

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Vliv vitamínu D na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* v tkáňových řezech z lidského střeva

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Tereza Mazurová

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu této diplomové práce PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D., za odborné vedení, čas, trpělivost, připomínky a cenné rady. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Huličiakovi za pomoc v experimentální části práce, za odborné rady a ochotu.

Dále bych chtěla poděkovat Grantové agentuře Univerzity Karlovy (grant č.: GAUK 364521) za finanční podporu tohoto výzkumu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Tereza Mazurová

Školitel: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv vitamínu D na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* v tkáňových řezech z lidského střeva

Při perorálním podání léčiv je jejich absorpce významně ovlivněna intestinální střevní bariérou. Tato bariéra exprimuje celou řadu efluxních a uptake transportérů, ale také biotransformační enzymy první a druhé fáze. Za nejvýznamnější efluxní transportér ve střevní bariéře můžeme považovat P-glykoprotein, který má širokou substrátovou specifitu. Z biotransformačních enzymů první fáze je to pak cytochrom P450 3A4.

Jejich funkce spočívá v ochraně lidského organismu před toxickým působením xenobiotik, a to včetně léčiv. Řada klinicky významných léčiv působí ve vztahu k těmto proteinům jako substráty, inhibitory nebo induktory, což může mít za následek zvýšené riziko lékových interakcí.

V lékárně nalezneme nepřeberné množství doplňků stravy nebo léčivých přípravků obsahující vitamin D. Je užíván pro správný vývoj kostí a zubů, pro správnou funkci imunitního systému nebo pro léčbu osteomalacie, křivice či osteoporózy. O jeho působení na expresi *P-gp* a *CYP3A4* v lidském tenkém střevě je dostupné omezené množství informací.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv vitamínu D3 na expresi *P-gp* a *CYP3A4* ve střevní bariéře za využití metody ultratenkých řezů z lidského proximálního jejunu. Jako modelový induktor pro porovnání jsme použili rifampicin 30 μM . V experimentech jsme testovali vitamin D3 o následujících koncentracích: 100 nM, 50 nM. Ze získaných výsledků vyplývá, že vitamin D nemá v použitých koncentracích signifikantní vliv na expresi *P-gp* a *CYP3A4*. U rifampicinu byl podle očekávání potvrzen signifikantní vliv jak na expresi *P-gp*, tak *CYP3A4*.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Tereza Mazurová

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of vitamin D on the expression of *ABCB1* and *CYP3A4* in human intestinal slices

When drugs are administered orally, their absorption is significantly affected by the intestinal barrier. This barrier expresses a variety of efflux and uptake transporters, as well as first and second-phase biotransformation enzymes. The most important efflux transporter in the intestinal barrier is P-glycoprotein, which has a broad substrate specificity. Among the first-phase biotransformation enzymes, cytochrome P450 3A4 is the most important.

Their function is to protect the human body from the toxic effects of xenobiotics, including drugs. Many clinically important drugs act as substrates, inhibitors or inducers in relation to these proteins, which may result in an increased risk of drug interactions.

A plethora of dietary supplements or medicines containing vitamin D can be found in the pharmacy. It is used for the proper development of bones and teeth, for the proper function of the immune system or for the treatment of osteomalacia, rickets or osteoporosis. Limited information is available on its effects on *P-gp* and *CYP3A4* expression in the human small intestine.

The aim of this thesis was to investigate the effect of vitamin D3 on *P-gp* and *CYP3A4* expression in the intestinal barrier using the method of precision cut intestinal slices from human proximal jejunum. We used rifampicin 30 μM as a model inducer. In the experiments we tested vitamin D3 with the following concentrations: 100 nM, 50 nM. The obtained results show that vitamin D3 has no significant effect on *P-gp* and *CYP3A4* expression at the concentrations used. As expected, rifampicin was confirmed to have a significant effect on both *P-gp* and *CYP3A4* expression.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Střevní bariéra.....	4
3.1.1	Transportéry tenkého střeva	5
3.2	Intestinální efluxní transportéry.....	8
3.2.1	ABC transportéry	8
3.3	Cytochrom P450	15
3.3.1	Základní charakteristika	15
3.3.2	Strukturální charakteristika genu <i>CYP3A4</i>	15
3.3.3	Regulace exprese <i>CYP3A4</i>	17
3.4	Vitamin D	21
3.4.1	Základní charakteristika	21
3.4.2	Metabolismus	21
3.4.3	Lékové interakce	23
3.5	Jaderné receptory	25
3.5.1	Klasifikace.....	25
3.5.2	Strukturální charakteristika jaderných receptorů	28
3.5.3	Mechanismus účinku.....	28
3.5.4	Receptor vitaminu D (VDR)	30
3.6	Metody studia indukce léčiv ve střevní bariéře	36
4	CÍL PRÁCE	39
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
5.1	Chemikálie a reagentia, přístroje, biologický materiál	40
5.2	Pracovní postupy	44

5.2.1	Příprava ultratenkých intestinálních řezů	44
5.2.2	Funkční studie s RHD123	45
5.2.3	Inkubace řezů pro stanovení životnosti tkáně	46
5.2.4	Inkubace řezů pro stanovení exprese <i>ABCB1</i> a <i>CYP3A4</i>	46
5.2.4	Stanovení koncentrace RHD123	47
5.2.5	Stanovení koncentrace ATP	47
5.2.6	Stanovení koncentrace proteinu	48
5.2.7	Izolace RNA	48
5.2.8	Reverzní transkripce.....	49
5.2.9	Real-Time PCR	50
5.2.10	Statistická analýza	50
6	VÝSLEDKY	51
6.1	Vliv vitamínu D3 na ATP.....	51
6.2	Vliv vitamínu D3 na expresi <i>CYP3A4</i>	52
6.3	Vliv vitamínu D3 na expresi <i>ABCB1</i>	53
6.4	Vliv vitamínu D3 na expresi <i>VDR</i>	54
6.5	Vliv vitamínu D3 na intracelulární obsah RHD123	55
7	DISKUZE	56
8	ZÁVĚR	59
9	SEZNAM LITERATURY	60

1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
AF – 2	activation function 2
AR	androgenní receptor
BCRP	breast cancer resistance protein, ABCG2
Caco-2	colorectal adenokarcinoma
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CLEM4	constitutive liver enhancer module
COUP-TF	transkripční faktor kuřecího ovalbuminu
CP	CP100356, modelový inhibitor ABCB1 transportéru
CYP	cytochrom P450
DAX 1	receptor DAX 1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1)
DBD	doména vázající DNA
ER	estrogenový receptor
FXR	fanesoidní X receptor
GR	glukokortikoidový receptor
HNF	hepatocytický jaderný faktor 4
HRE	hormon-responzivní element
JNK2	c-Jun NH2-terminal kinase
LBD	doména vázající ligand
LXR	jaterní X receptor
KHB	Krebs-Henseleit pufr
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MRP	multidrug resistance associated protein
NBD	nukleotid-vázající doména

NR	jaderné receptory (nuclear receptor)
NTD	N-terminální doména
OATP	solute carrier organic anion
PCIS	precision-cut intestinal slices
PCR	polymerase chain reaction
PEPT-1	solute carrier peptide transporter
P-gp	P-glykoprotein, ABCB1
PPAR	receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor kyseliny retinové
RIF	rifampicin
RHD123	rhodamin 123
RXR	retinoidní X receptor
SF-1	steroidogenní faktor 1
SHP	receptor nazývaný krátký heterodimerní partner
SLC	solute carrier family
SP1	sphingosine-1-phosphate receptor
TDM	transmembránová doména
TR	receptor hormonu štítné žlázy
VDR	receptor vitamínu D
VDRE	vitamin D response element
WME	Williams E médium (inkubační médium)
XREM	xenobiotic responsive enhancer module

2 ÚVOD

Většina léčiv je dnes podávána v perorální formě a poté vstřebávána (absorbována) z gastrointestinálního traktu dále do centrálního oběhu. V tomto procesu hraje hlavní úlohu střevní bariéra, kterou léčivo musí překonat. Jak bude léčivo pronikat přes střevní bariéru závisí nejen na jeho fyzikálně chemických vlastnostech, ale také na interakci s enzymy a efluxními transportéry střevní bariéry, které mohou vlastní absorpci omezovat (Currie 2018). Společné působení biotransformačních enzymů a transportérů vede u některých léčiv k podstatnému ovlivnění jejich účinku, a to zejména z důvodu ovlivnění jejich biologické dostupnosti. Zásadní jsou v tomto ohledu lékové interakce na úrovni indukce nebo inhibice (Wu and Benet 2005).

Při průchodu střevní bariérou, játry, ale i dalšími tkáněmi může léčivo podléhat biotransformaci (Zhao et al. 2021), která převážně vede ke vzniku hydrofilnějších metabolitů. Tyto metabolity jsou tak snáze vylučovány z organismu (Fan and de Lannoy 2014). Biotransformace xenobiotik je rozdělena na dvě fáze (He et al. 2014). Fáze I zahrnuje oxidaci, redukci a hydrolýzu (Zhao et al. 2021) a do chemické struktury léčiva jsou přidány či odhaleny vybrané funkční skupiny (např. –OH, –NH₂, –SH, –COOH) (Currie 2018; Fan and de Lannoy 2014). Na této fázi se podílí především enzymy cytochromu P450 (Dressman and Thelen 2009). Ve fázi II dochází ke konjugaci funkčních skupin s hydrofilními endogenními substráty (např. glukuronidace, sulfatace, N-methylace nebo acetylace) (Fan and de Lannoy 2014). Posledním krokem je vyloučení léčiva ven z těla nejčastěji močí nebo žlučí a následně stolicí (Currie 2018). Eliminace léčiv může být ovlivněna efluxními transportéry (Wu and Benet 2005).

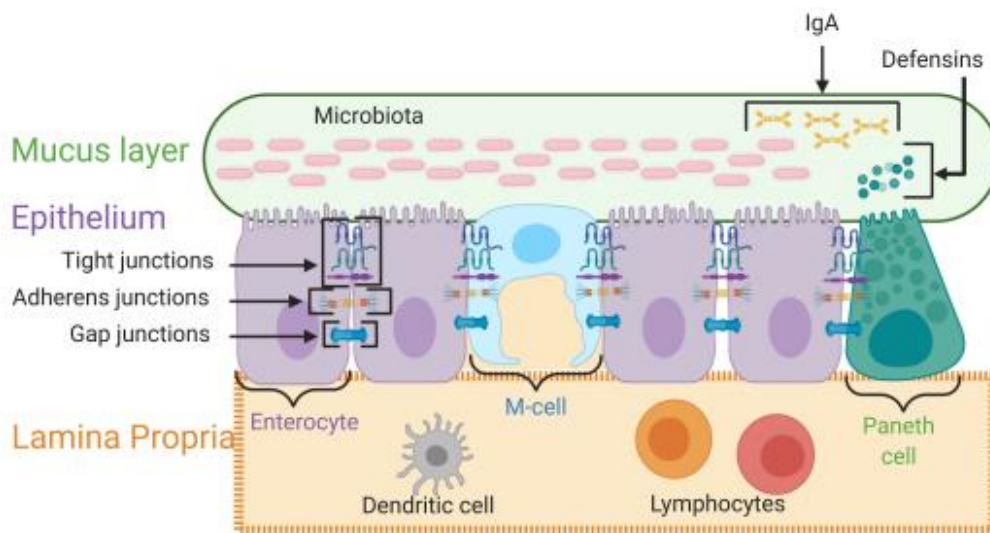
Vitamin D má nepostradatelnou funkci v lidském organismu. Je nezbytný pro vstřebání vápníku a fosfátů nebo je užíván pro prevenci křivice (Dusso et al. 2005). Jeho nedostatek je celosvětovým problémem, který je spojován s vyšším rizikem výskytu kardiovaskulárních nebo infekčních onemocnění (Ao et al. 2021). Bylo prokázáno, že biologicky aktivní forma vitamínu D (kalcitriol) je schopná intestinální indukce jak P-glykoproteinu (P-gp/ ABCB1), tak CYP3A4 (Fathi et al. 2019; Tachibana et al. 2009; Thummel et al. 2001).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Střevní bariéra

Rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím představuje střevní bariéra, která umožňuje vstřebávání živin a tekutin, ale zároveň zabraňuje průchodu škodlivých látek (např. toxinů a bakterií) střevním epitelem (Schoultz a Keita 2020). Povrch střevní sliznice je pokryt vrstvou hlenu, jehož úloha spočívá v ochraně epitelové výstelky. Další vrstvou je střevní epitel, který se podílí na vstřebání živin, vody a elektrolytů. Klíčovými elementy epitelové výstelky jsou enterocyty, které exprimují receptory vrozené imunitní odpovědi a uvolňují řadu chemokinů a cytokinů. K posílení střevní epitelové bariéry slouží sekreční buňky, a to zejména pohárkové, Panethovy a enteroendokrinní buňky (Alonso et al. 2014).

Enterocyty dále exprimují celou řadu transportérů včetně ABC (ATP binding cassette) a SLC (Solute carrier family) a biotransformačních enzymů první (např. CYP450 podrodiny 3A a 2C) a druhé fáze (sulfotransferáza a UDP-glukuronyltransferáza) biotransformace, které zde slouží k omezení absorpce xenobiotik a to včetně řady léčiv, viz kapitola 3.3 (Dressman and Thelen 2009; Oostendorp et al. 2009). Metabolismus léčiv ve střevě je spojen s variabilní biologickou dostupností, která je dána genetickými a epigenetickými faktory. Absorpce může být ovlivněna enzymovou indukcí nebo inhibicí, které jsou výsledkem nežádoucích interakcí (souběžné podávání léčiv, potrava) (Fritz et al. 2019). Schématické znázornění střevní bariéry popisuje Obr. 1.

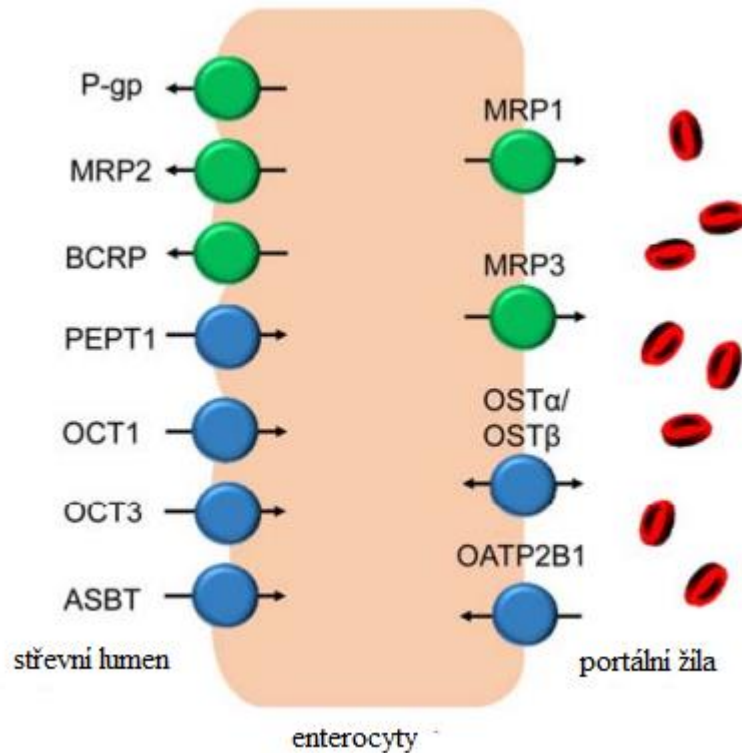


Obr. 1 Schématické znázornění střevní bariéry. Skládá se z vrstvy hleny, která obsahuje mucin, IgA, defensiny a střevní mikrobiotu. Vrstva epitelu je složena ze specializovaných typů buněk (enterocyty, Panethovy buňky). Buňky v této vrstvě jsou propojeny transmembránovými proteinovými komplexy. Poslední vrstvou je lamina propria obsahující imunitní buňky, krevní a lymfatické cévy. Převzato a upraveno z (Sharma and Riva 2020).

3.1.1 Transportéry tenkého střeva

Lidské tenké střevo dosahuje délky přibližně 6 metrů a je rozděleno na tři úseky: duodenum, jejunum a ileum. Představuje klíčové místo pro vstřebání většiny látek. Absorpce léčiv probíhá především na vnějším epitelu trávicího traktu, konkrétně v enterocytech, kde absorpční funkci plní vysoce diferenciované klky. V tenkém střevě byly popsány dvě základní formy transportu léčiv: paracelulární (mezi buňkami) a transcelulární (přes buňky). Paracelulární permeace probíhá pomocí mezer v epitelové membráně a je možná výhradně u malých molekul. Při transcelulárním transportu z lumen střeva do krve nejdříve dochází k absorpci přes apikální membránu do cytosolu. Léčivo přestupuje z enterocytů do krevního kompartmentu skrze bazolaterální membránu (Oostendorp et al. 2009). Transcelulární transport probíhá třemi mechanismy: pasivní difúzí skrze lipidovou dvojvrstvu, endocytózou (transcytózou) a transportéry zprostředkovaným transportem, ke kterému dochází prostřednictvím membránových přenašečů. Tyto přenašeče se dělí do dvou hlavních nadrodin: SLC a ABC transportéry (Murakami and Takano 2008; Oostendorp et al. 2009), které jsou popsány v podkapitole 3.2. ABC a SLC transportéry ovlivňují farmakokinetiku léčiv, toxinů,

endogenních sloučenin a jejich metabolitů (Oostendorp et al. 2009). Základní přehled lékových transportérů vyskytujících se v enterocytech ilustruje Obr. 2.



Obr. 2 Přehled vybraných lékových transportérů vyskytujících se ve střevní bariéře. Zeleně jsou označeny ABC transportéry (MRP = Multidrug Resistance Associated Protein, P-gp = P-glycoprotein, BCRP = Breast Cancer Resistance Protein) a modře SLC transportéry (OATP = Organic Anion Transporting Polypeptid, OCT = Organic Cation Transporter, PEPT = Peptide Transporter, ASBT = Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter, OST = Organic Solute Transporter).

Převzato a upraveno z (Müller et al. 2017).

3.1.1.1 Solute Carrier Family

V současné době se do nadrodiny SLC řadí více než 450 transportních proteinů, které se člení do 65 rodin. SLC proteiny zodpovídají za transport široké škály substrátů, včetně sacharidů, aminokyselin, vitamínů, nukleotidů, anorganických iontů, organických aniontů a léčiv (Pizzagalli et al. 2021). Látky transportují ve směru koncentračního gradientu a nespotřebovávají energii hydrolýzou ATP (Oostendorp et al. 2009; Pizzagalli et al. 2021).

Mezi nejvýznamnější rodiny z hlediska transportu léčiv ve střevě na apikálním povrchu epitelálních buněk patří OATP (solute carrier organic anion transporter), PEPT1 (solute carrier peptide transporter) a OCTN (organic zwitterion/cation transporter). Exprese SLC transportérů se v různých částech gastrointestinálního traktu liší (Oostendorp et al. 2009). OATP2B1, OCT1 a OCT3 (organic cation transporter) jsou rovnoměrně rozmístěny v tenkém i tlustém střevě, zatímco ASBT (apical sodium-bile acid transporter) a PEPT1 jsou výhradně distribuovány v tenkém střevě. Nárůst jejich hladin můžeme pozorovat od duodena k ileu (Müller et al. 2017).

3.2 Intestinální efluxní transportéry

3.2.1 ABC transportéry

ABC transportéry jsou všudypřítomné integrální membránové proteiny vyskytující se napříč všemi živými organismy (Tsybovsky et al. 2010). Můžeme je nalézt v plazmatické membráně prokaryot a eukaryot a v eukaryotních membránových organelách, včetně peroxizomů, mitochondrií, lyzozomů a endoplazmatického retikula (Tawbeh et al. 2021). V lidském genomu je identifikováno 49 ABC transportérů, které jsou na základě genové struktury, sekvence aminokyselin a fylogenetické analýzy uspořádané do 7 podrodin (ABCA až ABCG). Pomocí energie, která je vyráběna hydrolyzou ATP na ADP transportují molekuly přes lipidovou membránu proti koncentračnímu gradientu, což je rozhodující pro většinu aspektů buněčné fyziologie, včetně příjmu živin, eliminace odpadních produktů, tvorby energie a buněčné signalizace (Linton 2007; Moussatova et al. 2008). Podílí se na transportu rozmanité škály substrátů, od malých molekul, jako jsou ionty, cukry či aminokyseliny, až po větší sloučeniny jako jsou léčiva, lipidy a oligopeptidy (Moussatova et al. 2008). Nejvíce studovaným ABC transportérem je P-gp (Lin and Yamazaki 2003), který ovlivňuje absorpci, distribuci a eliminaci řady sloučenin (Elmeliegy et al. 2020). Inhibice nebo indukce tohoto transportéru jsou příčinou významných lékových interakcí (Lin and Yamazaki 2003).

Pro jejich funkční aktivitu je nutná přítomnost alespoň čtyř následujících domén: dvou transmembránových domén (TDM) zabudovaných v membránové dvojvrstvě a dvou nukleotid-vázajících domén (NBD) umístěných v cytoplazmě (Higgins 2001; Rees et al. 2009; Tsybovsky et al. 2010). NBD je vysoce konzervovaná hydrofilní doména a zodpovídá za vazbu a hydrolyzu ATP (ter Beek et al. 2014; Higgins 2001). Součástí struktury NBD jsou dva charakteristické motivy zvané jako motiv Walker A a motiv Walker B oddělené 90 – 120 aminokyselinami (Dean et al. 2022). Hydrofobní TDM je zodpovědná za vazbu substrátu (Biemans-Oldehinkel et al. 2006; Tsybovsky et al. 2010) a zpravidla se skládá z 6-12 alfa helixů, což určuje specifičnost substrátu (Dean et al. 2022).

Funkcí lidských ABC transportérů je vylučovat z buněk cytotoxické sloučeniny. Za nejdůležitější transportéry u člověka lze považovat P-gp, Breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2) a Multidrug resistance associated protein 1 (MRP1/ ABCC1), které jsou exprimované především ve střevě, játrech a ledvinách, kde omezují biologickou dostupnost celé řady xenobiotik včetně léčiv. Dále jsou P-gp a BCRP exprimovány v mozku, placentě

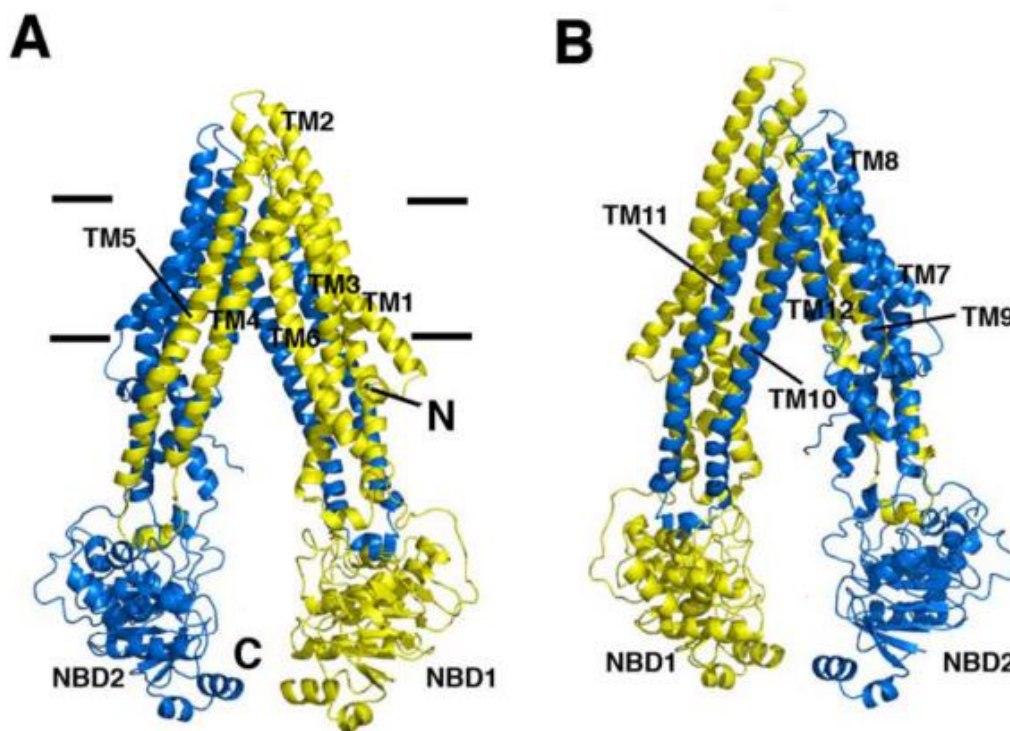
a kmenových buňkách, kde vykonávají bariérovou funkci (Linton 2007). Kromě fyziologických tkání se P-gp, BCRP a MRP1 nacházejí také v nádorových buňkách, kde bývají jednou z příčin rezistence proti cytostatickým látkám, jelikož snižují jejich akumulaci v nádorové buňce (Callaghan et al. 2014; Choi and Yu 2014).

3.2.1.1 P-glykoprotein (P-gp, ABCB1)

P-gp je membránový protein o 170 kDa patřící mezi zásadní ABC transportéry. U lidské populace je kódován genem *ABCB1* (Fu and Arias 2012). Nachází se v různých částech těla jako je mozek, ledviny, játra, trávicí trakt, varlata a placenta a je základní složkou hematoencefalické bariéry. V mozku je exprimován na apikálním povrchu endoteliálních buněk díky čemuž omezuje vstup cizorodých látek (Ahmed Juvale et al. 2022). Efluxní funkci plní také v ledvinách, kde je exprimován na apikálním povrchu epitelových buněk proximálních renálních tubulů (Ahmed Juvale et al. 2022). Dále tento transportér nalezneme na apikální membráně placentárního syncytiotrofoblastu, kde zabraňuje prostoupení léčiv do placenty a fetálního oběhu (Taggi et al. 2022) nebo ho můžeme nalézt v kartáčovém lemu membrány enterocytů, kanalikulární membráně hepatocytů (Choi and Yu 2014) nebo hematotestikulární bariéře (Ahmed Juvale et al. 2022). Všechny výše zmíněné tkáně chrání před toxickým působením xenobiotik a endogenních metabolitů (Wang et al. 2021). Mezi endogenní sloučeniny, které jsou substrátem P-gp patří např. beta amyloid, který se hromadí v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou (Pyun et al. 2022). Jeho kontinuální transport z CNS prostřednictvím P-gp zabraňuje jeho neurotoxické akumulaci (Abuznait et al. 2011; Pyun et al. 2022). Klíčové je působení P-gp jako součást střevní bariéry, kde může zabraňovat nebo omezovat vstup látek do krevního oběhu. Mezi látky, které jsou substráty P-gp patří i celá řada léčiv (viz Tab. 1) (Yano et al. 2018). U člověka se exprese P-gp v jednotlivých částech tenkého střeva liší. Bylo prokázáno, že v ileu byla vyšší exprese než v jejunu. Rozdíly v expresi existují také mezi muži a ženami. U mužů byly nalezeny vyšší hladiny P-gp v jejunu a ileu (Mai et al. 2021).

P-gp má flexibilní strukturu, která je klíčová pro translační a rotační pohyby během efluxního mechanismu (Mollazadeh et al. 2018). Skládá se z 1280 aminokyselin (Fu and Arias 2012) a ve fosfolipidové dvojvrstvě je složen ze dvou homologních TDM, z nichž každá obsahuje šest helixů a jednu cytoplazmatickou NBD (Ahmed Juvale et al. 2022). NBD zodpovídá za vazbu a hydrolýzu ATP (Zoghbi et al. 2017). Obě TDM jsou spojené flexibilním proteinem o 75 aminokyselinách (Ahmed Juvale et al. 2022). Energie vyráběná

z hydrolyzy ATP způsobí konformační změny v TDM a katalyzuje eflux substrátů přes TDM a lipidovou dvojvrstvou (Mollazadeh et al. 2018). Vnitřní konformace P-gp má různé vazebné kapsy zahrnující aromatické a hydrofobní zbytky spolu a aminokyselinami, které obsahují polární postranní řetězce. Vzhledem k tomuto uspořádání dochází ke vzniku van der Waalsových interakcí a vodíkových můstků a tím jsou umožněny interakce širokého spektra substrátů. Protože P-gp nemá pevnou kapsu vázající ligand, jako jeho substráty byly identifikovány polární, nepolární, lineární, hydrofobní, a aromatické sloučeniny s molekulovou hmotností v rozmezí 250 až 4 000 Da (Ahmed Juvale et al. 2022). Struktura P-gp je vyobrazena na Obr. 3.



Obr. 3 Struktura P-gp ze předního (A) a zadního (B) pohledu. N- koncová část molekuly je znázorněna žlutě a C-koncová část modře. Černé vodorovné čáry zobrazují přibližné umístění lipidové dvojvrstvy. TM – transmembránová doména, NBD – nukleotid vázající doména, N- N – koncová část molekuly, C–C–koncová část molekuly.

Převzato a upraveno z (Aller et al. 2009).

Regulace exprese P-gp

Expres P-gp ve zdravých tkáních je regulována prostřednictvím nukleárních receptorů PXR (pregnanový X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor) (Callaghan et al. 2014). V 5' upstream enhancerové oblasti *ABCB1* se nachází funkční místa vázající PXR a CAR (Hegedüs et al. 2015), jejichž navázáním na DR4 motivy v promotoru *ABCB1* dojde ke zvýšení transkripce P-gp (Elmeliegy et al. 2020). Po navázání ligandu tyto jaderné receptory (NR) indukují expresi mRNA. Na regulaci transkripce se také podílí TR β (receptor hormonu štítné žlázy) a VDR (vitamin D receptor), které se váží na 5' upstream enhancerovou oblast jako heterodimery s RXR α (retinoidní X receptor) (Hegedüs et al. 2015). Účast VDR na regulaci exprese P-gp byla potvrzena u Caco-2 (colorectal adenocarcinoma) buněčné linie, potkaních jater a ledvin, myších ledvin a mozku (Durk et al. 2012).

Mezi další faktory, které ovlivňují regulaci exprese P-gp může být také hypoxie nebo metabolická acidóza. Toto bylo potvrzeno pro nádorové tkáně (Callaghan et al. 2014).

Na regulaci exprese se podílí také transkripční faktory p53, MYCN, SP1 (sphingosine-1-phosphate receptor) a YB-1, jejichž společným vazebným místem je promotorová oblast P-gp (Ahmed Juvale et al. 2022). Promotor *ABCB1* namísto konsensu TATA boxu obsahuje invertovaný CCAAT a element bohatý na GC (Mahadevan and List 2004), kam se váže například SP1. Pro aktivaci *ABCB1* při ozáření ultrafialovým světlem je nutný SP1 a invertovaný prvek CCAAT. Nejvýznamnějším jaderným induktorem genu *ABCB1* je YB-1, který se po aktivaci přesouvá z buněčné cytoplazmy do jádra, kde se váže na DNA a slouží jako signál pro zvýšení transkripce P-gp. Studie naznačují, že aktivace YB-1 může být vyvolána prostřednictvím tepla, chladu a ultrafialového záření (Zhou 2008).

Ke snížení hladin exprese může docházet v důsledku působení miRNA (miRNA-145, miRNA-27a a miRNA-331-5p) interagující s 3' UTR (untranslated region) *ABCB1* mRNA. MiR-137 může modulovat YB-1, čímž se nepřímo snižuje expres P-gp. MiR200c snižuje úroveň exprese v důsledku snížení exprese genu *JNK2* (c-Jun NH2-terminal kinase) a inhibice signalizace JNK2/p-JNK/p-c-Jun/ABCB1. GTPázy Ra1A, Rab4 a Rab5 mohou modulovat povrchovou expresi P-gp (Ahmed Juvale et al. 2022). Bylo prokázáno, že nadměrná expres RAB5 urychluje endocytický transport včetně endocytózy P-gp a dochází ke zvýšení jeho intracelulární lokalizace. Kromě toho nadměrná expres Ra1A také způsobuje akumulaci P-gp v intracelulárních strukturách (Fu et al. 2007).

Substráty

P-gp je schopen vázat a transportovat stovky strukturně a funkčně rozmanitých substrátů, což jsou ve většině případů hydrofobní a amfifilní chemické sloučeniny obsahující dusík se schopností vytvářet vodíkové vazby (Ahmed Juvale et al. 2022; Chufan et al. 2015). Dále jsou tvořeny dvěma či třemi donorovými (akceptorovými) skupinami s pevnou prostorovou vzdáleností v rozmezí $2,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$ nebo $4,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$ (Lin and Yamazaki 2003). Jedná se, jak o malé molekuly jako jsou organické kationty, sacharidy a aminokyseliny až po makromolekuly proteinů a polysacharidů (Zhou 2008). Naopak P-gp není schopen vázat aniontové látky (Ambudkar et al. 2003).

Mezi typické substráty P-gp (viz Tab. 1) patří řada klinicky významných léčiv včetně antineoplastik, inhibitorů tyrosinkinázy, blokátorů kalciových kanálů, antibiotik a inhibitorů HIV proteázy (Chufan et al. 2015).

V TMD P-gp bylo pro substráty identifikováno několik vazebných míst (Lin and Yamazaki 2003). Dle studií existují dvě hlavní vazebná místa pro substrát (označovaná jako R a H), a to konkrétně v místech TMD 5 a 6 a TMD 11 a 12 (Martinez et al. 2014; Zhou 2008). Imunologickou analýzou po rozkladu P-gp trypsinem byly charakterizovány dva hlavní fragmenty (4 a 5 kD), které leží uvnitř nebo bezprostředně vedle poslední TMD každé kazety TMD6 a TMD12 P-gp. Fragment 5 kD zahrnuje aminokyselinové zbytky 311-456 a fragment 4 kD obsahuje aminokyselinové zbytky od 979-1048. Z mutačních studií vyplývá, že aminokyselinové substituce, které ovlivňují substrátovou specifitu, se nachází v celém P-gp, včetně TMD1, TMD4, TMD6, TMD10, TMD11 a TMD12. V TMD1 se aminokyseliny His61, Gly64 a Leu65 podílí na tvorbě vazebné kapsy, která je důležitá při určování vhodné velikosti substrátu pro P-gp. Záměna His61 za aminokyselinu s krátkým postranním řetězcem vede ke zvýšení rezistence vůči vinblastinu (molekulová hmotnost 811), zatímco substitucí aminokyseliny s dlouhým postranním řetězcem se zvýší rezistence vůči kolchicinu (molekulová hmotnost 399). Pro rozpoznání substrátu jsou kromě TMD podstatné intracelulární spojovací smyčky P-gp. Pro stanovení specifity substrátu jsou významné Gly141 a Gly187 mezi TMD2 a TMD3, Gly288 mezi TMD4 a TMD5, Gly812 a Gly830 mezi TMD8 a TMD9 (Lin and Yamazaki 2003).

Inhibitory

Molekula působí jako ligand P-gp pokud je hydrofobní. Jen tak je schopná prostoupit buněčnou membránou a vstoupit do hydrofobní kapsy vázající léčivo. Nedávné studie naznačují, že potenciální inhibitory pro klinické využití musí mít několik společných vlastností. Důležitá je vysoká hodnota rozdělovacího koeficientu alespoň nad 2,92, která je nutná pro vznik hydrofobních nebo Van der Waalsových interakcí s vazebným místech P-gp. Dále je podstatná molekulová hmotnost, kdy molekuly by měla mít alespoň 18 a více atomů z důvodu pokrytí více než jedné vazebné oblasti P-gp. HOMO (highest occupied molecular orbital) energie molekuly by měla mít vysoký rozsah, kvůli zajištění nukleofilní interakce molekuly s transportérem. V poslední řadě je nutný alespoň jeden terciární atom dusíku, protože při fyziologickém pH generuje kationt, čímž je zaručena vazba pomocí iontové interakce (Mollazadeh et al. 2018).

Mezi inhibitory P-gp se řadí řada klinicky užívaných látek jako například blokátory kalciových kanálů (verapamil, diltiazem), imunosupresiva (cyklosporin), antagonist estrogenních receptorů (tamoxifen), antineoplastika (vikristin) (Lopez and Martinez-Luis 2014).

Induktory

Při indukci P-gp se uplatňuje PXR a CAR. Jejich vazbou na DR4 v lidském promotoru *ABCB1* dochází ke zvýšené transkripci P-gp. Při indukci P-gp prostřednictvím PXR může dojít ke snížení absorpce jeho substrátů. Indukci může vyvolat například rifampicin (RIF), fenytoin, karbamazepin a třezalka tečkovaná (Elmeliegy et al. 2020). Indukce může být způsobena nejen chemickými sloučeninami, ale i fyzickým stresem, jako je rentgenové a ultrafialové záření a tepelný šok – viz kapitola „Regulace exprese (Zhou 2008). Přehled vybraných substrátů, inhibitorů a induktorů léčiv reprezentuje Tab. 1.

Tab. 1 Příklady vybraných klinicky relevantních léčiv interagujících s P-gp.

Substrát	Inhibitor	Induktor
Cyklosporin	Amiodaron	Fenobarbital
Dabigtran etexilát	Atorvastatin	Fenytoin
Dexametazon	Cyklosporin	Kolchicin
Digoxin	Itrakonazol	Methotrexát
Diltiazem	Ketokonazol	Rifampicin
Doxorubicin	Klaritromycin	Třezalka tečkovaná
Doxycyklin	Takrolimus	
Erytromycin	Tamoxifen	
Fenobarbital	Verapamil	
Fenytoin		
Indinavir		
Takrolimus		
Verapamil		

Převzato a upraveno z (Elmeliegy et al. 2020) a (Zhou 2008).

3.3 Cytochrom P450

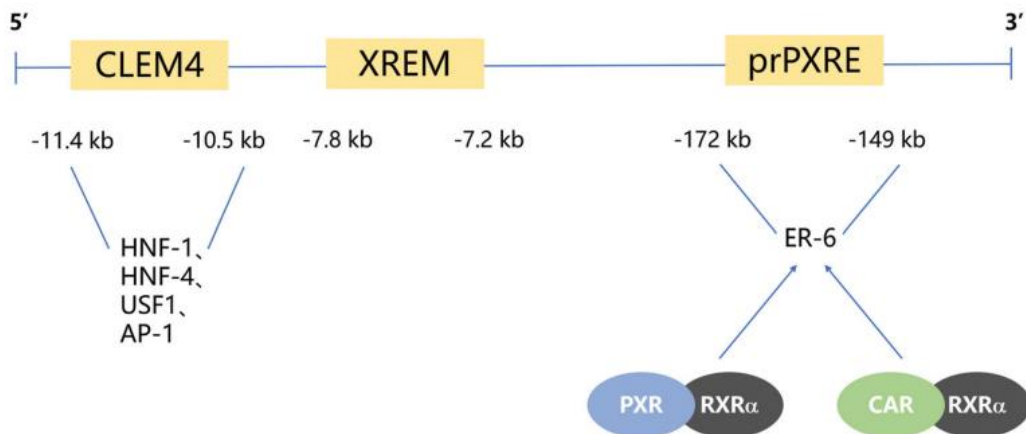
3.3.1 Základní charakteristika

V metabolismu xenobiotik hrají významnou roli hemoenzymy cytochromu P450, jejichž biosyntéza se u zdravých jedinců odehrává zejména v játrech, ačkoliv jejich variabilní hladiny byly zjištěny v extrahepatálních tkáních a orgánech, a to zejména v tenkém střevě, ledvinách, plicích a mozku. CYP ve většině případů představují monooxygenázy umožňující jak hydroxylační, tak oxidační reakce (Lolodi et al. 2017; Wang et al. 2013). Díky těmto reakcím se xenobiotika přeměňují na hydrofilnější sloučeniny (Pascussi et al. 2003). Bylo zjištěno téměř 60 lidských CYP, které jsou rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin (Lolodi et al. 2017; Zanger and Schwab 2013). Dle současných znalostí se rodiny CYP1, CYP2, CYP3 účastní biotransformace většiny xenobiotik, kdežto ostatní rodiny CYP přispívají k metabolismu endobiotik (Lolodi et al. 2017). Zároveň mají rodiny CYP1, CYP2 a CYP3 významné postavení v biosyntéze cholesterolu, metabolismu vitamínu D a žlučových kyselin (Pascussi et al. 2003). Zhruba 80 % léků se primárně metabolizuje prostřednictvím zástupců rodin CYP1, CYP2 a CYP3 a z toho 50 % je výlučně metabolizováno CYP3A4, který je nejhojněji studován a je exprimován převážně ve střevních enterocytech a v játrech (Lolodi et al. 2017; Zanger and Schwab 2013). CYP3A4 významně přispívá k first-pass metabolismu perorálně podávaných léků (Zanger and Schwab 2013). Ve své aktivitě může vykazovat širokou interindividuální variabilitu, což je způsobeno zejména transkripčními a genetickými faktory (Matsumura et al. 2004).

3.3.2 Strukturální charakteristika genu *CYP3A4*

Lidský lokus pro *CYP3A4* je lokalizován na chromozomu 7q22.1, jež dosahuje délky 231 kb. Délka 5'-flanking regionu genu *CYP3A4* je 35,8 kb a pouze 13 kb oblastí je určeno pro intestinální a hepatální regulaci (Yuan et al. 2020). Pro konstitutivní aktivaci genu *CYP3A4* je důležitý modul CLEM4 (constitutive liver enhancer modul), což je region od 11,4 do 10,5 kb, se kterým interagují některé transkripční faktory včetně HNF-1 α (hepatocytický jaderný faktor-1 α), HNF-4 α (hepatocytický jaderný faktor-4 α), USF1 (upstream transcription factor 1) a AP-1 (aktivátor protein-1). Navíc byl v CLEM4 nalezen genetický polymorfismus s třínukleotidovou inzercí TGT, což má za následek ovlivnění aktivity enhanceru genu *CYP3A4* *in vitro* (Matsumura et al. 2004). Transkripční regulace může být také způsobena dvěma

dalšíma cis – regulačními moduly: prPXRE (proximal PXR responsive element) a distální XREM (xenobiotic-responsive enhancer modul), jež se vyskytuje v rozmezí 7,2 – 7,8 kb (Zanger and Schwab 2013) a je indukovatelný PXR (Collins and Wang 2020). Tyto elementy jsou složeny ze dvou kopií hexanukleotidu AG(G/T)TCA a mohou být organizované jako přímé repetice s třínukleotidovou distribucí (DR3) a evertované repetice oddělené 6 bp (ER6) (Pascussi et al. 2003). Stavba 5'-flanking regionu lidského *CYP3A4* je vyobrazena na Obr. 4.



Obr. 4 Základní struktura funkčních responzivních elementů jaderných receptorů v 5'-flanking region lidského genu *CYP3A4*.

Převzato a upraveno z (Yuan et al. 2020).

3.3.3 Regulace exprese *CYP3A4*

3.3.3.1 Transkripční regulace

K regulaci genů *CYP3A4* přispívají mnohočetné signální dráhy (Zanger and Schwab 2013). Exprese *CYP3A4* může být regulována více způsoby, a to buď transkripčními faktory včetně PXR, CAR, HNF4, RXR α , PPAR α (receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu), FXR (farnesoidní X receptor) a LXR (jaterní X receptor), epigenetickými faktory nebo negenetickými faktory (Collins and Wang 2020; Yuan et al. 2020). Indukce *CYP3A4* xenobiotiky je částečně závislá na NR PXR (Istrate et al. 2010), který se aktivuje navázáním agonisty. Interakce PXR s RXR α dává vzniknout heterodimeru, který se váže na responzivní elementy v 5'-flanking regionu některých genů včetně *CYP3A4*, což způsobí indukci exprese (Lolodi et al. 2017; Pascussi et al. 2003). Po heterodimerizaci s RXR mohou být některé z těchto elementů také rozpoznány CAR a VDR, a proto jsou tyto NR schopné regulovat řadu genů prostřednictvím totožných cis-regulačních modulů (Pascussi et al. 2003). PXR, stejně jako jeho primární cílový gen *CYP3A4*, je exprimován v játrech, tenkém a tlustém střevě. Je schopný vázat s nízkou afinitou širokou škálu strukturálně odlišných různorodých exogenních a endogenních látek včetně léků počínaje RIF, fenobarbitalem, blokátory kalciových kanálů (nifedipin), klotrimazolem, mifepristonem a steroidních hormonů s jejich metabolity jako je progesteron, estrogen, kortikosteron, kumestrol a hyperforin (Pascussi et al. 2003). Kyselina valproová v terapeutických dávkách je schopná transaktivace *CYP3A4* prostřednictvím PXR dráhy v primárních lidských hepatocytech (Yuan et al. 2020).

Transkripce CYP genů dále může být výrazně ovlivněna CAR, který je v porovnání s PXR schopný vázat méně chemických entit, což může být způsobeno menší kapsou vázající ligand. Transkripční kontrola cílových genů probíhá podobným způsobem jako u PXR (Lolodi et al. 2017) s tím rozdílem, že CAR je lokalizován v cytoplazmě a po aktivaci se translokuje do jádra. Typickým ligandem CAR je fenobarbital (Drocourt et al. 2002). Následně dojde k tvorbě heterodimerního komplexu s RXR, který rozpoznává identické sekvenční motivy v distálních XREM a proximálních promotorových oblastech cílových genů, mezi něž patří *CYP3A4* (Lolodi et al. 2017). CAR je schopný transaktivace motivů ER6 a DR3 reagující na PXR v genu *CYP3A4* (Pascussi et al. 2003).

Studie dokazují, že aktivace transkripce *CYP3A4* prostřednictvím PXR a CAR vyžaduje přítomnost nukleárního transkripčního faktoru HNF4 α (Gonzalez 2008). HNF4 α je exprimován

zejména v játrech, střevě, slinivce a ledvinách a má vliv na transkripční regulaci enzymů, které se podílejí na metabolismu xenobiotik (Lolodi et al. 2017).

Na expresi genu *CYP3A4* se může podílet také VDR, což jako první uvedli autoři Schmiedlin-Ren *et al.* v roce 1997, kteří prokázali, že 25-hydroxyvitamin D₃ působí jako induktor transkripce *CYP3A4* u buněčné linie odvozené kolorektálního karcinomu Caco-2 (Pascussi et al. 2003; Schmiedlin-Ren et al. 1997). Na VDR se narozdíl od PXR a CAR specificky váže sekosteroidní ligand 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. Podobně jako u PXR a CAR dojde k navázání ligandu a k tvorbě heterodimeru s RXR. Tento komplex následně váže a aktivuje responzivní elementy VDR cílových genů, včetně *CYP3A4* (Lolodi et al. 2017). Bylo prokázáno, že dlouhodobá terapie RIF způsobuje nedostatek vitamínu D. Navíc léky RIF a fenobarbital jsou spojovány s osteomalácií, kdy dochází k defektu mineralizace kostí v důsledku změn metabolismu vitamínu D (Pascussi et al. 2003). RIF a fenobarbital indukují *CYP3A4*, čímž dochází ke zvýšené eliminaci, respektive ke snížení terapeutického účinku vitamínu D, který je biotransformován tímto cytochromem (Hakkola et al. 2020; Wang et al. 2013). To naznačuje, že se CAR nebo PXR mohou podílet na řízení genů, které jsou odpovědné za syntézu nebo katabolismus vitamínu D (Pascussi et al. 2003).

Existuje řada důkazů, že se na indukci genu *CYP3A4* podíl rovněž glukokortikoidní receptor (GR). Při fyziologických hladinách glukokortikoidů dojde k aktivaci GR, čímž se zvýší produkce PXR, CAR a RXR (Pascussi et al. 2003).

3.3.3.2 Posttranskripční regulace

Příkladem může být miRNA-27b, která vyvolává down-regulaci mRNA *CYP3A4* a snižuje proteinovu expresi *in vivo* (Ekström et al. 2015). Úroveň exprese *CYP3A4* může být regulována i nepřímo působením miRNA-24 a miRNA-34a. V buněčné linii HepG2 bylo prokázáno, že tyto miRNA se podílí na regulaci exprese HNF4 α (Lolodi et al. 2017). Součástí nepřímé regulace je dále miRNA-148a, která reguluje PXR (Swart and Dandara 2014). *In vitro* funkčními studii bylo prokázáno i několik dalších miRNA, které působí jako regulátory PXR, konkrétně miRNA-18a-5p, miRNA-140-3p, miRNA-30c-1-3p a miRNA-877-5p (Smutny et al. 2021).

3.3.3.3 Regulace enzymatické aktivity

Řada látek včetně významných léčiv může zapříčinit inhibici nebo naopak indukci některých CYP (Pelkonen et al. 2008). Induktory CYP3A4 stimuluje jeho syntézu *de novo* (Beck et al. 2021) a patří mezi ně např. barbituráty, dexametazon, RIF a třezalkový extrakt (Guengerich 1997). Díky zvýšené intracelulární koncentraci se zvyšuje aktivita enzymu. Rychlost syntézy CYP3A4 je závislá na množství mRNA a enzymová indukce zde vykazuje charakteristické vztahy mezi dávkou ligandu a účinkem enzymu. Koncentrace proteinu v rovnovážném stavu je dána rychlostí jeho syntézy a rychlostí jeho degradace. Indukce CYP zahrnují převážně zvýšení genové transkripce. Maximální transkripční aktivita po expozici induktoru je pozorována cca po 10 – 12 hodinách a přibližně za 18 hodin se aktivita vrátí na bazální hodnotu v závislosti na dávce induktoru. mRNA je degradována pomalu a po návratu transkripční aktivity na bazální úroveň dochází k její akumulaci (Hollenberg 2002).

Indukce CYP3A4 vede ke snížení účinnosti terapie některými léčivy. To může mít negativní dopad na léčbu život ohrožujících onemocnění a stavů (Liu et al. 2007). Jako příklad lze uvést rejekci orgánového štěpu v důsledku zvýšeného metabolismu cyklosporinu při léčbě RIF (Burk et al. 2004) nebo selhání kombinované perorální antikoncepce u pacientek užívající antiepileptika (Reimers et al. 2015).

Inhibice CYP může způsobit zvýšení toxicity nebo nedostatečný terapeutický účinek zejména u proléčiv, kdy dochází ke snížení množství aktivní formy léčiva. (Pelkonen et al. 2008). K inhibici dochází téměř okamžitě (Guengerich 1997) a nejčastějším případem je kompetitivní inhibice, ke které dochází v důsledku kompetitivní vazby ve vazebném místě enzymu a je závislá na afinitě substrátu k inhibovanému enzymu, koncentraci substrátu potřebného pro inhibici a poločasu inhibičního léčiva. Druhým a méně častým mechanismem je nekompetitivní inhibice, ke které dochází v důsledku inaktivace enzymu inhibitorem s normální vazbou substrátu (Michalets 1998). Inhibitory CYP3A4 jsou především lipofilní sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností (např. klaritromycin), přestože některé substráty mohou mít relativně nízkou molekulovou hmotnost (např. diltiazem). Inhibitory disponují četnými aromatickými kruhy a hydrofobními skupinami, které mají významnou roli pro interakci s lipofilními aktivními místy CYP. Charakteristickými znaky je jejich velká molekulová hmotnost, velký povrch a vysoká lipofilita ($\text{LogP} = 4.0$). Navíc mají jako místo

oxidace dusíkovou nebo allylovou polohu (Beck et al. 2021). Přehled vybraných substrátů, inhibitorů a induktorů enzymu CYP3A4 je uveden v Tab. 2.

Tab. 2 Přehled vybraných klinicky významných substrátů, inhibitorů a induktorů CYP3A4.

Substrát	Inhibitor	Induktor
Alprazolam	Diltiazem	Barbituráty
Atorvastatin	Erytromycin	Efavirenz
Budesonid	Ethinylestradiol	Glukokortikoidy
Karbamazepin	Grapefruitový džus	Fenobarbital
Citalopram	Isoniazid	Fenytoin
Klaritromycin	Ketokonazol	Karbamazepin
Kodein	Klaritromycin	Rifampicin
Kortizol	Nikardipin	Statiny
Cyklosporin	Verapamil	Třezalka tečkovaná
Dexamatazon	Vorikonazol	Valproová kyselina
Dexomethorfan		
Diazepam		
Diltiazem		
Erytromycin		
Fentanyl		
Midazolam		
Paracetamol		
Simvastatin		
Takrolimus		
Tramadol		
Zolpidem		

Převzato a upraveno z (Zanger and Schwab 2013).

3.4 Vitamin D

3.4.1 Základní charakteristika

Vitamin D je steroidní prohormon rozpustný v tucích (Sirajudeen et al. 2019), jehož optimální hladina u zdravých jedinců se pohybuje v rozmezí 75–125 nmol/l (Khammissa et al. 2018). Je syntetizován především v lidské kůži (Zhou and Glowacki 2017). Má klíčové postavení v lidském organismu. Je považován za esenciální vitamin pro prevenci křivice (Dusso et al. 2005). Zároveň je důležitý pro správnou funkci kosterní soustavy a ve střevě je zodpovědný za zvýšenou absorpci fosfátů, vápníku a hořčíku. Jeho dostatečná suplementace vede k posílení vrozené imunitní odpovědi. Oproti tomu nedostatek (pod 50 nmol/l) bývá spojován s mnoha nemocemi, a to včetně zvýšeného rizika kardiovaskulárních, infekčních a autoimunitních chorob (Ao, Kikuta, and Ishii 2021, Fathi et al. 2019, Khammissa et al. 2018, Peng et al. 2021). Nízkými hladinami vitaminu D jsou ohroženi především pacienti užívající antikonvulziva, systémové glukokortikoidy, ketokonazol nebo antiretrovirotika, dále pak starší osoby, pacienti trpící osteoporózou či malabsorpčním syndromem (Khammissa et al. 2018). Nedostatkem vitaminu D trpí zejména obyvatelé Severní Ameriky a Evropy z důvodu nutričního deficitu a nedostatečnému pobytu na slunci (Dusso et al. 2005).

Vyskytuje se převážně ve dvou základních formách (Zhou a Glowacki 2017). První forma je označována jako cholekalciferol (vitamin D3). Jeho syntéza probíhá působením ultrafialového slunečního záření o vlnové délce 280-320 nm (UVB) v kožní tkáni přeměnou 7- dehydrocholesterolu, který vzniká oxidací cholesterolu ve střevním epitelu. Cholekalciferol je živočišného původu (Fathi et al. 2019, Zhou and Glowacki 2017). Druhá forma se nazývá ergokalciferolu (vitamin D2) a je rostlinného původu. Tato forma může být suplementována z doplňků stravy nebo z potravinových zdrojů (Sirajudeen, Shah, and al Menhali 2019, Zhou and Glowacki 2017).

3.4.2 Metabolismus

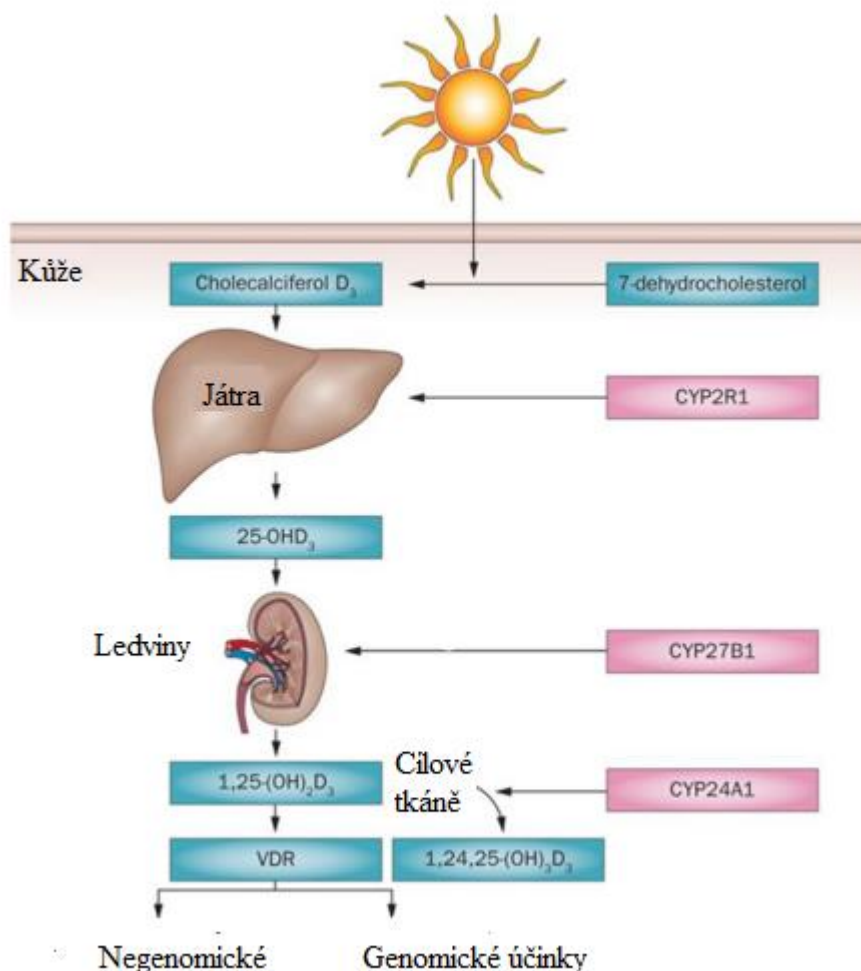
Biologicky neaktivní vitamíny D2 a D3 se transportují v krevní plazmě prostřednictvím DBP (vitamin D vazebný protein) (Khammissa et al. 2018), který váže proteiny s afinitou v pořadí $25(\text{OH})\text{D} > 24,25(\text{OH})_2\text{D} > 1,25(\text{OH})_2\text{D} > \text{vitamin D}$ (Dusso et al. 2005). Následně podléhají metabolické aktivaci a degradaci pomocí kaskády enzymatických procesů za účasti

různých isoformů CYP (Zhou and Glowacki 2017). Aktivace probíhá dvěma hydroxylačními kroky, díky kterým vzniká biologicky aktivní forma vitamínu D, kalcitriol (Fathi et al. 2019).

K první hydroxylaci dochází v játrech, kde vzniká 25- hydroxyvitamin D (25(OH)D, kalcidiol. Tato reakce je katalyzována prostřednictvím mitochondriálního enzymu CYP27A1 a mikrosomálního enzymu CYP2R1. Kalcidiol se oproti ostatním formám vitamínu D vyskytuje ve fyziologicky vyšší koncentraci, proto se ve studiích využívá k odhadu hladin vitamínu D v plasmě (Fathi et al. 2019, Zhou and Glowacki 2017). Druhá hydroxylace probíhá v renálních mitochondriích prostřednictvím enzymu 1 α hydroxylázy (CYP27B1) a dochází k produkci biologicky aktivní formy vitamínu D, který je označován jako 1 α 25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D, kalcitriol). Biosyntéza tohoto hormonu probíhá nejen v renálních proximálních tubulech, ale i například v dendritických buňkách, keratinocytech, pre-osteoklastických monocytech, v prostatických nebo v nádorových buňkách (Fathi et al. 2019, Zhou and Glowacki 2017). Aktivita 1 α hydroxylázy je regulována prostřednictvím vápníku dvěma způsoby. Buď přímo pomocí změny sérového vápníku. Nebo nepřímo změnou hladin parathormonu v renálních proximálních buňkách díky změnám cAMP prostřednictvím stimulace transkripce genu 1 α hydroxylázy (Dusso et al. 2005).

Kalcitriol se následně váže na VDR (Fathi et al. 2019), který se translokuje do jádra a působí zde jako transkripční faktor (Bakke and Sun 2018). Mechanismus účinku VDR je detailně popsán v podkapitole 3.5.4.4. Vitamin D je biotransformován prostřednictvím CYP3A4 (Wang et al. 2013). K inaktivaci všech cirkulujících forem vitamínu D dochází prostřednictvím 24-hydroxylázy (CYP24A1) (Fathi et al. 2019; Zhou and Glowacki 2017). Schématické znázornění syntézy vitamínu D ilustruje Obr. 5.

Rovnováha mezi aktivitou 1 α hydroxylázy a 24-hydroxylázy je významná pro regulaci metabolismu kalcitriolu. Tyto kritické enzymy jsou striktně řízeny sérovým vápníkem, hladinou kalcitriolu a hladinou fosfátů. Při nízkých hladinách vitamínu D nebo vápníku v séru, parathormon secernovaný příštítnými tělísky stimuluje syntézu 1 α hydroxylázy, čímž dojde ke zvýšení aktivity 1,25(OH)₂D. Zároveň je parathyroidní hormon zodpovědný za inhibici 24-hydroxylázy a indukuje syntézu osteoklastů a syntézu osteocytárního fibroblastového růstového faktoru 23. Působení tohoto fibroblastového růstového faktoru spočívá v redukcii exprese renálních sodno-fosfátových transportérů. Dále je schopný potlačit renální expresi 1 α hydroxylázy a indukuje 24-hydroxylázu, čímž v séru dochází ke snížení hladiny kalcitriolu a kalcia při hyperfosfatémii (Gil et al. 2018).



Obr. 5 Schéma syntézy vitamínu D, která začíná v kůži. Východí sloučeninou je 7-dehydrocholesterol, ze kterého fotolytickou přeměnou vzniká cholecalciferol, což je neaktivní forma vitamínu D. Aktivní forma vzniká dvěma hydroxylačními kroky. Finální sloučeninou je 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. Následně dojde k vazbě na VDR, který zprostředkovává účinky pomocí dalšího ligandu (nongenomické), vazebné kapsy nebo genomické účinky pomocí genomické kapsy. Prostřednictvím 24- hydroxylázy se inaktivují všechny cirkulující formy vitamínu D.

Převzato a upraveno z (Fathi et al. 2019).

3.4.3 Lékové interakce

Je známo, že 1,25 (OH)₂D₃ forma vitamínu D je schopná intestinální indukce jak P-gp, tak CYP3A4 (Tachibana et al. 2009; Thummel et al. 2001). Regulace střevní exprese CYP3A4 prostřednictvím VDR a 1,25(OH)₂D₃ byla poprvé dokázána studii, ze kterých vyplývá, že léčba buněk Caco-2 analogy vitamínu D vedla ke zvýšení mRNA *CYP3A4* (Thummel et al. 2001). Při léčbě 1,25(OH)₂D₃ buněčných linií lidského kolorektálního karcinomu a LS180 došlo ke zvýšení hladin mRNA *ABCB1* (Tachibana et al. 2009).

Kalcitriol je schopný indukovat MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4) v potkaním střevě, což vede ke zvýšení perorální absorpce adefoviru dipivoxilu. Proléčivo Adefovir dipivoxil je považováno za substrát P-gp a jeho aktivní metabolit adefovir je substrátem MRP4 (Yoon et al. 2015).

Léčiva, které významně ovlivňují stav vitamínu D, lze rozdělit na dvě základní skupiny, a to na léčiva ovlivňující vstřebání vitamínu D ve střevě a léčiva ovlivňující metabolismus vitamínu D (Kupisz-Urbá Nska et al. 2021). Mezi léčiva, které zasahují do absorpce vitamínu D patří například orlistat nebo sekvestranty žlučových kyselin (kolestípol, cholestyramin). Do druhé skupiny můžeme zařadit léčiva včetně statinů (atorvastatin simvastatin), antiepileptik (fenytoin, karbamazepin) či antimikrobiálních látek (RIF, isonioazid) (Robien et al. 2013).

3.5 Jaderné receptory

Superrodina NR, která obsahuje 49 členů, je považována za nejrozsáhlejší skupinu transkripčních regulátorů (Königshofer et al. 2021). NR pracují jako senzory pro malé intracelulární molekuly, lipidy a jejich deriváty a xenobiotika a překládají příslušné signály na genomickou úroveň (Königshofer et al. 2021, Libby et al. 2021). Zároveň, se podílí na koordinaci biologických procesů včetně metabolismu a reprodukce (Weikum et al 2018).

3.5.1 Klasifikace

Na základě sekvenční homologie se superrodina NR kategorizuje do 7 podrodin (Königshofer et al. 2021). Souhrnný přehled podrodin lidských NR s aktivujícími ligandy je uveden v Tab. 3.

3.5.1.1 Podrodina 0

Do této skupiny se řadí 2 atypické receptory s neznámými ligandy: DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1) a SHP (receptor nazývaný krátký heterodimerní partner), které jsou jedinečné svojí strukturou (Weikum et al 2018). Neobsahují DBD (doména vázající DNA), ale skládají se pouze z LBD (doména vázající ligand) (Nedumaran et al. 2009, Weikum et al 2018).

3.5.1.2 Podrodina 1

Tato velká podrodina zahrnuje receptory TR, RAR (receptor kyseliny retinové), PPAR, FXR, LXR, VDR, REV-ERB (reverzní-Erb receptory), ROR (receptory příbuzné kyselině retinové). Jejich regulace probíhá prostřednictvím lipofilních signálních molekul jako jsou hormony štítné žlázy, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a steroly (Weikum et al 2018). VDR je podrobněji rozebrán v podkapitole 3.5.4.

3.5.1.3 Podrodina 2

Tato skupina se skládá ze sirotčích receptorů, které váží mastné kyseliny. Patří sem transkripční faktory kuřecího ovalbuminu COUP-TF (transkripční faktory kuřecího ovalbuminu) HNF4 a RXR (Weikum et al. 2018).

3.5.1.4 Podrodina 3

Do této skupiny patří SR (steroidní receptory), zahrnující GR, AR (androgenní receptor), PR (progesteronový receptor), MR (mineralkortikoidní receptor) a ER α a ER β (dva blízké příbuzné estrogenové receptory) (Weikum et al. 2018).

3.5.1.5 Podrodina 4

Do této skupiny patří sirotčí NR nezbytné pro vývoj dopaminergních neuronů v mozku a rovněž se podílí na regulaci energetického metabolismu (Khorasanizadeh and Rastinejad 2016; Weikum et al. 2018). Označují se jako NGF1 (nervový růstový faktor 1), NURR1 (Nurr faktor 1) a NOR-1 (neuron-derived orphan receptor-1) (Weikum et al. 2018).

3.5.1.6 Podrodina 5

Tato skupina obsahuje SF-1 (steroidogenní faktor 1) a LRH-1 (jaterní receptor homolog-1), které jsou životně důležité pro vývoj a metabolismus. Přestože jsou klasifikovány jako sirotčí receptory, jsou regulovány fosfolipidy (Weikum et al. 2018).

3.5.1.7 Podrodina 6

Poslední podrodina obsahuje pouze jeden receptor s neznámým ligandem, nazývaný jako GCNF (zárodečný buněčný jaderný faktor), který je nezbytný pro embryonální vývoj (Alonso et al. 2019; Weikum et al. 2018).

Tab. 3 Celkový přehled podrodin jaderných receptorů s jejich ligandy.

Podrodina	Jméno	Zkratka	Ligand
OB	DAX-1	DAX-1	Neznámý
	Krátký heterodimerní partner	SHP	Neznámý
1A	Receptory hormonů štítné žlázy- α a β	TR α , β	Hormony štítné žlázy
1B	Receptory kyseliny retinové- α , β , γ	RAR α , β , γ	Kyselina retinová
1C	Receptory aktivované proliferátorem peroxisomu- α , β , γ	PPAR α , β , γ	Mastné kyseliny
1D	Reverzní Erb receptory- α a β	REV-	Hem
		ERB α , β	
1F	Sirotčí receptory související s RAR- α , β , γ	ROR α , β , γ	Steroly
1H	Farnesoidní X receptory- α	FXR α	Žlučové kyseliny
	Farnesoidní X receptor- β	FXR β	Neznámý
	Jaterní X receptory- α a β	LXR α , β	Oxysteroly
1I	Receptor vitamínu D	VDR	1α,25-dihydroxyvitamin D3
	Pregnanový X receptor	PXR	Endobiotika a xenobiotika
2A	Hepatocytární jaderné faktory 4- α a β	HNF4 α , β	Mastné kyselina
2B	Retinoidní X receptory-α, β, γ	RXRα, β, γ	Kyselina 9-cis retinová
2C	Testikulární receptory 2 a 4	TR2, 4	Neznámý
2E	Lidský homolog rodu Drosophila tailles	TLX	Neznámý
	Receptor specifický pro fotoreceptorovou buňku	PNR	Neznámý
2F	Transkripční faktory kuřecího ovalbuminu- α , β , γ	COUP-	Neznámý
		TF α , β , γ	
3A	Estrogenové receptory- α a β	Er α , β	Estrogeny
3B	Estrogeneru příbuzné receptory- α , β , γ	ERR α , β , γ	Neznámý
3C	Androgenní receptor	AR	Androgeny
	Glukokortikoidní receptor	GR	Glukokortikoidy
	Mineralokortikoidní receptor	MR	Mineralkortikoidy a glukokortikoidy
	Progesteronový receptor	PR	Progesteron
4A	Receptor nervového růstového hormonu 1B	NGF1-B	Neznámý
	Nurr faktor 1	NURR1	Nenasycené mastné kyseliny
	Osiřelý neuronový receptor	NOR-1	Neznámý
5A	Steroidogenní faktor 1	SF-1	Fosfolipidy
	Jaterní receptor homolog-1	LRH-1	Fosfolipidy
6A	Zárodečný buněčný jaderný faktor	GCNF	Neznámý

Převzato a upraveno z (Weikum et al. 2018).

3.5.2 Strukturální charakteristika jaderných receptorů

Všichni zástupci NR, s výjimkou atypických receptorů DAX-1 a SHP, sdílejí jednotnou proteinovou strukturu, která zprostředkovává jejich navázání na DNA a tím dochází k regulaci genové transkripce (Königshofer et al. 2021; Mukha et al. 2021; Weikum et al. 2018).

Polypeptid NR lze rozdělit do 5 až 6 oblastí od N-konce k C-konci, označovaných jako A-F (Li et al. 2022). Skládají se z následujících domén: variabilní N-koncová doména (NTD, oblast A/B), DBD (oblast C), závěsné oblasti (oblast D), LBD (oblast E) a variabilní C-koncová doména (oblast F) (Porter et al. 2019; Weikum et al. 2018). DBD a LBD jsou vysoce konzervované. DBD je složena ze dvou zinkových motivů (Zn prstů), ve kterých se nachází 8 cysteinových zbytků (Li et al. 2022; Porter et al. 2019). Zinkové motivy působí jako háček a v jádře zprostředkovávají vazbu na chromatin (Porter et al. 2019). Tato doména přímo interaguje s HRE (hormon-responzivními elementy), čímž se vyvolá aktivace genové transkripce (Mukha et al. 2021).

3.5.3 Mechanismus účinku

K aktivaci NR dochází prostřednictvím navázání ligandu (Mukha et al. 2021). Mezi typické přirozené ligandy se řadí malé lipofilní molekuly, jako jsou hormony (včetně reprodukčních), žlučové a mastné kyseliny, vitaminy a exogenní látky (například toxiny) (Königshofer et al. 2021; Mukha et al. 2021). Poté se NR vážou na specifické elementy DNA, buď ve formě monomeru, nebo homo- či hetero- dimeru. HRE obsahují dvě hexamerové sekvence, které jsou umístěny v inverzní, evertované nebo přímé orientaci (Mukha et al. 2021) a jsou obvykle odděleny 1-5 páry bází. HRE jsou lokalizovány v regulační oblasti cílových genů. Nadrodina NR byla rozdělena do následujících čtyř typů podle odlišných dimerizačních vlastností a vazebných míst na DNA (Königshofer et al. 2021).

NR typu I: Do této skupiny se řadí steroidní receptory, které jsou aktivovány steroidními hormony odvozenými od cholesterolu (estrogeny, androgeny, progestageny, kortikoidy) (Weikum et al. 2018). NR typu I jsou lokalizovány v cytoplazmě a zde jsou ukotveny chaperonovými proteiny (např. HSP90, heat shock protein) (Sever and Glass 2013; Weikum et al. 2018). Po navázání ligandu se z proteinového komplexu uvolní receptor, který poté vstupuje do jádra (Weikum et al. 2018). V jádře utvoří homodimery, které se vážou na invertované repetice HRE (Königshofer et al. 2021; Weikum et al. 2018).

NR typu II: Tyto receptory sídlí v buněčném jádře nezávisle na přítomnosti ligandu (Weikum et al. 2018). Vazba ligandu na LBD způsobí uvolnění receptoru z korepresového komplexu a jejich nahrazení koaktivátory (Sever and Glass 2013; Weikum et al. 2018). Komplexy koaktivátorů obsahují histon acetyltransferázu. Jedná se o proteinový enzym, který se podílí na otevření chromatinu a napomáhá aktivaci cílových genů (Sever and Glass 2013). Receptory tohoto typu heterodimerizují nejčastěji s RXR a váží se na přímé repetice HRE (Königshofer et al. 2021; Mangelsdorf et al. 1995). Jako příklad si můžeme uvést RAR a LXR (Weikum et al. 2018).

NR typu III: Mechanismus účinku je obdobný jako NR typu II (Weikum et al. 2018). Váží se na přímé repetice HRE, ale dochází k formaci homodimeru (Königshofer et al. 2021). Do NR typu III patří VDR (Weikum et al. 2018).

NR typu IV: Tento typ NR, jako je LHR-1 (jaterní receptor homolog-1) a SF-1, má také podobný mechanismus účinku jako druhý typ NR (Weikum et al. 2018), ale na HRE se váží jako monomery (Königshofer et al. 2021).

3.5.4 Receptor vitamínu D (VDR)

3.5.4.1 Základní charakteristika

VDR je polypeptid, obsahující 427 aminokyselin, který je součástí superrodiny NR (Christakos et al. 2016; Saponaro et al. 2020). Funguje jako transkripční faktor schopný modulovat geny, které kódují enzymy modifikující chromatin, a tím působí na lidský epigenom. Další úrovní epigenetické kontroly je interakce VDR s proteiny chromatinu. Zároveň bylo potvrzeno, že VDR interaguje s koaktivátory, jako je NCOA (nuclear receptor coactivator) rodina nebo s korepresory, jako jsou NCOR1 (nuclear receptor co-repressor 1) proteiny, které mají na starost otevření nebo naopak uzavření chromatinu (Saponaro et al. 2020). Dále ovlivňuje především metabolismus vitamínu D, kostí, vápníku a jeho homeostázu. Jsou mu připisovány protizánětlivé a antifibrotické účinky, podílí se také na snížení proteinurie, hypertenze a aterosklerózy (Fathi et al. 2019; Saponaro et al. 2020).

VDR se rovněž podílí na regulaci exprese CYP3A4 a P-gp (Qin and Wang 2019; Tachibana et al. 2009). U VDR a PXR byly popsány obdobné responzivní elementy vyskytující se v promotoru genu *CYP3A4* (proximální ER6, distální DR3, DR4) (Qin and Wang 2019; Wang et al. 2013). Vazba VDR-RXR na tyto elementy vyvolá indukci transkripce CYP3A4. Expozice Caco-2 buněk, buněk LS180, HepG2 buněk a lidských hepatocytů kalcitriolem způsobí zvýšení *CYP3A4* mRNA (Wang et al. 2013). VDR se také účastní exprese P-gp (Tachibana et al. 2009).

3.5.4.2 Lokalizace

Receptor se nachází převážně v epitelu endokrinních orgánů (např. v příštítných tělískách či v mléčných žlázách), ledvin, průdušek a brzlíku (Mutchie et al. 2019). Také je exprimován v trávicí soustavě, a to především v tenkém a tlustém střevě (Bakke and Sun 2018; Mutchie et al. 2019). Střevní VDR má důležité postavení v imunitě, proliferaci a diferenciaci (Bakke and Sun 2018). Kompletní rozmístění VDR ve tkáních a buňkách uvádí Tab. 4.

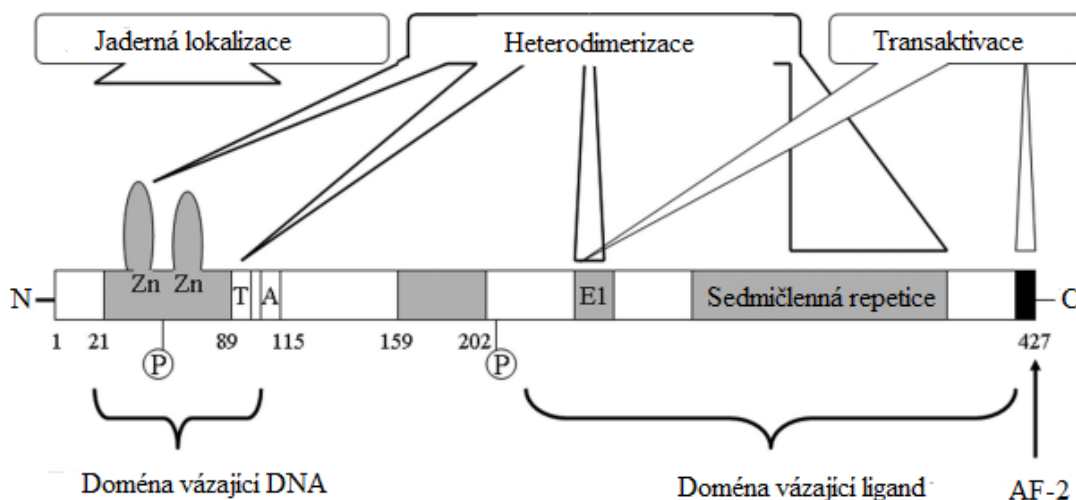
Tab. 4 Distribuce VDR ve tkáních a buňkách.

Orgán/tkáň	Míra expresivity	Typ buněk
Trávicí soustava		
Tenké střevo	+++++++	Epiteiální
Tlusté střevo	++++++	Epiteiální
Játra	–	–
Slinivka břišní	+++	Epiteiální
Ledviny		
Distální tubulus	+++++++	Epiteliální
Proximální tubulus	++	Epiteliální
Glomerulární podocyty	+	Podocyty
Dýchací systém		
Plicní alveolární buňky	–	–
Průdušky	+++++	Epiteliální
Kost		
Osteoblasty	+++++	Osteoblasty
Chondrocyty	+	Chondrocyty
Svalový systém	–	–
Imunitní systém		
Thymus	+++++	Epiteliální
Slezina/lymfatická uzlina	++	monocyty/makrofágy/T-buňky
Endokrinní systém		
Štítná žláza	–	–
Příštítná tělíska	+++++++	Epiteliální
Hypofýza	+++	Epiteliální
Nadledviny	–	–
Rozmnožovací soustava		
Varlata	++	Zárodečné buňky
Předstojná žláza	++++	Epiteliální
Prsní žláza	++++	Epiteliální

Převzato a upraveno z (Wang et al. 2012).

3.5.4.3 Strukturální charakteristika

VDR se skládá z následujících oblastí: NTD, DBD, LBD a pantové oblasti, která zprostředkovává dimerizaci (Mutchie et al. 2019). VDR, spolu se steroidními receptory, je schopný vázat své ligandy v nanomolárních koncentracích ve specifické LBD doméně s kapsou (Saponaro et al. 2020). Kapsa vázající ligand VDR umožňuje specifické interakce především s kalcitriolem, což je jeho přirozený ligand. Jako komerčně využívané ligandy se uplatňují kacípotril při léčbě psoriázy, doxerkalciferol, falekalcitriol a maxakacitol pro léčbu sekundární hyperparatyroidy a eldekalцитol na osteoporózu (Mutchie et al. 2019). Obr. 6 schématicky znázorňuje funkční domény VDR, které jsou zapojeny do hlavních kroků kontroly genové transkripce. Nejdříve dojde k navázání ligandu, poté k vytvoření heterodimeru s RXR, který se dále váže na VDRE (vitamin D response element) v promotoru 1,25(OH)₂D-rezponzivních genů. Posledním krokem je nábor koregulátorů do transkripčního iniciačního komplexu, jehož úloha spočívá ve zvyšování či potlačování rychlosti genové transkripce VDR. Koregulátor je označení pro jaderné proteiny interagující s VDR (Dusso et al. 2005).



Obr. 6 Strukturální charakteristika domén VDR, která zprostředkovává vazbu ligandu a DNA, jadernou lokalizaci, heterodimerizaci s RXR, transaktivaci a dvě hlavní fosforylační oblasti. Dále je zde znázorněna aktivační funkce 2.

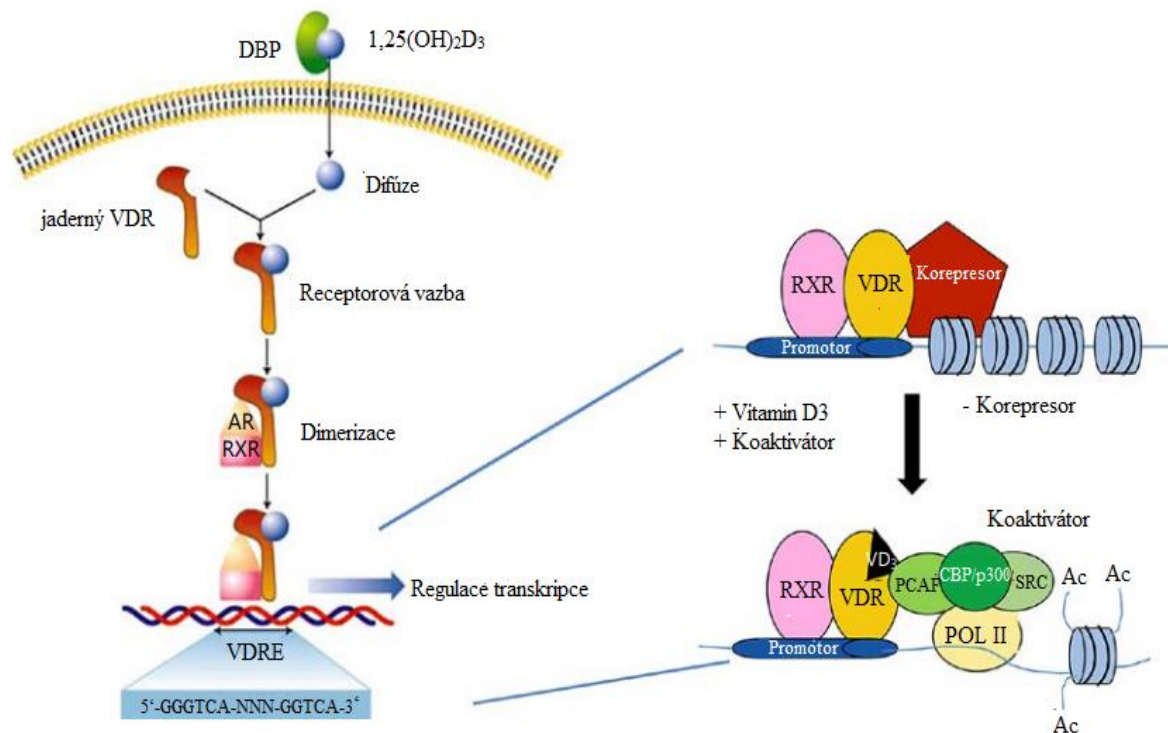
Převzato a upraveno z (Dusso et al. 2005).

3.5.4.4 Genomický mechanismus účinku kalcitriolu

Prostřednictvím genomických účinků, které zprostředkovává VDR, dochází k biologickému působení kalcitriolu (Fathi et al. 2019). Navázáním $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na VDR dojde k tvorbě heterodimeru s RXR. V jádře vzniká komplex $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR (Usategui-Martín et al. 2022), který se následně váže na VDRE (Fathi et al. 2019), které se skládají z promotorové oblasti genů a jsou schopné stimulovat nebo naopak potlačit genovou expresi (Jääskeläinen et al. 2000). Nejběžnější typ VDRE se nazývá DR3 a obsahuje variabilní poloprvky složené ze šesti bází s obecnou konsenzuální sekvencí AGGTCA, které jsou oddělené spacerem tří nukleotidů. Další typ VDRE se jmenuje IP9 skládající se ze dvou invertovaných palindromických sekvencí, které jsou odděleny devíti páry bází (Dusso et al. 2005). Nově vzniklý komplex se následně váže se do regulačních oblastí, nacházejících se v promotorových místech a distálních částí cílových genů (Fathi et al. 2019). Tyto geny se podílejí na účincích vitamínu D, ovlivňují metabolismus vápníku a fosforu a kontrolují adaptivní a vrozenou imunitní odpověď (Usategui-Martín et al. 2022).

Dimer VDR-RXR se kromě $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ může asociovat s dalšími molekulami jako je např. rodina koaktivátorů p160, aktivátory steroidních receptorů 1, 2 a 3 (SRC) (Christakos et al. 2016; Gil et al. 2018). Jejich působení je synergické s VDR, kdy dochází k zesílení transkripční schopnosti genu (Dusso et al. 2005). Jedná se o primární koaktivátory, které vykazují histonacetylázovou aktivitu a váží se na doménu AF-2 (activation function 2) VDR. Členové této rodiny rekrutují proteiny jako sekundární koaktivátory jako je CBP/p300, které mají také histonacetylázovou aktivitu, kdy výsledkem je multipodjednotkový komplex. Tento komplex slouží k modifikaci chromatinu a destabilizuje interakci DNA/histon, kde dochází k methylaci či acetylaci. Ligandový VDR interaguje s bazálními transkripčními faktory (TFIIB a faktory asociované s proteinem vázající TATA box), čímž dojde k vytvoření stabilního preiniciačního komplexu. Transkripci zprostředkovanou VDR umožňuje Mediátor, multiproteinový komplex, fungující prostřednictvím náboru RNA polymerázy II, který napomáhá k vytvoření preiniciačního komplexu (Gil et al. 2018). Při represii transkripce VDR vazba komplexu VDR-RXR rekrutuje korepresory z rodiny enzymů histon deacetyláz. Toto uskupení následně brání vazbě TATA vazebných proteinů, které jsou nutné k iniciaci

transkripce cílového genu RNA-polymerázou II (Dusso et al. 2005). Výše uvedený mechanismus popisuje Obr. 7.



Obr. 7 Mechanismus účinku vitaminu D. PCAF – CBP/p300 asociovaný faktor, SRC – koaktivátory steroidních receptorů.

Převzato a upraveno z (Gil et al. 2018).

3.5.4.5 Regulace exprese VDR

Regulace exprese VDR je závislá na genetických faktorech a faktorech prostředí. VDR řídí enviromentální faktory jako jsou strava, věk, sluneční záření, infekce a znečištění (Fathi et al. 2019, Usategui-Martín et al. 2022). Exprese genu *VDR* může být zvýšena kalcitriolem (Fathi et al. 2019). Množství ligandu přístupného pro vazbu VDR v cílové buňce je dáno bilancí mezi rychlostí vychytávání ligandu do buňky a rychlostí jeho metabolické inaktivace. Ligandově dependentní aktivaci VDR lze specifickým způsobem modulovat prostřednictvím obsahu intracelulárního ligandu a hladin intracelulárních proteinů interagujících s vitaminem D (IDBPs). Ligandy VDR se podílí na regulaci intracelulárních hladin VDR v cílové buňce, což je označení pro homologní regulaci. Naopak za heterologní up-regulaci se považuje regulace pomocí hormonů a růstových faktorů, které se neváží na VDR (Dusso et al. 2005). *VDR* gen může být regulován například prostřednictvím kyseliny retinové, parathormonem nebo glukokortikoidy (Fathi et al. 2019). Mechanismus up-regulace *VDR* mRNA kalcitriolem v ledvinách a příštítných tělískách není doposud objasněna, poněvadž v promotoru *VDR*

se nenachází VDRE pro přímou transaktivaci genu *VDR*. Indukce VDR proteinu prostřednictvím kalcitriolu se odehrává u všech typů buněk, a navíc zahrnuje stabilizaci VDR, která je závislá na ligandu z degradace proteazomů (Dusso et al. 2005), kde se uskutečňuje štěpení VDR (Masuyama and Macdonald 1998). Mediátor proteazomové degradace SUG1 interaguje s AF-2 doménou VDR (Jääskeläinen et al. 2000) a jeho nadměrná exprese selektivně mění proteolýzu VDR (Masuyama and Macdonald 1998).

3.6 Metody studia indukce léčiv ve střevní bariéře

In vitro buněčné kultury a *in vivo* zvířecí modely se řadí mezi konvenční metody, které jsou hojně využívány v akademické sféře či farmaceutickém průmyslu (Li et al. 2016). Své využití nachází zejména při predikci intestinální toxicity, metabolismu a transportu xenobiotik (Biel et al. 2020). K testování schopností látek indukovat střevní P-gp se využívají *in vitro* zejména buněčné linie Caco-2, LS180 nebo LS174T transfekované NR (Martinec et al. 2021). Caco-2 buněčná linie je odvozena z buněk lidského adenokarcinomu tlustého střeva a exprimuje enzymy typické pro střevní buňky (disacharidáza, peptidáza) (Xu et al. 2021). Z důvodu deficitu PXR však není tato buněčná linie vhodná pro studium indukce zprostředkované PXR (van de Kerkhof et al. 2008). Komerčně dostupná LS180 je rovněž buněčnou linií odvozenou z lidského adenokarcinomu tlustého střeva. V obou těchto buněčných liniích může být exprese *CYP3A4* regulována prostřednictvím 1,25-dihydroxyvitaminu D₃, ale pouze u LS180 byla zaznamenána indukce P-gp (van de Kerkhof et al. 2007). Buněčné kultury mají některá omezení, jelikož neodráží tkáňovou multicelulární a trojrozměrnou (3D) strukturu. Kromě toho mohou být pozorovány významné rozdíly v expresi lékových transportérů a biotransformačních enzymů v porovnání s normální tkání (Li et al. 2016). Tyto modely jsou cennými nástroji v počáteční fázi vývoje léčivých přípravků, kdy se využívají k hodnocení účinnosti transportu a mechanismů transportu léčivých látek. Pro získání podrobnějších informací, jak léčiva působí ve střevní bariéře je nutné použít komplexnější *in vivo* a *ex vivo* modely (Xu et al. 2021).

Modely *in vivo* si oproti buněčným *in vitro* modelům zachovávají vhodné fyziologické podmínky (Li et al. 2016). Pro studium absorpce léčiv se běžně používají myši, potkani, prasata a psi, kdy potkani jsou nejrozšířenějším druhem pro studium perorálně podávaných léčiv (Xu et al. 2021). *In vivo* modely mají také své limity. Oproti tomu aplikace těchto modelů je obtížná vzhledem k etickým omezením a finanční či časové náročnosti (Li et al. 2016; Xu et al. 2021). Při provádění pokusů na živých zvířatech musí být dodržena zásada 3R (replacement, reduction a refinement), jak je popsáno ve Směrnici EU 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Dalším jejich nedostatkem je, že neexistuje žádný živočišný druh, který by měl fyziologii gastrointestinálního traktu shodnou s lidskou fyziologií (Xu et al. 2021).

Za kompromis mezi modely *in vitro* a *in vivo* lze považovat modely *ex vivo* založené na izolovaných orgánech a z nich připravených řezech (Xu et al. 2021). Ultratenké intestinální

řezy (PCIS, precision-cut intestinal slices) je označení pro kultivační techniku *ex vivo* (Bigaeva et al. 2019), která našla uplatnění v případě studia intestinální bariéry. PCIS jsou životaschopné části tkáně, které mohou být připraveny za pomoci Krumdieckova tkáňového kráječe s reprodukovatelnou a definovanou tloušťkou (de Graaf et al. 2010). Za pomoci tohoto poloautomatického kráječe je zajištěna definovaná velikost řezu o tloušťce přibližně 250–400 μm (Li et al. 2016; Martinec et al. 2021). Řezy mohou být připraveny nikoli jen ze střeva, ale i z dalších tkání, jako jsou játra, plíce, ledviny, slezina, mozek či srdce (de Graaf et al. 2010).

Historie této techniky sahá až do roku 1923 Otto Warburg poprvé publikoval použití ručně připravených jaterních řezů, avšak z důvodu vysoké variability a krátké životaschopnosti bylo od jejich použití opuštěno. V 80. letech použil Farthing et al. ručně připravené střevní řezy, které využil pro studium metabolismu testosteronu, avšak pro inkubaci trvající pouze 1 hodinu. Z důvodu obtížné přípravy tenkých řezů došlo však již po 2 minutách inkubace k poškození epitelu. Až v současné době je možné připravit řezy s dobrou reprodukovatelností a životností za pomoci již výše zmíněného Krumdieckova kráječe nebo konkurenčního kráječe Vitron (van de Kerkhof et al. 2008).

PCIS nachází uplatnění ve studiu střevních onemocnění, fyziologii, účinnosti léčiv, toxicitě, transportu a metabolismu (Biel et al. 2020). Tento model je vhodný pro zkoumání regionálních rozdílů ve všech úsecích tenkého a tlustého střeva. Doposud byly tyto řezy získány ze zvířat (potkan, myš) a lidského střeva. Za hlavní výhody modelu PCIS lze považovat, že každý jednotlivý řez reprezentuje svým buněčným složením situaci *in vivo* a z jednoho vzorku lidské tkáně je možné připravit až 100 řezů. (Biel et al. 2022). Na druhou stranu nevýhodou této techniky je krátká životnost tkáňových řezů, kdy řezy z myší tkáně lze kultivovat až do 48 hodin, zatímco potkaní řezy jsou životaschopné několik hodin (Bigaeva et al. 2019) a řezy získané z lidského střeva jsou životaschopné 48 hodin (Martinec et al. 2021). Souhrn výhod a nevýhod *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo* modelů je uveden v Tab. 5.

Tab. 5 Shrnutí výhod a nevýhod modelů *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* při hodnocení intestinální transportu léčiv.

Model	Výhody	Nevýhody
<i>In vitro</i>	nízké náklady v porovnání s <i>in vivo</i> snadné zavedení systému žádné etické aspekty	nedostatek skutečné anatomie/fyziologie střeva interindividuální rozdíly mezilaboratorní variabilita
<i>In vivo</i>	zlatý standard v preklinické fázi inaktní fyziologické procesy a vlastnosti onemocnění	finanční a časová náročnost etické ohledy druhové rozdíly mezi lidmi a pokusnými zvířaty
<i>Ex vivo</i>	zachování integrity střeva dostupnost různých střevních segmentů	složitý systém zřízení nedostatek krevního zásobení

Převzato a upraveno z (Xu et al. 2021).

4 CÍL PRÁCE

Vitamin D je široce užívaný mikronutrient užívaný v doplňcích stravy, který plní nepostradatelné funkce v organismu. Údaje o tom, jak působí na intestinální enzymy a efluxní transportéry nemusí být vždy dostatečné. Ultratenké tkáňové řezy připravené z lidského střeva slouží k podrobnějšímu prozkoumání účinku vitamínu D3 v intestinální bariéře.

Cílem této diplomové práce bylo posoudit, zda vitamin D3 ovlivňuje expresi a aktivitu *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevní bariéře. Pro splnění tohoto cíle jsme použili metodu ultratenkých tkáňových řezů, které byly připraveny z lidského proximálního jejunu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie a reagentia, přístroje, biologický materiál

Chemikálie a reagentia

- 2-propanol (VWR Chemicals)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich)
- Agaróza (Low gelling temperature, Sigma-Aldrich)
- Amfotericin B – roztok o koncentraci 250 µg/ml (Sigma-Aldrich)
- ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche)
- CP-100356 monohydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Diethyl pyrokarbonát (DEPC) (PanReac AppliChem)
- DMSO (Dimethyl sulfoxid, Sigma-Aldrich)
- EDTA pufr
- EtOH (VWR Chemicals)
- Gene assay (Thermo Fisher Scientific) viz. Tab. 6.

Tab. 6: Použité genové assaye.

Číslo genové assay	Název
Hs00604506	<i>CYP3A4</i>
Hs00184500	<i>ABCB1</i>
Hs01045843	<i>VDR (NR1I1)</i>
Hs00984230	<i>B2M</i>

- Gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech)
- Gentamicin – roztok o koncentraci 50 mg/ml (Sigma-Aldrich)
- Glykogen (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Thermos Scientific)
- Krebs-Henseleitův roztok
- NaOH (Lach:NER)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- Rhodamin 123 (Sigma-Aldrich)
- rifampicin 30 µM (Sigma-Aldrich)

- SONOP
- Tris-HCl
- Vitamin D 100 nM, 50 nM (Sigma-Aldrich)
- Williams E medium GlutaMAX™(Thermo Scientific)

Přístroje

- Bio-rad Thermal cyklér/cycler T100
- Inkubátor (Binder CB 60, napojení na O₂ a CO₂ tlakové lahve)
- Kráječ tkáňových řezů (Krumdieck tissue slicer, MD 4001)
- Laminární box (AURA 2000 M.A.C.)
- Mini centrifuga (GUSTO, Heathrow Scientific)
- Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Přípravek pro zalití tkáně do agarózy
- Real-Time PCR QuantStudio 6 (Applied Biosystems)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200 PRO (Tecan)
- Termostat TCH-100
- Vortex (GENIE 2, Scientific Industries)
- Orbitální třepačka PSU i10 (Biosan)
- Homogenizátor FastPrep24-5G (MPbio)

Biologický materiál

- Vzorek lidského střeva (proximální jejunum) odebraný v průběhu operace typu pylorus zachovávající pankreatoduodenektomie. Všechny vzorky byly odebrány od pacientů po podepsání informovaného souhlasu. Experimenty byly povoleny etickou komisí pod číslem 202103 I67P.

Ostatní materiál

- 24 jamkové destičky (Sarstedt)
- 96 jamkové destičky (Sarstedt)
- stříkačkový membránový filtr (PTFE, 0,22 µm; Ø 25 mm)
- mikrokumavky (1,5 a 5 ml; Eppendorf)
- mikrokumavky se závitovým víčkem (2 ml, Sarstedt)

- keramické kuličky (1,2 – 1,6 mm, Ginzell)
- opakovací pipeta (Eppendorf)
- multikanálová pipeta (Eppendorf)

Roztoky a jejich příprava

Krebs-Henseleit pufr

Příprava Krebs-Henseleitova pufru (KHB) probíhala dle protokolu podle de Graaf *et al.* 2010 a dělí se do dvou částí (de Graaf et al. 2010). Nejdříve jsme připravili 10x koncentrovaný zásobní roztok, který se v den experimentu naředil na požadovanou koncentraci a byly do něj přidány další důležité látky.

Příprava 10x koncentrovaného základního roztoku KHB

Látky uvedené v Tab. 7 se rozpustily v 1l vody. Poté se roztok přefiltroval pomocí PFTE filtru (0,22 μm , průměr 25 mm) do sterilních 100 ml kelímků a byl skladován v chladu do doby spotřeby.

Tab. 7 Příprava 10x koncentrovaného zásobního roztoku KHB.

Látka	Množství
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,67 g
KCl	3,73 g
NaCl	69,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,71 g
KH ₂ PO ₄	1,63 g
H ₂ O doplnit do	1000 ml

Příprava 1x koncentrovaného finálního roztoku KHB

Koncentrovaný základní roztok KHB byl těsně před experimentem zředěn 10x a doplněn o další látky uvedené v Tab. 8. Poté byl uložen do nádoby s ledem a 30 min byl prokysličován pneumoxidem (95 % O₂, 5 % CO₂). Po prokysličení se pH upravilo pomocí roztoku NaOH (5M) na 7,42. Po celou dobu experimentu byl KHB uchovávan na ledu.

Tab. 8 Příprava 1x koncentrovaného finálního roztoku KHB.

Látka	Množství
10x základní roztok KHB	100 ml
NaHCO ₃	2,10 g
D-glukóza monohydrát	4,95 g
HEPES	2,38 g
H ₂ O doplnit do	1000 ml

Inkubační médium WME

Za sterilních podmínek v laminárním boxu bylo v malém objemu Williams E media (WME) rozpuštěno 1,387 g D-glukóza monohydrátu. Tento roztok byl následně přefiltrován za pomoci injekční stříkačky a stříkačkového membránového filtru (PTFE, 0,22 µm; Ø 25 mm) zpět do zásobní lahve se zbytkem WME (0,5 litru). Do zásobní lahve bylo dále přidáno 0,5 ml antibiotika Gentamicinu (50 mg/ml) a 5 ml antimykotika Amfotericinu B (250 µg/ml). Takto připravené médium bylo uchováváno v lednici a bylo odebíráno za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Agaróza 3%

Do skleněné lahve bylo naváženo 1,5 g agarózy (Low gelling temperature type IIV) a 0,45 g NaCl. Destilovanou vodou byl objem doplněn do 50 ml. Láhev byla následně zahřívána na vodní lázni na minimálně 60 °C. Za této teploty je agaróza rozpuštěná v roztoku. Takto připravená agaróza je připravena pro vlastní použití v experimentu, nebo ji lze opět zchladit a uchovávat v lednici.

Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení ATP (SONOP)

Rozpustíme 0,372 g EDTA v 100 ml MilliQ vody. Dále upravíme pH pomocí 5 M roztoku NaOH na 10,9. Následně je přidáno 370 ml ethanolu (96%) do 500 ml (v odměrné baňce).

Příprava Tris/EDTA pufru pro stanovení hladiny ATP

Nejprve jsou rozpuštěny EDTA (0,37 g) a Tris HCl (6 g) v objemu cca 300 ml MilliQ vody. Dále je pomocí HCl upraveno pH na 7,6. V odměrné baňce je objem doplněn na 500 ml.

5.2 Pracovní postupy

5.2.1 Příprava ultratenkých intestinálních řezů

Pro inkubace s jednotlivými látkami bylo třeba připravit řezy ze vzorku střeva o definované tloušťce. Postup pro přípravu ultratenkých řezů v našich experimentech byl převzat z protokolu publikovaného de Graaf *et al.*, 2010. Níže je stručně popsán postup přípravy.

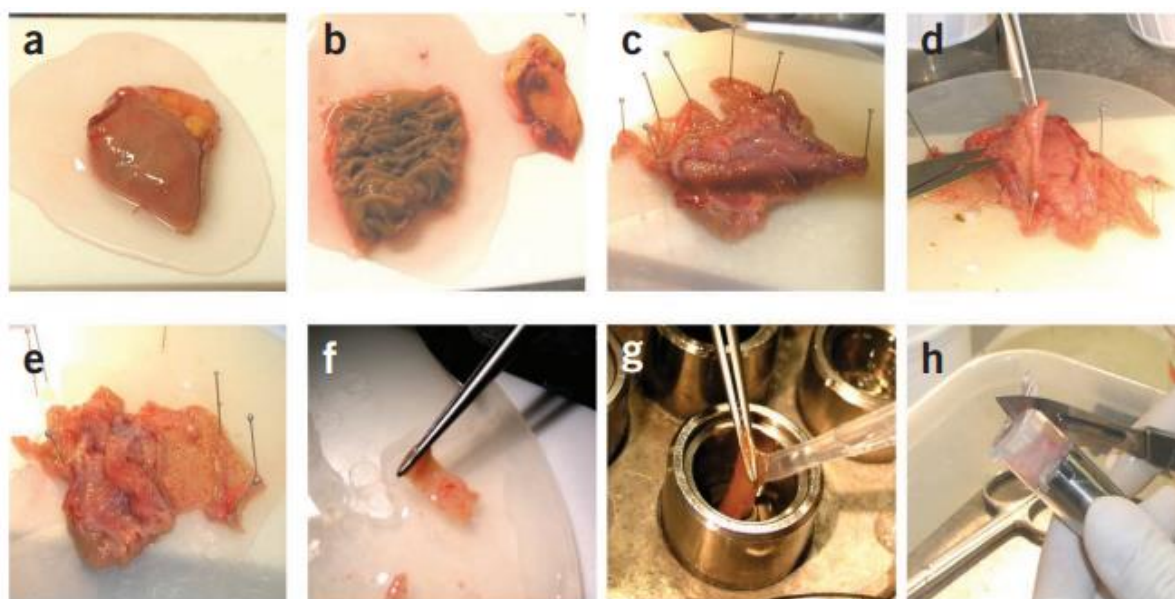
Vychlazený KHB (4 °C) jsme ponechali okysličit probubláním pneumoxidu (95 % O₂, 5 % CO₂) po dobu půl hodiny. Následně bylo jeho pH upraveno roztokem 5M NaOH na hodnotu 7,42. Takto připravený KHB byl po dobu celého experimentu uchováván na ledu.

Vzorek střeva byl odebrán v průběhu operace typu pylorus zachovávající pankreatoduodenektomie na chirurgickém oddělení ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v souladu s etickými pravidly po podepsání informovaného souhlasu pacientem. Tkáň byla ihned přenesena do KHB a byla transportována v uzavřené nádobě, která byla umístěna v termosce na ledu do laboratoře, kde byl vzorek střeva dále zpracován.

Po celou dobu zpracování vzorku byla tkáň omývána pomocí prokysličeného KHB, aby se tak předešlo její degradaci. Tkáň byla dále po celou dobu zpracování umístěna na chladicí gumové podložce (4 °C).

Vzorek střeva není možné krájet přímo. Je třeba oddělit nejprve jeho mukózní část od zbytku svaloviny. Po oddělení byla mukózní část rozdělena na segmenty obdélníkového tvaru o přibližné velikosti 4 mm x 4 cm. Takto připravená tkáň byla dále příčně rozdělena na dva totožné segmenty. Takto nachystanou tkáň jsme přenesli do přípravku pro zalití tkáně do agarózy sestávající se z dutého válečku a pístu na dně tohoto válečku. Tkáň jsme opřeli o stěny válečku, kde jsme na dno nalili trochu agarózy, která tkáň fixovala k pístu. Takto fixovaná tkáň byla dále rychle zalita agarózou a za pomoci pinzety nebo špendlíku držena v horizontální poloze. Celý přípravek pro zalití tkáně do agarózy byl umístěn na ledu a předem vychlazen, aby došlo k rychlému stuhnutí agarózy. Po ztuhnutí jsme vytlačili pístem z kovového válečku tkáň střeva zalitou do agarózy a přesunuli ji do kráječe (Krumdieck Tissue

Slicer MD4000). Kráječ, naplněný KHB, byl napojen na chladicí okruh (4 °C), aby byla tkáň a připravené řezy stále drženy v chladu. Za pomoci otočného mikrošroubu byl kráječ nastaven na tloušťku řezu 300 μm. Řezy byly po odebrání z kráječe vizuálně zkontrolovány. Pro experiment byly vybrány řezy pravidelného tvaru bez známek viditelného poškození, které jsme důkladně očistili od zbytků agarózy za pomoci entomologické pinzety. Při přebírání řezů a jejich čištění od agarózy jsme pracovali na Petriho misce naplněné KHB a umístěné v nádobě s ledem. Očištěné a nachystané řezy jsme použily pro následné experimenty. Postup přípravy lidských řezů popisuje Obr. 8.



Obr. 8 Postup přípravy lidských řezů. (a) Odstranění tukové tkáně a otevření střeva. (b,c) Úsek se upevní pomocí špendlíků na předchlazenou silikonovou podložku. (d,e) Opatrné rozříznutí svaloviny. (f) Nakrájení střeva na proužky požadované velikosti. (g,h) Vložení do agarózy a vyjmutí hotového válečku.

Převzato a upraveno z (de Graaf et al. 2010).

5.2.2 Funkční studie s RHD123

V rámci tohoto experimentu jsme ověřili, zda byl v řezech funkční efluxní transportér P-gp a zda inkubace s potenciálním induktorem měla vliv tento transportér. Rhodamin 123 (RHD123) je substrátem P-gp a je snadné stanovit jeho koncentraci na destičkovém fluorometru.

Do 24 jamkových destiček (Sarstedt) jsme nejprve napipetovali 1,3 ml WME s a bez studované látky. Destičky jsme vložili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂ a 80 % O₂) a nechali po dobu 30 minut preinkubovat, aby se WME nasýtilo kyslíkem. Následně jsme do každé

jamky přenesli dva řezy a destičku opět vložili do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂ a 80 % O₂) na třepačku (nastavenou 90 kmitů za minutu). Vlastní experiment s RHD123 (10 μM) jsme provedli v čase 24 a 48 hodin inkubace. V případě 48hodinové inkubace bylo médium po 24 hodinách vyměněno za nové. Kontrola v čase 0 byla bez předchozí inkubace se studovanou látkou a měla primárně ověřit funkční stav získané tkáně.

Po uplynutí 24, nebo 48 hodin byly řezy přeneseny do 24 jamkové destičky s napipetovaným čistým 0,5 ml WME, nebo WME s inhibitorem ABCB1 (CP100356), kde byly ponechány 0,5 hodiny. Po půl hodině v preinkubaci byly řezy přeneseny na další 24 jamkovou destičku s 0,5 ml WME média obsahujícího 10 μM RHD123, případně 10 μM RHD123 a inhibitoru (CP100356, 2 μM). Za těchto podmínek byly řezy inkubovány po dobu 2 hodin.

Po uplynutí 2 h jsme řezy opláchli 2x v KHB (< 4 °C) na 24 jamkové destičce (1 ml na jamku). Po opláchnutí každého řezu jsme je vložili do 2 ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem s keramickými kuličkami (1,2 – 1,6 mm, Ginzler, přibližný objem 200 μl). Takto připravené vzorky je možné okamžitě zpracovat nebo je vložit do mrazáku pro pozdější vyhodnocení (-20°C).

5.2.3 Inkubace řezů pro stanovení životnosti tkáně

Abychom zjistili, zda mají námi studované látky vliv na životnost řezů stanovili jsme v 24 a 48hodinových intervalech hladinu ATP. Pro inkubaci byly použity 24 jamkové destičky, ve kterých bylo napipetováno 1,3 ml WME. Dále v jedné řadě po třech byl přidán vitamin D o koncentracích 50 nM a 100 nM a RIF o koncentraci 30 μM. Inkubace probíhala opět v čase 0, 24 a 48 hodin, kdy v každé jamce byl umístěn jeden řez. V případě 48hodinové inkubace bylo médium po 24 hodinách vyměněno za nové. Vzorek jsme následně opláchli a umístili do 2 ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem s keramickými kuličkami (1,2 – 1,6 mm, Ginzler, přibližný objem 200 μl) a 0,2 ml SONOPu. Vzorky jsme mohli ihned zpracovat nebo je ihned zamrazit v dusíku nebo na suchém ledu (-80 °C).

5.2.4 Inkubace řezů pro stanovení exprese *ABCB1* a *CYP3A4*

Tato inkubace probíhala podobným způsobem jako dvě výše uvedené s RHD123 a ATP s tím rozdílem, že v každé jamce byly umístěny tři tkáňové řezy. Po ukončení inkubace byly řezy umístěny do 1 ml roztoku TriReagentTM napipetovaném v 2 ml zkumavkách

se šroubovacím uzávěrem s keramickými kuličkami (1,2 – 1,6 mm, Ginzl, přibližný objem 200 μ l). Tyto vzorky byly ihned po odebrání zmrazeny v tekutém dusíku nebo na suchém ledu a následně uchovávány při -80 °C.

5.2.4 Stanovení koncentrace RHD123

Do každé zkumavky obsahující vzorek a keramické kuličky jsme přidali 600 μ l roztoku acetonitrilu ve vodě (2:1, v/v). Vzorek jsme následně zhomogenizovali na homogenizátoru FastPrep24-5G (6,5 m/s, 2x po 40 sekundách s pauzou po dobu 20 vteřin). Zhomogenizované vzorky jsme stočili v centrifuze (s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma) po dobu 10 minut na 10 000 RPM. Na dně zkumavky se vytvořila peleta sraženého proteinu. Z každého vzorku bylo opatrně pipetou odebráno 150 μ l supernatantu, který jsme napipetovali na 96 jamkovou destičku. Každý vzorek byl následně změřen v duplikátu. Zkumavky s peletou jsme vložili do termostatu TCH-100 a při 37 °C se roztok acetonitrilu nechal odpařit do sucha (většinou do druhého dne). Ve zkumavkách zbyly pouze kuličky a precipitát bílkovin, ze kterého se následně změřila koncentrace proteinu. Na každou destičku byly dále připraveny dvě kalibrační křivky o koncentracích 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1 a 2 μ M. Tyto kalibrační roztoky RHD123 byly připraveny ze zásobního roztoku RHD123 o koncentraci 10 mM. Destička byla změřena na přístroji Tecan Infinite, kde jako parametry měření byly použity excitační vlnová délka 485 nm a emisní vlnová délka 530 nm.

5.2.5 Stanovení koncentrace ATP

Pro měření koncentrace ATP jsme používali komerční ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II. Nejprve jsme si připravili chlazenou centrifugu (s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma) na 4 °C a mezitím jsme vzorky rozmrazili na ledu. Množství SONOPu jsme doplnili do objemu 1 ml a vzorky ihned homogenizovali na homogenizátoru FastPrep-24 5G (6,5 m/s, 2x po 40 sekundách s pauzou po dobu 20 vteřin). Vzorky jsme následně stočili na centrifuze při 4 °C po dobu 5 minut na 13 200 RPM. Na černou 96 jamkovou destičku jsme nanášeli 5 μ l supernatantu a dále 45 μ l TRIS pufru. Každý vzorek byl napipetován na destičku v duplikátu.

Dále jsme připravili z příloženého standardu ATP kalibrační křivku o koncentracích $1,65 \times 10^{-4}$; $1,65 \times 10^{-6}$; $3,30 \times 10^{-7}$; $1,65 \times 10^{-7}$; $3,30 \times 10^{-8}$ a $1,65 \times 10^{-8}$ M ATP.

Jako poslední krok jsme naředili v 10 ml destilované vody luciferázu a nechali volně na stole inkubovat po dobu 5 minut. Roztok luciferázy jsme poté opatrně promýchali

a do každé jamky přidali 50 µl tohoto enzymu. Na přístroji Tecan Infinite m200 jsme následně změřili luminiscenci v čase 0 a 5 minut. Stanovením ATP jsme ověřili, zda tkáň žije, případně zda má studovaná látka na tkáň toxické účinky. Dle předchozí studie se za živou tkáň považuje taková, která má hladinu ATP 2 nmol.mg⁻¹ (de Graaf et al. 2010).

5.2.6 Stanovení koncentrace proteinu

Po odpaření vzorků do sucha jsme k řezům napipetovali 200 µl 5M NaOH. Toto činidlo způsobilo lýzu proteinu. Následovala 30minutová inkubace na třepačce umístěné v suchém inkubátoru TCH 100 (37 °C) za stálého míchání (300 RPM). Pak se ke každému vzorku přidalo 800 µl destilované vody. Doplněním vody na 1 ml jsme dosáhli zředění na finální koncentraci 1M NaOH. Po homogenizaci vzorků na homogenizátoru FastPrep-24 5G (6,5 m/s, 2x po 40 sekundách s pauzou po dobu 20 vteřin) se na 96 jamkovou destičku nanáší 10 µl z každého vzorku v duplikátu. Dále byla připravena kalibrační křivka albuminu v 1M NaOH o koncentracích 0, 50, 100, 200, 300 a 500 µg/ml. Od těchto kalibračních roztoků bylo na destičku pipetováno také 10 µl. Na každé destičce byly dvě kalibrační křivky. Následně jsme do všech jamek přidali pomocí multikanálové pipety 200 µl zeleného roztoku C, který jsme si nachystali těsně před použitím smícháním roztoku A (kyselina bicinchoninová – BCA, NaHCO₃ a Na₂CO₃) s roztokem B (síran měďnatý) v poměru 50:1. Roztok A a B byl součástí komerčního kitu Pierce BCA Protein Assay Kit, který jsme použili pro stanovení množství proteinu. Následovala 30minutová inkubace při 37 °C v suchém inkubátoru na třepačce. Po uplynutí 30 minut byla měřena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite při vlnové délce 562 nm. Zjištění koncentrace proteinu ve vzorcích je důležitá kvůli výpočtům koncentrace ATP a RHD123. Výsledky z těchto experimentů se vztahují na koncentraci proteinu.

5.2.7 Izolace RNA

Pro provedení qPCR reakce bylo nejprve nutné izolovat ze vzorku tkáň RNA. Po celou dobu experimentu jsme pracovali na ledu, abychom zabránili degradaci RNA.

Vzorky byly po roztátí nejprve zhomogenizovány na homogenizátoru FastPrep24-5G (6,5 m/s, 2x po 40 sekundách s pauzou po dobu 20 vteřin). Ke zhomogenizovaným vzorkům jsme přidali 200 µl chloroformu na 1 ml TriReagentTM roztoku a následně jsme vzorky intenzivně protřepali. Po protřepání jsme vzorky stočili na centrifuze (12 000 g, 15 minut, 4 °C).

Po stočení se roztok rozdělil na 3 fáze. Vodná část obsahuje RNA, mezifáze DNA a na dně se nacházela organická fáze, proteiny a lipidy.

Do předem připravené Eppendorf zkumavky jsme odpipetovali co nejvíce vodné fáze, aniž bychom zasáhli ostatní fáze. Poté jsme přidali 2 μ l glykogenu, který má podobnou strukturu jako RNA a napipetovali 500 μ l 2-propanolu. Vzorky jsme promíchali a nechali je stát 10 minut při pokojové teplotě. V dalším kroku jsme vzorky stočili opět na centrifuze (12 000 g po dobu 10 minut při 4 °C). Vysrážená RNA se zformovala do bílé pelety na stěně zkumavky. Po odstranění supernatantu a jsme peletu opláchli v 1 ml 75 % ethanolu. Vzorky jsme stočili na centrifuze (12 000 g, 5 minut, 4 °C) a krok s oplachem ještě jednou opakovali. Ethanol jsme poté odsáli pomocí pipety, zbytek ethanolu jsme nechali odpařit, avšak peleta nesměla být úplně suchá, aby bylo možné ji následně snadno rozpustit. Peletu jsme rozpustili ve 20 μ l DEPC vody. Odebrali jsme 2 μ l izolované RNA a z toho jsme odebrali 1 μ l na Nanodrop. Použili jsme program Nukleové kyseliny – RNA 40 a koncentrace RNA byla měřena v ng/ μ l. Ideální absorbanční poměr 260/280 byl 1,8 až 2,2, nižší hodnoty znamenaly kontaminaci proteiny či DNA a absorbanční poměr 260/230 měl být větší než 1,7, nižší hodnoty znamenaly přítomnost organického rozpouštědla.

5.2.8 Reverzní transkripce

Z jednotlivých vzorků jsme připravili směsný vzorek, kdy z každého jednotlivého vzorku bylo odebráno 8 μ l. Celkový objem ve zkumavce byl 24 μ l. Z tohoto objemu jsme následně odebrali 2 μ l a změřili jsme koncentraci na Nanodropu. Dle výsledné koncentrace jsme dopočítali kolik DEPC vody je potřeba k naředění vzorku na koncentraci 500 ng/ml. S touto koncentrací jsme dále pracovali.

Samotnou reverzní transkripci jsme prováděli pomocí gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi-Biotech). Do 0,2 ml zkumavky jsme napipetovali celkem 1000 ng vyizolované RNA a přidali jsme DEPC vodu (celkový objem RNA + vody byl 10 μ l). Dále jsme do každé zkumavky přidali 10 μ l roztoku z kitu, který se připravil smícháním 200 μ l roztoku A (obsahuje pufr, dNTP, primery) s roztokem B (obsahuje samotný enzym). Finální objem byl tedy 20 μ l. Na závěr jsme vzorky stočili. Takto připravené vzorky byly přemístěny do PCR termocykléru, kde byly inkubovány při 42 °C po dobu 1 hodiny. V průběhu reakce došlo k přepisu mRNA na cDNA.

5.2.9 Real-Time PCR

Pro následné stanovení exprese jsme cDNA z reverzní transkripce zředili na finální koncentraci 25 ng/ μ l. V původní reakční směsi pro reverzní transkripci bylo 50 ng/ μ l a proto jsme do každého přidali 20 μ l DEPC vody.

Vzorky jsme nanášeli na PCR 384 jamkovou destičku. Každý vzorek obsahoval 1 μ l cDNA, 2,5 μ l Master Mixu (TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG), 0,25 μ l gene assay a 1,25 μ l DEPC vody. Finální objem byl v každé jamce tedy 5 μ l. Jako kontrola se všemi geny byla napipetována DEPC voda namísto mRNA. Veškerá příprava probíhala v laminárním boxu. Následně jsme destičku překryli folií a byla přemístěna do přístroje pro Real-Time PCR (polymerase chain reaction), kde byly nastaveny podmínky dle Tab. 9. Expresi studovaných genů *ABCBI*, *CYP3A4*, *VDR* byla vypočítána na základě metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak 2008). Jako referenční gen byl použit *B2M* (Beta-2-Microglobulin).

Tab. 9 Nastavené podmínky pro Real-Time PCR.

Systém	Aktivace	PCR - 40 cyklů	
	polymerázy	Denaturace	Hybridizace a elongace
Teplota (°C)	95	95	60
Čas (mm:ss)	10:00	00:15	1:00

5.2.10 Statistická analýza

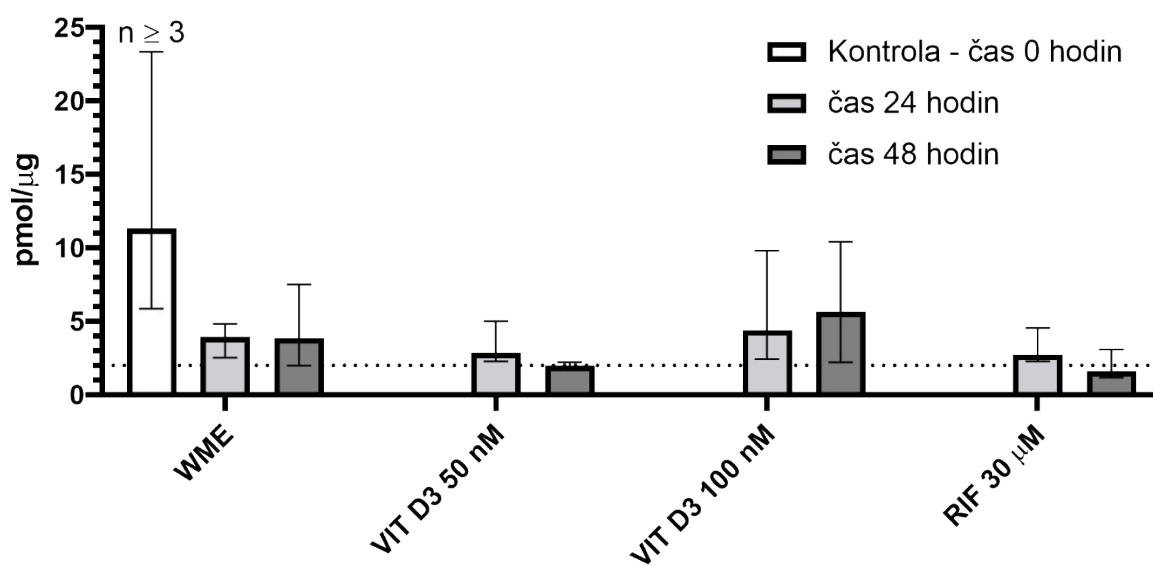
Výsledky vlivu Vitaminu D a RIF na expresi vybraných genů byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Data v grafech jsou prezentována jako medián \pm rozsah (variační rozpětí). Vliv studovaných látek na hladiny ATP byl hodnocen metodou one-way ANOVA s následným Bonferroniho multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena jako: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6 VÝSLEDKY

6.1 Vliv vitamínu D3 na ATP

V tomto experimentu jsme testovali vliv vitamínu D3 (50 nM a 100 nM) na životaschopnost střevních řezů v časových intervalech 24 a 48 hodinách. Dle získaných dat (Obr. 9) můžeme pozorovat, že tkáň byla živá v průběhu celé inkubace s výjimkou času 48 hodin u vitamínu D3 50 nM a RIF 30 μ M, kde hladiny ATP klesly mírně pod mezní hodnotu. Toto bylo pravděpodobně způsobeno problémy se samotnou tkání než vlivem léčiva. Vitamin D3 v některých experimentech naopak mírně zvyšoval hladiny ATP oproti kontrole. Problémy s životností v čase 48 hodin se také projevíly v experimentu s RHD123 (viz níže).

Vitamin D3 - vliv na životnost střevních řezů - koncentrace ATP

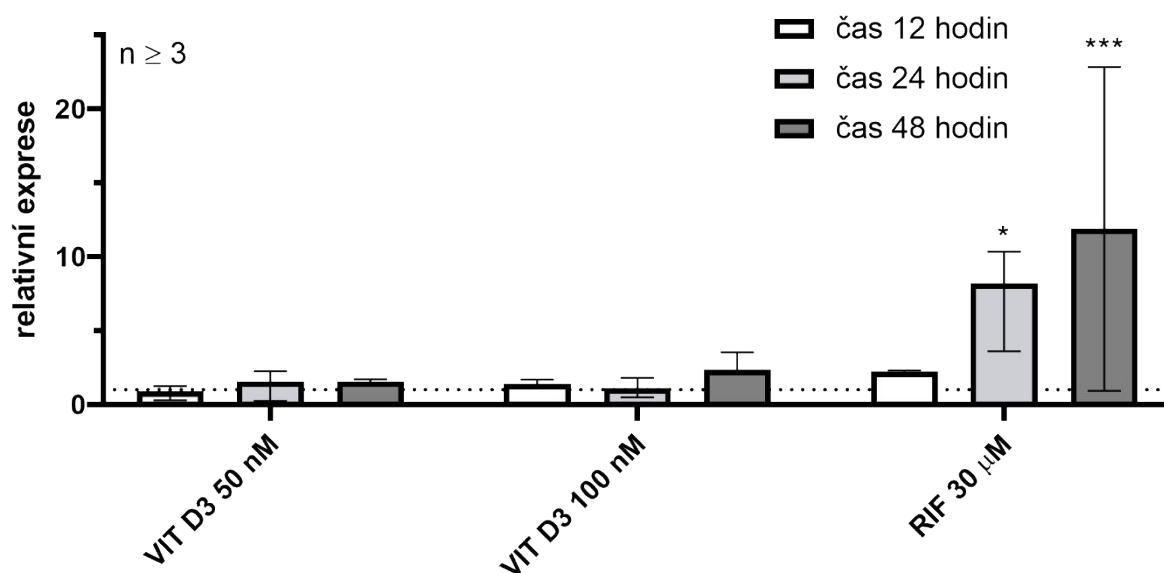


Obr. 9 Vliv vitamínu D3 na životaschopnost střevních řezů během 24 a 48hodinové inkubace. Tečkovaná čára značí hladinu ATP 2 pmol/μg proteinu. Pokud se koncentrace ATP drží nad touto hodnotou je tkáň považována za živou. Výsledky byly vyhodnoceny metodou one-way ANOVA s následným multiple comparasion testem. Data v grafech jsou prezentována jako medián ± rozsah (variační rozpětí).

6.2 Vliv vitamínu D3 na expresi *CYP3A4*

V tomto experimentu jsme sledovali vliv vitamínu D3 na expresi *CYP3A4* po 12, 24 a 48 hodinách. Z Obr. 10 vyplývá, že vitamin D3 nemá vliv na expresi tohoto genu. Pouze koncentrace 100 nM vykazuje v čase 48 hodin přibližně dvojnásobnou hladinu exprese oproti kontrole (medián zvýšení exprese - 2,36x). RIF 30 potvrdil, že námi studovaná tkáň byla schopna indukce *CYP3A4*, avšak zejména v čase 48 hod byla poměrně velká variabilita mezi experimenty.

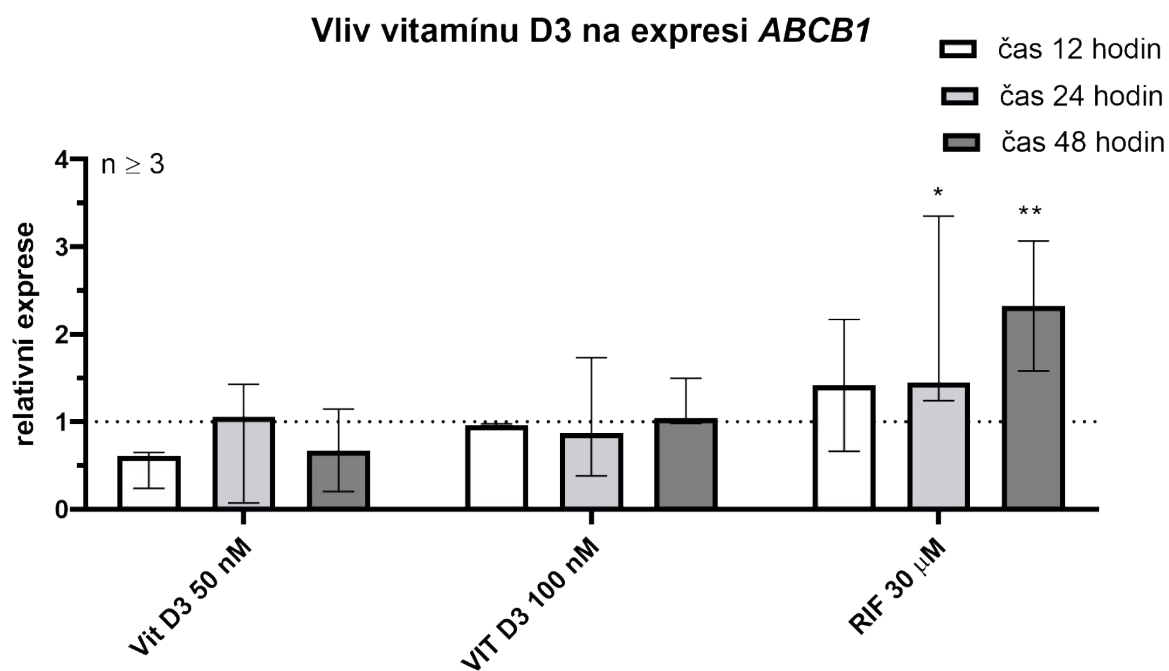
Vliv vitamínu D3 na expresi *CYP3A4*



Obr. 10 Vliv vitamínu D3 na expresi *CYP3A4* během 12, 24 a 48hodinové inkubace. Data v grafech jsou prezentována jako medián \pm rozsah (variační rozpětí). Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Získaná data byla statisticky hodnocena metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena jako: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.3 Vliv vitamínu D3 na expresi *ABCB1*

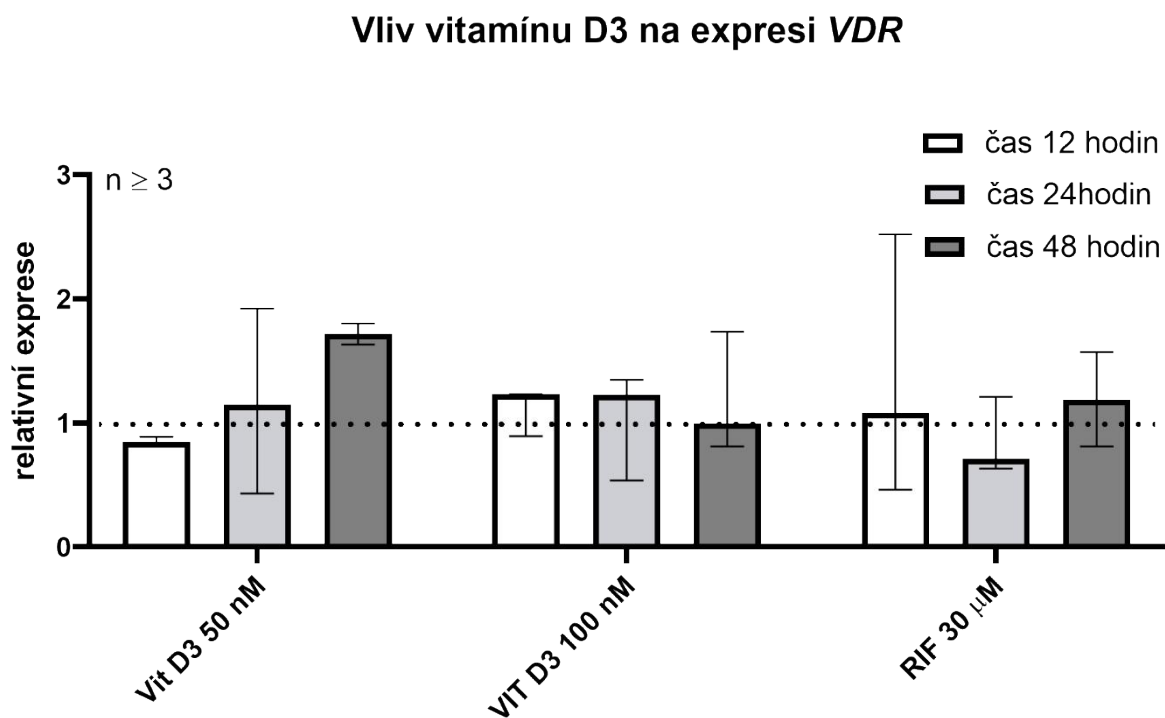
V této části experimentu jsme sledovali vliv vitamínu D3 na expresi *ABCB1* v čase 12, 24 a 48 hodin. Statisticky se nepotvrdilo, že by vitamin D3 měl významný vliv na tento gen. RIF jako kontrola měl na expresi *ABCB1* signifikantní vliv v čase inkubace 24 a 48 hodin (viz. Obr. 11).



Obr. 11 Vliv vitamínu D3 a expresi v čase 12, 24 a 48 hodin. Data v grafech jsou prezentována jako medián \pm rozsah (variační rozpětí). Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Získaná data byla statisticky hodnocena metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena jako: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.4 Vliv vitamínu D3 na expresi VDR

Obr. 12 znázorňuje vliv vitamínu D3 na expresi VDR v časovém intervalu 12, 24 a 48 hodin. Nejvyšší změny v expresi byly pozorovány v čase 48 hodin u vitamínu D3 v koncentraci 50 nM. Ani u jedné koncentrace nebo látky nebyly změny signifikantní.

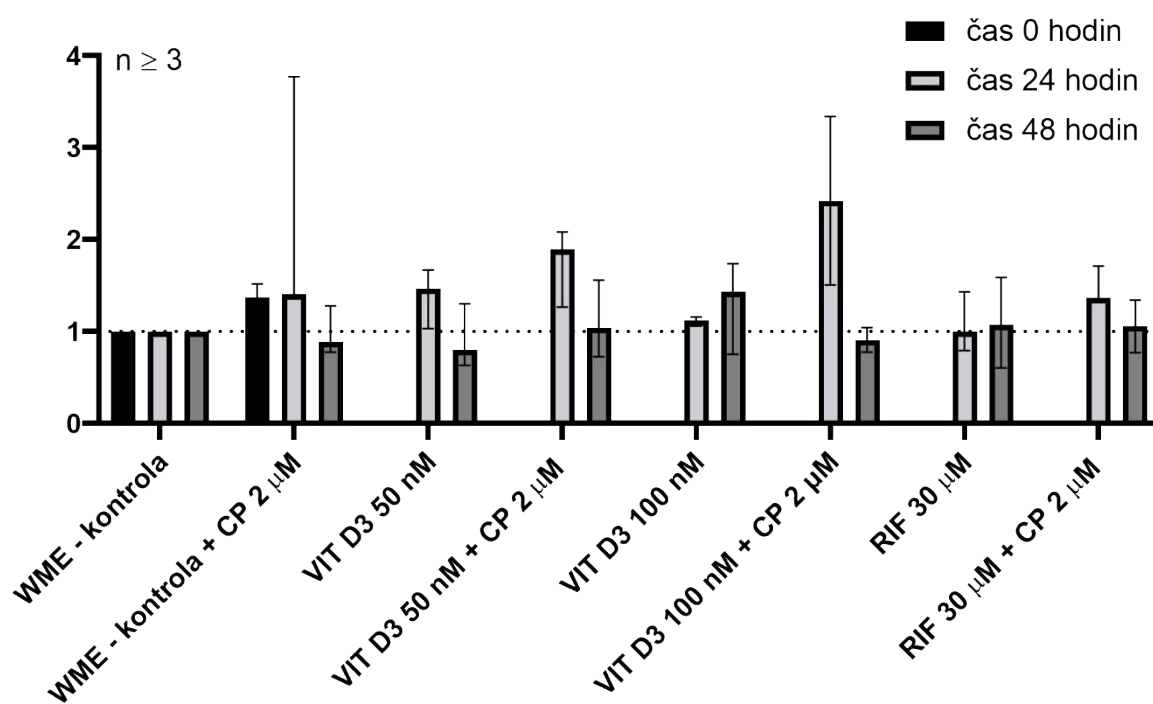


Obr. 12 Vliv vitamínu D3 na VDR v čase 12, 24, 48 hodin. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Získaná data byla statisticky hodnocena metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena jako: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.5 Vliv vitamínu D3 na intracelulární obsah RHD123

V tomto experimentu jsme studovali vliv vitamínu D3 na intracelulární obsah RHD123 v čase 0, 24 a 48 hodin. Data byla normalizována ke kontrole v čase. Ani u jednoho studovaného léčiva nebyla hladina RHD123 signifikantně nižší než korespondující kontrola v daném čase. Vliv na eflux tedy nebyl pozorován. Bohužel dle získaných dat (obr. 13) tkáň po 48 hodinách vykazovala špatnou funkci, a to i v kontrole s RIF. To je nicméně částečně v souladu s daty z měření ATP, kde vzorky v čase 48 hodin vykazovaly nižší hodnoty a jejich životnost mohla být ovlivněna.

Vliv vitamínu D3 na intracelulární obsah RHD123



Obr 13 Vliv vitamínu D3 na intracelulární obsah RHD123 v čase 0, 24 a 48 hodin. Funkce řezů byla studována v čase 24 a 48 hodin po ovlivnění léčivy. Zároveň jsme v čase $t=0$ provedli funkční kontrolu společně kontrolou s modelovým inhibítor. Pokud je tkáň v pořádku, koncentrace RHD123 by měla být oproti kontrole bez CP zvýšena. Data byla normalizována k neovlivněné kontrole bez inhibitoru v korespondujícím čase. Data jsme hodnotili metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Data v grafu jsou vyjádřena jako medián \pm rozsah (variační rozpětí). Statistická významnost je v grafech vyznačena následovně: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

7 DISKUZE

Perorálně podávaná léčiva jsou absorbována z gastrointestinálního traktu do centrálního oběhu. Při tomto procesu léčivo musí překonat střevní bariéru (Currie 2018). Absorpce léčiv ve střevě je významně omezena transportéry (ABC a SLC), ale i biotransformačními enzymy první a druhé fáze biotransformace. Z biotransformačních enzymů první fáze je to pak CYP3A4 (Dressman and Thelen 2009; Oostendorp et al. 2009). Nejvíce studovaným ABC transportérem ve střevní bariéře je P-gp (Elmeliegy et al. 2020), jehož inhibice nebo indukce může mít za následek významné lékové interakce (Lin and Yamazaki 2003).

Indukci ve střevě lze studovat pomocí různých metod. *In vitro* metody, zejména pak buněčné linie Caco-2, LS180 nebo LS174T transfekované NR, se běžně používají ke sledování indukce P-gp (Martinec et al. 2021). Nevýhodou těchto modelů je, že v porovnání s normální lidskou tkání mohou být významné rozdíly v expresi jednotlivých lékových transportérů a biotransformačních enzymů (Li et al. 2016). Pro studium absorpce léčiv lze využít také modelů založených na laboratorních zvířatech, kdy nejčastěji jsou užíváni potkani nebo myši. U těchto *in vivo* modelů jsou limitací zejména etické problémy a finanční či časová náročnost (Li et al. 2016; Xu et al. 2021).

Za kompromis mezi modely *in vivo* a *in vitro* lze považovat modely *ex vivo* (Xu et al. 2021), do kterých se řadí i metoda PCIS, která je vhodná pro studium střevní bariéry (Bigaeva et al. 2019; de Graaf et al. 2010). PCIS se využívá pro studium střevních onemocnění, fyziologie, účinnosti léčiv, toxicity, transportu a metabolismu (Biel et al. 2020). Jejich výhodou je, že každý jednotlivý řez představuje svým buněčným složením situaci *in vivo*. Z jednoho vzorku lidské tkáně je možné připravit více než 100 řezů (Biel et al. 2022). Hlavní nevýhodou této techniky je krátká životnost řezů, kdy řezy připravené z lidské tkáně jsou životaschopné 48 hodin (Biel et al. 2022; Martinec et al. 2021).

Cílem této práce bylo posoudit vliv vitamínu D3 na expresi *ABCB1* a *CYP3A4*. Pro naše účely jsme použili metodu PCIS, které byly připraveny z lidského proximálního jejunu. Jako modelový induktor pro kontrolu, zda samotná indukce v námi studované tkáni funguje, jsme použili RIF (30 μ M). Samotnou metodu tkáňových řezů jsme provedli dle protokolu publikovaného de Graaf a kolektivem v roce 2010 (příprava řezů) a Martincem a kolektivem v roce 2021 (indukční studie) (de Graaf et al. 2010; Martinec et al. 2021).

V této práci jsme se konkrétně zabývali vitamínem D3 o koncentracích 50 nM a 100 nM, což odpovídá doporučené denní dávce 5 resp. 10 μ g vitamínu D3 rozpuštěné v 250 ml vody

(nařízení rady EU č. 1169/2011) (Charalabidis et al. 2019). Z našich získaných dat plyne, že vitamin D3 v použitých koncentracích nebyl toxický na intestinální tkáň a koncentrace 100 nM dokonce mírně zvyšovala hladiny ATP oproti kontrole (viz. Obr. 9). Statisticky významný však tento vliv nebyl. Statisticky se nepotvrdilo, že by měl vitamin D3 vliv na expresi *ABCB1* a *CYP3A4*. Určitý trend vykazuje jen exprese *CYP3A4* u vitaminu D3 100 nM, kde je ve srovnání s kontrolou exprese přibližně dvojnásobná (medián zvýšení exprese - 2,36x). U RIF byl potvrzen signifikantní vliv na expresi u obou námi studovaných genů (viz Obr. 10, 11). Tkáň v experimentu s RHD123 po 48 hodinách vykazovala špatnou funkci, a to i v kontrole s RIF, což je pravděpodobně způsobeno sníženou životností na, kterou poukazují i výsledky ATP.

Naše výsledky s RIF jsou v souladu s experimentem Martinec *et al.* (2021), kde došlo během 48 hodin inkubace v lidských PCIS ke zvýšení genové exprese *ABCB1* a *CYP3A4* prostřednictvím RIF (30 μ M). Samotná indukce byla závislá na čase a s dobou inkubace se zvyšovala. Indukce genu *CYP3A4* byla oproti indukci *ABCB1* výraznější, což opět potvrdilo předchozí data k této látce (Martinec et al. 2021; van de Kerkhof et al. 2008).

Aiba *et al.* (2005) studovali indukci mRNA *CYP3A4* a *MDR1* působením 1 α ,25-dihydroxyvitaminu D3 (testováno 100 nM a 250 nM) ve dvou lidských intestinálních buněčných liniích. V buňkách Caco-2 a LS180 byla exprese mRNA *CYP3A4* výrazně zvýšena působením vitaminu D3 100 nM. Exprese mRNA *MDR1* vitaminem D3 100 nM v Caco-2 nebyla významně ovlivněna. V buňkách LS180 byla exprese mRNA *MDR1* zvýšena v menší míře ve srovnání s expresí mRNA *CYP3A4*. Indukce probíhala u buněk LS180 po dobu dvou dnů a u Caco-2 dva týdny. V Caco-2 a LS180 může být exprese *CYP3A4* regulována prostřednictvím kalcitriolu, ale pouze u LS180 byla pozorována indukce P-gp, což souvisí s rozdíly v expresi jednotlivých intracelulárních receptorů, kdy Caco-2 buněčná linie oproti LS180 postrádá intracelulární receptor PXR a exprese receptoru VDR je také nižší (van de Kerkhof et al. 2007).

Naše zjištění ohledně vitaminu D3 korelují s prací Fukumori *et al.* (2007), kteří pozorovali vliv metabolismu vitaminu D3 na jeho aktivitu. Vitamin D3 v jimi provedených experimentech vykazoval jen mírný vliv na expresi *CYP3A4*. Jak již bylo uvedeno výše, v našich experimentech vitamin D3 nevykazoval žádný signifikantní vliv na expresi obou genů s výjimkou koncentrace 100 nM, kde exprese *CYP3A4* byla zhruba dvojnásobná ve srovnání s kontrolou.

V návaznosti na námi provedené experimenty by bylo v dalších experimentech vhodné studovat také metabolity vitamínu D3, zejména pak aktivní formu vitamínu D3, u které je vyšší předpoklad, že bude indukce *CYP3A4* a *ABCB1* pozorována (Fukumori et al., 2007), a která je také v některých případech podávána perorální formou.

8 ZÁVĚR

Hlavní úlohou této práce bylo zjistit, zda vitamin D3 je schopný indukovat *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevní bariéře. K tomuto účelu byla použita *ex vivo* metoda ultratenkých řezů z lidského proximálního jejunum. Jako modelový induktor jsme použili RIF (30 μ M) jako referenční inhibitor pak CP-100356 (2 μ M). V experimentech jsme sledovali, jak vitamin D3 (50 nM, 100 nM) ovlivňuje genovou expresi *ABCB1* a *CYP3A4*.

Statisticky se nepotvrdilo, že by měl vitamin D3 vliv na expresi námi studovaných genů ve střevní bariéře. Určitý trend vykazuje pouze exprese *CYP3A4* u vitaminu D3 v koncentraci 100 nM, kde je oproti kontrole exprese přibližně dvojnásobná. To je v souladu s experimenty, které proběhly v minulosti na buněčné kultuře LS180. RIF jako kontrola vykazoval signifikantní vliv na expresi jak u *CYP3A4*, tak u *ABCB1*, což je také v souladu s předchozími experimenty provedenými na modelu tkáňových řezů připravených z lidského jejunum.

9 SEZNAM LITERATURY

Abuznait, A. H., Cain, C., Ingram, D., Burk, D. and Kaddoumi, A. (2011) 'Up-Regulation of P-glycoprotein reduces intracellular accumulation of beta amyloid: investigation of P-glycoprotein as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(8), pp. 1111–18. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01309.x.

Ahmed Juvale, I. I., Abdul Hamid, A. A., Abd Halim, K. B. and Che Has, A. T. (2022) 'P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 8(6), p. e09777, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e0977.

Aiba, T., Susa, M., Fukumori, S. and Hashimoto, Y. (2005) 'The effects of culture conditions on CYP3A4 and MDR1 mRNA induction by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) in human intestinal cell Lines, Caco-2 and LS180', *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 20(4), pp. 268–274. doi: 10.2133/dmpk.20.268.

Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R. *et al.* (2009) 'Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 323(5922), pp. 1718–1722. doi: 10.1126/science.1168750.

Alonso, C., Vicario, M., Pigrau, M., Lobo, B. and Santos, J. (2014) 'Intestinal barrier function and the brain-gut axis', *Advances in experimental medicine and biology*. Springer New York LLC, 817, pp. 73– 113. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_4.

Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. and Gottesman, M. M. (2003) 'P-glycoprotein: from genomics to mechanism', *Oncogene*. Nature publishing group, 22(47), pp. 7468–7485. doi: 10.1038/sj.onc.1206948.

Ao, T., Kikuta, J. and Ishii, M. (2021) 'The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases', *Biomolecules*. MDPI, 11(11), p. 1624. doi: 10.3390/biom11111624.

Bakke, D. and Sun, J. (2018) 'Ancient Nuclear Receptor VDR with New Functions: Microbiome and Inflammation', *Inflammatory bowel diseases*. Lippincott Williams and Wilkin, 24(6), pp. 1149–1154. doi: 10.1093/ibd/izy092.

Beck, T. C., Beck, K. R., Morningstar, J., Benjamin, M. M. and Norris, R. A. (2021) 'Descriptors of Cytochrome Inhibitors and Useful Machine Learning Based Methods for the Design of Safer Drugs', *Pharmaceuticals*. MDPI, 14(5), p. 472. doi: 10.3390/ph14050472.

Biel, C., Bigaeva, E., Hesse, M., Bomers, J. J. M., van Summeren, K., Teunis, M. A. T. *et al.* (2020) 'Survival and cellular heterogeneity of epithelium in cultured mouse and rat precision-cut intestinal slices', *Toxicology in vitro*. Elsevier Ltd, 69: 104974. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104974.

Biel, C., Martinec, O., Sibering, B., van Summeren, K., Wessels, A. M. A., Touw, D. J. *et al.* (2022) 'Extending the viability of human precision-cut intestinal slice model for drug metabolism studies', *Archives of Toxicology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 96(6), pp. 1815–1827. doi: 10.1007/s00204-022-03295-1.

Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. and Poolman, B. (2006) 'ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains', *FEBS letters*, 580(4), pp. 1023–35. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.079.

Bigaeva, E., Bomers, J. J. M., Biel, C., Mutsaers, H. A. M., de Graaf, I. A. M., Boersema, M. *et al.* (2019) 'Growth factors of stem cell niche extend the life-span of precision-cut intestinal slices in culture: A proof-of-concept study', *Toxicology in vitro*. Elsevier Ltd, 59, pp. 312–321. doi: 10.1016/j.tiv.2019.05.024.

Bizkarguenaga, M., Gomez-Santos, L., Madrid, J. F., Sáez, F. J. and Alonso, E. (2019) 'Increase of germ cell nuclear factor expression in globozoospermic Gopc^{-/-} knockout mice', *Andrology*, 7(3), pp. 319–328. doi: 10.1111/andr.12594.

Callaghan, R., Luk, F. and Bebawy, M. (2014) 'Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy?', *Drug metabolism and disposition*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 42(4), pp. 623–631. doi: 10.1124/dmd.113.056176.

Collins JM. and Wang D. (2020) 'Cis-acting regulatory elements regulating CYP3A4 transcription in human liver', *Pharmacogenetics and genomics*. Lippincott Williams and Wilkins, 30(5), pp. 107-116. doi: 10.1097/FPC.0000000000000402.

Currie G. M. (2018) 'Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics', *Journal of nuclear medicine technology*. Society of Nuclear medicine Inc, 46(3), pp. 221–230. doi: 10.2967/jnmt.117.199638.

de Graaf, I. A., Olinga, P., de Jager, M. H., Merema, M. T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E. *et al.* (2010) 'Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies', *Nature protocols*, 5(9), pp.1540–1551. doi: 10.1038/nprot.2010.111.

Dean, M., Moitra, K. and Allikmets, R. (2022) 'The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily', *Human mutation*. John and Wiley Sons Inc, 43(9), pp. 1162–1182. doi: 10.1002/humu.24418.

Drocourt, L., Ourlin, J. C., Pascussi, J. M., Maurel, P. and Vilarem, M. J. (2002) 'Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes', *The Journal of biological chemistry*, 277(28), pp. 25125–25132. doi: 10.1074/jbc.M201323200.

Durk, M. R., Chan, G. N., Campos, C. R., Peart, J. C., Chow, E. C., Lee, E. *et al.* (2012) '1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells', *Journal of neurochemistry*, 123(6), pp. 944–953. doi: 10.1111/jnc.12041.

Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. (2005) 'Vitamin D', *American journal of physiology. Renal physiology*, 289(1), pp. F8–F28. doi: 10.1152/ajprenal.00336.2004.

Ekström, L., Skilving, I., Ovesjö, M. L., Aklillu, E., Nylén, H., Rane, A. *et al.* (2015) 'miRNA-27b levels are associated with CYP3A activity in vitro and in vivo', *Pharmacology research & perspectives*. Willey-Blackwell Publishing Ltd, 3(6), p. e00192. doi: 10.1002/prp2.19.

Elmeliogy, M., Vourvahis, M., Guo, C. and Wang, D. D. (2020) 'Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug-Drug Interaction Studies', *Clinical pharmacokinetics*. Adis, 59(6), pp. 699–714. doi: 10.1007/s40262-020-00867-1.

Fan, J. and de Lannoy, I. A. (2014) 'Pharmacokinetics', *Biochemical pharmacology*, 87(1), pp. 93–120. doi: 10.1016/j.bcp.2013.09.007.

Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M. *et al.* (2019) 'Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer', *Biomedicine & pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 109, pp. 391-401. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.102.

Fritz, A., Busch, D., Lapczuk, J., Ostrowski, M., Drozdziak, M. and Oswald, S. (2019) 'Expression of clinically relevant drug-metabolizing enzymes along the human intestine and their correlation to drug transporters and nuclear receptors: An intra-subject analysis', *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. Blackwell Publishing Ltd, 124(3), pp. 245–255. doi: 10.1111/bcpt.13137.

Fu, D. and Arias, I. M. (2012) 'Intracellular trafficking of P-glycoprotein', *The international journal of biochemistry & cell biology*. Elsevier Ltd, 44(3), pp. 461–464. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.009.

Fu, D., van Dam, E. M., Brymora, A., Duggin, I. G., Robinson, P. J. and Roufogalis, B. D. (2007) 'The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein', *Biochimica et biophysica acta*, 1773(7), pp. 1062–1072. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.03.023.

Fukumori, S., Murata, T., Taguchi, M. and Hashimoto, Y. (2007) 'Rapid and drastic induction of CYP3A4 mRNA expression via vitamin D receptor in human intestinal LS180 cells', *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22(5), pp. 377–381. doi: 10.2133/dmpk.22.377.

Gil, Á., Plaza-Diaz, J. and Mesa, M. D. (2018) 'Vitamin D: Classic and Novel Actions', *Annals of nutrition & metabolism*, 72(2), pp. 87–95. doi: 10.1159/000486536.

Gonzalez F. J. (2008) 'Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription', *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 23(1), pp. 2–7. doi: 10.2133/dmpk.23.2.

Guengerich F. P. (1997) 'Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions', *Advances in pharmacology*, 43, pp. 7–35. doi: 10.1016/s1054-3589(08)60200-8.

Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M. and Pelkonen, O. (2020) 'Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update', *Archives of toxicology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 94(11), pp. 3671–3722. doi: 10.1007/s00204-020-02936-7.

He, Y., Chevillet, J. R., Liu, G., Kim, T. K. and Wang, K. (2015) 'The effects of microRNA on the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs', *British journal of pharmacology*, 172(11), pp. 2733–2747. doi: 10.1111/bph.12968.

Hegedüs, C., Telbisz, Á., Hegedüs, T., Sarkadi, B. and Özvegy-Laczka, C. (2015) 'Lipid regulation of the ABCB1 and ABCG2 multidrug transporters', *Advances in cancer research*. Academic Press Inc, 125, pp. 97–137. doi: 10.1016/bs.acr.2014.10.004.

Higgins C. F. (2001) 'ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview', *Research in microbiology*, 152(3-4), pp. 205–210. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01193-7.

Hollenberg P. F. (2002) 'Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes', *Drug Metabolism Reviews*, 34(1–2), pp. 17–35. doi: 10.1081/dmr-120001387.

Charalabidis, A., Sfouni, M., Bergström, C. and Macheras, P. (2019) 'The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines', *International journal of pharmaceutics*, 566, pp. 264–281. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.041.

Choi, Y. H. and Yu, A. M. (2014) 'ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development', *Current pharmaceutical design*, 20(5), pp. 793–807. doi.: 10.2174/138161282005140214165212.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L. and Carmeliet, G. (2016) 'Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects', *Physiological reviews*, 96(1), pp. 365–408. doi: 10.1152/physrev.00014.2015.

Chufan, E. E., Sim, H. M. and Ambudkar, S. V. (2015) 'Molecular basis of the polyspecificity of P-glycoprotein (ABCB1): recent biochemical and structural studies', *Advances in cancer research*. Academic Press Inc, 125, pp. 71–96. doi: 10.1016/bs.acr.2014.10.003.

Istrate, M. A., Nussler, A. K., Eichelbaum, M. and Burk, O. (2010) 'Regulation of CYP3A4 by pregnane X receptor: The role of nuclear receptors competing for response element binding', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), pp. 688–693. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.058.

Jääskeläinen, T., Ryhänen, S., Mahonen, A., DeLuca, H. F. and Mäenpää, P. H. (2000) 'Mechanism of action of superactive vitamin D analogs through regulated receptor degradation', *Journal of cellular biochemistry*, 76(4), pp. 548–558. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(20000315)76:4<548::aid-jcb3>3.3.co;2-s.

Khammissa, R. A. G., Fourie, J., Motswaledi, M. H., Ballyram, R., Lemmer, J. and Feller, L. (2018) 'The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health', *BioMed Research International*. Hindawi Limited, p. 9276380. doi:10.1155/2018/9276380.

Khorasanizadeh, S. and Rastinejad, F. (2016) 'Visualizing the Architectures and Interactions of Nuclear Receptors', *Endocrinology*. Endocrinology Society, 157(11), pp. 4212–4221. doi: 10.1210/en.2016-1559.

Königshofer, P., Brusilovskaya, K., Petrenko, O., Hofer, B. S., Schwabl, P., Trauner, M. *et al.* (2021) ‘Nuclear receptors in liver fibrosis’, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. Elsevier B.V., 1867(12), p. 166235. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166235.

Li, F., Song, C., Zhang, Y. and Wu, D. (2022) ‘Structural overview and perspectives of the nuclear receptors, a major family as the direct targets for small-molecule drugs’, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 54(1), pp. 12–24. doi: 10.3724/abbs.2021001.

Li, M., de Graaf, I. A. and Groothuis, G. M. (2016) ‘Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research’, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. Taylor and Francis Ltd, 12(2), pp. 175–190. doi: 10.1517/17425255.2016.1125882.

Lin, J. H. and Yamazaki, M. (2003) ‘Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications’, *Clinical pharmacokinetics*, 42(1), pp. 59–98. doi: 10.2165/00003088-200342010-00003.

Linton K. J. (2007) ‘Structure and function of ABC transporters’, *Physiology*, 22(2), pp. 122–130. doi: 10.1152/physiol.00046.2006.

Lolodi, O., Wang, Y. M., Wright, W. C. and Chen, T. (2017) ‘Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery’, *Current drug metabolism*. Bentham Science Publishers Ltd, 18(12), pp. 1095–1105. doi: 10.2174/1389200218666170531112038.

Lopez, D. and Martinez-Luis, S. (2014) ‘Marine natural products with P-glycoprotein inhibitor properties’, *Marine drugs*. MDPI AG, 12(1), pp. 525–546. doi: 10.3390/md12010525.

Mahadevan, D. and List, A. F. (2004) ‘Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies’, *Blood*, 104(7), pp. 1940–1951. doi: 10.1182/blood-2003-07-2490.

Mai, Y., Dou, L., Yao, Z., Madla, C. M., Gavins, F. K. H., Taherali, F. *et al.* (2021) ‘Quantification of P-Glycoprotein in the Gastrointestinal Tract of Humans and Rodents: Methodology, Gut Region, Sex, and Species Matter’, *Molecular pharmaceuticals*. American Chemical Society, 18(5), pp. 1895–1904. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00574.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K. *et al.* (1995) ‘The nuclear receptor superfamily: the second decade’, *Cell*, 83(6), pp. 835–839. doi:10.1016/0092-8674(95)90199-x.

Martinec, O., Biel, C., de Graaf, I. A. M., Huliciak, M., de Jong, K. P., Staud, F. *et al.* (2021) ‘Rifampicin Induces Gene, Protein, and Activity of P-Glycoprotein (ABCB1) in Human Precision-Cut Intestinal Slices’, *Frontiers in pharmacology*. Frontiers Media S.A., 12, p. 684156. doi: 10.3389/fphar.2021.684156.

Martinez, L., Arnaud, O., Henin, E., Tao, H., Chaptal, V., Doshi, R. *et al.* (2014) ‘Understanding polyspecificity within the substrate-binding cavity of the human multidrug resistance P-glycoprotein’, *The FEBS journal*. Blackwell Publishing Ltd, 281(3), pp. 673–682. doi: 10.1111/febs.12613.

Masuyama, H. and MacDonald, P. N. (1998) 'Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR', *Journal of cellular biochemistry*, 71(3), pp. 429–440.

Matsumura, K. *et al.* (2004) 'Identification of a novel polymorphic enhancer of the human CYP3A4 gene', *Molecular Pharmacology*, 65(2), pp. 326–334. doi: 10.1124/mol.65.2.326.

Michalets, E.L. (1998) 'Update: Clinically Significant Cytochrome P-450 Drug Interactions', *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 18(1), pp. 84–112. doi: 10.1002/j.1875-9114.1998.tb03830.x.

Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J. and Arabzadeh, S. (2018) 'Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors', *Life Sciences*. Elsevier Inc, 214, pp. 118–123. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.

Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M. L. and Tieleman, D. P. (2008) 'ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*', *Biochimica et biophysica acta*, 1778(9), pp. 1757–1771. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.009.

Mukha, A., Kalkhoven, E. and van Mil, S. W. C. (2021) 'Splice variants of metabolic nuclear receptors: Relevance for metabolic disease and therapeutic targeting', *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. Elsevier B.V., 1867(10), p. 166183. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166183.

Müller, J., Keiser, M., Drozdik, M. and Oswald, S. (2017) 'Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update', *Biological chemistry*, 398(2), pp. 175–192. doi: 10.1515/hsz-2016-0259.

Murakami, T. and Takano, M. (2008) 'Intestinal efflux transporters and drug absorption', *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 4(7), pp. 923–939. doi: 10.1517/17425255.4.7.923.

Mutchie, T. R., Yu, O. B., Di Milo, E. S. and Arnold, L. A. (2019) 'Alternative binding sites at the vitamin D receptor and their ligands', *Molecular and cellular endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 485, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.mce.2019.01.011.

Nedumaran, B., Hong, S., Xie, Y. B., Kim, Y. H., Seo, W. Y., Lee, M. W. *et al.* (2009) 'AX-1 acts as a novel corepressor of orphan nuclear receptor HNF4alpha and negatively regulates gluconeogenic enzyme gene expression', *The Journal of biological chemistry*, 284(40), pp. 27511–27523. doi: 10.1074/jbc.M109.034660.

Oostendorp, R. L., Beijnen, J. H. and Schellens, J. H. (2009) 'The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier', *Cancer treatment reviews*, 35(2), pp. 137–147. doi: 10.1016/j.ctrv.2008.09.004.

Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P. and Vilarem, M. J. (2003) 'The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors', *Biochimica et biophysica acta*, 1619(3), pp. 243–253. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00483-x.

Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J. and Raunio, H. (2008) 'Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status', *Archives of toxicology*, 82(10), pp. 667–715. doi: 10.1007/s00204-008-0332-8.

Peng, M. Y. *et al.* (2021) 'Immunological Aspects of SARS-CoV-2 Infection and the Putative Beneficial Role of Vitamin-D', *International journal of molecular sciences*. MDPI AG, 22(10), p. 5251. doi: 10.3390/ijms2210525.

Pizzagalli, M. D., Bensimon, A. and Superti-Furga, G. (2021) 'A guide to plasma membrane solute carrier proteins', *The FEBS journal*. John Wiley and Sons Inc., 288(9), pp. 2784–2835. doi: 10.1111/febs.15531.

Porter, B. A., Ortiz, M. A., Bratslavsky, G. and Kotula, L. (2019) 'Structure and Function of the Nuclear Receptor Superfamily and Current Targeted Therapies of Prostate Cancer', *Cancers*. MDPI AG, 11(12), p.1852. doi: 10.3390/cancers11121852.

Pyun, J., McInnes, L. E., Donnelly, P. S., Mawal, C., Bush, A. I., Short, J. L. *et al.* (2022) 'Copper bis(thiosemicarbazone) complexes modulate P-glycoprotein expression and function in human brain microvascular endothelial cells', *Journal of neurochemistry*. John Wiley and Sons Inc., 162(3), pp. 226–244. doi: 10.1111/jnc.15609.

Qin, X. and Wang, X. (2019) 'Role of vitamin D receptor in the regulation of *CYP3A* gene expression', *Acta pharmaceutica Sinica. B*. Chinese Academy of Medical Science, 9(6), pp. 1087–1098. doi: 10.1016/j.apsb.2019.03.005.

Rees, D. C., Johnson, E. and Lewinson, O. (2009) 'ABC transporters: the power to change', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(3), pp. 218–227. doi: 10.1038/nrm2646.

Robien, K., Oppeneer, S. J., Kelly, J. A. and Hamilton-Reeves, J. M. (2013) 'Drug-vitamin D interactions: a systematic review of the literature', *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 28(2), pp. 194–208. doi:10.1177/0884533612467824.

Saponaro, F., Saba, A. and Zucchi, R. (2020) 'An Update on Vitamin D Metabolism', *International journal of molecular sciences*, MDPI AG, 21(18), p. 6573. doi: 10.3390/ijms21186573.

Sever, R. and Glass, C. K. (2013) 'Signaling by nuclear receptors', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), p. a016709. doi: 10.1101/cshperspect.a016709.

Sharma, L. and Riva, A. (2020) 'Intestinal Barrier Function in Health and Disease-Any role of SARS-CoV-2?', *Microorganisms*. MDPI AG, 8(11), p. 1744. doi: 10.3390/microorganisms8111744.

Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Paine, M. F., Lown, K. S. and Watkins, P. B. (1997) 'Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3', *Molecular pharmacology*, 51(5), pp. 741–754. doi: 10.1124/mol.51.5.741.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nature protocols*, 3(6), pp. 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

Sirajudeen, S., Shah, I. and Al Menhali, A. (2019) 'A Narrative Role of Vitamin D and Its Receptor: With Current Evidence on the Gastric Tissues', *International journal of molecular sciences*, 20(15), p. 3832. doi: 10.3390/ijms20153832.

Smutny, T., Hyrsova, L., Braeuning, A., Ingelman-Sundberg, M. and Pavek, P. (2021) 'Transcriptional and post-transcriptional regulation of the pregnane X receptor: a rationale for interindividual variability in drug metabolism', *Archives of toxicology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 95(1), pp. 11–25. doi: 10.1007/s00204-020-02916-x.

Swart, M. and Dandara, C. (2014) 'Genetic variation in the 3'-UTR of CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, NR1I2, and UGT2B7: potential effects on regulation by microRNA and pharmacogenomics relevance', *Frontiers in genetics*. Frontiers Research Foundation, 5, p. 167. doi: 10.3389/fgene.2014.00167.

Taggi, V., Riera Romo, M., Piquette-Miller, M., Meyer Zu Schwabedissen, H. E. and Neuhoﬀ, S. (2022) 'Transporter Regulation in Critical Protective Barriers: Focus on Brain and Placenta', *Pharmaceutics*. MDPI, 14(7), p. 1376. doi: 10.3390/pharmaceutics14071376.

Tachibana, S., Yoshinari, K., Chikada, T., Toriyabe, T., Nagata, K. and Yamazoe, Y. (2009) 'Involvement of Vitamin D receptor in the intestinal induction of human ABCB1', *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 37(8), pp. 1604–1610. doi: 10.1124/dmd.109.027219.

Tawbeh, A., Gondcaille, C., Trompier, D. and Savary, S. (2021) 'Peroxisomal ABC Transporters: An Update', *International journal of molecular sciences*, 22(11), p. 6093. doi: 10.3390/ijms22116093.

ter Beek, J., Guskov, A. and Slotboom, D. J. (2014) 'Structural diversity of ABC transporters', *The Journal of general physiology*. Groninger, 143(4), pp. 419–435. doi: 10.1085/jgp.201411164.

Thelen, K. and Dressman, J. B. (2009) 'Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall', *The Journal of pharmacy and pharmacology*. Oxford University Press, 61(5), pp. 541–558. doi: 10.1211/jpp/61.05.0002.

Thummel, K. E. *et al.* (2001) 'Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃', *Molecular pharmacology*, 60(6), pp. 1399–1406. doi: 10.1124/mol.60.6.1399.

Tsybovsky, Y., Molday, R. S. and Palczewski, K. (2010) 'The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease', *Advances in experimental medicine and biology*, 703, pp. 105–125. doi: 10.1007/978-1-4419-5635-4_8.

Usategui-Martín, R., De Luis-Román, D. A., Fernández-Gómez, J. M., Ruiz-Mambrilla, M. and Pérez-Castrillón, J. L. (2022) 'Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Nutrients*. MDPI, 14(2), p. 360. doi: 10.3390/nu14020360.

van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. A. and Groothuis, G. M. (2007) 'In vitro methods to study intestinal drug metabolism', *Current drug metabolism*. Bentham Science Publishers Ltd, 8(7), pp. 658–675. doi: 10.2174/138920007782109742.

van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. A., Ungell, A. L. and Groothuis, G. M. (2008) 'Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro', *Drug metabolism and disposition*, 36(3), pp. 604–613. doi: 10.1124/dmd.107.018820.

Wang, H., Liang, Y., Yin, Y., Zhang, J., Su, W., White, A. M. *et al.* (2021) 'Carbon nano-onion-mediated dual targeting of P-selectin and P-glycoprotein to overcome cancer drug resistance', *Nature communications*. Nature Research, 12(1), p. 312. doi:10.1038/s41467-020-20588-0.

Wang, Y., Zhu, J. and DeLuca, H. F. (2012) 'Where is the vitamin D receptor?', *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), pp. 123–133. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001.

Wang, Z., Schuetz, E. G., Xu, Y. and Thummel, K. E. (2013) 'Interplay between vitamin D and the drug metabolizing enzyme CYP3A4', *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Elsevier Ltd, 136, pp. 54–58. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.012.

Weikum, E. R., Liu, X. and Ortlund, E. A. (2018) 'A structural perspective', *Protein science: a publication of the Protein Society*. Blackwell Publishing Ltd, 27(11), pp. 1876–1892. doi: 10.1002/pro.3496.

Wu, C. Y. and Benet, L. Z. (2005) 'Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system', *Pharmaceutical research*, 22(1), pp. 11–23. doi: 10.1007/s11095-004-9004-4.

Xu, Y., Shrestha, N., Pr at, V. and Beloqui, A. (2021) 'An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers', *Advanced drug delivery reviews*. Elsevier B.V., 175, p. 113795. doi: 10.1016/j.addr.2021.05.005.

Yano, K., Tomono, T. and Ogihara, T. (2018) 'Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 41(1), pp. 11–19. doi: 10.1248/bpb.b17-00725.

Yoon, I. S., Son, J. H., Kim, S. B., Choi, M. K. and Maeng, H. J. (2015) 'Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 on Intestinal Absorption and Disposition of Adefovir Dipivoxil and Its Metabolite, Adefovir, in Rats', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(11), pp. 1732–1737. doi: 10.1248/bpb.b15-00356.

Yuan, X., Lu, H., Zhao, A., Ding, Y., Min, Q. and Wang, R. (2020) 'Transcriptional regulation of CYP3A4 by nuclear receptors in human hepatocytes under hypoxia', *Drug metabolism reviews*. Taylor and Francis Ltd, 52(2), pp. 225–234. doi: 10.1080/03602532.2020.1733004.

Zanger, U. M. and Schwab, M. (2013) 'Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation', *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), pp. 103–141. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X. *et al.* (2021) 'Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans', *International journal of molecular sciences*, 22(23), p. 12808. doi: 10.3390/ijms222312808.

Zhou S. F. (2008) 'Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition', *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 38(7-8), pp. 802–832. doi: 10.1080/00498250701867889.

Zhou, S. and Glowacki, J. (2017) 'Chronic kidney disease and vitamin D metabolism in human bone marrow-derived MSCs', *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Ltd, 1402(1), pp. 43–55. doi: 10.1111/nyas.13464.

Zoghbi, M. E., Mok, L., Swartz, D. J., Singh, A., Fendley, G. A., Urbatsch, I. L. *et al.* (2017) 'Substrate-induced conformational changes in the nucleotide-binding domains of lipid bilayer-associated P-glycoprotein during ATP hydrolysis', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc, 292(50), pp. 20412–20424. doi: 10.1074/jbc.M117.814186.