

Annika Hafkemeyer<sup>1</sup>, Vincent Rönnpagel<sup>1</sup>, Felix Morof<sup>1</sup>, Jörn Lange<sup>2</sup>, Lyubomir Haralambiev<sup>2</sup>, Heinrich Brinkmeier<sup>3</sup>, Mladen V. Tzvetkov<sup>1</sup>, Gabriele Jedlitschky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Pharmakologie, <sup>2</sup>Klinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und Rehabilitative Medizin, <sup>3</sup>Institut für Pathophysiologie, Universitätsmedizin Greifswald

## Problem

- Hintergrund:** Statine dienen der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen, indem sie die HMG-CoA-Reduktase hemmen und so die Cholesterinspiegel im Blut senken. Muskelschmerzen sind häufige Nebenwirkungen der Statine. Entscheidend für die Entstehung dieser Myalgien ist die Menge der Statin-Aufnahme in die Hepatozyten, die verbleibende systemische Konzentration im Blut und die Aufnahme und Akkumulation der Statine in den Myozyten.<sup>1</sup> Nur wenig ist darüber bekannt, wie Statine in und aus den Myozyten –also dem Entstehungsort der Nebenwirkungen– transportiert werden, während die Transporter auf den Hepatozyten bereits gut beschrieben wurden.<sup>2</sup>
- Ziel:** In diesem Projekt soll untersucht werden, wie Statine in die Myozyten aufgenommen werden und ob dies die Entstehung der Myotoxizität und folglich der Myalgien beeinflusst.

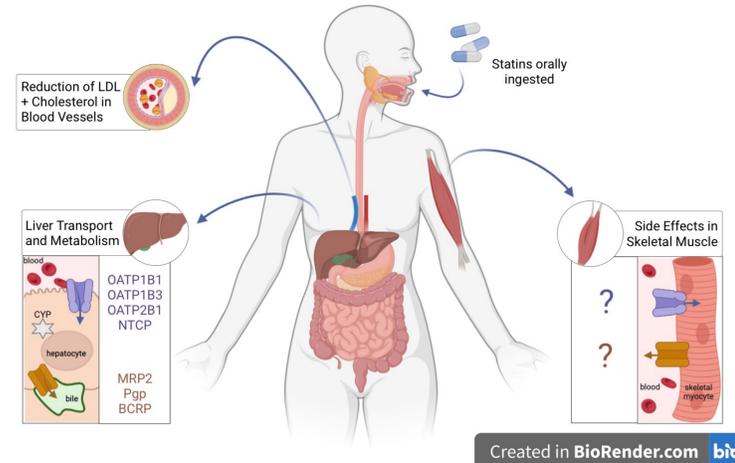


Abb. 1. Schema über die pharmakologisch relevanten Wirkorte der Statine und ihre (un-)bekannten Transporter in Hepato- und Myozyten

## Methoden

- Die Expression der Aufnahme- und Effluxtransporter wurde in der humanen Rhabdomyosarkomzelllinie TE671 (in undifferenzierter und differenzierter Form) mittels RT-qPCR und Westernblot auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. Die Transporterexpression der Zellen wurde mit humanem Muskelgewebe (M. gracilis, M. semitendinosus) verglichen. Die Lokalisation der Transporter wurde durch Immunfluoreszenz dargestellt.
- Die Myotoxizität der Statine wurde mittels Resazurin-Viabilitätsassays in TE671-Zellen untersucht.
- Die Akkumulation der Statine in den Myozyten wurde in Transportassays gemessen. Um gezielt die Aufnahme über relevante Transporter zu unterbinden, wurden Inhibitoren eingesetzt (4',5'-Dibromfluorescein (DBF) für OATP2B1, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) für OATP2A1, Lactat für MCT4).

## Ergebnisse

### Expression relevanter Transporter in TE671-Zellen auf mRNA- und Proteinebene

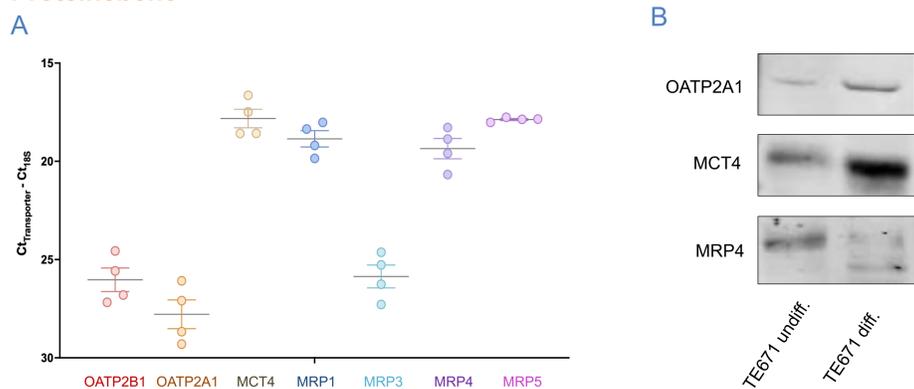


Abb. 2. (A) Überblick der Ct-Werte von Aufnahme- (OATPs, MCT4) und Efflux- (MRPs) Transportern in TE671. mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. (normalisiert auf 18S rRNA, mean  $\pm$  SEM, n = 4) (B) Darstellung der Proteinexpression ausgewählter Transporter in undifferenzierten und differenzierten TE671 im Westernblot. Die Transporterexpression verändert sich während der Differenzierung.

### Lokalisation von Aufnahmetransportern, z.B. MCT4 in TE671-Zellen und humanem Muskelgewebe

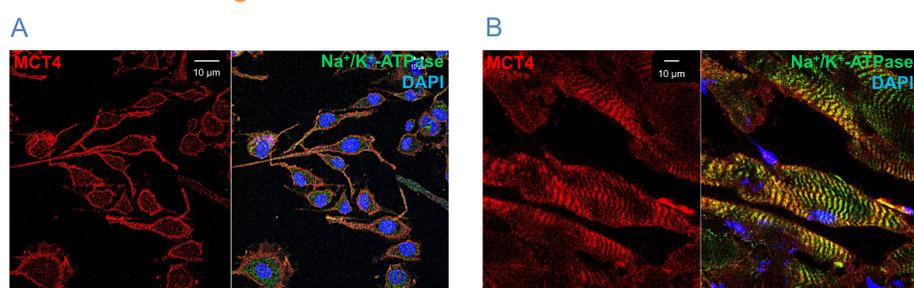


Abb. 3. MCT4 (rot) befindet sich in der Zellmembran von (A) TE671-Myozyten und (B) humanem Muskelgewebe. Kofärbung mit der membranständigen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (grün) bestätigt dies. (A) 400x Vergrößerung (B) 630x Vergrößerung, Längsanschnitt

## Schlussfolgerungen

- Im TE671-Modell unterscheidet sich die Myotoxizität der untersuchten Statine.
- Dementsprechend variiert auch die Aufnahme der Statine in die Zellen. Der Transport der lipophilen Statine in die Zellen ist sättigbar.
- Die Effizienz der Aufnahme korreliert mit der Toxizität der Statine.
- Transportversuche mit Inhibitoren lassen vermuten, dass mehrere Transporter in unterschiedlichem Ausmaß an der Aufnahme der Statine beteiligt sind, z.B. OATP2B1, OATP2A1 und MCT4.

### Myotoxizität der Statine in TE671-Zellen

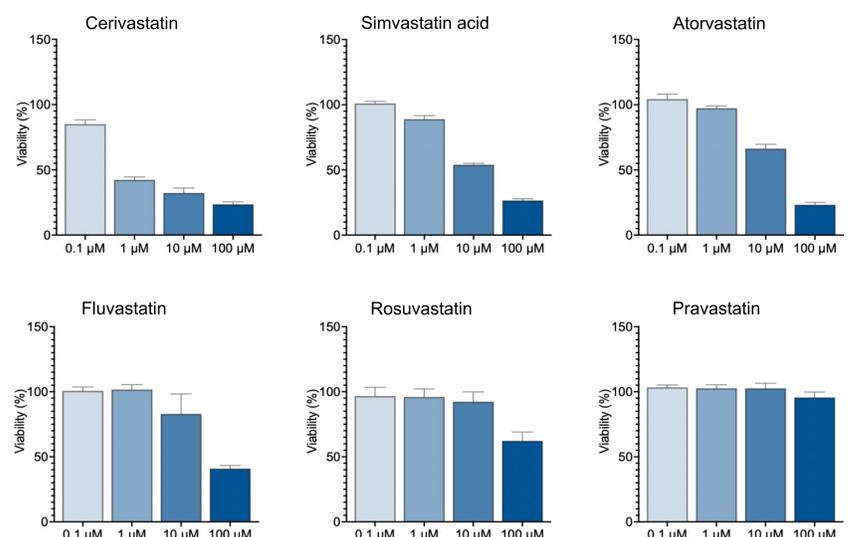


Abb. 4. Reduktion der Viabilität nach 48h-Inkubation der TE671-Zellen mit Statinen. Konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität durch myotoxische Effekte der lipophilen Statine (Cerva-, Simva-, Atorva-, Fluvastatin). Cerivastatin ist am toxischsten. Die eher hydrophilen Statine (Rosuva-, Pravastatin) zeigten kaum toxische Effekte auf die Myozyten. (mean  $\pm$  SEM, n = 3)

### Konzentrationsabhängige Akkumulation der Statine in TE671-Zellen und Effekt von Inhibitoren auf die Aufnahme

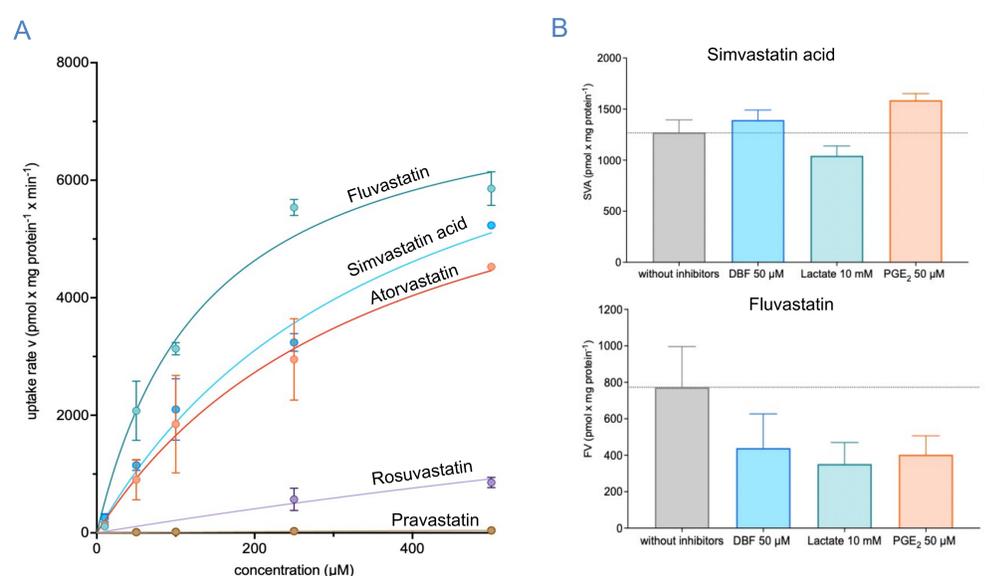


Abb. 5. (A) Konzentrationsabhängige Aufnahme der Statine in TE671-Zellen (B) Intrazelluläre Akkumulation von Statinen bei gleichzeitiger Inhibition der Aufnahme über OATP2B1 durch DBF / MCT4 durch Laktat / OATP2A1 durch PGE<sub>2</sub> (mean  $\pm$  SEM, n = 3-4)