

SOUHRN

Placenta je jedinečný orgán zajišťující řadu vitálních funkcí, které jsou nezbytné pro správný průběh těhotenství a vývoj jedince. Vedle hlavní funkce přísunu živin, odvodu zplodin metabolismu a výměny plynů plní placenta také úlohu endokrinní, metabolickou a především ochrannou. Placenta je považována za jednu z fyziologických bariér organismu, která zásadním způsobem reguluje transport endogenních i exogenních látek mezi dvěma kompartmenty - krevním oběhem matky a plodu.

Do nedávné doby se předpokládalo, že placentární bariéru tvoří především buněčné vrstvy oddělující krev matky a plodu - syncytiotrofoblast a endotel fetálních kapilár. V současné době se však stále více ukazuje, že vedle této mechanické složky se na placentární bariéře podílí i složka aktivní, realizovaná činností efluxních transportérů a biotransformačních enzymů lokalizovaných ve vrstvě syncytiotrofoblastu. Efluxní transportéry jsou membránové proteiny, které aktivně (za spotřeby ATP) "pumpují" širokou škálu substrátů ven z buňky. Kinetiku transportu látek přes placentu ovlivňují zásadním způsobem především dva transportéry: P-glykoprotein (P-gp) a "breast cancer resistant protein" (BCRP). Oproti transportérům tvoří biotransformace látek v placentě pravděpodobně minoritní, avšak nezanedbatelnou složku aktivní bariéry. Jedná se zejména o enzymy cytochromu P450, konjugační enzymy II. fáze metabolismu a enzymy uplatňující se v metabolismu steroidních molekul.

V rámci této disertační práce byly studovány obě složky aktivní placentární bariéry - transportní i metabolická. Z efluxních transportérů se naše pozornost soustředila na transportér BCRP jehož expresi a aktivitu jsme studovali na modelu placenty potkana v podmínkách *in-vitro* a *in-situ*. Přítomnost BCRP jsme potvrdili v potkaní placentární buněčné linii HRP-1 i v placentě potkana na konci březosti a to jak na úrovni mRNA tak na úrovni proteinu s využitím metod real-time RT-PCR, Western blottingu a imunohistochemie. Paralelně s BCRP jsme sledovali také expresi P-gp, který byl detekován pouze v placentě potkana, zatímco v buněčné linii HRP-1 nebyl přítomen. Aktivitu BCRP v podmínkách *in-vitro* jsme potvrdili s využitím fluorescenčně značeného substrátu BCRP - BODIPY FL prazosinu a inhibitorů BCRP - GF120918 a Ko143. V souladu s výsledky expresních studií jsme v linii HRP-1 nepozorovali žádnou aktivitu P-gp. Dále jsme studovali vliv BCRP na farmakokinetiku transportu léčiv přes placentární bariéru s využitím duální perfúze placenty potkana *in-situ*. Jako modelový substrát BCRP jsme zvolili cimetidin, jehož

průchod přes placentu jsme sledovali jak v materno-fetálním tak feto-maternálním směru. Pro ověření BCRP specifického transportu byly použity inhibitory BCRP - GF120918 a fumitremogin C. S pomocí tohoto modelu se nám podařilo prokázat, že BCRP hraje v kinetice přestupu látek přes placentu dvojí roli: 1) omezuje průchod substrátů z krve matky do plodu a 2) aktivně urychluje vylučování léčiva již přítomného v krvi plodu.

V dalších dvou studiích jsme se zaměřili na sledování exprese a aktivity enzymu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (11 β -HSD) jako feto-placentární bariéry průchodu glukokortikoidů (GK) z krve matky do plodu. První práce se zabývá rolí placentární 11 β -HSD v metabolismu GK v průběhu březosti potkana a dále vztahem mezi aktivitou placentární a fetální 11 β -HSD a jejich vlivem na poměr mezi aktivními a neaktivními formami GK v krvi plodu. Nejprve byl sledován profil exprese a aktivity placentární 11 β -HSD typu 1 a 2 mezi 13. a 21. dnem březosti potkana. U obou typů placentární 11 β -HSD byl pozorován pokles v expresi, avšak s odlišným profilem. Zatímco hladiny mRNA 11 β -HSD1 nejprve prudce poklesly mezi 13. a 14. dnem březosti a poté zůstávaly víceméně konstantní, exprese 11 β -HSD2 v poslední třetině gravidity pozvolně klesala a vždy převažovala nad 11 β -HSD1. Pokles 11 β -HSD2 v placentě ke konci posledního trimestru byl dále potvrzen i na úrovni proteinu. Pokles exprese 11 β -HSD1 byl doprovázen také poklesem její aktivity. Oproti tomu, NAD⁺ dependentní dehydrogenázová aktivita 11 β -HSD2 analyzovaná v tkáňových homogenátech se ke konci gravidity zvyšovala. Tyto výsledky naznačují existenci posttranslačního regulačního mechanismu, který ovlivňuje aktivitu placentární 11 β -HSD2. Ze studia aktivity 11 β -HSD2 v přítomnosti dithiotreitolu *in-situ* vyplynulo, že tento mechanismus je pravděpodobně odlišný od procesu aktivace a deaktivace 11 β -HSD2 reverzibilní dimerizací. Dále jsme sledovali hladiny kortikosteronu a 11-dehydrokortikosteronu v krvi plodu a porovnávali je s aktivitou placentární a plodové 11 β -HSD. Z výsledků vyplývá, že na regulaci metabolismu GK a jejich hladin v krvi plodu se významně podílí aktivita plodové 11 β -HSD a to především ke konci gravidity.

V následující práci jsme se zabývali vlivem prenatálně podávaných syntetických steroidů (dexametazonu a betametazonu) na expresi a konverzní kapacitu placentární 11 β -HSD typu 2. Ke studiu byl opět použit model potkaní placenty. GK byly podávány březím samicím ve dvou různých dávkách (nízká nebo vysoká) v průběhu 16. - 20. dne březosti. Exprese 11 β -HSD v placentách odebraných

21. den březosti byla analyzována s pomocí metod real-time RT-PCR a Western blottingem. Konverzní kapacita 11β -HSD2 byla hodnocena pomocí duální perfúze placenty potkana, jako modelový substrát pro 11β -HSD2 byl použit kortikosteron. Naše výsledky ukázaly, že ačkoliv vliv prenatální terapie syntetickými GK na expresi 11β -HSD je minimální nebo, v případě dexametazonu, omezený na transkripční úroveň, konverzní kapacita tohoto enzymu je oběma podávanými GK významně snižena. Narušení placentární bariéry tvořené 11β -HSD2 jsme zaznamenali nejen u vysokých dávek GK, ale také u nízkých dávek dexametazonu. Tato pozorování naznačují, že syntetické steroidy ovlivňují aktivitu 11β -HSD2 především na posttranslační úrovni. Naše výsledky také zdůrazňují význam funkčních studií při hodnocení vlivu exogenních látek na aktivitu enzymů placentární bariéry.

