

Barierowa rola białek nadrodziny ABC w łożysku ludzkim

Barrier role of ABC family of proteins in human placenta

Kozłowska-Rup Danuta, Czekaj Piotr

Zakład Histologii, Katedra Morfologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Zarówno ciążarna matka, jak i płód są narażone na działanie ksenobiotyków. Łożysko, będące jedynym narządem komunikacji między matką a płodem, pełni ważną rolę ochronną, funkcjonując jako bariera półprzepuszczalna, ograniczająca przechodzenie związków obcych do krwi płodowej. Białka błonowe zaangażowane w transport ksenobiotyków są obecne w łożysku ludzkim w syncytiotrofoblastie i w śródbłonku naczyń płodowych.

Najistotniejsze wśród nich, transportery nadrodziny ABC: glikoproteina P, BCRP i MRP, działają ochronnie na płód i łożysko wypierając swoje ligandy do środowiska pozakomórkowego. Zaobserwowano jednak spadek ekspresji białek ABC w stanach patologicznych związanych z upośledzeniem funkcji łożyska. W związku z tym, wiele leków przenika przez barierę łożyskową zwiększając ryzyko narażenia płodu na ich teratogenne działanie. Tak więc, wiedza o aktywności transporterów łożyskowych oraz rozpoznanie możliwości farmakologicznej kontroli aktywności białek ABC mają swoje istotne kliniczne implikacje. Jest ona niezwykle ważna w kontekście stosowania farmakoterapii skutecznej i bezpiecznej dla płodu.

W opracowaniu tym, przedstawiamy przegląd wiedzy na temat barierowej roli transporterów ABC w łożysku ludzkim.

Słowa kluczowe: **łożysko ludzkie / bariera łożyskowa / transportery ABC /
/ glikoproteina P / białko oporności raka sutka (BCRP) /
/ białka związane z opornością wielolekową (MRP) /**

Adres do korespondencji:

Danuta Kozłowska-Rup
Zakład Histologii, Katedra Morfologii
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
40-752 Katowice, ul. Medyków 18
e-mail: dan.kozlowska@wp.pl

Otrzymano: **10.09.2010**
Zaakceptowano do druku: **20.12.2010**

Summary

Both a pregnant woman and a fetus are exposed to a wide range of xenobiotics. Placenta provides the only link between the mother and the developing fetus. It plays a major protective role acting as a semi-permeable barrier to minimize fetal exposure to exogenous compounds. Membrane proteins taking part in the xenobiotic transport were found in human placenta, both in syncytiotrophoblast and fetal capillaries. Most importantly, placental ABC transporters - P-glycoprotein, BCRP and MRP - protect placental and fetal tissues by the efflux of their substrates. However, a decline in placental ABC transporter expressions was observed in some disorders. As a result, many drugs may cross the placental barrier increasing the risk of teratogenic effects. Thus, knowledge about placental transport proteins and pharmacological control of ABC proteins activity has important clinical implications. It is very important in the context of effective and safe pharmacotherapy during pregnancy. In this review, we summarized the current state of knowledge about the barrier role of ABC transporters in the human placenta.

Key words: placenta / placental barrier / ABC transporter / P-glycoprotein / Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) / Multidrug Resistance Protein (MRP) /

Wprowadzenie

Okres życia wewnątrzmacicznego wymaga najwyższego poziomu protekcji. Poprzez krążenie matczyne i łożysko, wraz z niezbędnymi do życia i rozwoju związkami endogennymi dociera do płodu cała gama substancji egzogennych – ksenobiotyków i ich metabolitów, które mogą wykazywać działanie cytotoksyczne, genotoksyczne, teratogenne czy karcynogenne. Zarówno łożysko, jak i tkanki płodu rozwijają samodzielne układy enzymatyczne I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków, które podobnie jak w matczynej wątrobie i nerkach, chociaż na znacznie mniejszą skalę, mogą uczestniczyć w biotransformacji i eliminacji związków egzogennych. Spośród enzymów uczestniczących w I fazie metabolizmu ksenobiotyków najistotniejsze są enzymy należące do nadrodziny cytochromu P-450.

Reakcje koniugacji (II faza) katalizowane są zasadniczo przez sulfotransferazy, N-acetylotransferazy, S-transferazy glutationu i transferazy glukuronianowe. Tkanki płodowe dysponują więc potencjalną, ale ograniczoną możliwością ochrony metabolicznej przed teratogennymi i embriotoksycznymi skutkami leczenia, stylu życia, narażenia środowiskowego i zawodowego kobiety ciężarnej, chroniącą płód przed niebezpiecznymi konsekwencjami.

Krytycznym dla rozwoju wewnątrzmacicznego jest okres embrionalny, w którym łożysko nie jest jeszcze funkcjonalnie i morfologicznie ukształtowane oraz toczą się intensywne procesy różnicowania komórek i tkanek zarodka. Wiele kobiet w tym czasie nie rozpoznaje jeszcze ciąży, kontynuując ryzykowne zachowania (alkohol, papierosy, leki, narkotyki). Także brak równowagi w aktywności enzymów biorących udział w reakcjach biotransformacji (polimorfizm genów, indukcja, inhibicja) czyni metabolity pośrednie ksenobiotyków bardziej toksycznymi, mutagennymi czy karcynogennymi, narażając płód na ich kumulację w tkankach [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Przy niedojrzałości metabolizmu płodowego, zminimalizowanie ryzyka narażenia płodu na działanie ksenobiotyków oraz końcowe produkty przemian ustrojowych następuje dzięki funkcjonalnej i strukturalnej barierze łożyskowej. Przechyłkowy transfer ksenobiotyków obejmuje m.in.: dyfuzję bierną, dyfuzję ułatwioną oraz transport aktywny. Większość cząsteczek przenika przez błony łożyska za pomocą prostej dyfuzji, osiągając

znaczące farmakologicznie i toksykologicznie stężenia w tkankach i płynach ustrojowych płodu. Łožysko ludzkie wykazuje ponadto ekspresję znacznej liczby transporterów ułatwiających import i eksport całej gamy substratów endogennych i ksenobiotyków. Specyficzne rozmieszczenie transporterów w barierze łożyskowej zapewnia transfer składników odżywczych od matki do płodu i eliminację produktów przemiany materii w kierunku przeciwnym. Liczne substancje egzogenne obecne w krwi matki są również ligandami dla białek nośnikowych mogącymi ułatwiać im dostęp do tkanek płodowych. Z drugiej jednak strony, transportery pośredniczące w wyrzucie substratów endogennych poza łożysko mogą chronić płód przed dostępem ksenobiotyków. Wśród tych ostatnich znajdują się białka należące do nadrodziny ABC (*ATP-Binding Cassette Superfamily*), znane jako transportery leków: glikoproteina P, białko oporności raka sutka BCRP i białka związane z opornością wielolekową MRP, zlokalizowane w większości na szczytowej powierzchni syncytiotrofoblastu, pozostającej w kontakcie z krwią matczyną [7, 8, 9, 10].

Celem tego opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat transporterów łożyskowych z nadrodziny ABC, zaangażowanych głównie w procesy adsorpcji, dystrybucji i wydalania leków oraz ich metabolitów, a tym samym najistotniejszych pod względem farmakologicznym i toksykologicznym.

Poziomy łożyskowej fetoprotekcji

Ludzkie łożysko jest łożyskiem typu krwiokosmówkowego, w którym tkanki płodowe pozostają w ścisłym kontakcie z krwią matki. Płodową część łożyska tworzą silnie rozgałęzione pnie kosmkowe wyrastające z płyty kosmówkowej. Pnie kosmkowe oraz kosmki trzeciorzędowe zawierają płodowe naczynia krwionośne, zrąb kosmka i warstwę syncytiotrofoblastu, kontaktującą się bezpośrednio z krwią matki. Zewnętrzną błonę syncytiotrofoblastu pokrywają liczne mikrokosmki zwiększające powierzchnię wymiany substancji z 3,4 m² w 28 tygodniu ciąży do średnio 13 m² w 40 tygodniu ciąży [1, 3, 11]. Bariera łożyskowa definiowana jest jako ogół cech strukturalnych i czynnościowych łożyska mających na celu prewencję płodu przed ekspozycją na potencjalnie szkodliwe czynniki pochodzące z krwioobiegu matki. Do tkanek oddzielających krążenie matki i płodu, i tworzących

barierę łożyskową należy pięć histologicznie różnych struktur: trofoblast (syncytio- i cytotrofoblast), błona podstawna trofoblastu, tkanka mezenchymatyczna zrębu kosmka oraz śródbłonek płodowych naczyń włosowatych leżący na błonie podstawnej. We wczesnej ciąży warstwa ta ma około 50-100µm grubości i zmniejsza się w miarę wzrostu i rozwoju łożyska (częściowe zanikanie warstwy cytotrofoblastu, elongacja naczyń włosowatych kosmka i przesunięcie ich w kierunku błony podstawnej syncytiotrofoblastu) do 4-5µm. Szczególnie istotną rolę w tworzeniu bariery łożyskowej pełni syncytiotrofoblast, powstający w wyniku fuzji komórek cytotrofoblastu. Błona komórkowa syncytium komórkowego wykazuje silnie polarną strukturę, w której w części szczytowej znajduje się rąbek szczoteczkowy pozostający w bezpośrednim kontakcie z krwią matki, utworzony przez liczne mikrokosmki efektywnie zwiększające pole powierzchni wymiany substancji. Część przypodstawna błony syncytiotrofoblastu graniczy ze ścianą naczyń krążenia płodowego. Obie powierzchnie błonowe są także istotne ze względu na zróżnicowane rozmieszczenie enzymów, receptorów hormonów oraz transporterów [1, 3, 11, 12].

Specyficzne mechanizmy biorące udział w tworzeniu w łożysku bariery funkcjonalnej występują na trzech różnych poziomach fetoprotekcji, (Rycina 1):

- I. Ograniczenie dostępu ksenobiotyków (eksport) – błony komórkowe syncytiotrofoblastu.
- II. Bariera metaboliczna (biotransformacja ksenobiotyków) – przede wszystkim siateczka śródplazmatyczna gładka syncytiotrofoblastu.
- III. Ograniczenie dostępu ksenobiotyków (eksport) – błona komórkowa śródbłonek naczyń włosowatych płodu.

Wymienione poziomy w barierze protekcyjnej płodu tworzą: układ enzymów mikrosomalnych I i II fazy (poziom II) oraz białka błonowe z nadrodziny transporterów ABC (poziom I i III). Na losy ksenobiotyków w łożysku ludzkim w głównej mierze wpływają zmiany aktywności i ekspresji wymienionych enzymów łożyskowych oraz transporterów błonowych towarzyszące przemianom w strukturze łożyska. Zarówno bariera łożyskowa jak i farmakokinetyczne parametry leków zmieniają się w zależności od wieku ciążowego, czyniąc pierwszy trymestr ciąży krytycznym pod względem narażenia płodu na działanie ksenobiotyków [1, 7].

Białka transportowe łożyska

W ciągu ostatnich 30 lat w łożysku opisano kilka systemów, które w większości dotyczą mechanizmów transportu dla składników endogennych i odżywczych, podczas gdy mechanizmy regulujące przezłożyskowy transfer ksenobiotyków są znacznie słabiej udokumentowane. Transfer łożyskowy zdominowany jest przez dyfuzję bierną. Inne przezłożyskowe mechanizmy transportu to: dyfuzja ułatwiona, transport aktywny, pinocytoza i endocytoza, filtracja oraz przepływ wymuszony. W aspekcie transportu przez łożysko leków i ksenobiotyków najistotniejsze znaczenie odgrywają dyfuzja bierna i aktywny transport z udziałem nośników białkowych [11, 13]. (Tabela I).

Ze względu na zdolność do transferu określonych związków farmakologicznych, transportery związków endogennych określa się też mianem „transporterów leków” [8].

Białka łożyskowe należące do nadrodziny ABC posiadają charakter pomp lub kanałów błonowych transportujących sub-

straty egzogenne i endogenne poza syncytiotrofoblast, wbrew gradientowi stężeń, przy udziale energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Zasadniczą rolą białek ABC jest ochrona komórki przed szkodliwymi substancjami, czyli transport substratów do środowiska pozakomórkowego. Dotychczas opisano 48 białek ABC zgrupowanych w 7 podrodzin (A-G) ze względu na podobieństwo w strukturze, porządek domen przezbłonowych (*TMD-transmembrane domains*) i domen przyłączających nukleotydy (*NBD-nucleotide binding domains*) oraz homologię sekwencji w domenach. Wszystkie charakteryzuje duża jednorodność struktury przestrzennej. TMD składają się z 6 fragmentów przezbłonowych i biorą udział w przenikaniu substratów przez błony lipidowe, podczas gdy położone wewnątrzkomórkowo NBD odpowiadają za wiązanie i hydrolizę ATP.

Wszystkie białka transportowe ABC zdolne są do transportu przez dwuwarstwę lipidową błon biologicznych rozmaitych substratów począwszy od jonów organicznych i nieorganicznych do białek, steroidów, czy antybiotyków. Wśród substratów białek ABC znajdują się m.in.: leki immunosupresyjne, inhibitory proteazy HIV, leki przeciwnowotworowe, uspakajające, przeciwdrgawkowe, przeciwpasożytnicze, przeciwbakteryjne, sercowo-naczyniowe. Wśród substratów endogennych znajdują się hormony steroidowe, tyroksyna, niektóre cytokiny, witaminy i prostaglandyny.

Do najliczniej występujących białek nadrodziny ABC, których funkcją jest usuwanie ksenobiotyków z łożyska należą, (Rycina 1 i 2): glikoproteina P (P-gp), białka związane z opornością wielolekową (*MRP – Multidrug Resistance-Associated Protein*) oraz białko oporności raka sutka (*BCRP – Breast Cancer Resistance Protein*) [14, 15, 16, 17].

Glikoproteina P

Najszerzej opisanym białkiem z nadrodziny ABC jest glikoproteina P; glikolizowane białko o ciężarze cząsteczkowym 170 kD, kodowane przez gen oporności wielolekowej *MDR1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 7. P-gp składa się z dwóch domen TMD i dwóch domen NBD, i jest integralnym białkiem błon komórkowych w wielu prawidłowych tkankach m.in. w wątrobie, trzustce, nerkach, jelicie cienkim i grubym, mózgu, czy w łożysku. W łożysku, P-gp zlokalizowana jest w błonie rąbka szczoteczkowego syncytiotrofoblastu. Białko to bierze udział w zależnym od ATP transporcie na zewnątrz komórki hydrofobowych metabolitów ksenobiotyków i hormonów steroidowych, ograniczając ich dostęp do płodu. Substratami dla P-gp są cząsteczki organiczne (związki obojętne lub słabe zasady, rzadziej składniki o charakterze kwasowym) osiągające rozmiary od 200 do 1900 Da. Spośród ksenobiotyków są to leki cytotoksyczne, inhibitory proteazy HIV, antybiotyki, opioidy, leki przeciwnowotworowe, barwnik diagnostyczny – rodamina 123 [3, 18].

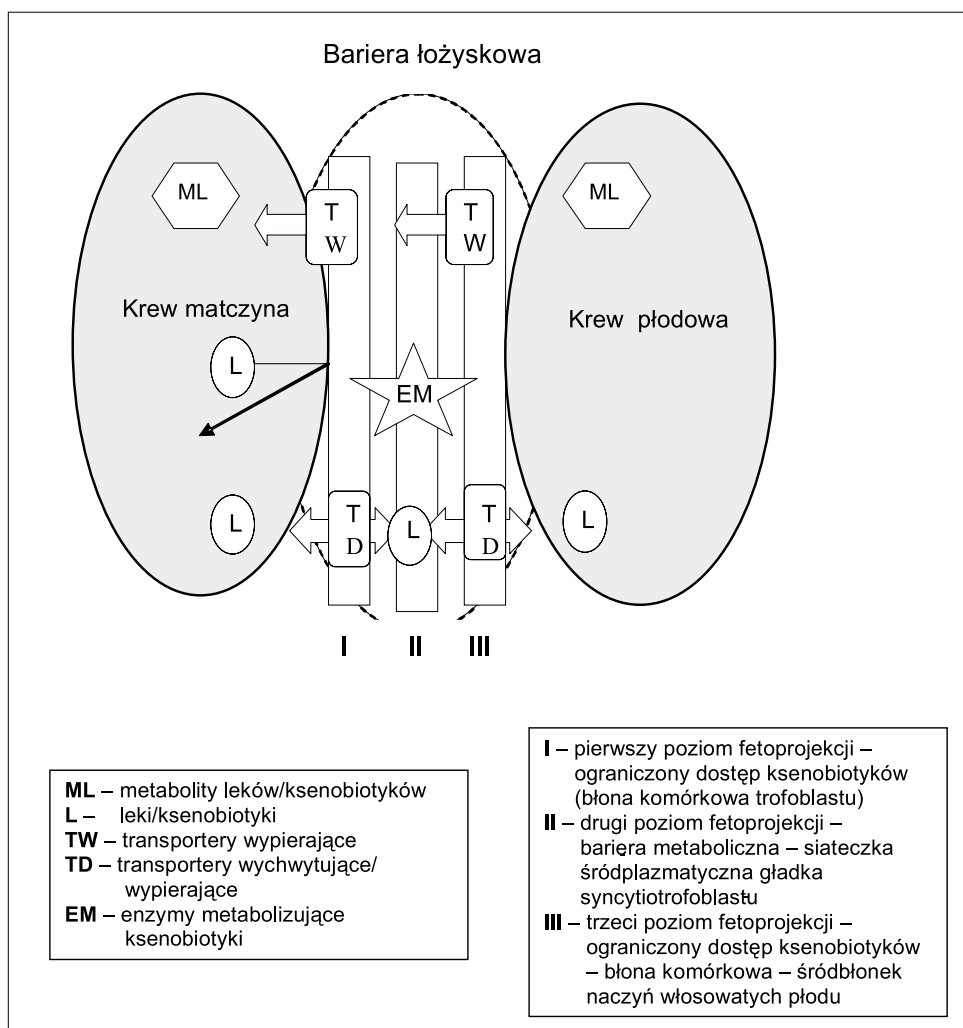
Chociaż P-gp jest wykrywalna w ludzkim trofoblastie przez cały okres trwania ciąży, to ekspresja zarówno mRNA, jak i białka zmniejsza się wraz z jej postępem. Bazując na tej obserwacji sugeruje się, iż protekcyjna rola P-gp jest najwyższa w najwcześniejszych stadiach rozwoju. Potwierdzają to badania Nanovskaya i wsp. wykazujące, że transfer metadonu jest o 30% większy w 38-40 tygodniu ciąży niż w łożyskach z wcześniejszych okresów. Podobne wyniki uzyskiwano w badaniach nad przezłożyskowym transferem innych leków będących substratami dla P-gp [7, 19].

Tabela I. Białka uczestniczące w przezłożyskowym transporcie ksenobiotyków i związków endogennych.

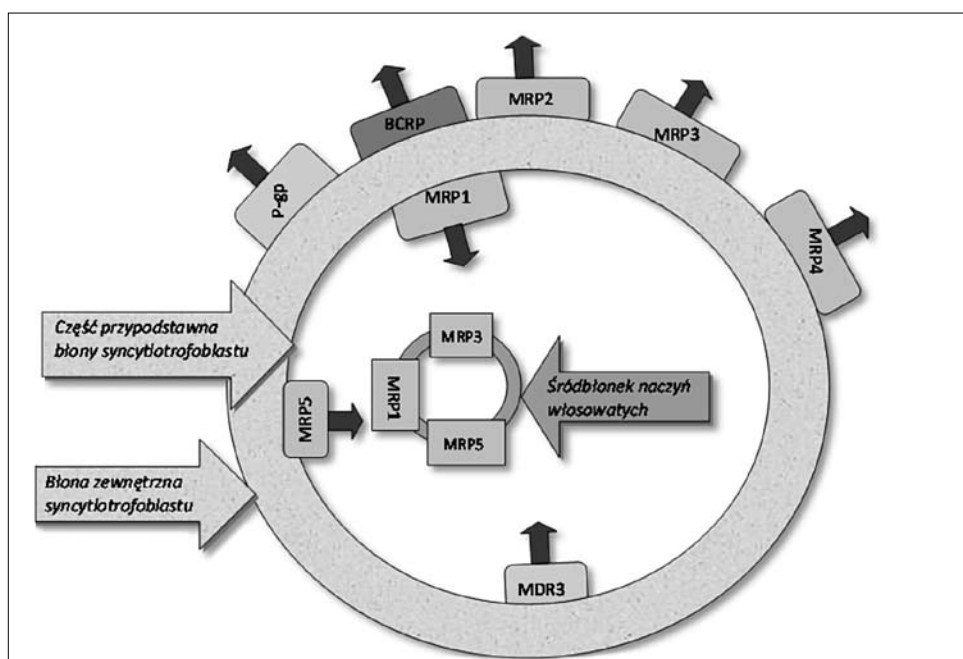
Nadrodzina	Rodzina	Transporter	Nazwa	Funkcja	Symbol genu	Ekspresja mRNA/białko
ABC Nadrodzina kasety białek związanych z ATP	ABCB	<i>P-gp</i>	Glikoproteina P, białko oporności wielolekowej	Białko wypierające	<i>ABCB1</i>	<i>b</i>
		<i>MDR3</i>	Białko oporności wielolekowej 3	Białko wypierające	<i>ABCB4</i>	<i>b</i>
		<i>BSEP</i>	Pompa soli żółciowych	Białko wypierające	<i>ABCB11</i>	<i>b</i>
	ABCC	<i>MRP1</i>	Białka związane z opornością wielolekową 1-5,7-8	Białka wypierające/ wychwytyjące	<i>ABCC1-5, ABCC7, ABCC11</i>	<i>b</i>
		<i>MRP2</i>				<i>b</i>
		<i>MRP3</i>				<i>b</i>
		<i>MRP4</i>				<i>m</i>
		<i>MRP7</i>				<i>b</i>
		<i>MRP5</i>				<i>m</i>
		<i>MRP8</i>				<i>m</i>
	ABCG	<i>BCRP</i>	Białko oporności raka sutka	Białko wypierające	<i>ABCG2</i>	<i>b</i>
SLC Nadrodzina nośników substancji rozpuszczalnych	SLC6 Transportery monoamin	<i>SERT</i>	Transporter serotoniny	Białko wychwytyjące	<i>SLC6A4</i>	<i>b</i>
		<i>NET</i>	Transporter epinefryny	Białko wychwytyjące	<i>SLC6A2</i>	<i>b</i>
	SLC22	<i>OCT3</i>	3 Transporter kationów organicznych	Białko wypierające	<i>SLC22A3</i>	<i>b</i>
		<i>OCTN1</i>	Nowy transporter karnityny/kationów organicznych 1	Białko wychwytyjące/ wypierające	<i>SLC22A4</i>	<i>b</i>
		<i>OCTN2</i>	Nowy transporter karnityny/kationów organicznych 1	?	<i>SLC22A5</i>	<i>b</i>
		<i>OAT1</i> <i>OAT4</i>	Transporter anionów organicznych 1	?	<i>SLC22A6</i>	<i>m</i>
			Transporter anionów organicznych4	Białko wypierające	<i>SLC22A11</i>	<i>b</i>
		<i>OATP1A2</i>	Poliipeptydy transportujące aniony organiczne	?	<i>SLCO1A2</i>	<i>m</i>
		<i>OATP1B1</i>			<i>SLCO1B1</i>	<i>m</i>
		<i>OATP1B3</i>			<i>SLCO1B3</i>	<i>m</i>
	SLC21	<i>OATP2B1</i>		Białko wypierające	<i>SLCO2B1</i>	<i>b</i>
		<i>OATP3A1</i>		?	<i>SLCO3A1</i>	<i>m</i>
		<i>OATP4A1</i>			<i>SLCO4A1</i>	<i>b</i>
						<i>b</i>
	SLC29	<i>hENT1</i>	Ludzkie transportery nukleozydów	Białka wychwytyjące/ wypierające?	<i>SLC29A1</i>	<i>b</i>
		<i>hENT2</i>			<i>SLC29A2</i>	<i>b</i>
	SLC5	<i>SMVT</i>	Transporter sodu/witamin	Białko wychwytyjące	<i>SLC5A6</i>	<i>b</i>
	SLC10	<i>SOAT</i>	Zależny od sodu transporter anionów organicznych	Białko wypierające?	<i>SLC10A3</i>	<i>m</i>

(?) - ograniczona liczba informacji, (m/b) - ekspresja na poziomie mRNA/białka

Barierowa rola białek nadrodziny ABC w łożysku ludzkim.



Rycina 1. Poziomy bariery łożyskowej dla ksenobiotyków.



Rycina 2. Lokalizacja i funkcja (kierunek transportu) białek nadrodziny ABC w kosmku trzeciorzędowym łożyska ludzkiego.

Istnieją duże indywidualne różnice w poziomach ekspresji łożyskowej P-gp, związane z występowaniem polimorfizmów genu ABCB1, co z kolei ma swoje kliniczne odzwierciedlenie w farmakokinetyce substratów P-gp i funkcjonowaniu mechanizmów oporności na leki [9]. Do tej pory zidentyfikowano ponad 100 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu ABCB1 [19, 20].

Wpływ P-gp na ograniczenie transportu ksenobiotyków do płodu został potwierdzony w licznych badaniach eksperymentalnych. Lanks i wsp. udowodnili, że brak aktywności łożyskowej P-gp w kolonii myszy CF-1 wpływa na rozwój wad wrodzonych u płodów (rozszczep podniebienia) wynikający z kumulacji w ich tkankach awermektyn. Rozszczep podniebienia występował u 100% płodów homozygotycznych o genotypie *mdr1a*(-/-). Zwierzęta *mdr1a*(+/-) wykazywały pośrednią wrażliwość na lek, u zwierząt *mdr1a*(+/+) nie odnotowano żadnych skutków teratogennych [21]. Badania Smit'a i wsp. wskazują, że przezłożyskowy transfer substratów P-gp (digoksyna, paklitaksel, sakwinawir) był od 2,4 do 16 razy wyższy u myszy z wyłączoną ekspresją genów glikoprotein P (*mdr1a/1b*) w porównaniu do grupy myszy z utrzymaną czynnością tego białka. Badania z wyłączeniem genu *mdr1* wskazują, że transporter ten odgrywa zasadniczą rolę protekcyjną w rozwoju płodu, chroniąc go przed toksycznym i teratogennym wpływem ksenobiotyków i ich pośrednich metabolitów [13].

Transport substratów P-gp może być blokowany przez związki zwane „chemouczulaczami”, blokerami lub inhibitorami P-gp. Bazując na ich aktywności farmakologicznej związki te podzielono na inhibitory trzech generacji. Do pierwszej generacji inhibitorów należy m. in. cyklosporyna i werapamil, do drugiej, np. valspodar i birikodar, a do trzeciej: tariquidar XR9576, zosuquidar LY335979, laniquidar R101933 i ONT-093. Zdolność do inhibicji aktywności P-gp posiadają także powszechnie stosowane ekstrakty ziołowe; rozmaryn, ziele przęśli czy korzeń rzewienia [18].

BCRP – białko oporności raka sutka

Białko oporności raka sutka (*BCRP-breast cancer resistance protein*) jest produktem genu ABCG2, zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 4 (4q22). Nazwa wywodzi się od linii nowotworowej raka piersi MCF-7, z której transporter został wyizolowany po raz pierwszy. Równolegle stosowane są dwa dodatkowe określenia tego białka: MXR (*mitoxantrone resistance-associated protein*) - białko związane z opornością na mitoksantron, oraz ABCP (*placenta-specific ABC transporter*) - białko ABC specyficzne dla łożyska. BCRP należy do podrodziny ABCG, t.j. białek o typie odwróconych pół-transporterów, zawierających pojedynczą domenę TMD na końcu karboksylowym i pojedynczą domenę NBD na końcu aminowym. Białko BCRP, podobnie jak P-gp, występuje w wielu tkankach organizmu: w łożysku, kanalikach żółciowych, jelicie czy w śródbłonku mózgu, gdzie pełni fizjologiczną rolę ochrony komórek przed działaniem toksyn. Badania immunohistochemiczne w łożysku, wskazują na lokalizację BCRP w błonie komórek syncytiotrofoblastu, a także w śródbłonku naczyń płodowych, nabłonku owodni, kosmówce i doczesnej [10, 22].

BCRP uczestniczy w transporcie wielu substratów, w tym cytostatyków, takich jak np.: mitoksantron, pochodne kamptoteczyny (topotekan, irinotekan), epirubicyna, etopozyd,

metotreksat, daunorubicyna czy analogi nukleozydów - zidovudina (AZT) i lamivudina (3TC). Wśród innych substratów można wymienić: prazosin, dipirydamol, fitoestrogeny oraz leki powszechnie stosowane w terapii pacjentek ciężarnych, np.: nitrofurantoina, cymetydyna czy gliburyd. Wiele z tych leków jest również substratami dla P-gp [22].

Wysoka ekspresja BCRP w komórkach syncytiotrofoblastu sugeruje, że białko to, uczestnicząc w transporcie ksenobiotyków poza trofoblast, może obok P-gp spełniać istotną rolę ochronną dla płodu i stanowić efektywny element bariery łożyskowej. Transport zależny od BCRP może być blokowany przez specyficzne inhibitory – fumitremorgin C (FTC) i jego analogi, inhibitory kinaz tyrozynowych, inhibitory proteazy anty-HIV (np. neflinawir, ritonawir), blokery kanałów wapniowych, immunosupresanty i inne. Farmakologiczna kontrola aktywności oraz identyfikacja substratów i inhibitorów BCRP dają możliwość sterowania ruchem substratów BCRP przez barierę łożyskową, w celu prowadzenia skutecznej terapii lekami [1, 22].

Ekspresja BCRP w łożysku pozostaje najprawdopodobniej pod ścisłą kontrolą związanych z ciążą hormonów steroidowych, czynników wzrostu i cytokin [7, 22]. Ekspresja tego białka wzrasta intensywnie podczas fuzji i różnicowania komórek trofoblastu *in vitro* i jest negatywnie regulowana przez niektóre cytokiny, a pozytywnie przez estrogeny, epidermalny czynnik wzrostu (EGF) i insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF II). Czynniki martwicy nowotworów TNF-alfa i interleukina 1β (IL-1β) znacząco obniżają ekspresję mRNA i białka BCRP. Wang i wsp. badali wpływ głównych hormonów steroidowych produkowanych przez łożysko – progesteronu (P4) i 17β-estradiolu (E2), na ekspresję i funkcję wypierającą BCRP w modelu ludzkich łożyskowych komórek BeWo, charakteryzujących się wysokim poziomem ekspresji endogennych BCRP. W modelu tym, E2 obniżał, a P4 podnosił poziom ekspresji BCRP. Ponadto, wykazano wpływ niektórych receptorów jądrowych hormonów steroidowych na regulację BCRP w komórkach BeWo. Paradoksalnie, aktywność BCRP w gruczole sutkowym powoduje gromadzenie w mleku matki leków i toksyn środowiskowych [10, 23, 24].

BCRP wykazuje wysoką ekspresję w łożysku przez cały okres ciąży, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka; poziom mRNA BCRP jest w łożysku około 100 razy większy niż w wątrobie, jelicie, mózgu, jajnikach, jądrach czy prostaty. Ostatnie badania pokazują jednak, że ekspresja BCRP w łożysku zmienia się wraz z wiekiem ciążowym. Wyniki te nie są jednak jednoznaczne, a ich wspólnym elementem jest maksimum ekspresji białka w połowie ciąży. Warto nadmienić, że ekspresja P-gp maleje, a MRP2 wzrasta wraz z czasem trwania ciąży. Mao i wsp. wysunęli wniosek, że różne poziomy ekspresji BCRP, P-gp i MRP2 w czasie trwania ciąży zapewniają ciągłość mechanizmów kompensacyjnych dla ochrony płodu w różnych okresach życia wewnątrzmacicznego [22]. Istnieją jednak duże indywidualne różnice łożyskowej ekspresji BCRP, sugerujące zmienne narażenie płodu na ksenobiotyki i ich metabolity. Różnice te wynikają m.in. z polimorfizmów genu ABCG2 [7, 22].

MRP – białka związane z opornością wielolekową

Rodzina białek oporności wielolekowej MRP składa się siedmiu protein oznaczanych symbolami MRP1-MRP7, o masie cząsteczkowej 190-200 kDa.

Występują one w prawie wszystkich tkankach organizmu, gdzie uczestniczą w zależnym od ATP transporcie ksenobiotyków, głównie w postaci koniugatów z glutationem lub kwasem glukuronowym. Transportery MRP charakteryzuje wyższa niż P-gp specyficzność substratowa. Preferowanymi przez MRP substratami są związki o charakterze anionów organicznych. Lekami transportowanymi przez tę grupę białek są, np.: metotrexat, etopozyd, winblastyna, winkrystyna, inhibitory proteazy HIV i niektóre antybiotyki z grupy fluorochinolonów [3, 25].

Metodami immunohistochemicznymi potwierdzono obecność co najmniej 5 przedstawicieli rodziny MRP w łożysku z trzeciego trymestru ciąży: MRP1 – w części podstawnej i szczytowej błony syncytiotrofoblastu oraz w śródbłonku naczyń włosowatych kosmków; MRP2 – w części szczytowej błony syncytiotrofoblastu; MRP3-5 – w części podstawnej błony syncytiotrofoblastu i w śródbłonku naczyń włosowatych kosmków.

Ekspresja białek MRP zmienia się wraz z rozwojem ciąży: wzrasta w przypadku MRP1 i MRP2; MRP3 wykazuje stałą aktywność aż do końca trzeciego trymestru, natomiast ekspresja MDR5 w tym czasie maleje [10]. Na podstawie analizy biblioteki cDNA łożyska ludzkiego, ustalono sekwencję nowych białek z rodziny MRP: MRP7 (ABCC10), ABCC13, MRP8 (ABCC11). Ich lokalizacja komórkowa nie jest jeszcze jasno określona. Prawdopodobnie one także odgrywają rolę w tworzeniu bariery łożyskowej transportując m.in. cykliczne nukleotydy i ich analogi, kwasy żółciowe, związane steroidy i eikozanoidy [1, 10].

Implikacje kliniczne

Łožysko pełni wiele istotnych funkcji, niezbędnych do utrzymania ciąży i zapewnienia prawidłowego rozwoju płodu [26]. Wiedza o aktywności białek transportowych w łożysku jest niezwykle istotna w kontekście stosowania farmakoterapii w czasie ciąży i ograniczania narażenia płodu na szkodliwe działanie leków. Kiedy celem farmakoterapii jest rozwijający się płód, pierwszeństwo mają leki nie będące substratami białek ABC. Przykładowo, Ivermektyna (substrat P-gp) przenika przez łożysko tylko w nieznacznych ilościach i dlatego sugerowano używanie jej w leczeniu onchocerkozy u kobiet ciężarnych zamieszkujących rejony wysokiego ryzyka występowania tej choroby. Także leki przeciwnowotworowe są znanymi substratami dla transporterów ABC i znajdują zastosowanie w terapii kobiet ciężarnych. Opisano przypadek 36 letniej kobiety ciężarnej z chorobą nowotworową sutka, która otrzymywała naprzemiennie chemioterapię od 14 do 32 Hdb, zawierającą kolejno: epirubicynę i paklitaksel, a w 32 tygodniu ciąży urodziła zdrowego chłopca. Immunohistochemiczne badania łożyska z tego porodu wykazały nadekspresję P-gp. Autorzy wnioskowali, iż łożyskowa P-gp odgrywa istotną rolę w ograniczeniu narażenia płodu na antracykliny i taksany zalecając te leki jako środki wspomagające w leczeniu ciężarnych [18]. Z kolei badania przezłożyskowego transportu doksorubicyny (substrat P-gp i MRP2) nie wykazały dopłodowego transferu leku, nawet w wysokich dawkach. Roboz i wsp. [27] wykazali brak doksorubicyny w płynie owodniowym w 20 tygodniu ciąży, co potwierdza minimalne ryzyko narażenia płodu.

Klinicznie istotnym zagadnieniem jest zjawisko interakcji między lekami będącymi ligandami transporterów i lekami-inhibitorami białek transportowych. Zablokowanie P-gp przez inhibitory powoduje zwiększenie koncentracji substratów w tkankach płodowych, nawet do poziomów toksycznych.

Przykładowo, interakcje digoksyny stosowanej w leczeniu tachykardii płodowej, z innymi lekami nasercowymi (werapamil, chinidyna) mogą wpływać na zwiększenie jej poziomu w surowicy płodu i powodować szkodliwe efekty. Niekiedy jednak całkowite zablokowanie ekspresji i/lub aktywności P-gp przez inhibitory białek ABC, wpływające na penetrację leku do płodu, może być klinicznie uzasadnione i wykorzystane w celu zwiększenia matczyno-płodowego transferu leku. Dzieje się tak w przypadku wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej HAART (*highly active antiretroviral therapy*) stosowanej w celu ograniczenia ryzyka transmisji zakażenia z matki na płód. Aktywność transporterów ABC w łożysku i powinowactwo do wiązania z białkami osocзовymi sprawiają, że inhibitory proteazy HIV zasadniczo nie przenikają przez łożysko. Dodatkowo łożyska matek HIV-pozytywnych wykazują znacznie podwyższoną ekspresję białek ABC. Większość inhibitorów proteazy HIV jest podawana z ritonawirem, działającym jako inhibitor pompy glikoproteiny P, przez co zwiększa się ich stężenie w przedziale płodowym. W kilku różnych badaniach wykazano, że podobne działanie, blokujące P-gp, wykazują także sakwinawir, indinawir i nelfinawir. Niektóre inhibitory proteazy indukują ekspresję P-gp. Vishnuvardhan i wsp. wykazali, że intensywna terapia lopinawirem hamuje aktywność P-gp; natomiast przedłużona ekspozycja na ten lek nie tylko zwiększa wyrzut rodaminę 123, ale także ekspresję mRNA i białka P-gp [18, 26, 27].

Zarówno cukrzyca, jak i cukrzyca ciążowa to jednostki chorobowe występujące u części ciężarnych. Szacuje się, że cukrzyca ciążowa rozwija się u 3-5% kobiet, a nieleczona może być przyczyną poważnych komplikacji dla matki i płodu. Doustne leki hipoglikemizujące są stosowane u ciężarnych pacjentek bardzo oszczędnie, ze względu na ryzyko rozwoju noworodkowej hipoglikemii. Pochodna sulfonilomocznika – gliburyd to lek, który nie przenika przez łożysko, m.in. w wyniku dużej skłonności do wiązania z białkami (zaledwie 0,2% leku występuje w krążeniu w wolnej postaci), a także interakcji z łożyskowymi transporterami ABC o funkcji wypierającej. Gliburyd jest aktywnie wypierany z łożyska wbrew gradientowi stężeń, do krążenia matki. W transporcie gliburydu do przedziału matczynego obok P-gp uczestniczą BCRP i MRP3, a zablokowanie aktywności P-gp przez werapamil nie wpływa znacząco na przezłożyskowy transfer leku [26, 28]. Hemauer i wsp. badali udział transporterów łożyskowych (BCRP, P-gp, MRP1) w biodyspozycji doustnych leków przeciwcukrzycowych stosowanych w monoterapii i w leczeniu skojarzonym (gliburyd, metformina, rozyglitazon) cukrzycy ciążowej. Autorzy wnioskują, że różne leki stosowane w terapii skojarzonej, a przenoszone przez ten sam transporter, mogą współzawodniczyć o wyrzut z syncytiotrofoblastu w kierunku przedziału matczynego. Współzawodnictwo o nośnik wpływa na zwiększenie koncentracji leków w krążeniu płodowym. Wykazano także, że MRP1 jest w głównej mierze związany z pozakomórkowym transportem gliburydu, a BCRP i P-gp z transportem metforminy [29].

Evseenko i wsp. zakładają, że spadek ekspresji łożyskowych transporterów ABC (pomimo faktu, iż łożyskowe czynniki wzrostu i steroidy stymulują ich ekspresję i funkcję) może być związany z patologiami ciąży, w których funkcja łożyska jest upośledzona, i które wiążą się ze wzrostem poziomu cytokin, tj. z niewydolnością łożyska w wewnątrzmacicznym opóźnionym wzrastaniu płodu IUGR (*intrauterine growth restriction*),

w stanie przedrzucawkowym, bakteryjnych stanach zapalnych, zakażeniach wewnątrzmacicznych, czy cukrzycy ciążowej. Nadekspresja TNF- α w łożysku występuje m. in. w cukrzycy i stanie przedrzucawkowym. W tej ostatniej patologii wzrasta także poziom IL-1 β i IL-6. Wyniki wskazują, że TNF- α i IL-1 β wpływają hamująco na ekspresję najważniejszych transporterów leków zlokalizowanych w szczytowej części błony syncytiotrofoblastu, podczas gdy IL-6 działa stymulująco, bądź hamująco zależnie od transportera. Transportery podstawno-boczne pozostają względnie niewrażliwe na działanie cytokin. Najistotniejsze znaczenie klinicznie ma fakt redukcji ekspresji BCRP i MDR1 przez TNF- α i IL-1 β występujący w schorzeniach położniczych związanych ze wzrostem poziomu cytokin, sugerujący wzrost narażenia płodu na działanie ksenobiotyków i wzrost podatności komórek trofoblastu na apoptozę [10, 23, 30].

Podsumowanie

Wzrost poziomu wiedzy na temat transportu łożyskowego oraz specyficzności substratowej białek zaangażowanych w przełożyskowy transfer ksenobiotyków pozwala odróżnić substancje, które z łatwością przenikają przez barierę łożyskową, narażając płód na ich toksyczne działanie od tych, które są usuwane, unieczynniane czy metabolizowane przez transportery i enzymy łożyskowe w sposób wystarczający aby zminimalizować ryzyko uszkodzenia struktur płodowych.

W dobie wzrostu zachorowalności na choroby cywilizacyjne i szerokiego stosowania leków, wiedza o aktywności białek transportowych w łożysku pozwala na prowadzenie skutecznej farmakoterapii kobiet ciężarnych przy minimalnym narażeniu płodu na powikłania z nią związane. Niezbędne są dalsze badania dotyczące klinicznego wykorzystywania transporterów i ich inhibitorów, regulacji ekspresji białek nośnikowych w łożysku oraz molekularnych mechanizmów transportu ksenobiotyków przez barierę łożyskową w celu efektywnej ochrony płodu.

11. van der Aa E, Peereboom-Stegeman J, Noordhoek J, [et al.]. Mechanisms of drug transfer across the placenta. *Pharm World Sci.* 1998, 20, 139-148.
12. Ganapathy V, Prasad P, Ganapathy M, [et al.]. Placental Transporters Relevant to Drug Distribution across the Maternal-Fetal Interface. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000, 294, 413-420.
13. Rahi M. Role of membrane transporters, P-Glycoprotein and MRP1, in the placental transfer of drugs. With Special Reference to Saquinavir and Quetiapine. *Annales Universitatis Turkuensis* 2009. University of Turku, Finland.
14. Zaremba M. Lekooporność w nowotworach wieku dziecięcego. Część I - białka związane z lekoopornością. *Onkol Pol.* 2005, 2, 57-61.
15. Unadkat J, Dahlin A, Vijay S. Placental drug transporters. *Curr Drug Metab.* 2004, 5, 125-131.
16. Litman T, Druley T, Stein W, [et al.]. From MDR to MXR: New understanding of multi-drug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 2001, 58, 931-959.
17. Schinkel A, Jonker J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003, 55, 3-29.
18. Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol.* 2006, 22, 400-410.
19. Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol.* 2009, 158, 665-678.
20. Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008, 23, 223-235.
21. Behravan J, Piquette-Miller M. Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007, 3, 819-830.
22. Mao Q. BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharm Res.* 2008, 25, 1244-1255.
23. Evseenko D, Murthi P, Paxton J, [et al.]. The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *FASEB J.* 2007, 21, 3592-3605.
24. Wang H, Zhou L, Gupta A, [et al.]. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17 β -estradiol in human placental BeWo cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006, 290, 798-807.
25. Włoch S, Pałasz A, Kamiński M. Czynny i bierny transport leków w łożysku ludzkim. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 772-777.
26. Weier N, He S, Li X, [et al.]. Placental drug disposition and its clinical implications. *Curr Drug Metab.* 2008, 9, 106-121.
27. Gulati A, Gerk P. Role of placental ATP-binding cassette (ABC) transporters in antiretroviral therapy during pregnancy. *J Pharm Sci.* 2009, 98, 2317-2335.
28. Gedeon C, Behravan J, Koren G, [et al.]. Transport of Glyburide by Placental ABC Transporters: Implications in Fetal Drug Exposure. *Placenta.* 2006, 27, 1096-1102.
29. Hemauer S, Patrikeeva S, Nanovskaya T, [et al.]. Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *Am J Obstet Gynecol.* 2010, 202, 383.e1-7.
30. Petrovic V, Teng S, Piquette-Miller M. Regulation of drug transporters during infection and inflammation. *Mol Interv.* 2007, 7, 99-111.

Piśmiennictwo

1. Marin J, Briz O, Serrano M. A Review on the Molecular Mechanisms Involved in the placental Barrier for Drugs. *Curr Drug Deliv.* 2004, 1, 275-289.
2. Kovo M, Golan A. In Vitro Models Using the Human Placenta to Study Fetal Exposure to Drugs. *Clin Med Reprod Health.* 2008, 2, 15-24.
3. Syme M, Paxton J, Keelan J. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *Clin Pharmacokinet.* 2004, 43, 487-514.
4. Szalek E, Grześkowiak E. Bezpieczeństwo farmakoterapii w okresie ciąży. *Farmacja Wsp.* 2008, 1, 109-115.
5. Webster W, Freeman J. Is drug safe in pregnancy? *Reprod Toxicol.* 2001, 15, 619-629.
6. Holcberg G, Tsadkin-Tamir M, Sapir O, [et al.]. New Aspects in Placental Drug Transfer. *IMAJ.* 2003, 5, 873-876.
7. Myllynen P, Immonen E, Kummu M, [et al.]. Developmental expression of drug metabolizing enzymes and transporter proteins in human placenta and fetal tissues. *Expert Opin. Drug Metab Toxicol.* 2009, 5, 1483-1499.
8. Ganapathy V, Prasad P. Role of transporters in placental transfer of drugs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005, 207, Suppl 2, 381-387.
9. St-Pierre M, Ugele B, Gambling L, [et al.]. Mechanisms of drug transfer across the human placenta - a workshop report. *Placenta.* 2002, 23, Suppl A, 159-164.
10. Evseenko D, Paxton J, Keelan J. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos.* 2007, 35, 595-601.