

VII.
SOUHRN / SUMMARY

Membránové transportéry mají vedle enzymů podstatný vliv na pohyb léčiva v organismu. Spektrum a míra exprese transportérů a jejich lokalizace na cytoplazmatických membránách buněk pak ovlivňuje průběh základních farmakokinetických dějů absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece léčiva.

Tématicky je možno původní práce, které jsou součástí této dizertace, rozdělit do dvou oblastí podle orgánů, jejichž transportní procesy byly studovány. První čtyři původní práce se zabývají expresí, lokalizací a funkční aktivitou efluxních transportérů P-gp a BCRP, v lidské a potkaní placentě a v buněčné linii BeWo odvozené od placentárního choriokarcinomu. V poslední práci byly studovány transportéry, které jsou zapojeny do vychytávání MRI diagnostické látky B22956/1 v buněčných liniích HepG2 a Chang Liver používané jako modely pro studium jaterního transportu.

V první práci byla potvrzena funkční exprese P-gp (*Abcb1*) v placentě potkana na konci březosti. V této studii byla pomocí duální perfúze potkana *in situ* prokázána funkce P-gp v omezení přestupu léčiv do plodu a dále jeho schopnost aktivně pumpovat své substráty z krve plodu zpět do cirkulace matky.

Protože však nebylo zřejmé, zda je P-gp přítomen (a může tak plnit svou ochrannou roli) v placentě po celou dobu březosti experimentálního zvířete a zda se jeho exprese v průběhu dozrávání placenty mění, byla v návaznosti na předchozí studii zkoumána přítomnost P-gp v placentě v průběhu březosti potkana. Na mRNA úrovni byla exprese obou genů kódujících potkaní P-gp, *Abcb1a* a *Abcb1b*, studována pomocí relativní kvantifikace metodou real-time RT-PCR a vztahena k expresi housekeepingového genu beta-2-mikroglobulinu. Pomocí Western-blottingu byl pak P-gp detekován rovněž na proteinové úrovni. Imunohistochemická metoda byla použita pro sledování exprese a především lokalizace P-gp v placentě v průběhu březosti potkana.

Naše studie prokázala přítomnost mRNA transkriptů obou genů kódujících P-gp již v 11. dni gestace. V této době již končí vývoj chorioallantoické placenty potkana a placenta začíná plnit svoji transportní funkci. Během dalšího dozrávání placenty se exprese obou genů dále zvyšovala. Pomocí Western-blottingu byl P-gp detekován od 13. až do konečného 22. dne březosti potkana. Imunohistochemická analýza potvrdila přítomnost placentárního P-gp již ve 13. dni březosti, kdy byl P-gp lokalizován ve vyvíjející se labyrintové zóně placenty. Od 15. dne až do konce březosti byla již imunopozitivita pro P-gp pozorována ve vrstvě trofoblastu. Naše data tak naznačují, že P-gp je přítomen v trofoblastu placenty brzy po jejím vzniku a může tak pravděpodobně plnit svou úlohu v transplacentární farmakokinetice po celou dobu březosti potkana.

V naší další práci jsme se zaměřili na studium teprve nedávno objeveného lékového efluxního transportéru BCRP kódovaného genem *ABCG2*. Jeho lokalizace a funkční exprese byla sledována na placentární linii BeWo, která je používána jako *in vitro* model trofoblastu. Na úrovni mRNA transkriptů pro BCRP jsme prokázali výraznou endogenní expresi tohoto transportéru v BeWo buňkách, stejně jako v lidské terminální placentě. Přítomnost BCRP byla dále potvrzena na proteinové úrovni v BeWo buněčné linii i v lidské placentě imunodetekcí pomocí Western blottingu s použitím monoklonální protilátky BXP-21. Funkční akumulární studie prokázala významnou aktivitu BCRP v odčerpávání svých substrátů ven z buněk. Pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie jsme dále studovali subcelulární lokalizaci BCRP v BeWo buňkách. Lokalizace tohoto transportéru byla patrná především na mikrovilózní apikální membráně, která odpovídala té straně vrstvy trofoblastu, jež je v přímém kontaktu s mateřskou krví. Protože BeWo buňky představují model trofoblastu, zdá se být pravděpodobné, že BCRP je schopen odčerpávat své substráty ve fetomaternálním směru ven z buněk této vrstvy. Imunohistochemická lokalizace BCRP v lidské placentě potvrdila výraznou expresi BCRP právě ve vrstvě trofoblastu, přestože imunopozitivita pro BCRP byla patrná i v endotelových buňkách fetálních cév. Uvedená data tak naznačují, že BCRP, podobně jako P-gp, pumpuje léčiva a xenobiotika zpět do krevního oběhu matky a pravděpodobně tak poskytuje ochranu plodu před potenciálně toxickým účinkem těchto látek. Uvedené poznatky získané *in vitro* jsme posléze sledovali na *in situ* perfundované placentě potkana, kdy jsme funkční aktivitu placentárního BCRP prokázali pomocí modelového substrátu cimetidinu.

Na transkripční úrovni jsme dále pomocí absolutní kvantifikace porovnávali hladiny exprese genů pro BCRP (*ABCG2*) a P-gp (*ABCB1*) v lidské placentě. Počet transkriptů *ABCG2* více než desetinásobně převyšoval počet transkriptů *ABCB1*. Na základě těchto výsledků se domníváme, že BCRP je přinejmenším stejně důležitým, ne-li důležitějším lékovým transportérem v placentě jako P-gp.

Cílem poslední práce, která byla vypracována na základě mezinárodní spolupráce mezi Centro studi fegato, University of Trieste a Farmaceutickou fakultou, bylo studium molekulárních mechanismů jaterního transportu diagnostika B22956/1 pro magnetickou rezonanci na jaterních buněčných modelech. B22956/1 je nová kontrastní látka pro magnetickou rezonanci, která vykazuje značnou biliární exkreci a proto se zdá být vhodnou látkou pro hepatobiliární zobrazení. Její transportní vlastnosti jsme srovnávali

s taurocholátem, jako typickým zástupcem endogenních látek, které podléhají biliární exkreci.

Kinetika transportu byla sledována pomocí vychytávacích („uptake“) experimentů na buněčných liniích Chang Liver a HepG2, které jsou považovány za *in vitro* buněčné modely nenádorových a nádorových jaterních buněk. Tyto pokusy nám ukázaly, že transportní parametry taurocholátu byly velmi podobné v obou buněčných liniích, zatímco B22956/1 je vychytáván 3,5 krát účinněji do Chang Liver buněk než do HepG2 buněk.

V obou buňkách byla pozorována inhibice vychytávání B22956/1 v přítomnosti cholecystokininu-8 (CCK8), specifického inhibitoru transportéru OATP-8 (SLCO1B3), ačkoli tento efekt byl u HepG2 buněk patrný pouze při nízké koncentraci B22956/1. Inhibiční studie dále ukázaly, že transport B22956/1 do Chang Liver buněk je inhibován taurocholátem i bromsulfoftaleinem n rozdíl od transportu v HepG2 buňkách, na které tyto inhibitory neměly vliv.

Vzhledem k tomu, že není známo, jaké transportéry se podílí na vychytávání B22956/1, provedli jsme absolutní kvantitativní real-time RT-PCR analýzu exprese genů pro transportéry OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E, OATP-8, OAT2, OAT3, OCT1, NTCP, PEPT-1, PEPT-2 v liniích HepG2 a Chang Liver a ve zdravé jaterní tkáni. Výsledky ukázaly, že ve srovnání s jaterní tkání byla v HepG2 buňkách snížena exprese transportérů OATP-C (*SLC1B1*), OATP-D (*SLCO3A1*) a OATP-8 (*SLCO1B3*), zatímco exprese OATP-B (*SLCO2B1*), OAT2 (*SLC22A7*) a OAT3 (*SLC22A8*) byla podobná nebo zvýšená. Naopak v Chang Liver buňkách transkripty OAT2 (*SLC22A7*) a OAT3 (*SLC22A8*) detekovány vůbec a hladina OATP-D (*SLCO3A1*), OATP-E (*SLCO4A1*) a OATP-8 (*SLCO1B3*) byla podobná jako v játrech.

Z výsledků inhibičních experimentů usuzujeme, že OATP-8 (*SLCO1B3*) lze pokládat za transportér, který se podílí z velké většiny na vychytávání B22956/1. V Chang liver buňkách by dále mohly být do vychytávání zapojeny transportéry OATP-D (*SLCO3A1*) a OATP-E (*SLCO4A1*), avšak s mnohem menší afinitou. Z výsledků na HepG2 buňkách je vidět, že OATP-8 se podílí na transportu i přes jeho nízkou expresi a že do transportu by mohly být zapojeny i OATP-B (*SLCO2B1*) a OAT2 (*SLC22A7*). Vzhledem k tomu, že OATP-8 (*SLCO1B3*) je transportér exprimovaný výhradně v játrech a jeho exprese je značně potlačena v jaterních nádorech, dalo by se očekávat, že kontrastní látka B22956/1 bude akumulována v jaterních nádorech méně a proto by mohla být užitečným diagnostikem pro rozlišení nádorové a zdravé jaterní tkáně.