

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmakologie a toxikologie**



**Interakce MRP2 transportéru s vybranými  
antiepileptiky**

**Diplomová práce**

Hradec Králové 2007

Jitka Bačová

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla v první řadě poděkovat Mgr. Lukáši Červenému za všechno, co mě naučil v laboratoři, za trpělivost, se kterou sledoval mou práci, ať už v laminárním boxu nebo při psaní diplomky, za snahu všechno mi co nejjasněji a nejnázorněji vysvětlit a za veškerou pomoc.

Další dík patří PharmDr. Petru Pávkovi za jeho vstřícný přístup a vedení při psaní diplomky. Poděkování patří také Doc. Františku Štaudovi za jeho poutavé přednášky z farmakologie, díky nimž jsem vůbec přišla na myšlenku dělat diplomovou práci právě na katedře Farmakologie a toxikologie.

# Obsah

Seznam zkratk	5
Abstrakt	7
Abstract (English version)	8
<b>1. ÚVOD</b>	<b>9</b>
1.1 RODINA ABC TRANSPORTÉRŮ	9
1.1.1 Definice a funkce ABC transportérů	9
1.1.2 Struktura	9
1.1.3 Rozdělení do podrodin a jejich charakteristika	10
1.1.3.1 ABCA podrodina	10
1.1.3.2 ABCB podrodina	11
1.1.3.3 ABCC podrodina	11
1.1.3.4 ABCD podrodina	12
1.1.3.5 ABCG podrodina	12
1.1.3.6 ABCE a ABCF podrodina	12
1.2 MRP2 TRANSPORTÉR (ABCC2, C MOAT)	13
1.2.1 Funkce	14
1.2.2 Struktura	14
1.2.3 Lokalizace	14
1.2.4 Substráty MRP2	15
1.2.4.1 Endogenní substráty	15
1.2.4.2 Exogenní substráty	15
1.2.5 Klinický dopad	15
1.3 VÝZNAM EXPRESE ABC TRANSPORTÉRŮ V HEMATOENCEFALICKÉ BARIÉŘE A JEJÍ DŮSLEDKY	16
1.3.1 Transport látek přes hematoencefalickou bariéru	16
1.3.2 ABC transportéry lokalizované v hematoencefalické bariéře	17
1.3.3 Role ABC transportérů v rezistentní epilepsii	18
1.3.3.1 Definice refrakterní epilepsie	18
1.3.3.2 Popsané interakce antiepileptik s ABC transportéry	18
<b>2. CÍL VÝZKUMU</b>	<b>20</b>
<b>3. METODY</b>	<b>21</b>
3.1 MATERIÁL	21
3.2 KULTIVACE BUNĚK	21
3.3 TRANSPORTNÍ EXPERIMENTY	22
3.3.1 Princip transportní zkoušky	22
3.3.2 Postup	22
3.3.3 Validace metody	23
3.3.4 Vyhodnocení	23

3.4	AKUMULAČNÍ ZKOUŠKY .....	24
3.4.1	<i>Princip akumulční zkoušky</i> .....	24
3.4.2	<i>Postup</i> .....	24
3.4.3	<i>Validace metody</i> .....	25
3.4.4	<i>Vyhodnocení</i> .....	25
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>26</b>
4.1	TRANSPORTNÍ EXPERIMENTY .....	26
4.1.1	<i>Validace metody</i> .....	26
4.1.2	<i>Transportní zkoušky u vybraných antiepileptik</i> .....	27
4.1.3	<i>Transportní experiment s radioaktivně značeným valproátem</i> .....	28
4.2	AKUMULAČNÍ ZKOUŠKY .....	29
4.2.1	<i>Validace metody</i> .....	29
4.2.2	<i>Akumulační zkoušky u vybraných antiepileptik</i> .....	30
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>35</b>

## Seznam zkratk

ABC	ATP-binding cassette
ATP	adenosintrifosfát
ABCA-G	označení podrodin ABC transportérů
BCRP	breast cancer resistance protein
CBZ	karbamazepin
CFTR	cystic fibrosis transmembrane receptor
CLP	klonazepam
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter (kanalikulární multispecifický transportér organických aniontů)
DMEM	Dulbeco's modified eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ESM	etosuximid
FCS	fetal calf serum (fetální telecí sérum)
HDL	high density lipoproteins
HEB	hematoencefalická bariéra
kalcein-AM	acetoxymethylester kalceinu
LMG	lamotrigin
MDCKII	Madine-Darby Canine Kidney (psí ledvinová epiteliální buněčná linie)
MDCKII-MRP2	psí ledvinová epiteliální buněčná linie transfekovaná cDNA lidského MRP2 transportéru
MDCKII-NeO	psí ledvinová epiteliální buněčná linie s utlumenou expresí MRP2 transportéru
MDR	multidrug resistance (vícečetná léková rezistence)
MK-571	inhibitor MRP2 transportéru
MRP	multidrug resistance-associated proteins (proteiny sdružené s vícečetnou lékovou rezistencí)
MXR1	mitoxantron resistance-associated protein
MT	membránové transportéry
NBD	nukleotid-binding domain (nukleotid vázající domény)
Opti-MEM	modified eagle's medium (médiu bez přídavku séra)
PB	fenobarbital

PBS	phosphate buffer saline
P-gp	P-glykoprotein
PHT	fenytoin
PRM	primidon
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecyl sulfát sodný)
TM	transmembránové
VPA	valproát

## Abstrakt

**Cíl studie:** Na základě současných studií, které odhalily zvýšenou expresi efluxního transportéru MRP2 v hematoencefalické bariéře pacientů rezistentních k léčbě antiepileptiky, byla učiněna hypotéza, že by tato zvýšená exprese MRP2 mohla přispívat k selhávání antiepileptické léčby, k tzv. refrakterní epilepsii. Cílem naší studie bylo testovat substrátovou afinitu vybraných antiepileptik k MRP2 transportéru. Zvláště jsme se soustředili na fenobarbital, etosuximid, primidon, valproát, karbamazepin, klonazepam a lamotrigin. Dále jsme testovali inhibiční potenciál těchto antiepileptik k MRP2-řízenému transportu.

**Metody:** Ke studiu substrátové afinity testovaných antiepileptik k MRP2 byly provedeny transportní experimenty na epiteliálních buněčných monovrstvách kultivovaných na mikroporózních membránových filtrech. Konkrétně byly pro tento účel použity polarizované MDCKII buňky transfekované cDNA lidského MRP2 a jako kontrolní MDCKII-NeO buněčné linie, kde je vlastní exprese MRP2 utlumena. Pro určení inhibičního potenciálu byly na výše zmíněných buněčných kulturách provedeny akumulací zkoušky za použití známého fluorescenčního substrátu MRP2 kalceinu.

**Výsledky:** Testovaná antiepileptika nejsou ani substátem ani inhibitorem MRP2 transportéru.

**Závěr:** Naše data nepotvrdily hypotézu, že se zvýšená exprese MRP2 v hematoencefalické bariéře pacientů rezistentních k léčbě antiepileptiky podílí na refrakterní epilepsii. Testovaná antiepileptika neovlivňují prostřednictvím inhibice MRP2-řízený transport substrátů tohoto transportéru.

## Abstract (English version)

**Purpose:** Based on recent studies, which have determined overexpression of efflux transporter MRP2 in blood-brain barrier of patients with refractory epilepsy, it has been suggested that this overexpression could contribute to the farmacoresistance to antiepileptic drugs. The aim of our study was to test substrate affinity of selected antiepileptic drugs. In particular, we focused on phenobarbital, phenytoin, ethosuximide, primidone, valproate, carbamazepin, clonazepam and lamotrigin. Furthermore, the inhibitory potency of these antiepileptic to MRP2 was examined.

**Methods:** To study substrate affinity of tested antiepileptic to MRP2, transport experiments were performed in epithelial cell monolayers cultivated on mikroporous membrane filters. Particular, MDCKII cells transfected with cDNA of human MRP2 and, as a control, MDCKII-NeO cells where the expression of MRP2 is suppressed, were used. For detection of inhibitory potency of the antiepileptic drugs to MRP2, accumulation assays were carried out on MDCKII-MRP2 and MDCKII-NeO cell lines using calcein as a known fluorescent substrate of MRP2.

**Results:** The tested antiepileptic drugs are neither substrates nor inhibitors of MRP2.

**Conclusion:** Our data do not support the hypothesis that the overexpression of MRP2 in blood-brain barrier of resistant epileptics is involved in refractory epilepsy. The tested antiepileptic also do not influence, by means of MRP2 inhibition, MRP2-directed transport of its substrates.



# 1. ÚVOD

## 1.1 Rodina ABC transportérů

### 1.1.1 Definice a funkce ABC transportérů

ABC rodina aktivních transportérů (ATP-binding cassette superfamily) zahrnuje velké množství funkčně rozlišných transmembránových proteinů, jejichž základní fyziologickou funkcí je transport různorodých substrátů zahrnujících např. lipidy, žlučové soli, toxické sloučeniny a peptidy přes plazmatickou membránu.

K transmembránovému transportu, který se uskutečňuje proti koncentračnímu gradientu, využívají tyto proteiny energii získanou z hydrolyzy ATP, přičemž hydrolyza dvou molekul ATP umožní transport jedné molekuly substrátu. Navíc ABC transportéry obstarávají intracelulární transport přes membrány endoplazmatického retikula, peroxizomů a mitochondrií [1-4].

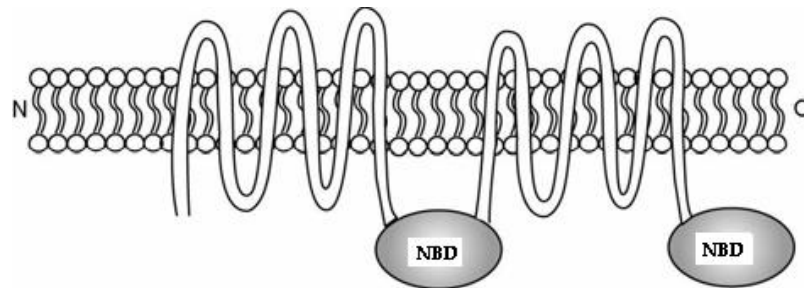
### 1.1.2 Struktura

Proteiny jsou klasifikovány jako ABC transportéry na základě sekvence a organizace ATP-vázajících domén, známých také jako nukleotid-vázající domény (nukleotid-binding domains - NBD). Tyto NBD obsahují 3 charakteristické prvky - Walker A a Walker B nacházející se ve všech ATP-vázajících proteinech a další doplňkový prvek nazývaný signatura C, umístěný v protisměru Walker B. C motiv je specifický pro ABC transportéry a odlišuje je od ostatních ATP-vázajících proteinů.

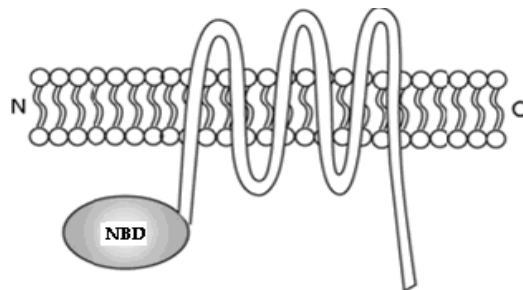
Funkční proteiny typicky obsahují dvě NBD a dvě transmembránové (TM) domény. TM domény obsahují 6-11 membránou proložených  $\alpha$ -helixů a zajišťují substrátovou specifitu. NBD jsou umístěny v cytoplazmě a přenášejí energii k transportu substrátu přes membránu. ABC pumpy jsou většinou jednosměrné, transportují substrát ven z cytoplazmy.

ABC transportéry jsou organizovány buď jako úplné transportéry obsahující dvě TM domény a dvě NBD kódovány jednoduchým polypeptidem (Obr.1) nebo jako poloviční transportéry

obsahující jednu z každé domény (Obr.2). Poloviční transportéry se k vytvoření funkčního transportéru spojují buď jako homodimery nebo heterodimery [4-6].



**Obr.1.** Úplný ABC transportér skládající se ze dvou transmembránových domén a dvou nukleotid vázajících domén (NBD) kódovaných jednoduchým polypeptidem [3].



**Obr.2.** Poloviční ABC transportér skládající se z jedné transmembránové domény a jedné nukleotid vázající domény (NBD) [3].

### ***1.1.3 Rozdělení do podrodin a jejich charakteristika***

V současnosti je známo 48 lidských ABC transportérů, které mohou být podle human genome nomenclature rozděleny do sedmi odlišných podrodin ABCA-G na základě organizace domén a homologie aminokyselin.

#### **1.1.3.1 ABCA podrodina**

Tato podrodina obsahuje 12 úplných transportérů, které jsou dále rozděleny do dvou podskupin. První skupina zahrnuje sedm genů lokalizovaných na šesti různých chromozomech, zatímco druhá skupina obsahuje 5 genů uspořádaných ve shluku na chromozomu 17q24. Dva členové této podrodiny ABCA1 a ABCA4 byly obsáhle studovány. ABCA1 protein je studován zejména v souvislosti s poruchami transportu cholesterolu a biosyntézou HDL (high-density lipoproteins). ABCA4 protein transportuje deriváty

vitamínu A ve vnějších částech buněk fotoreceptorů, což naznačuje, že je klíčový pro správnou funkci zraku [5, 7].

### **1.1.3.2 ABCB podrodina**

Podrodina humánních ABCB transportérů je jedinečná tím, že obsahuje jak úplné transportéry, tak i transportéry poloviční. V současnosti jsou v rámci této skupiny identifikovány čtyři úplné a sedm polovičních transportérů. ABCB1 (MDR/P-glykoprotein) je první lidský ABC transportér, který byl doposud nejvíce studován, a to skrze jeho schopnost způsobovat vícečetnou lékovou rezistenci (tzv. multidrug resistance) nádorových buněk vůči cytostatikům. Funkční umístění tohoto proteinu zahrnuje např. hematoencefalickou bariéru (HEB), placentu a játra. ABCB2 a ABCB3 jsou poloviční transportéry, jejichž podjednotky jsou tvořeny heterodimerem, a slouží k transportu peptidů do plazmatického retikula. ABCB4 a B11 jsou oba lokalizovány v játrech a účastní se sekrece fosfatidylcholinu a žlučových solí. Ostatní poloviční transportéry této podrodiny jsou přítomny v lysozomech (ABCB9) nebo v mitochondriích (ABCB6, B7, B8 a B10), kde se účastní metabolismu kovů a transportu Fe/S proteinových prekurzorů [3-5, 8].

### **1.1.3.3 ABCC podrodina**

ABCC podrodina obsahuje 12 úplných transportérů nazývaných také proteiny sdružené s vícečetnou lékovou rezistencí (multidrug resistance-associated proteins, MRP), které mají rozlišné funkční spektrum zahrnující iontový transport, eliminaci toxických látek a také funkci buněčného povrchového receptoru. Název MRP je odvozen od schopnosti několika těchto transportérů transportovat širokou škálu cytostatik ven z buněk a jejich přítomnost v mnoha nádorech nasvědčuje tomu, že mohou způsobovat dosud nevysvětlené případy lékové rezistence. ABCC7 (MRP1, CFTR) má navíc funkci chloridového kanálu, který hraje roli např. v exokrinní sekreci plic, potních žláz, střeva a pankreatu [4, 5, 9]. Mutace genu ABCC7 má za následek cystickou fibrózu, genetickou autozomálně recesivní chorobu způsobující abnormální produkci hlenu především v dýchacím systému [3, 10]. ABCC8 a ABCC9 proteiny váží sulfonylmočovinu a regulují draselné kanály zapojené např. v modulaci inzulinové sekrece. ABCC1 a ABCC3, stejně jako ABCC2 (MRP2), o kterém bude podrobně pojednáno později, transportují léčiva konjugovaná s glutathionem a další organické anionty. ABCC4, C5, C11 a C12 jsou menší než ostatní MRP a postrádají konečnou aminokyselinovou doménu, která ovšem není nezbytná pro transportní funkce [4, 5, 9].

#### **1.1.3.4 ABCD podrodina**

ABCD podrodina obsahuje 4 proteiny, které kódují poloviční transportéry lokalizované výhradně v peroxizomech, kde ve formě homo- a/nebo heterodimerů působí v regulaci transportu dlouhých řetězců mastných kyselin [4, 5].

#### **1.1.3.5 ABCG podrodina**

ABCG podrodina zahrnuje šest „obrácených“ transportérů, které mají NBD na aminokonci a TM doménu na karboxylovém konci. První objevený zástupce této skupiny, ABCG1, byl popsán jako lidský homolog bílého genu *Drosophily*. Lidský ABCG1 je zapojen v regulaci transportu cholesterolu [4, 5]. Druhým velmi dobře známým členem této podrodiny je ABCG2 označovaný také jako BCRP (breast cancer resistance protein) nebo také MXR1 (mitoxantron resistance-associated protein). Bylo prokázáno, že BCRP může být lokalizován v lidských nádorových buňkách, kde je schopen zprostředkovávat vícečetnou lékovou rezistenci těchto buněk k cytostatikům [11]. Dále bylo prokázáno, že se BCRP nachází v epiteliálních buňkách řady tkání a fyziologických bariér (např. v placentě, játrech, plicích a ledvinách). Tento transportér byl v posledních letech studován v souvislosti s jeho lokalizací v hematoencefalické bariéře (HEB), kde byla pozorována jeho zvýšená exprese v mnoha případech epileptogenních nádorů. Cílem studií bylo prokázat, zda-li tato zvýšená exprese BCRP nehraje roli v omezení penetrace antiepileptik přes hematoencefalickou bariéru [12-14]. ABCG5 a G8 transportují steroly ve střevě a játrech. ABCG3 byl prozatím nalezen jen u hlodavců, ABCG4 je přítomen výhradně v játrech, funkce těchto transportérů však doposud není známá [5].

#### **1.1.3.6 ABCE a ABCF podrodina**

Tyto podrodiny obsahují proteiny, které mají ATP-vázající domény odvozené od ostatních ABC transportérů, ale nemají žádnou transmembránovou doménu a není známo, že by byly zapojeny v jakékoliv transmembránové transportní funkci[3].

**Tab.1:** Přehled ABC transportérů, jejich lokalizace a funkce [5]

Gene	Alias	Location	Subfamily	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	ABC1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	ABC1	Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	ABC1	Photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	ABC1	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	ABC1	Liver	
ABCA7		19p13.3	ABC1	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	ABC1	Ovary	
ABCA9		17q24	ABC1	Heart	
ABCA10		17q24	ABC1	Muscle, heart	
ABCA12		2q34	ABC1	Stomach	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	MDR	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	MDR	Liver	PC transport
ABCB5		7p14	MDR	Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36	MDR	Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	MDR	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36	MDR	Mitochondria	
ABCB9		12q24	MDR	Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	MDR	Mitochondria	
ABCB11	SPGP	2q24	MDR	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	CF/MRP	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3	CF/MRP	Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1	CF/MRP	Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	CF/MRP	Exocrine tissue	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	CF/MRP	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	CF/MRP	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	ALD	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	ALD	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	ALD	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS41	4q31	OABP	Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABCS0	6p21.33	GCN20	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	GCN20	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	GCN20	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	White	Ubiquitous	Cholesterol transport?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	White	Placenta, intestine	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	White	Liver	
ABCG5	White3	2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport

## 1.2 MRP2 transportér (ABCC2, c MOAT)

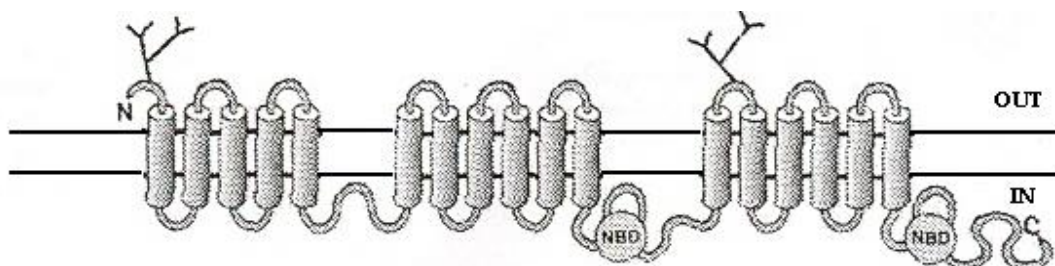
V dalším textu bude podrobněji pojednáno o MRP2 transportéru náležejícím do ABCC podrodiny ABC transportérů, který byl předmětem našeho výzkumu.

### 1.2.1 Funkce

Toxické sloučeniny, které vstupují do těla, jsou často modifikovány oxidací (1.fáze metabolismu) a/nebo se stávají rozpustnější ve vodě konjugací s glutathionem, sulfátem nebo glukuronátem (2.fáze). Výsledné konjugáty jsou příliš hydrofilní na to, aby mohly opustit buňku difúzí, a vyžadují náležité transportéry, díky kterým jsou vypumpovány ven z buňky. Za hlavní savčí membránový transportér zodpovědný za sekreci bilirubin-glukuronidů z jater do žluči je považován kanikulární multispecifický transportér organických aniontů - cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter), dnes nazývaný MRP2 [1, 15, 16].

### 1.2.2 Struktura

Základní struktura MRP2 vychází z obecného modelu úplného ABC transportéru (viz výše), navíc je však na aminokonce rozšířena o pět transmembránových segmentů. Segmenty jsou N-glykozylovány blízko N-konce a na šesté extracelulární smyčce.



**Obr.3.** Sekundární struktura MRP2. Transportér obsahuje dvě NBD a dvě TM domény jako klasický ABC transportér, navíc je rozšířen o 5 transmembránových segmentů na aminokonce. N a C označují amino- a karboxy- konec proteinu. [8]

### 1.2.3 Lokalizace

MRP2 je lokalizován na apikální straně polarizovaných epiteliálních buněk a nachází se nejen v kanikulární membráně hepatocytů, ale také v luminální membráně střevního epitelu, v luminální membráně proximálního tubulu ledvin, v jejunu a v apikální syncytiotrofoblastové membráně placenty [1, 8, 17, 18]. Pozdější studie také odhalily výskyt MRP2 v endoteliálních buňkách mozkových kapilár, čímž se MRP2 začala přisuzovat role

v omezení expozice mozku mnohými endogeními i exogeními sloučeninami, zahrnující toxické i terapeutické agens [16, 19, 20].

#### **1.2.4 Substráty MRP2**

MRP2 je schopen transportovat celou řadu exogenních i endogenních sloučenin. Substráty MRP2 mohou být konjugované s glutathionem, glukuronidy či sulfáty, nekonjugované organické anionty nebo látky transportované v přítomnosti glutathionu [9, 15, 21, 22].

##### **1.2.4.1 Endogenní substráty**

Fyziologickou úlohou MRP2 je vylučovat bilirubin mono- a bis-glukuronidy, 17 $\beta$ -estradiol-17 $\beta$ -D-glukuronid, redukované foláty a leukotrien C4 [23, 24].

##### **1.2.4.2 Exogenní substráty**

Množství exogenních substrátů transportovaných MRP2 je rozsáhlé [15, 25-28]. Z léčiv jsou substrátem MRP2:

- chemoterapeutika: irinotekan, metotrexát, vinblastin, vinkristin, antracykliny - doxorubicin, epirubicin
- antibiotika: ampicilin, ceftriaxon, rifampicin
- antihyperlipidemika: pravastatin
- inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu: temokapril.

Kromě léčiv MRP2 transportuje také toxiny a jejich konjugáty (těžké kovy, mykotoxin ochratoxin A,  $\alpha$ -naftylisothiokyanát) a některé látky, které mohou být obsaženy v potravě (čajový flavonoid epikatechin) [29-32].

#### **1.2.5 Klinický dopad**

Spousta faktorů může měnit expresi a/nebo funkci MRP2, což může mít za následek řadu důležitých klinických efektů. Předně snížená funkce MRP2 může poškodit normální funkci jater omezeným vylučováním endogenních sloučenin jako jsou konjugáty bilirubinu, steroidy a leukotrieny. Bylo prokázáno, že za Dubin-Johnsonův syndrom, charakterizovaný hyperbilirubinemií a hnědými pigmentovými skvrnami v játrech, je zodpovědný právě chybějící funkční MRP2 [15, 33, 34]. Dále může pozměněná funkce MRP2 ovlivnit celkovou clearance mnoha klinicky důležitých léčiv, která jsou jeho substrátem (viz výše). MRP2 hraje

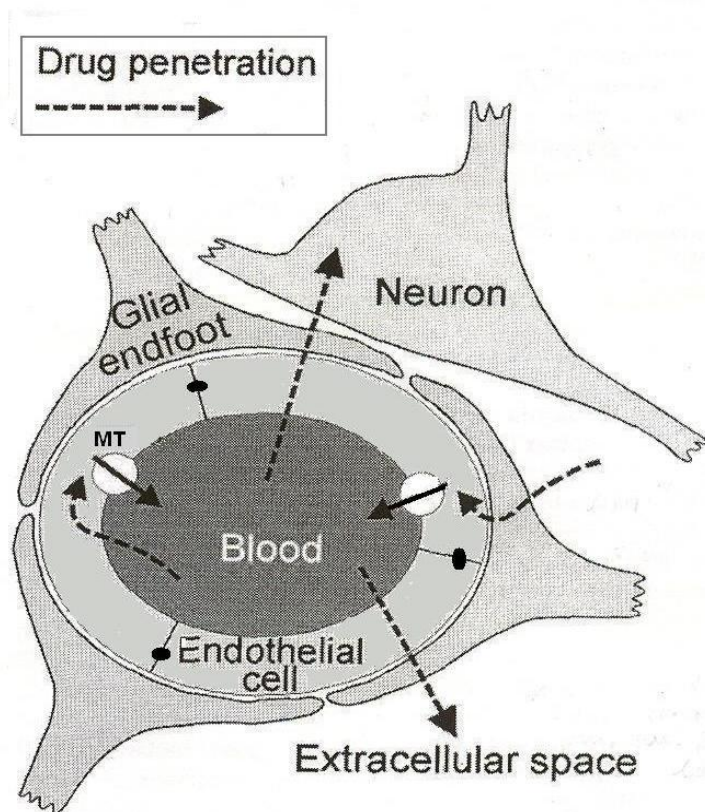
roli také v léčivých a estrogenních vyvolané cholestáze a v buněčné odpovědi na oxidační stres [15, 22]. Naopak zvýšená exprese MRP2 může mít za následek nižší koncentraci léčiva v cílových strukturách [16, 35].

## **1.3 Význam exprese ABC transportérů v hematoencefalické bariéře a její důsledky**

### ***1.3.1 Transport látek přes hematoencefalickou bariéru***

Hematoencefalická bariéra (HEB) je fyziologická a metabolická bariéra mezi mozkem a systémovou cirkulací, která slouží k regulaci a ochraně prostředí mozku. HEB se skládá ze souvislé vrstvy endoteliálních buněk bez fenestrací těsně propojených pomocí tzv. „tight junctions“ a vrstvy podpůrných buněk (gliové buňky a výběžky astrocytů). HEB má dvě významné úlohy 1) dává možnost vzniku a udržení stálého složení extracelární mozkové tekutiny (konkrétně mozkomíšního moku) a 2) výrazně limituje přechod potenciálně škodlivých xenobiotik do mozkové tkáně. Anatomická struktura HEB je důvodem blokády přechodu polárních látek z krevního řečiště do mozku. Pro transport polárních látek jako jsou glukóza a esenciální aminokyseliny, které v tomto případě nemohou do mozku procházet paracelulárně, je nutná přítomnost více či méně specifických transportních mechanismů. Makromolekuly (peptidy a proteiny) jsou transportovány převážně transcytózou, která může být buď receptorově zprostředkovaná nebo na receptorech nezávislá [36]. Pro lipofilní látky existuje předpoklad, že mají potenciál procházet přes HEB pasivní difúzí, jejíž rychlost je úměrná jejich rozpustnosti v tucích a koncentračnímu gradientu na obou stranách HEB. Avšak existuje velký počet výjimek, u nichž přechod přes HEB neodpovídá jejich liposolibilitě. U těchto látek bylo prokázáno, že jsou často „pumpovány“ z mozku zpět do krevního oběhu právě pomocí ABC transportérů [37, 38] (Obr.4.).





**Obr.4.** Schématické znázornění HEB a role membránových transportérů (MT) v transportu léčiv přes HEB. Na obrázku je znázorněna mozková kapilára s třemi endoteliálními buňkami spojenými mezi sebou tight junctions. Kapilární endotel je obklopen astrocytárními výběžky (glial endfoot). Průnik vysoce lipofilních léčiv skrze HEB je znázorněn přerušovanou šipkou. Jako aktivní obranný mechanismus HEBu proti lipofilním látkám působí systém membránových transportérů jako je P-gp nebo MRP2 přesunující část léčiv, která pronikla do buněk prostou difúzí, zpátky do krve[39].

### 1.3.2 ABC transportéry lokalizované v hematoencefalické bariéře

Prvním transportérem objeveným v endoteliálních buňkách HEB v souvislosti s vícečetnou rezistencí k cytostatikům byl P-glykoprotein (P-gp) [8, 40, 41]. Podle většiny publikovaných dat je tento transportér lokalizován na apikální (luminální) straně membrány endoteliálních buněk mozkových kapilár, takže léčiva, která jsou substráty P-gp, vstupující z krve do endoteliálních buněk, jsou okamžitě pumpována zpět do krve [41].

Ve srovnání s P-gp o ostatních ABC transportérech vyskytujících se v HEB existuje v literatuře mnohem méně dostupných dat. Exprese v endoteliálních buňkách HEB byla popsána pro některé členy MRP (ABCC) podrodiny jako je MRP2, který se nachází stejně jako P-gp v apikální membráně endoteliálních buněk cévních kapilár, navíc byl v membráně epiteliálních buněk choroidního plexu detekován MRP1, který je zde ovšem lokalizován bazolaterálně. Další transportéry, které se v HEB pravděpodobně vyskytují jsou MRP4 a MRP5, oba lokalizované na apikální straně, MRP4 byl však nalezen také na bazolaterální

straně membrány endoteliálních buněk mozku. Přesná lokalizace těchto transportérů však musí být ještě objasněna [9, 38, 42]. Posledním objeveným ABC transportérem byl v apikální membráně endotelových buněk HEB lokalizovaný BCRP [12, 14].

### **1.3.3 Role ABC transportérů v rezistentní epilepsii**

Přítomnost výše zmíněných ABC transportérů v HEB spolu s jejich prokázanou účastí ve vícečetné lékové rezistenci nádorových buněk k cytostatikům vedla k hypotéze, že by se některé z těchto transportérů mohly podílet také na farmakorezistenci v léčbě antiepileptiky, tzv. refrakterní epilepsii. Při dalších studiích byla zjištěna zvýšená exprese těchto transportérů v HEB mozku pacientů s refrakterní epilepsií a navíc byla tato teorie podpořena faktem, že některá antiepileptika (např. fenytoin nebo valproát) jsou prokázanými substráty P-gp [39, 43-45].

#### **1.3.3.1 Definice refrakterní epilepsie**

Pacienti trpící epilepsií jsou rezistentní k léčbě v jedné třetině případů, ale základní mechanismus této rezistence není stále objasněn. Jde pravděpodobně o multifaktoriální a nespecifický klinický problém. Většina pacientů s refrakterní epilepsií je rezistentní k několika antiepileptikům najednou, přestože tato léčiva působí rozdílnými mechanismy [46, 47]. Přesná definice rezistence k antiepileptikům se může lišit v závislosti na syndromech a jednotlivých případech. Až dosud je za platnou definici považováno selhání kontroly epileptických záchvatů navzdory užívání tří nebo více antiepileptik v maximálních tolerovaných dávkách, jelikož šance dosáhnout kontroly epilepsie po selhání druhého antiepileptika prudce klesají [47].

#### **1.3.3.2 Popsané interakce antiepileptik s ABC transportéry**

Několik studií se soustředilo na interakce antiepileptik s ABC transportéry vzhledem k modulaci (indukci/ inhibici) transportní aktivity těchto sloučenin.

- *In vitro* metodami bylo dokázáno, že lamotrigin, karbamazepin, fenytoin a valproát mají v koncentracích vyšších než je terapeutická hladina potenciál inhibovat P-gp [43-45].
- Několik *in vivo* studií bylo provedeno za účelem prokázat, zda-li je některé z antiepileptik substrátem MRP2. Bylo zjištěno, že absence MRP2 v HEB vedla ke vzrůstající penetraci fenytoinu do mozku a významnému zvýšení antikonvulzní

aktivity ve srovnání s potkany s neporušenou MRP2 funkcí. Podobných výsledků bylo dosaženo také v kombinaci PHT se známým inhibitorem MRP2 probenecidem [16]. Významně zvýšený průnik léčiv do mozku za použití probenecidu byl již dříve popsán pro hlavní antiepileptika valproát a karbamazepin, což bylo připisováno právě MRP2 [16, 35, 48].

Potenciální inhibice dalších ABC transportérů antiepileptiky zatím nebyla studována, ačkoli jde o velmi důležitý klinický aspekt v případě souběžného podávání dvou léčiv interagujících se stejným transportérem [13].

## 2. CÍL VÝZKUMU

Předmětem našeho výzkumu bylo testování potenciálních interakcí vybraných antiepileptik s MRP2 transportním systémem. Zvláště pak byla testována substrátová afinita a inhibiční potenciál pro následující antiepileptika: fenobarbital (PB), fenytoin (PHT), etosuximid (ESM), primidon (PRM), valproát (VPA), karbamazepin (CBZ), klonazepam (CLP) a lamotrigin (LMG).

Byly použity dvě *in vitro* metody: a) transepiteliální transportní studie k testování potenciální afinity antiepileptik k MRP2 a b) akumulční experimenty s rozpoznávaným fluorescenčním MRP2 substrátem k určení schopnosti testovaných antiepileptik inhibovat MRP2-zprostředkovaný transport.

Pro oba typy experimentu byly použity buněčné monovrstvy tvořené polarizovanými MDCKII buňkami, transfekovanými cDNA humánního MRP2. Kontrolní experimenty byly provedeny na monovrstvách tvořených polarizovanými MDCKII-NeO buňkami. Zkoušky inhibičního potenciálu vybraných antiepileptik byly založeny na akumulaci fluorescenčního substrátu MRP2, kalceinu [49, 50].

## 3. METODY

### 3.1 Materiál

LMG byl zakoupen v GlaxoSmithKline (Research Triangle Park, NC, U.S.A.), PB, PRM, CBZ, VPA a ESM byly zakoupeny ze Sigmy, PHT z Parke-Davis GmbH (Berlin, Freiburg, Německo), původně vyrobené jako parenterální Epanutin. CLP byl z F. Hoffmann-La Roche Ltd Roche (Basel, Švýcarsko), vyroben jako Rivotril inj. Známý substrát MRP2 [<sup>3</sup>H]vinblastin sulfát byl z Toronto research Chemicals, Inc. (Toronto, Ontario, Kanada). Inhibitor MRP2 MK-571 byl dodán firmou Axxora, LLC (San Diego, CA, USA). Kalcein-AM byl pořízen v Invitrogen-Molecular Probe (Karlsruhe, Německo). Zásobní roztoky VPA a ESM byly připraveny rozpuštěním ve vodě, zásobní roztoky PB, LMG, PRM, a CBZ byly připraveny rozpuštěním v DMSO. Množství DMSO v kultivačním médiu bylo vždy <0.1%. Kompletní médium DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) s vysokým obsahem glukózy a fetální telecí sérum (fetal calf serum, FCS) byly zakoupeno ze Sigmy-Aldrich (St.Louis, MO), stejně jako [<sup>3</sup>H] inulin 40 kDa (0.5-3 Ci/mmol), dimethyl sulfoxid (DMSO) a dodecyl sulfát sodný (SDS). Medium Opti-MEM bez přídavku séra bylo vyrobeno v Invitrogen-Gibco (U.K.). 24-jamková plata a láhve pro kultivaci byly dodány z TPP (Trasadingen, Švýcarsko), mikroporózní polykarbonátové filtry (velikost pórů 3.0- $\mu$ m, průměr 24-mm, Transwell 3414) byly z Corning (Corning, NY, U.S.A.).

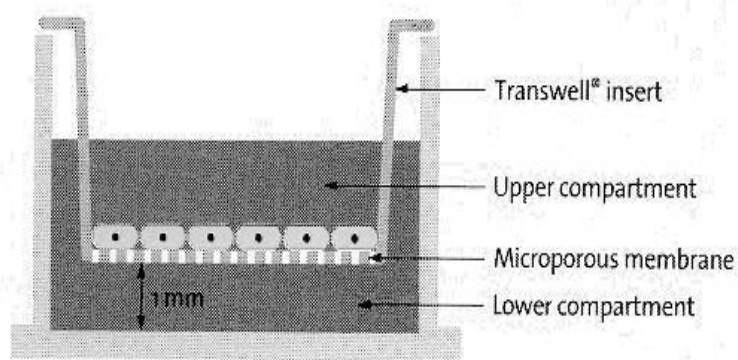
### 3.2 Kultivace buněk

MDCKII (Madine-Darby Canine Kidney) psí ledvinové epiteliální buněčné linie, parentní a transfekovaná cDNA humánního MRP2 transportéru, byly kultivovány v DMEM kompletovaném s vysokým obsahem glukózy a L-glutaminem, doplněným 10% FCS, penicilinem (100U/ml) a streptomycinem (100 $\mu$ g/ml), při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po dosažení 70-80% konfluency byly buňky omyty PBS, trypsinizovány a poté naředěny kultivačním médiem v poměru 1:10.

## 3.3 Transportní experimenty

### 3.3.1 Princip transportní zkoušky

Typické transportní zkoušky jsou založeny na aplikaci testované látky na apikální nebo bazolaterální stranu konfluentní monovrstvy polarizovaných epiteliálních buněk (Obr.5) a měření výsledného transportu látky přes monovrstvu. Pokud je látka substrátem studovaného transportéru, je její transport přes monovrstvu buněk vlivem transportéru v jednom směru zrychlen a ve směru opačném zpomalen. Naopak pokud látka není substrátem studovaného transportéru, nemůže být pozorována žádná asymetrie v transportu přes monovrstvu a nejsou žádné rozdíly mezi transportem látek v parentní a transportérem transfekované buněčné linii [13, 51].



**Obr.5.** Znárodnění inzertu s mikroporózní polykarbonátovou membránou používaného pro transportní experiment. Testovaná látka byla aplikována na apikální stranu (Upper compartment) nebo na bazolaterální stranu (Lower compartment) konfluentní monovrstvy polarizovaných epiteliálních buněk.

### 3.3.2 Postup

Transepiteliální transportní studie byly provedeny na mikroporózním polykarbonátovém membránovém filtru za využití buněčné monovrstvy tvořené polarizovanými MDCKII buňkami transfekovanými cDNA humánního MRP2 (MDCKII-MRP2). Kontrolní experimenty byly provedeny na monovrstvách tvořených polarizovanými MDCKII-NeO buňkami. Buňky byly nasazeny v hustotě  $1.0 \times 10^6$  a kultivovány do dosažení konfluencie. Transportní zkoušky byly provedeny, jak je uvedeno v publikaci autorů Červený a kol. s drobnými modifikacemi [13]. V čase  $t = 0$  bylo do obou kompartmentů přidáno Opti-MEM

medium (2 ml), které bylo v příslušném kompartmentu (apikálním či bazolaterálním) obohacené o zkoušené antiepileptikum. Antiepileptika byla testována v jedné, popř. dvou terapeuticky relevantních koncentracích. CBZ byl testován při koncentraci 20 a 25  $\mu\text{M}$ , VPA, PRM a ETS při koncentraci 25  $\mu\text{M}$ . Po čtyřech hodinách inkubace při 37°C v 5%  $\text{CO}_2$  bylo odebráno 800 $\mu\text{l}$  roztoku z protějšího kompartmentu, než bylo aplikováno antiepileptikum. Koncentrace antiepileptik byla analyzována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, popř. imunofluorescenčními metodami. Pro ověření transportu VPA přes monovrstvu tvořenou MDCKII-MRP2 buňkami, bylo také využito radioaktivně značeného [ $^{14}\text{C}$ ]VPA (0.11 $\mu\text{Ci/ml}$ ) při koncentraci 2  $\mu\text{M}$ . V čase  $t = 0$  byl roztok radioaktivně značeného VPA přidán do příslušného kompartmentu, a posléze byly každou hodinu z protějšího kompartmentu odebírány aliquoty (50  $\mu\text{l}$ ) a měřena radioaktivita. Po 4 hodinách byl experiment ukončen.

### **3.3.3 Validace metody**

Pro ověření validity metody byl použit radioaktivně značený [ $^3\text{H}$ ]vinblastin sulfát při koncentraci 2  $\mu\text{M}$ , který je rozpoznáný substrát MRP2 [28, 52]. Pro detekci vinblastinu byly po čtyřech hodinách odebírány vzorky (100 $\mu\text{l}$ ) a byla měřena radioaktivita. Integrita buněčné monovrstvy byla ve všech případech testována radioaktivně značeným [ $^3\text{H}$ ]inulinem. Penetrace inulinu bylo tolerována do 1% za hodinu na jamku.

### **3.3.4 Vyhodnocení**

Transport testovaných antiepileptik byl detekován jak ve směru apikálně-bazolaterálním (AB) tak i bazolaterálně-apikálním (BA). Výsledky jsou prezentovány v procentech, která byla vypočítána jako poměr naměřené koncentrace ke koncentraci zásobních roztoků antiepileptik. Data byla počítána jako průměr z transportované frakce (%)  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) nejméně ze tří experimentů. Statistická významnost byla hodnocena pomocí nepárového Student t testu („two-tailed“) a je vyjádřena pomocí hodnot  $p$ : \*  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 3.4 Akumulační zkoušky

### 3.4.1 Princip akumulace zkoušky

Princip akumulace nebo také inhibiční zkoušky je založen na akumulaci fluorescenčního substrátu studovaného transportéru v buňkách v přítomnosti potenciálních inhibitorů tohoto efluxního transportního systému. Pokud je testovaná látka inhibitorem transportéru, není fluorescenční sonda „pumpována“ z buňky a dochází tak k její akumulaci v buňce [51]. V našem případě byl použit jako fluorescenční sonda kalcein, který je rozpoznávaným substrátem MRP transportéru [49, 50]. Do buněk proniká tato sloučenina jako vysoce lipofilní nefluorescenční acetoxy-methylester kalceinu (kalcein-AM). V buňkách je endogenními esterázami odštěpen esterový zbytek, čímž vzniká hydrofobní a fluorescenční kalcein, který nemůže opustit buňku bez pomoci transportních systémů [53].

### 3.4.2 Postup

Experimenty byly provedeny podle postupu publikovaného autory Červený a kol. s drobnými modifikacemi [13]. MDCKII-MRP2 buňky byly nasazeny na 24 jamková plata ( $1 \times 10^5$  buněk/jamku). Po dosažení konfluence (95%) bylo odsáto médium, buňky byly omyty PBS a do každé jamky byl přidán roztok kalceinu-AM v Opti-MEM ( $2 \mu\text{M}$ ). Buňky byly 30 min inkubovány při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Poté byly omyty dvakrát PBS a jednou 10% FCS s PBS a inkubovány další dvě hodiny v Opti-MEM médiu bez inhibitoru, s inhibitorem nebo testovanými antiepileptiky při různých koncentracích (viz dále). CBZ byl testován při koncentracích 25, 100 a  $500 \mu\text{M}$ , LMG a PRM při 25 a  $100 \mu\text{M}$ , PHT při 10 a  $100 \mu\text{M}$ , PB při 20 a  $100 \mu\text{M}$ , CLP byl studován při koncentracích 500 nM a  $25 \mu\text{M}$ , VPA při 25, 500 a  $1000 \mu\text{M}$  a ETS při koncentraci 25 a  $500 \mu\text{M}$ . Jako pozitivní kontroly byl použit známý inhibitor MRP2 transportéru, MK-571 ( $20 \mu\text{M}$ ) [9, 54, 55]. Akumulace kalceinu byla ukončena odsátím média a několikanásobným omytím buněk studeným PBS. Buňky byly lyzovány pomocí 0.5 % SDS. Relativní buněčná akumulace kalceinu byla stanovena v lyzátu pomocí multifunkčního přístroje Genios plus (fy Tecan). Excitace pro kalcein byla 485nm a vlnová délka záření 535 nm.



### **3.4.3 Validace metody**

Pro ověření funkčnosti transportérů byl proveden srovnávací experiment mezi parentní MDCKII-NeO a transfekovanou MDCKII-MRP2 buněčnou linií za použití známých inhibitorů MRP2, MK-571 a probenecidu [56, 57].

### **3.4.4 Vyhodnocení**

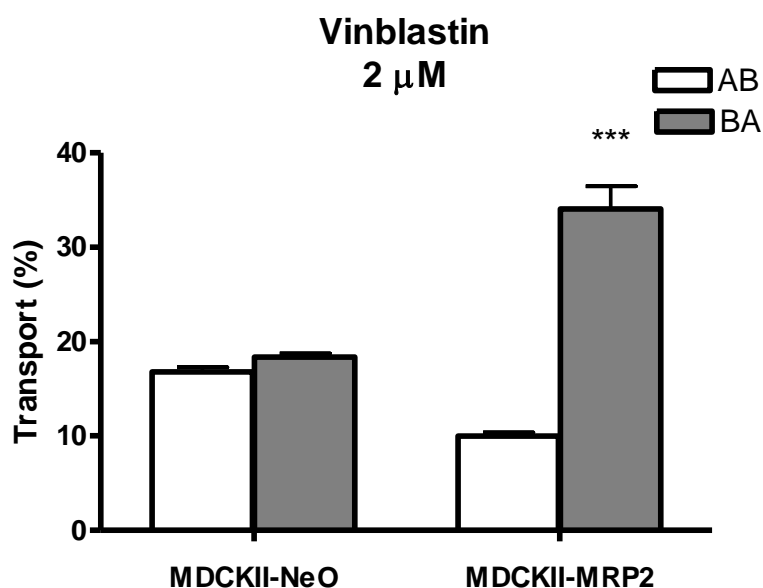
Relativní buněčná akumulace kalceinu je uváděna v procentech, která byla vypočítána jako podíl fluorescence vzorků zkoušených látek a fluorescence kontrolních buněk. Akumulace kalceinu v kontrolních experimentech bez přítomnosti antiepileptik byla považována za 100%. Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD nejméně ze tří experimentů. Statistická významnost byla hodnocena pomocí nepárového Student t testu („two-tailed“) a je vyjádřena pomocí hodnot p: \*  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Transportní experimenty

#### 4.1.1 Validace metody

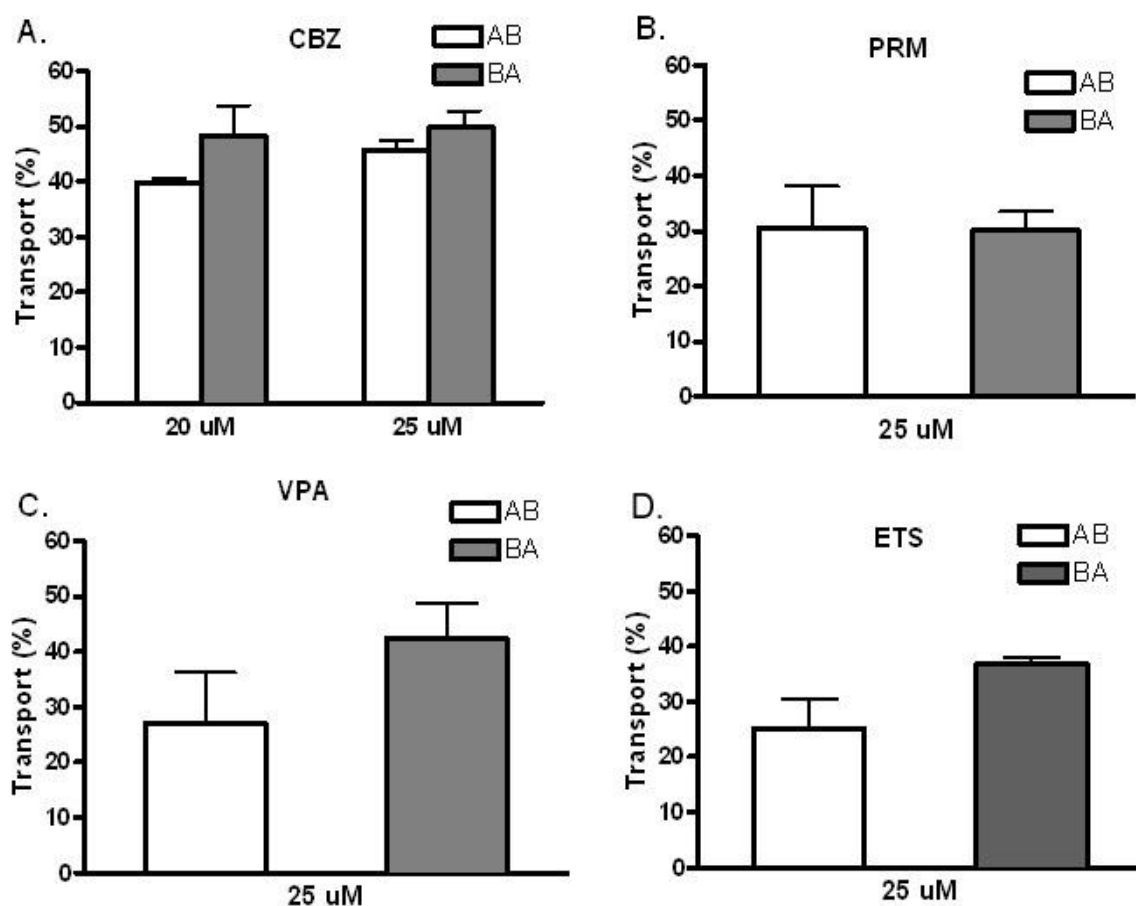
U transportu [<sup>3</sup>H]vinblastinu přes buněčnou linii MDCKII-MRP2 je po čtyřech hodinách zjevná asymetrie transportu způsobená aktivitou MRP2, který brání přechodu [<sup>3</sup>H]vinblastinu ve směru apikálně-bazolaterálním AB a urychluje ve směru bazolaterálně-apikálním BA, tzn. že byl pozorován statisticky významný rozdíl ( $p < 0,001$ ). U MDCKII-NeO linie tomu tak není, nemá v plazmatické membráně MRP2 transportér. (Obr.6)



**Obr.6.** Transepiteliální transport [<sup>3</sup>H]vinblastinu 2  $\mu$ M přes linii MDCKII-NeO a přes linii transfekovanou lidským MRP2 transportérem. Transport byl sledován v apikálně-bazolaterálním (AB) směru a bazolaterálně-apikálním (BA) směru. Vzorky byly z příslušných kompartmentů odebrány po čtyřech hodinách a byla měřena radioaktivita. Přechod přes buněčnou epitelii je vyjádřen jako procento látky aplikované do startovního kompartmentu (apikálního nebo bazolaterálního). Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 4.1.2 Transportní zkoušky u vybraných antiepileptik

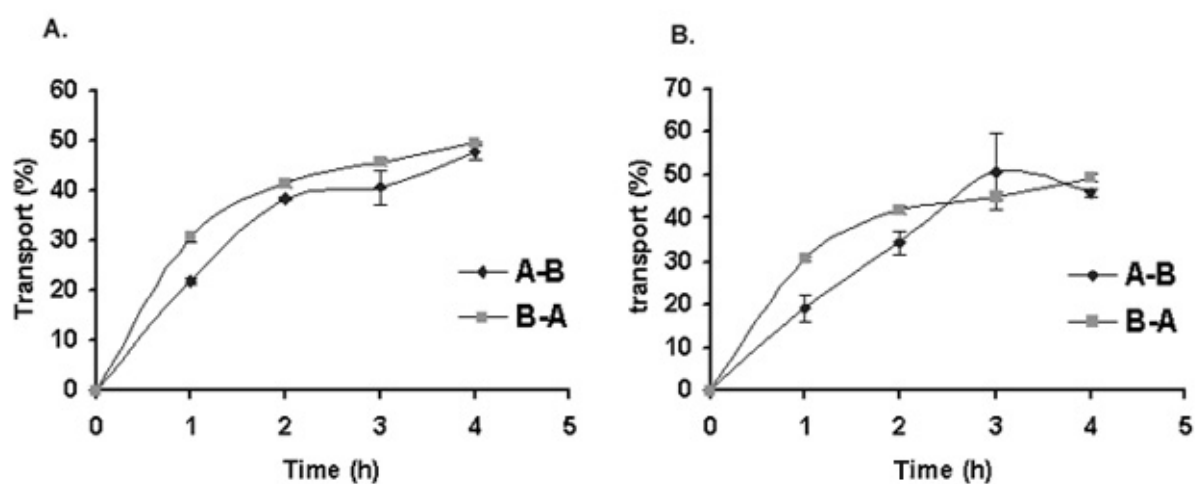
Při testovaných koncentracích jsme nepozorovali žádný vliv apikálně lokalizovaného MRP2 na transport sledovaných antiepileptik přes monovrstvu tvořenou MDCKII-MRP2 buňkami. Transport antiepileptik v apikálně-basolaterálním (AB) směru byl ve všech případech porovnatelný s transportem ve směru basolaterálně-apikálním (BA) (Obr. 7).



**Obr.7.** Transepiteliální transport antiepileptik přes MDCKII-MRP2. Byly testovány CBZ (A.), PRM (B.), VPA (C.) a ETS (D.) při koncentracích zvýrazněných v obrázku. Transport sledovaných látek přes monovrstvu polarizovaných MDCKII-MRP2 buněk byl studován v apikálně-basolaterálním směru (AB) a basolaterálně–apikálním směru (BA). V čase  $t = 0$  byly roztoky přidány do příslušného kompartmentu a po čtyřech hodinách inkubace byla v kompartmentu na druhé straně monovrstvy měřena výsledná koncentrace látek (A-D). Výsledky jsou uvedeny v procentech. Procenta byla vypočítána jako poměr naměřené koncentrace ke koncentraci zásobních roztoků antiepileptik a jsou prezentována jako průměry  $\pm$ SD,  $n \geq 3$ .

### 4.1.3 Transportní experiment s radioaktivně značeným valproátem

Pro ověření předchozích výsledků transportu VPA, dříve popsáno substrátu MRP2[16, 19], přes monovrstvu MDCKII-MRP2, byl s cílem dosáhnout vyšší citlivosti použit radioaktivně značený [ $^{14}\text{C}$ ]VPA ( $2\mu\text{M}$ ). Experiment byl proveden jak s MK-571 ( $5\mu\text{M}$ ), popsáným inhibitorem MRP2, tak i bez jeho přítomnosti. Nebyla pozorována žádná signifikantní asymetrie v transportu VPA přes MDCKII-MRP2 monovrstvu (Obr.8).



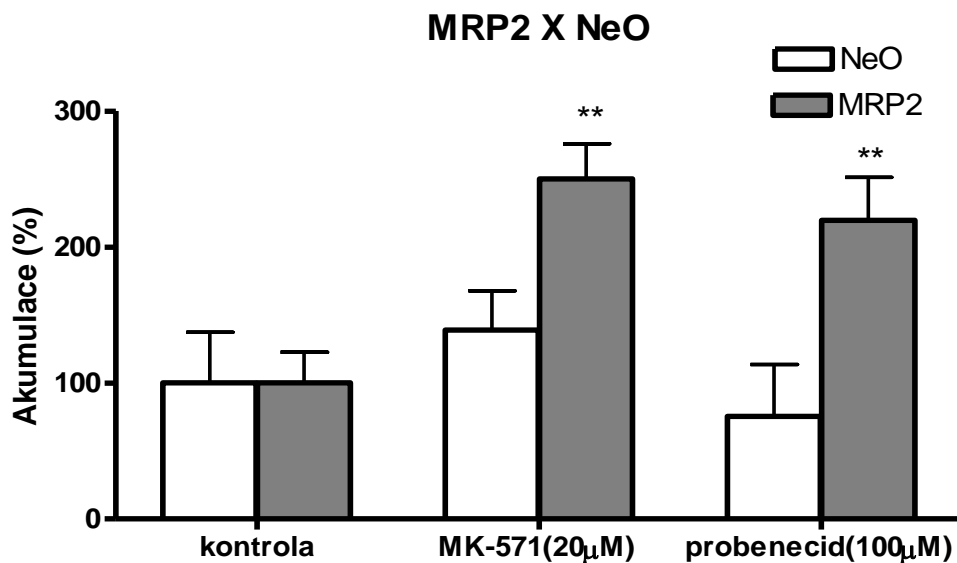
**Obr.8.** Transepiteliální transport VPA ( $2\mu\text{M}$ ) bez užití inhibitoru MRP2 (A.) a s užitím MK571 ( $5\mu\text{M}$ ) (B.) přes monovrstvu tvořenou MDCKII-MRP2 buňkami. Transport VPA přes monovrstvu polarizovaných buněk byl studován v apikálně-basolaterálním směru (AB) a basolaterálně–apikálním směru (BA). V čase  $t = 0$  byl roztok radioaktivně značeného VPA přidán do příslušného kompartmentu, a posléze byly každou hodinu z druhého kompartmentu odebírány  $50\mu\text{l}$  aliquoty a byla měřena radioaktivita. Po 4 hodinách byl experiment ukončen. Výsledky jsou uvedeny v procentech. Procenta byla vypočítána jako poměr naměřené radioaktivity jednotlivých vzorků k radioaktivitě zásobního roztoku VPA a jsou prezentována jako průměr  $\pm\text{SD}$ ,  $n\geq 3$ .

## 4.2 Akumulační zkoušky

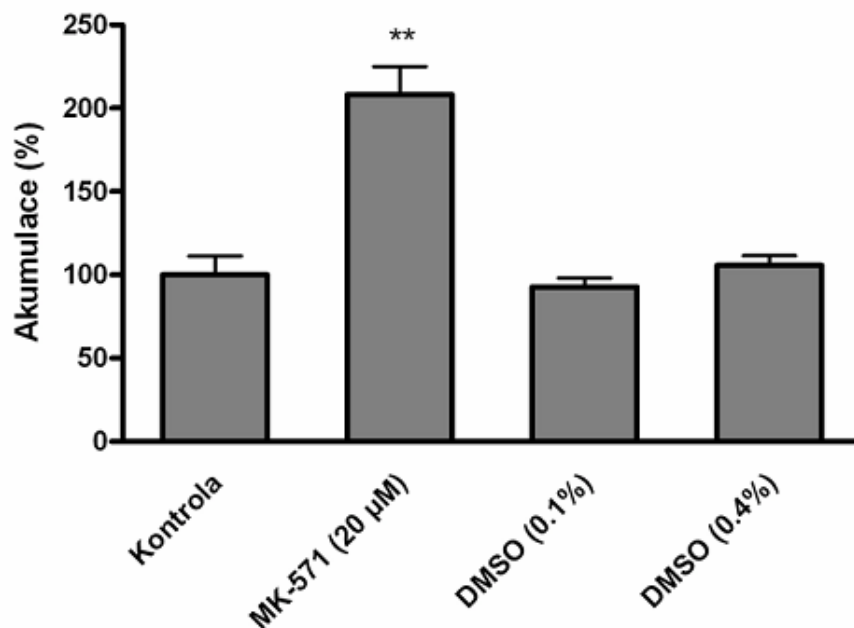
### 4.2.1 Validace metody

MK-571 a probenecid, známé inhibitory MRP2 transportéru, vykazovaly v buněčné linii MDCKII-MRP2 signifikantní inhibiční aktivitu MRP2-zprostředkovaného transportu kalceinu, zatímco v MDCKII-NeO buňkách nebyla pozorována signifikantní inhibice transportu tohoto fluorescenčního substrátu (Obr.9).

Při zavádění metody byl také proveden akumulací experiment s DMSO, který byl používán pro přípravu roztoků testovaných antiepileptik, aby byl vyloučen jakýkoliv vliv tohoto rozpouštědla na inhibiční aktivitu MRP2-řízeného transportu fluorescenčního substrátu kalceinu. DMSO byl testován ve dvou různých koncentracích (viz Obr.10).



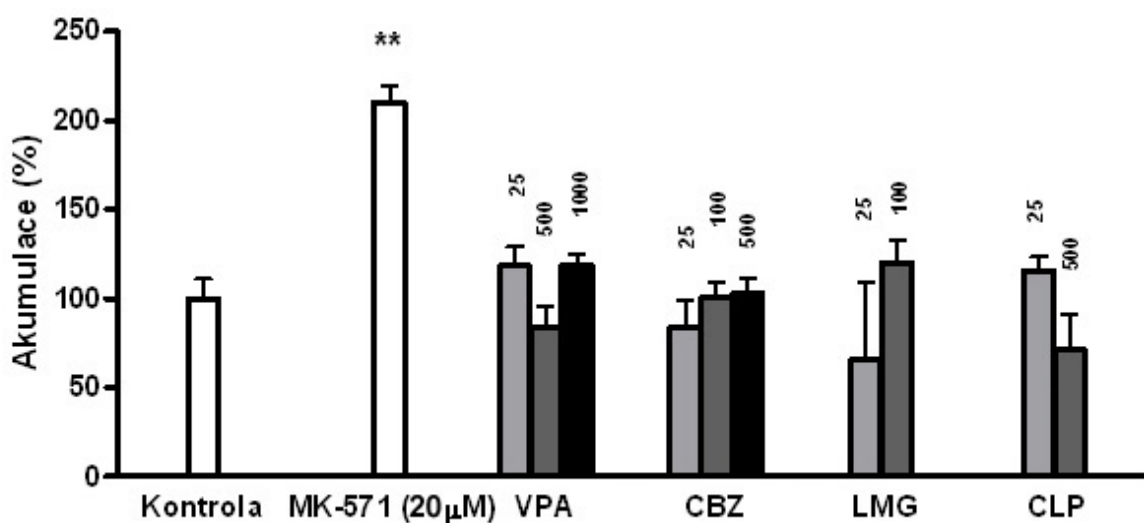
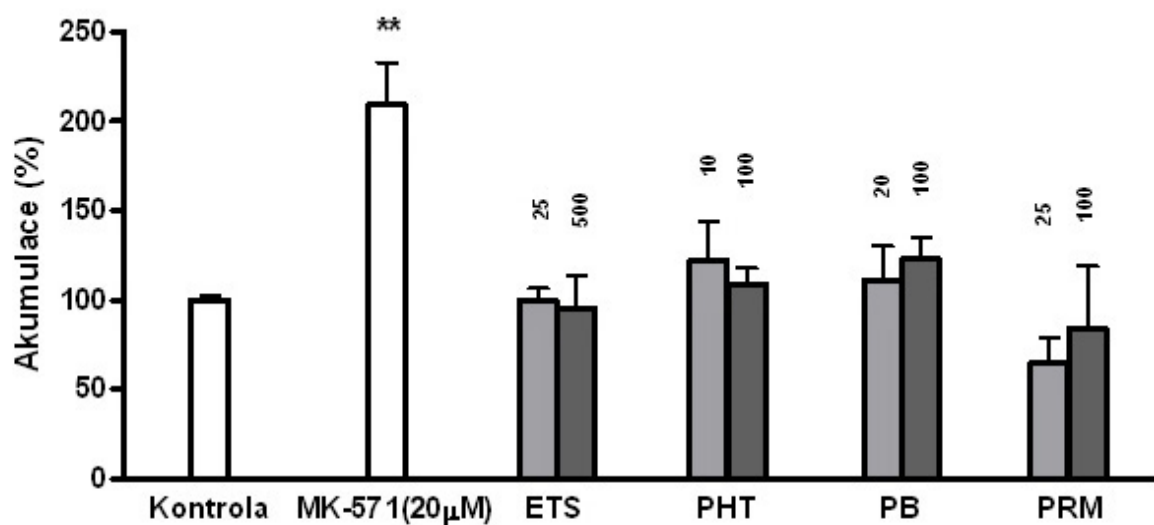
**Obr.9.** Srovnání efektu známých inhibitorů MRP2 transportéru MK-571 a probenecidu na MRP2 zprostředkovaný transport kalceinu (2 $\mu$ M) v MDCKII-NeO a transfekovaných MDCKII-MRP2 buňkách. Buňky byly nejprve 30 min inkubovány s kalceinem-AM a poté 2 hodiny kultivovány bez a v přítomnosti inhibitorů v koncentracích vyznačených na obrázku. Eflux kalceinu byl ukončen důkladným omytím buněk studeným PBS. Buňky byly poté lyzovány a v buněčném lyzátu byla na základě fluorescence detekována relativní buněčná akumulace kalceinu (%). Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , \*\* $p < 0.005$ .



**Obr.10.** Vliv rozpouštědla DMSO na aktivitu MRP2-řízeného transportu kalceinu. MDCKII-MRP2 buňky byly nejprve 30 min inkubovány s kalceinem-AM a poté 2 hodiny kultivovány bez inhibitoru, v přítomnosti inhibitoru nebo DMSO v koncentracích vyznačených na obrázku. Eflux kalceinu byl ukončen důkladným omytím buněk studeným PBS. Jako pozitivní kontrola byl použit popsáný inhibitor MRP2, MK-571. Buňky byly poté lyzovány a v buněčném lyzátu byla na základě fluorescence detekována relativní buněčná akumulace kalceinu (%). Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , \*\*  $p < 0.005$ .

#### 4.2.2 Akumulační zkoušky u vybraných antiepileptik

V akumulačních studiích nebyla pozorována žádná statisticky signifikantní, testovanými antiepileptiky podmíněná inhibice MRP2-zprostředkovaného transportu modelového fluorescenčního substrátu (Obr.11). Akumulace kalceinu byla v testovaných vzorcích srovnatelná s fluorescencí kontrolních buněk. MK-571 (20 $\mu$ M), inhibitor MRP2, který byl použit jako validátor metody, zvýšil akumulaci kalceinu v buňkách přibližně dvakrát ( $p < 0.005$ ).



**Obr.11.** Vliv testovaných antiepileptik na MRP2 řízený eflux fluorescenčního substrátu kalceinu v MDCKII-MRP2 buněčné linii. Testované koncentrace antiepileptik a inhibitorů jsou uvedeny v  $\mu\text{M}$ , kromě hodnoty 500 v případě CLP, která je prezentována v nM. MK-571 je popsáným inhibitorem MRP2 a v naší studii byl použit jako pozitivní kontrola pro ověření funkčnosti metody. Buňky byly 30 min kultivovány v přítomnosti kalceinu-AM ( $2 \mu\text{M}$ ). Poté byly buňky důkladně omyty studeným PBS. Eflux do bezsérového média probíhal dvě hodiny. Poté byla měřena fluorescence zůstatkového kalceinu v buňkách. Výsledky jsou uvedeny jako relativní buněčná akumulace (%), která je vztažena ke kontrolním buňkám (100 %). Data jsou prezentována jako  $\pm\text{SD}$ ,  $n \geq 3$ ,  $**p < 0,005$ .

## 5. DISKUZE

Efluxní membránové transportéry, tj. transportéry „pumpující“ substráty ven z buněk za současného štěpení ATP (ABC transportéry), do značné míry ovlivňují osud mnoha léčiv v organismu – od absorpce, přes distribuci až po eliminaci. Kromě toho se ukazuje, že některé efluxní transportéry tvoří aktivní složku řady tělesných bariér a chrání tak citlivé tkáně jako např. mozek nebo plod před toxickým vlivem xenobiotik. Z těchto důvodů se membránové efluxní transportéry staly v posledním desetiletí intenzivně sledovaným fenoménem, jehož studium nemá jen teoretický význam, ale stále častěji se promítá i do klinické farmakologie, farmakoterapie a lékových interakcí.

Jedním ze závažných klinických problémů, jehož pravděpodobnou příčinou by mohla být mj. up-regulace a ektopická exprese jmenovaných ABC transportérů, je farmakorezistentní epilepsie. Farmakorezistentní epilepsie, vyskytující se přibližně u 30 % postižených epilepsií, představuje vážný klinický problém, který je spojený s vysilujícími psychosociálními potížemi a se zvýšeným rizikem smrti pacienta [58]. Podstatou hypotézy, že některé ABC transportéry zapříčiňují farmakorezistentní formy epilepsie (tzv. refrakterní epilepsii), je fakt, že většina epileptiků je rezistentní k téměř všem klinicky používaným antiepileptikům [47]. Tento fakt popírá teorii patologických změn specifických vazebných míst pro antiepileptika a podporuje teorii, že se jedná o nespecifický, pravděpodobně adaptabilní mechanismus jako je snížený up-take antiepileptik do mozku. Další výzkum podpořil teorii o účasti ABC transportérů ve vzniku refrakterní epilepsie tím, že byla nalezena zvýšená exprese některých efluxních transportérů, jako je P-gp, MRP2 a BCRP v endoteliálních buňkách epileptogenních mozkových nádorů a v hematoencefalické bariéře pacientů s refrakterní epilepsií [12, 47].

Předmětem naší studie se stal MRP2 transportér, o jehož interakcích s antiepileptiky nejsou v literatuře dostupná téměř žádná data. Rozhodli jsme se testovat substrátovou afinitu a inhibiční potenciál antiepileptik k MRP2.

K testování substrátové afinity vybraných antiepileptik k MRP2 jsme použili citlivé *in vitro* transportní zkoušky provedené na epiteliálních monovrstvách buněk kultivovaných na mikroporózních membránových filtrech. Pro tento účel byly použity polarizované MDCKII buňky transfekované cDNA lidského MRP2 a jako kontrolní MDCKII-NeO buněčné linie, kde je vlastní exprese MRP2 utlumena. Transportní zkoušky s testovanými antiepileptiky byly provedeny na obou buněčných liniích, aby tak byla charakterizována specifická účast MRP2 v transepiteliálním transportu testovaných látek. Pokud látka není substrátem testovaného



transportéru, je její transport přes transportérem transfekovanou buněčnou linii velmi podobný v obou směrech (AB a BA). Navíc je výsledný transport rovnocenný v MDCKII-NeO i v MDCKII-MRP2 buněčné linii. Naopak pokud je daná látka substrátem MRP2 transportéru, je transport v MDCKII-MRP2 buněčné linii výrazně urychlen v jednom směru (BA) a zpomalen ve směru opačném (AB), zatímco v MDCKII-NeO nemůžeme pozorovat žádnou asymetrii v transportu. V naší studii jsme testovali vybraná antiepileptika v jedné, popřípadě dvou různých koncentracích, které odpovídaly terapeutické koncentraci v krvi pacientů s refrakterní epilepsií. Nepozorovali jsme žádnou signifikantní asymetrii v transportu antiepileptik přes MDCKII-MRP2 ani přes MDCKII-NeO buněčné monovrstvy (viz Obr.7, data pro MDCKII-NeO zde nejsou prezentována). Tato zjištění dokazují, že testovaná antiepileptika nejsou substráty MRP2 transportéru. Ke stejnému závěru současně dospěl v případě valproátu a karbamazepinu také kolektiv vědců Baltes a spol., který data na počátku roku 2007 publikoval [59, 60].

Antiepileptika jsou také spojována s klinicky důležitými lékovými interakcemi, které často ovlivňují bezpečnost a efektivitu farmakoterapie u pacientů s epilepsií [13, 61]. Oblast interakce antiepileptik s ABC transportéry na úrovni jejich funkční inhibice, popř. indukce zůstává však stále relativně neprozkoumána.

Náš výzkum se soustředil na určení potenciálního inhibičního efektu antiepileptik na MRP2-řízený transport pomocí akumulčních experimentů, které spočívají v detekci známého fluorescenčního substrátu MRP2 kalceinu [49, 50] v buněčném lyzátu. Zaměřili jsme se na testování inhibičního potenciálu antiepileptik v koncentracích, které odpovídají celkové plazmatické koncentraci. Pouze CLP byl testován v koncentracích vyšších než je normální terapeutická koncentrace v krvi. V rámci našich akumulčních experimentů jsme nezaznamenali žádný efekt testovaných antiepileptik na akumulaci substrátu MRP2 kalceinu (Obr.11).

V souhrnu se tedy domníváme, že zvýšená exprese MRP2 transportéru v hematoencefalické bariéře se nepodílí na rozvoji vícečetné lékové rezistence k testovaným antiepileptikům a na základě výsledků akumulčních zkoušek se domníváme, že testovaná antiepileptika v normálních terapeutických plazmatických koncentracích neovlivňují prostřednictvím inhibice MRP2-řízený transport substrátů tohoto transportéru jak v HEB, tak i v jiných tkáních exprimujících MRP2 jako je placenta, střevo a játra.

## 6. ZÁVĚR

Na základě našich *in vitro* dat jsme prokázali, že testovaná antiepileptika nejsou substrátem ani inhibitorem MRP2 transportéru. Z toho vyplývá, že se zvýšená exprese MRP2 v hematoencefalické bariéře refrakterních epileptiků pravděpodobně nepodílí na vzniku či rozvoji refrakterní epilepsie, a že testovaná antiepileptika v normálních plazmatických koncentracích neovlivňují prostřednictvím inhibice MRP2 farmakokinetiku substrátů tohoto transportéru.

## 7. LITERATURA

1. Borst, P. and R.O. Elferink, *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 537-92.
2. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
3. Stefkova, J., R. Poledne, and J.A. Hubacek, *ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases*. Physiol Res, 2004. **53**(3): p. 235-43.
4. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
5. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
6. Hyde, S.C., et al., *Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport*. Nature, 1990. **346**(6282): p. 362-5.
7. Broccardo, C., M. Luciani, and G. Chimini, *The ABCA subclass of mammalian transporters*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 395-404.
8. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(1): p. 3-29.
9. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(16): p. 1295-302.
10. Gottesman, M.M. and S.V. Ambudkar, *Overview: ABC transporters and human disease*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(6): p. 453-8.
11. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
12. Aronica, E., et al., *Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain*. Epilepsia, 2005. **46**(6): p. 849-57.
13. Cervený, L., et al., *Lack of interactions between breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) and selected antiepileptic agents*. Epilepsia, 2006. **47**(3): p. 461-8.
14. Cooray, H.C., et al., *Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain*. Neuroreport, 2002. **13**(16): p. 2059-63.
15. Gerk, P.M. and M. Vore, *Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 407-15.
16. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **306**(1): p. 124-31.
17. Schaub, T.P., et al., *Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(6): p. 1159-69.
18. St-Pierre, M.V., et al., *Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1495-503.
19. Huai-Yun, H., et al., *Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(3): p. 816-20.

20. Miller, D.S., et al., *Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1357-67.
21. Bakos, E., et al., *Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(4): p. 760-8.
22. Homolya, L., A. Varadi, and B. Sarkadi, *Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate*. Biofactors, 2003. **17**(1-4): p. 103-14.
23. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2*. Semin Liver Dis, 1998. **18**(4): p. 359-76.
24. Jedlitschky, G., et al., *ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2*. Biochem J, 1997. **327** ( Pt 1): p. 305-10.
25. Konig, J., et al., *Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 377-94.
26. Kusuhara, H. and Y. Sugiyama, *Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney*. J Control Release, 2002. **78**(1-3): p. 43-54.
27. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *Transporters for bile acids and organic anions*. Pharm Biotechnol, 1999. **12**: p. 387-439.
28. Van Aubel, R.A., et al., *Mechanisms and interaction of vinblastine and reduced glutathione transport in membrane vesicles by the rabbit multidrug resistance protein Mrp2 expressed in insect cells*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(4): p. 714-9.
29. Berger, V., et al., *Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2)*. Toxicol Lett, 2003. **140-141**: p. 465-76.
30. Vaidyanathan, J.B. and T. Walle, *Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(2): p. 745-52.
31. Vaidyanathan, J.B. and T. Walle, *Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2*. Pharm Res, 2001. **18**(10): p. 1420-5.
32. Aleo, M.F., et al., *Endogenous thiols and MRP transporters contribute to Hg<sup>2+</sup> efflux in HgCl<sub>2</sub>-treated tubular MDCK cells*. Toxicology, 2005. **206**(1): p. 137-51.
33. Toh, S., et al., *Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(3): p. 739-46.
34. Wada, M., et al., *Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 203-7.
35. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats*. Epilepsia, 2003. **44**(12): p. 1479-86.
36. Begley, D.J., *Understanding and circumventing the blood-brain barrier*. Acta Paediatr Suppl, 2003. **92**(443): p. 83-91.
37. Golden, P.L. and G.M. Pollack, *Blood-brain barrier efflux transport*. J Pharm Sci, 2003. **92**(9): p. 1739-53.
38. Loscher, W. and H. Potschka, *Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family*. NeuroRx, 2005. **2**(1): p. 86-98.

39. Loscher, W., and H. Potschka, *Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **301**(1): p. 7-14.
40. Cordon-Cardo, C., et al., *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 695-8.
41. Schinkel, A.H., *P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **36**(2-3): p. 179-194.
42. Zhang, Y., et al., *Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(2): p. 449-55.
43. Potschka, H. and W. Loscher, *In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats*. Epilepsia, 2001. **42**(10): p. 1231-40.
44. van Vliet, E.A., et al., *Region specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2007.
45. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats*. Neurosci Lett, 2002. **327**(3): p. 173-6.
46. Regesta, G. and P. Tanganelli, *Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies*. Epilepsy Res, 1999. **34**(2-3): p. 109-22.
47. Sisodiya, S.M., *Mechanisms of antiepileptic drug resistance*. Curr Opin Neurol, 2003. **16**(2): p. 197-201.
48. Potschka, H., M. Fedrowitz, and W. Loscher, *P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain*. Neuroreport, 2001. **12**(16): p. 3557-60.
49. Feller, N., et al., *ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion*. FEBS Lett, 1995. **368**(2): p. 385-8.
50. Legrand, O., et al., *Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4480-8.
51. Zhang, Y., C. Bachmeier, and D.W. Miller, *In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(1): p. 31-51.
52. Evers, R., et al., *Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1310-9.
53. Weiss, J., et al., *Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 262-7.
54. Gekeler, V., et al., *The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(1): p. 345-52.
55. Shen, H., et al., *Cellular and in vitro transport of glutathione conjugates by MRP*. Biochemistry, 1996. **35**(18): p. 5719-25.
56. Horikawa, M., et al., *The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites*. Drug Metab Pharmacokinet, 2002. **17**(1): p. 23-33.
57. Huisman, M.T., et al., *MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid*. Int J Cancer, 2005. **116**(5): p. 824-9.

58. Siddiqui, A., et al., *Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1*. N Engl J Med, 2003. **348**(15): p. 1442-8.
59. Baltes, S., et al., *Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 331-43.
60. Baltes, S., et al., *Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein*. Neuropharmacology, 2007. **52**(2): p. 333-46.
61. Tanaka, E., *Clinically significant pharmacokinetic drug interactions between antiepileptic drugs*. J Clin Pharm Ther, 1999. **24**(2): p. 87-92.