. *Bioscience Reports*. 2018, č. 38 (5).
92. **TOWNSEND, M. H.; BENNION, K. B.; BITTER, E. E.; FELSTED, A. M.; ROBISON, R. A. et al.** Overexpression and surface localization of HPRT in prostate cancer provides a potential target for cancer specific antibody mediated cellular cytotoxicity. *Experimental Cell Research*. 2021, č. 403 (1), 112567.
93. **TOWNSEND, M. H.; ENCE, Z. E.; COX, T. P.; LATTIN, J. E.; BURRUP, W. et al.** Evaluation of the upregulation and surface expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's B cell lymphoma. *Cancer Cell International*. 2020, č. 20 (1), 375.
94. **SHAKARTALLA, S. B.; ASHMAWY, N. S.; SEMREEN, M. H.; FAYED, B.; AL SHAREEF, Z. M. et al.** 1H-NMR metabolomics analysis identifies hypoxanthine as a novel metastasis-associated metabolite in breast cancer. *Scientific Reports*. 2024, č. 14 (1), 253.
95. **ZHOU, D.; ZHANG, L.; SUN, W.; GUAN, W.; LIN, Q. et al.** Cytidine monophosphate kinase is inhibited by the TGF-β signalling pathway through the upregulation of miR-130b-3p in human epithelial ovarian cancer. *Cellular Signalling*. 2017, č. 35, s. 197-207.
96. **LIU, N. Q.; DE MARCHI, T.; TIMMERMANS, A.; TRAPMAN-JANSEN, A. M.; FOEKENS, R. et al.** Prognostic significance of nuclear expression of UMP-CMP kinase in triple negative breast cancer patients. *Scientific Reports*. 2016, č. 6, 32027.

97. **LI, M.; TIAN, X.; GUO, H.; XU, X.; LIU, Y. et al.** A novel lncRNA-mRNA-miRNA signature predicts recurrence and disease-free survival in cervical cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2021, č. 54 (11).
98. **WU, Z.; BEZWADA, D.; CAI, F.; HARRIS, R. C.; KO, B. et al.** Electron transport chain inhibition increases cellular dependence on purine transport and salvage. *Cell Metabolism*. 2024, č. 36 (7), s. 1504-1520.
99. **JIRASKOVA, L.; CERVENY, L.; KARBANOVA, S.; PTACKOVA, Z. a STAUD, F.** Expression of Concentrative Nucleoside Transporters ( SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents. *Molecular Pharmaceutics Journal*. 2018, č. 15 (7), s. 2732-2741.
100. **VILLA, E.; ALI, E. S.; SAHU, U. a BEN-SAHRA, I.** Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides. *Cancers*. 2019, č. 11 (5), 688.
101. **HU, Y.; JIANG, Q.; ZHAI, X.; LIU, L. a HONG, Y**. Screening and validation of the optimal panel of reference genes in colonic epithelium and relative cancer cell lines. *Scientific Reports*. 2023, č. 13 (1), 17777.
102. **TRAN, D. H.; KIM, D.; KESAVAN, R.; BROWN, H.; DEY, T. et al.** De novo and salvage purine synthesis pathways across tissues and tumors. *Cell*. 2024, č. 187 (14), s. 3602-3618.
103. **HUANG, Z.; XIE, N.; ILLES, P.; VIRGILIO, F. D.; ULRICH, H. et al.** From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021, č. 6 (1), 162.
104. **KARAHODA, R.; ZAUGG, J.; FUENZALIDA, B.; KALLOL, S.; MOSER-HAESSIG, R. et al.** Trophoblast Differentiation Affects Crucial Nutritive Functions of Placental Membrane Transporters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022, č. 10.
105. **KARAHODA, R.; KALLOL, S.; GROESSL, M.; ONTSOUKA, E.; ANDERLE, P. et al.** Revisiting Steroidogenic Pathways in the Human Placenta and Primary Human Trophoblast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, č. 22 (4), 1704.