

SOUHRN

Dizertační práce

Mgr. Lenka Hahnová (roz. Cygalová)

Placenta představuje jedinečné spojení mezi matkou a plodem zajišťující řadu funkcí nezbytných pro správný průběh těhotenství a vývoj jedince. Jednou z hlavních funkcí placenty je výměna plynů, přívod živin do plodu a odvod jeho metabolických zplodin. Mimoto plní placenta také roli endokrinní, metabolickou a především ochrannou, jelikož matka je v průběhu těhotenství vystavována, ať už nevědomě či záměrně, celé škále pro plod toxických látek. Dříve se předpokládalo, že fyziologickou bariéru mezi cirkulacemi matky a plodu tvoří pouze buněčné vrstvy syncytiotrofoblast a endotel fetálních kapilár. Nedávno však bylo zjištěno, že kromě této mechanické složky disponuje placenta i ochrannou složkou aktivní, která je realizována působením efluxních transportérů a biotransformačních enzymů lokalizovaných v polarizované vrstvě syncytiotrofoblastu.

Efluxní transportéry jsou membránové proteiny, které jsou díky své afinitě k ATP schopny aktivně vypumpovávat velké množství různorodých molekul ven z buňky. Dosud nejlépe prostudovanými lékovými efluxními transportéry jsou P-glykoprotein (P-gp) a „breast cancer resistance protein“ (BCRP), které významným způsobem ovlivňují kinetiku transportu látek přes placentu. Hlavním cílem této dizertační práce bylo studium exprese placentárních transportérů Bcrp a P-gp a jejich vlivu na transport farmak přes placentu.

V první práci jsme s využitím metod RT-PCR, Western blottingu a imunohistochemie prokázali přítomnost Bcrp v terminální potkaní placentě i buněčné linii HRP-1. Při paralelním testování P-gp jsme popsali značnou expresi v placentě, avšak v placentárních buňkách HRP-1 nebyl tento transportér detekován. Přítomnost Bcrp v buněčné linii HRP-1 jsme potvrdili i na úrovni funkční s využitím inhibitorů Ko143 a GF120918. Jejich účinkem jsme pozorovali zvýšení akumulace fluorescenčně značeného substrátu BODIPY FL prazosinu do buněk o více než 100%. Stejně tak byla touto akumulací studií prokázána absence efluxní aktivity P-gp, což potvrdilo jeho nedetekovatelnost na úrovni mRNA a proteinu. Dále jsme v této práci studovali vliv Bcrp na transplacentární prostup modelového substrátu cimetidinu s využitím metody duálně perfundované potkaní placenty. Sledování transportu látky ve směru materno-fetálním a feto-maternálním prokázalo značnou asymetrii, která byla částečně snížena přidáním BCRP inhibitorů fumitremorginu C a GF120918, a zcela eliminována při vysokých koncentracích cimetidinu. Tato práce přinesla dva základní poznatky týkající se protektivní role BCRP v placentě, a to že transportér nejen redukuje prostup substrátů z matky do plodu, ale také aktivně odstraňuje léčiva v cirkulaci plodu již přítomná.

Přestože ochranná aktivita Bcrp v placentě na konci březosti byla první studií potvrzena, stále nebylo zřejmé, zda je transportér Bcrp přítomen v placentě experimentálního zvířete po celou dobu březosti a zda se jeho exprese a funkce v návaznosti na gestační období

mění. V naší další práci jsme tudíž sledovali expresi placentárního Bcrp v průběhu březosti potkana na úrovni mRNA a pozorovali signifikantně vyšší množství Bcrp transkriptů v 15. než v 12., 18. a 21. dni. V další části této studie jsme ve fetální tkáni kvantifikovali sedminásobně vyšší expresi Bcrp mRNA ke konci gestace v porovnání s 12. dnem. Ochrannou roli placentárního a fetálního Bcrp jsme zkoumali sledováním množství modelového Bcrp substrátu cimetidinu ve fetální tkáni po infuzní aplikaci do krve matky. Ve 12. dni gestace jsme pozorovali desetinásobně vyšší expozice plodu cimetidinu vzhledem k ostatním sledovaným dnům. Navíc srovnání postinfuzní hladiny substrátu v plodu odhalilo podstatně nižší průnik do mozku než do celkové fetální tkáně. Tyto poznatky podpořily naši hypotézu, že rostoucí exprese Bcrp ve fetální tkáni může s postupujícím těhotenstvím posilovat protektivní roli placenty před látkami pro vyvíjející se plod potenciálně toxickými.

Překrývající se substrátová specifita a podobná tkáňová distribuce transportérů P-gp a BCRP naznačují také jejich společnou úlohu na detoxikačních procesech placenty, proto jsme se rozhodli naši další práci zaměřit na posouzení efektu P-gp a Bcrp na transplacentární farmakokinetiku (PK) jejich substrátů. S využitím specifických inhibitorů, koncentrační škály modelových látek a PK výpočtů na modelu duálně perfundované potkaní placenty jsme potvrdili účinek P-gp a Bcrp ve smyslu omezení materno-fetálního (mf) a urychlení feto-maternálního (fm) transportu. Otázku, zda počet transportérů zapojených do transferu látky může ovlivnit její transplacentární PK, jsme se pokusili zodpovědět aplikací duálního substrátu P-gp a BCRP – BODIPY FL prazosinu (BP) na náš model perfundované potkaní placenty. Navzdory očekávání byl však u BP poměr clearance ve fm a mf směru (4,0) nejnižší mezi sledovanými látkami (cimetidin – 24,6; rhodamin 123 - 11,0; glyburid - 11,2). Obdobných výsledků bylo dosaženo také při testování eliminace těchto substrátů z kompartmentu plodu s využitím recirkulace fetálního rezervoáru, což naznačilo, že vliv fyzikálně-chemických vlastností, zejména liposolubility, může převážet nad efektem proteinů P-gp a Bcrp na transplacentární transport BP. Tuto hypotézu jsme v naší studii potvrdili PK modelováním. Ze vztahu mezi pasivním/aktivním transportem a liposolubilitou vyplynulo, že vzestup rozpustnosti látky v tucích zvyšuje pasivní difuzi a zároveň snižuje účinnost lékových transportérů.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky našich studií potvrzují expresi a funkční aktivitu Bcrp a P-gp v placentě potkana a kvantifikují vliv těchto efluxních transportérů na ochranu a detoxikaci plodu. Z poslední studie je však zřejmé, že relativní efektivita efluxních transportérů v transplacentární farmakokinetice může být limitována dalšími faktory, jako je lipofilita sledovaných molekul.