

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Vliv darunaviru a atazanaviru na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* v tkáňových řezech z lidského střeva

diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Tereza Hradecká

„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 dne

Tereza Hradecká

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli PharmDr. Ivanovi Vokřálovi, Ph.D. za to, že mi umožnil vypracovat diplomovou práci na Katedře farmakologie a toxikologie, za jeho rady, odborné připomínky a asistenci při práci. Také bych chtěla poděkovat za důkladnou korekci mé diplomové práce.

Můj velký dík patří Mgr. Martinovi Huličiakovi, který mi s mojí diplomovou prací velmi pomohl. Děkuji nejen za velkou pomoc při samotné realizaci mé diplomové práce, ale i za jeho trpělivost a vytvoření přátelského prostředí.

Na závěr 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 Hradecká

Školitel: PharmDr. Vokřál Ivan, Ph.D.

Perorální podávání léčiv je v současnosti nejběžnější a nejpohodlnější způsob aplikace léčiv. Většina takto podaných léčiv se absorbuje ve střevě a následně proniká do systémové cirkulace. Absorpce léčiv může být ve střevě ovlivňována řadou faktorů. Mezi faktory ovlivňující vstřebávání léčiv patří například efluxní transportéry nebo biotransformační enzymy. V současnosti je asi nejvíce prostudovaným střevním transportérem P-glykoprotein (P-gp), který je schopen transportovat širokou škálu látek zpět do lumen střeva. Dalším faktorem ovlivňujícím vstřebávání léčiv je střevní metabolismus, který v první fázi probíhá často prostřednictvím enzymů z rodiny cytochromu P450, přičemž nejvíce léčiv je metabolizováno prostřednictvím CYP3A4, který je ve střevě také široce zastoupen.

Aktivita efluxních transportérů i biotransformačních enzymů může být některými léčivy snížena (inhibice), nebo naopak zvýšena (indukce). To následně může vést k celé řadě lékových interakcí. Možné farmakokinetické důsledky indukce enzymu nebo transportéru závisí na konkrétní lokalizaci. Předpokládá se, že indukce střevního P-gp může výrazně snižovat biologickou dostupnost léčiv. Indukce biotransformačních enzymů lokalizovaných ve střevě pak přispívá k rychlejší pre-systémové eliminaci léčiv. V obou případech tato indukce vede ke snížené biologické dostupnosti perorálně podávaných léků, což může mít za následek snížení, nebo ztrátu účinku.

V terapii u HIV pozitivních pacientů je používána převážně kombinace dvou až tří anti-retrovirotik. Anti-retrovirotika jsou často substráty, induktory nebo inhibitory CYP3A4 nebo P-gp, což zvyšuje potenciál pro lékové interakce. Vzhledem k efektivitě léčby a stárnutí HIV pozitivní populace, mají nemocní často další komorbidity vedoucí k polyfarmakoterapii, která riziko těchto lékových interakcí zvyšuje. V rámci řešení diplomové práce jsem se zaměřila na studium indukčního potenciálu dvou anti-retrovirotik, darunaviru a atazanaviru, na expresi *ABCBI*, *CYP3A4* a vybraných

intracelulárních receptorů ve střevní bariéře. Studie byla provedena na *ex vivo* modelu ultratenkých řezů připravených z lidského jejunu. Tyto řezy byly inkubovány po dobu 12, 24 a 48 hodin. Kromě exprese jsme posuzovali vliv léčiv na životnost střevních řezů a ověřovali jsme také na funkci ABCB1 za použití modelového substrátu rhodaminu123 (RHD123).

Dle naměřených koncentrací ATP jsme zjistili, že studované látky neměly vliv na životnost tkáně. U obou léčiv byla potvrzena signifikantně zvýšená exprese genů pro *CYP3A4* i *ABCB1*. Změnu exprese intracelulárních receptorů jsme neprokázali. Studie nepotvrdila vliv na zvýšenou funkci ABCB1 za použití modelového substrátu RHD123.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Student: Tereza Hradecká

Department of Pharmacology & Toxicology

Supervisor: PharmDr. Vokřál Ivan, Ph.D.

Oral administration of drugs is currently the most common and most convenient method of drug administration. Most drugs administered in this way are subsequently absorbed in the intestine and enter the systemic circulation. The absorption of drugs in the intestine can be influenced by a number of factors. Factors influencing drug absorption include, for example, efflux transporters or biotransformation enzymes. Currently, the most studied intestinal transporter is P-glycoprotein (P-gp), which is able to transport various substances back into the lumen of the intestine. Another factor affecting the absorption of drugs is intestinal metabolism, which in the first phase often takes place through enzymes from the cytochrome P450 family, while most drugs are metabolized through CYP3A4, which is also widely represented in the intestine.

The activity of efflux transporters and biotransformation enzymes can be reduced (inhibition) or, conversely, increased (induction) by some drugs. This can subsequently lead to a whole range of drug interactions. The possible pharmacokinetic consequences of enzyme or transporter induction depend on the specific location. It is believed that the induction of intestinal P-gp can significantly reduce the bioavailability of drugs. The induction of biotransformation enzymes localized in the intestine then offers faster pre-systemic elimination of drugs. In both cases, this induction leads to a reduced bioavailability of the administered drugs, which may result in a reduction or loss of effect.

A combination therapy of two or three antiretrovirals is currently used in the therapy of HIV-positive patients. Antiretrovirals are often substrates, inducers, or inhibitors of CYP3A4 or P-gp, increasing the potential for drug interaction. Due to the effectiveness of treatment and the aging of the HIV-positive population, patients often have additional comorbidities, leading to polypharmacotherapy, which increases the risk of these drug interactions. As part of my thesis, I set out to study the induction potential of two antiretrovirals, darunavir and atazanavir, on the expression of *ABCB1*, *CYP3A4*

and selected intracellular receptors in the intestinal barrier. The study was performed on an *ex vivo* model of precision-cut intestinal slices prepared from human jejunum. These slices were incubated for 12, 24 and 48 hours. In addition to expression, we assessed the effect of drugs on the viability of intestinal slices and also verified the function of ABCB1 using the model substrate rhodamine123 (RHD123).

According to the measured ATP levels, we found that the studied substances had no effect on the lifetime of the tissue. Significantly increased gene expression for both *CYP3A4* and *ABCB1* was confirmed for both drugs. We did not observe a change in the expression of intracellular receptors. The study did not confirm an effect on the increased function of ABCB1 using the model substrate RHD123.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	6
2	ÚVOD.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Střevní bariéra	10
3.2	Transportéry	13
3.3	Střevní transportéry.....	14
3.3.1	P-glykoprotein	15
3.4	Cytochrom CYP 3A4	18
3.5	Regulace genové exprese	20
3.5.1	Indukce	20
3.5.2	Nukleární receptory	23
3.5.3	Receptor pro vitamin D	25
3.5.4	Pregnanový receptor X.....	25
3.5.5	Glukokortikoidní receptor	26
3.6	Antivirotika	26
3.6.1	Darunavir	27
3.6.2	Ritonavir	27
3.6.3	Saquinavir	28
3.6.4	Atazanavir.....	28
4	CÍLE PRÁCE	30
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1	Použité chemikálie:.....	31
5.2	Příprava roztoků:	33
5.2.1	Zásobní roztok Krebs-Henseleitova pufru	33
5.2.2	Pracovní roztok Krebs-Henseleitova pufru.....	33
5.2.3	Příprava pracovního roztoku inkubačního média Williams medium E (WME)	34
5.2.4	Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení ATP	34
5.2.5	Příprava Tris/EDTA pufru pro stanovení hladiny ATP.....	35
5.2.6	Příprava 3 % roztoku agarózy	35
5.3	Experimentální metody:	36
5.3.1	hPCIS (Human Precision-Cut Intestinal Slices)	36
5.3.2	Analýza ATP	39
5.3.3	Stanovení Rhodaminu123 – studium funkce	40
5.3.4	BCA stanovení bílkovin	41

5.3.5	Izolace RNA.....	42
5.3.6	Reverzní transkripce.....	43
5.3.7	qPCR.....	44
5.3.8	Statistická analýza.....	45
6	VÝSLEDKY.....	46
6.1	Vliv antivirotik na životnost střevních řezů.....	46
6.2	Vliv antivirotik na expresi genů.....	47
6.2.1	Vliv atazanaviru na genovou expresi <i>CYP3A4</i> , <i>ABCB1</i> , <i>PXR</i> , <i>GR</i> a <i>VDR</i>	47
6.2.2	Vliv darunaviru na genovou expresi <i>CYP3A4</i> , <i>ABCB1</i> , <i>PXR</i> , <i>GR</i> a <i>VDR</i>	53
6.3	Vliv studovaných látek na intracelulární koncentraci Rhodaminu123.....	58
7	DISKUZE.....	60
8	ZÁVĚR.....	64
	LITERATURA.....	65

1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette (ATP vázající transportéry)
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member (P-glykoprotein)
AHR	Aryl hydrocarbon receptor (Aryl uhlovodíkový receptor)
AJ	Adhesive junction (Adhezivní spojení)
AR	Androstan receptor (Androstanový receptor)
ATV	Atazanavir
ATP	Adenosintrifosfát
CAR	Constitutive androstan receptor (Konstitutivní androstanový receptor)
CYP	Cytochrom P450
DAR	Darunavir
GR	Glucocorticoid receptor (Glukokortikoidní receptor)
HIV	Human immunodeficiency virus (Virus lidské imunitní nedostatečnosti)
hPCIS	Human precision-cut intestinal slices (Lidské ultratenké tkáňové řezy)
HUGO	Human genome organization
NNRTI	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (Ne-nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy)
NR	Nuclear receptor (Nukleární receptor)
NRTI	Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (Nukleosidový/nukleotidový inhibitor reverzní transkriptázy)
P-gp	P-glykoprotein
PI	Protease inhibitor (Inhibitor proteázy)
PXR	Pregnan X receptor (Pregnanový receptor X)
RIF	Rifampicin
RT	Reverse transcription (Reverzní transkripce)
RTV	Ritonavir
RXR	Retinoid X receptor (Retinoidní X receptor)
SCLO	Solute carrier organic anion transporter
SLC	Solute carier

SQV	Saquinavir
TJ	Tigh junction (Těsná spojení)
VD3	Vitamin D3

2 ÚVOD

Střevní bariéra je klíčová při ochraně organismu před vnějším prostředím, ale také musí zabezpečit příjem veškerých nutrientů, které tělo pro svou funkci potřebuje. Pro tyto pochody je nejdůležitější tenké střevo, které se skládá ze tří částí: duodenum, jejunum a ileum (Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Bariérová funkce střeva je zajištěna zejména samotnými buňkami enterocytů. Tyto buňky, krom toho, že tvoří souvislou a pro řadu molekul nepropustnou vrstvu, jsou také vybaveny enzymatickým aparátem a transportéry. Některé z těchto enzymů a transportérů mají ochrannou funkci a brání vstupu xenobiotik (včetně léčiv), které pasivně pronikají do buňky enterocytu (Ikemura et al., 2014).

V případě, že je léčivo podáno cestou *per os*, je prvním dějem farmakokinetiky absorpce léčiva, k níž u většiny látek dochází v tenkém střevě (Murakami, 2017). Léčivo odtud musí projít střevní bariérou do krevního oběhu. Množství léčiva, které přestoupí může být ovlivněno transportéry umístěnými na apikální straně enterocytů (Varma et al., 2005). Druhým farmakokinetickým dějem je metabolismus. V minulosti se předpokládalo, že hlavním orgánem pro metabolismus léčiv při prvním průchodu jsou játra. Nyní lze tedy předpokládat, že střevní metabolismus je hlavní příčinou nízké perorální biologické dostupnosti mnoha látek. Mezi enzymy I. fáze metabolismu, kde probíhají převážně oxido-redukční děje patří enzymy cytochromu P450 CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Tyto enzymy jsou exprimovány podél střeva (Fritz et al., 2019). Po perorálním podání je však střevní absorpce ovlivněna pre-systémovou eliminací, která může zahrnovat aktivity P-gp a CYP3A4. Předpokládá se, že indukce střevního P-gp výrazně snižuje biologickou dostupnost léčiv (Martinec et al., 2021). Možné farmakokinetické důsledky indukce zahrnují sníženou nebo chybějící biologickou dostupnost perorálně podávaných léků, zvýšenou hepatální clearance nebo zrychlenou tvorbu reaktivních metabolitů, což obvykle souvisí s lokální toxicitou (Fuhr, 2000).

Léčiv, které jsou schopny ve větší, či menší míře indukovat expresi biotransformačních enzymů nebo efluxních transportérů je celá řada. Z klinického pohledu jsou významnější taková léčiva, která jsou podávána dlouhodobě. Jedněmi z takových léčiv jsou i anti-retrovirotika, léčiva užívaná pacienty trpícími infekcí HIV.

Odhaduje se, že na celém světě je více než 36 milionů lidí nakažených virem HIV a přibližně 1 milion z nich každoročně umírá (Martinec et al., 2019). Léčba probíhá převážně v kombinaci dvou až tří anti-retrovirotik, kde dochází k významným interakcím. Proto právě anti-retrovirotika byla předmětem naší diplomové práce. Z pohledu interakcí bylo zjištěno, že darunavir inhibuje P-gp jak na buňkách Caco-2 tak v hPCIS. Proto lze předpokládat, že tento lék má vysoký potenciál způsobit na úrovni střevních P-gp transportérů lékové interakce (Huličiak et al., 2022). Darunavir má také indukční potenciál. V minulosti byl studován za použití buněčné linie LS180, kdy po čtyřtýdenní expozici zvýšil aktivitu P-gp a genovou expresi *CYP3A4* a *ABCB1* (König et al., 2010). Dále je v naší práci zahrnut atazanavir, u kterého byla indukční schopnost studována v *in vitro* provedených studiích na buněčné linii LS180V, kde bylo dokázáno, že může působit i jako induktor P-gp (Perloff et al., 2005). Výsledky jsme porovnávali proti již známému induktoru rifampicinu, jehož indukční účinky byly potvrzeny metodou hPCIS. Indukce byla potvrzena jak pro *CYP3A4*, tak pro P-gp (Martinec et al., 2021).

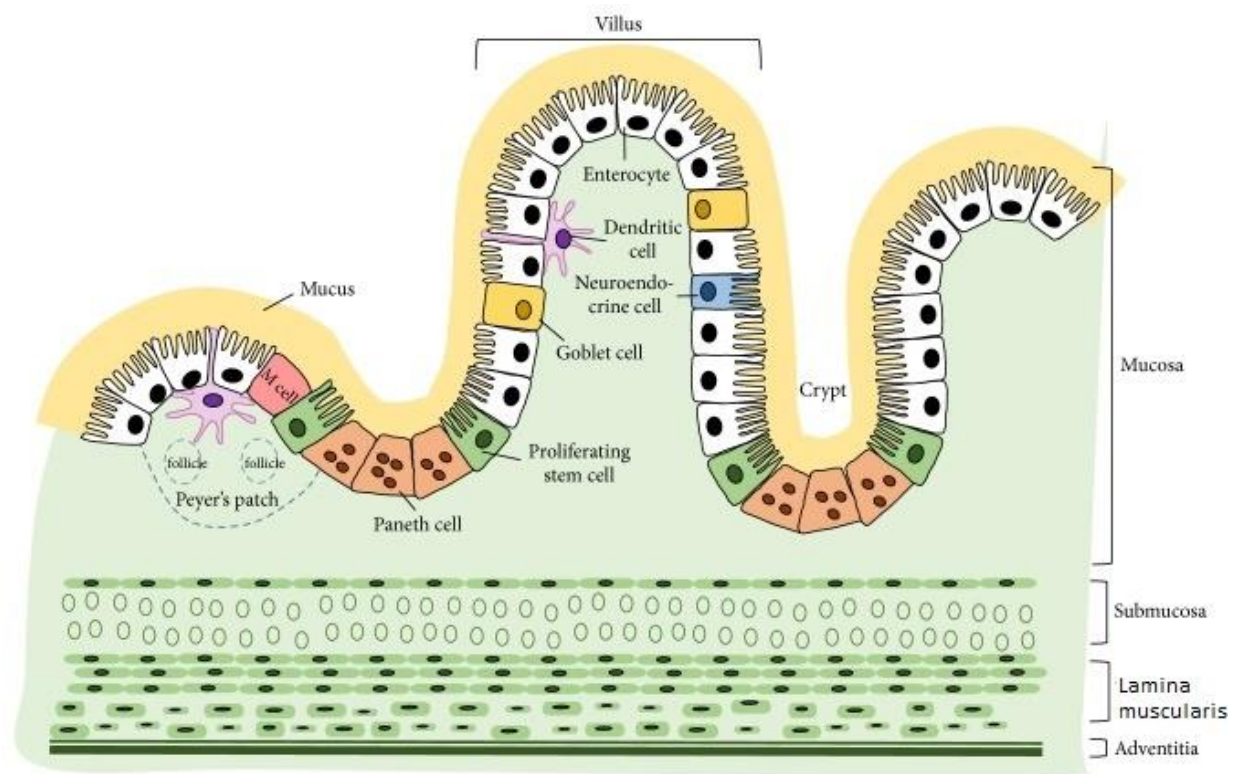
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Střevní bariéra

Střevní bariéra je klíčová při ochraně organismu před vnějším prostředím, ale také musí zabezpečit příjem veškerých nutrientů, které tělo pro svou funkci potřebuje. Pro tyto pochody je nejdůležitější tenké střevo, které se skládá ze tří částí: duodenum, jejunum a ileum. Duodenum je první a nejkratší úsek tenkého střeva. Přijímá částečně natrávené potraviny ze žaludečního a pankreatického sekretu obsahujícího trávicí enzymy a hraje důležitou roli při trávení potravy. Jejunum navazuje na duodenum a v rámci své struktury obsahuje kruhové záhyby a klky pro zvětšení povrchu a pro absorpci živin, které se následně portální vénou dostávají do jater. Ileum je třetí částí tenkého střeva a obsahuje klky podobné těm v jejunu. Ileum absorbuje například vitamín B12, žlučové kyseliny a další zbývající živiny neabsorbované jejunem (Kong et al., 2018).

Samotná střevní stěna je složena z několika vrstev (viz Obrázek 1). První vrstvu, orientovanou do lumen střeva tvoří mucosa. Mucosa se skládá z epiteliálních buněk, které vylučují hlen jako hustou ochrannou tekutinu. Hlavní funkcí mucosy je absorbovat a transportovat živiny, chránit tělo před patogeny, cizími částicemi a částečně také xenobiotiky. Pod mukózou se nachází submukóza, relativně tenká extracelulární matrice bohatá na kolagen, která podporuje sliznici a spojuje ji se svalovou vrstvou. Lamina muscularis se skládá ze svalové tkáně, která je zodpovědná za pohyb střev, jako je peristaltika. Adventicie je hladká tkáňová membrána vylučující serózní tekutinu, která se skládá ze dvou vrstev mezotelu, viscerální membrány a parietální vrstvy (Kong et al., 2018).

Vrstva hlenu je úplně první linií fyzické obrany, se kterou se vnější molekuly setkávají, když se dostanou do lumen střeva, která zabraňuje bakteriím přímý kontakt s epiteliálními buňkami. Hlavními stavebními kameny slizové vrstvy jsou vysoce glykosylované mucinové proteiny, které tvoří gelovitou sítovou strukturu překrývající střevní epitel. V tenkém a tlustém střevě se nachází mucin 2 (MUC2), který je nejhjojnějším slizovým proteinem vylučovaným pohárkovými buňkami. Tenké střevo má pouze jednu slizovou vrstvu (oproti tlustému střevu) (Vancamelbeke & Vermeire, 2017).



Obrázek 1: Znárodnění buněčných typů a jednotlivých vrstev lokalizovaných ve střešní bariéře. Přeřvato a upraveno z Shanshan Kong et al 2018.

Pod vrstvou hleny jsou epiteliální buňky, které jsou zdaleka nejsilnějšími determinanty fyzické střešní bariéry. Soubor pluripotentních kmenových buněk sídlících v kryptách dává vzniknout pěti odlišným typům buněk, včetně absorpčních enterocytů, pohárkových buněk, enteroendokrinních buněk, Panethových buněk a M-buněk (viz Obrázek 1). Tyto buňky společně tvoří souvislou a polarizovanou monovrstvu. Vzhledem k tomu, že buněčné membrány jsou nepropustné pro hydrofilní rozpuštěné látky v nepřítomnosti specifických transportérů, je průchod takových molekul přes intestinální epiteliální buňky velmi omezený. Příjem lipofilních nebo velkých molekul je většinou závislý na difúzi a endocytóze (Ikemura et al., 2014).

Transport molekul mezi intestinálními epiteliálními buňkami je regulován přítomností juncčních komplexů. Důležitými komplexy jsou těsná spojení (TJ), adhezivní spojení (AJ) a desmozomy. TJ jsou apikálně nejadhezivnější komplexy, které z velké části utěšňují mezibuněčný prostor a skládají se z transmembránových proteinů (např. claudins, occludin), proteinů periferní membrány (např. zonula occludens) a regulačních proteinů. AJ se nacházejí pod TJ a jsou nutné pro jejich spojení. Spolu s desmozomy poskytují AJ silné adhezivní vazby k udržení integrity epitelu (Ikemura et al., 2014).

Důležitým fyziologickým aspektem střevní bariéry je hodnota pH. Luminální pH gastrointestinálního traktu je závislé na střevním obsahu a pohybuje se v rozmezí 5-8 (proximální část 6,15-7,3 a část terminální 6,8-7,8) (Press et al., 1998), zatímco pH krve je stabilní okolo 7,4 (Neuhoff et al., 2005). Hodnota pH určuje výslednou povahu přenášené molekuly, tedy zda se kyselé a bazické molekuly budou vyskytovat ve své disociované nebo nedisociované formě. pH prostředí ovlivňuje i rychlost, kterou nenabitá molekula (léčivo) přestoupí přes lipofilní membránu pasivní difúzí. Navíc funkce některých transportérů je závislá na pH (Oise Ingels & Augustijns, 2003).

Jak již bylo uvedeno výše, bariérová funkce střeva je zajištěna zejména samotnými buňkami enterocytů. Tyto buňky krom toho, že tvoří souvislou a pro řadu molekul nepropustnou vrstvu, jsou také vybaveny enzymatickým aparátem a transportéry. Některé z těchto enzymů a transportérů mají ochrannou funkci a brání vstupu xenobiotik (včetně léčiv), které pasivně pronikají do buňky enterocytu (Ikemura et al., 2014). V případě, že je léčivo podáno cestou *per os*, je prvním dějem farmakokinetiky absorpce léčiva, k níž u většiny látek dochází v tenkém střevě (Murakami, 2017). Léčivo odtud musí projít střevní bariérou do krevního oběhu. Množství léčiva, které přestoupí může být ovlivněno transportéry umístěnými na apikální straně enterocytů (Varma et al., 2005).

Druhým farmakokinetickým dějem je metabolismus. V minulosti se předpokládalo, že hlavním orgánem pro metabolismus léčiv při prvním průchodu jsou játra. Z několika studií však vyplývá přesvědčivý důkaz, že střevní enzymy metabolizující léčiva se mohou na metabolismu léčiv při prvním průchodu podílet stejnou, nebo dokonce vyšší měrou než játra. Lze tedy předpokládat, že střevní metabolismus je hlavní příčinou nízké perorální biologické dostupnosti mnoha látek. Mezi enzymy I. fáze metabolismu, kde probíhají převážně oxido-redukční děje, patří enzymy cytochromu P450 CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Tyto enzymy jsou exprimovány podél střeva. Pokud jde o II. fázi střevního metabolismu léčiv, bylo prokázáno, že uridin 5'-difosfoglukuronosyltransferázy (UGT) 1A a 2B a sulfotransferázy (SULT) jsou ve střevě exprimovány a mají funkční význam pro mnoho léčiv (Fritz et al., 2019).

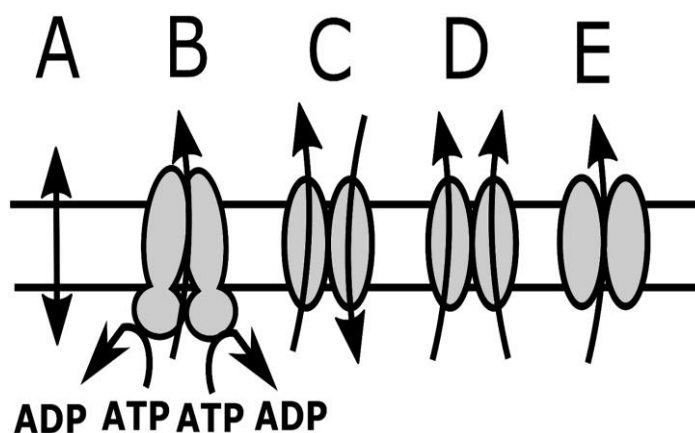
3.2 Transportéry

Transportéry jsou velké proteiny vázané na membránu a jsou exprimované prakticky ve všech tkáních lidského těla (Degorter et al., 2012). Jejich substráty jsou obecně látky tělu vlastní (eobiotika), tak látky tělu cizí (xeboniotika). Transportéry jsou tak důležité pro buňky i orgány, jelikož umožňují kontrolovat příjem a odsun klíčových sloučenin, jako jsou cukry, aminokyseliny, nukleotidy atd. Z pohledu xenobiotik a zejména pak léčiv mohou být hlavními determinanty farmakokinetiky, bezpečnosti a účinnosti (Estudante et al., 2013).

Membránové transportéry jsou exprimovány v lumenální nebo bazolaterální membráně enterocytů, hepatocytů, renálních tubulárních epiteliálních buňkách a dalších důležitých bariérových tkáních, včetně hematoencefalické bariéry a placentární bariéry. Expres těchto transportérů ve střevě a játrech tvoří dva hlavní faktory ovlivňující, kolik léku se dostane do systémového oběhu po perorální dávce (Estudante et al., 2013).

Membránové transportéry lze rozdělit do tří hlavních nadrodin: nadrodiny SLC (solute carrier), dále nadrodiny SLCO (solute carrier organic anion transporter), která byla dříve součástí podrodiny SLC21 a nadrodiny ABC (ATP-binding cassette) (Roberts, 2021). Toto rozdělení bylo zavedeno dle doporučení výboru pro genovou nomenklaturu HUGO.

Transportéry rodiny SLC se obecně sestávají z proteinů s molekulovou hmotností v rozmezí 40–90 kDa a obsahují 300–800 aminokyselinových zbytků, zatímco transportéry rodiny ABC mají hmotnosti 140–180 kDa a obsahují 1200–1500 zbytků (Estudante et al., 2013). Mezi hlavní rozdíly těchto rodin patří typ transportu. ABC transportéry jsou primární aktivní uniportéry (viz Obrázek 2), vyžadují tedy hydrolýzu ATP ve specifických proteinových doménách, které jsou známé jako nukleotidové vazebné domény (někdy také označovány jako ATPázové domény), aby poskytly energii pro transport. Členové superrodiny SLC jsou příklady sekundárních aktivních transportérů, které jsou poháněny elektrochemickými nebo koncentračními gradienty. Mohou také nepřímo využívat energii z iontových gradientů produkovaných pumpami závislými na ATP. Transportní mechanismy SLCO rodiny nejsou dobře známy (Roberts, 2021).

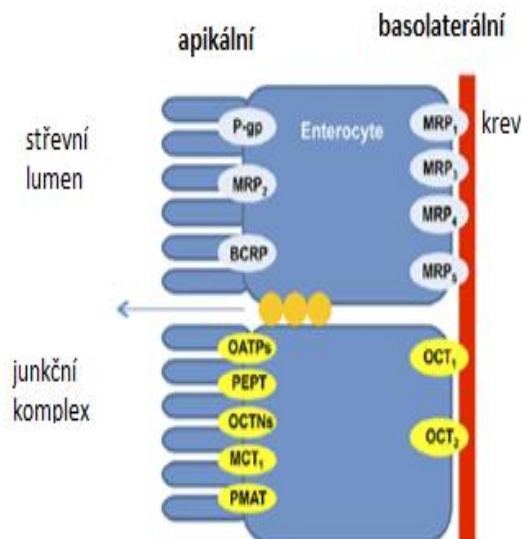


Obrázek 2: Transportem zprostředkovaná translokace molekul přes membrány.

A) pasivní difúze; B) primární aktivní transport zahrnující hydrolýzu ATP; C) antiport; D) symport; E) uniport. Převzato a upraveno z Roberts 2021.

3.3 Střevní transportéry

Jak již bylo zmíněno výše, střevní bariéra se skládá z polarizovaných enterocytů, které jsou spolu těsně spojeny pomocí TJ. Enterocyty exprimují několik transportérů (viz Obrázek 3) patřících do superrodiny ABC a SLC na apikálních nebo bazolaterálních membránách pro influx nebo eflux endogenních látek a xenobiotik (Roberts, 2021).



Obrázek 3: Grafické zobrazení střevních transportérů.

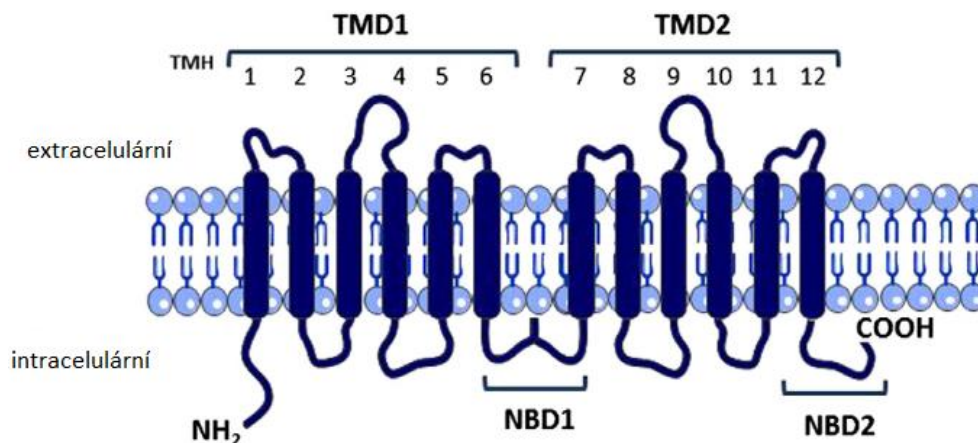
P-gp (P-glykoprotein), MRP₂ (multidrug resistance-associated protein 2), BCRP (breast cancer resistance protein), OATPs (organic anion transporting polypeptides), PEPT (peptide transporter), OCTNs (organic cation transporters), MCT₁ (monocarboxylate transporter), PMAT (plasma membrane monoamine transporter), MRP₁ (multidrug resistance-associated protein 1), MRP₃ (multidrug resistance-associated protein 3), MRP₄ (multidrug resistance-associated protein 4), MRP₅ (multidrug resistance-associated protein 5), OCT₁ (organic cation transporter 1), OCT₂ (organic cation transporter 2). Převzato a upraveno to z Estudante et al. 2013.

U řady těchto transportérů je známo, že hrají klíčovou roli ve střevní absorpci léčiv. Mezi ABC transportéry, které jsou exprimované ve střevě na apikální straně patří: P-glykoprotein (ABCB1; P-gp), breast cancer resistance protein (ABCG2; BCRP) a multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2; MRP2). Na basolaterální straně jsou to pak multidrug resistance-associated protein 1, 3, 4, 5 (MRP1, MRP3, MRP4, MRP5). SLC transportéry na apikálním povrchu enterocytů zahrnují peptide transporter 1 (PEPT1), organic anion transporting polypeptide (OATP1A2 a OATP2B1), monokarboxylate transporter 1 (MCT1), organic cation/carnitine transporter 1, 2 (OCTN1 a OCTN2) a plasma membrane monoamine transporter (PMAT). Ve střevě bylo také identifikováno několik dalších transportérů z rodiny SLC, zejména transportérů organických aniontů nebo kationtů (OAT nebo OCT), avšak předpokládá se, že jejich význam pro perorální absorpci léčiv je v porovnání s výše zmíněnými nižší (Roberts, 2021).

V následujících kapitolách se budu věnovat zejména P-gp, jelikož byl předmětem studia mé diplomové práce.

3.3.1 P-glykoprotein

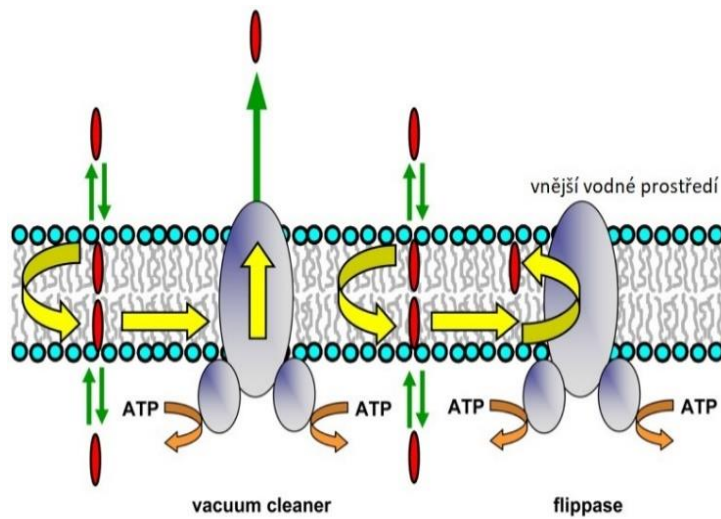
P-gp patří do rodiny transportérů ABC a ovlivňuje farmakokinetiku široké škály léčiv a xenobiotik. Hraje důležitou roli při absorpci, distribuci, metabolismu, vylučování léčiv i lékových interakcí. Jedná se patrně o nejvíce studovaný efluxní transportér ve střevě. Je kódován genem mnohočetné rezistence (*ABCB1*) (Estudante et al., 2013). Skládá se ze dvou homologních částí, kdy každá část obsahuje šest transmembránových helixů tvořících transmembránovou doménu (TMD) a v cytosolu umístěnou nukleotidovou vazebnou doménu (NBD) (Al-Shawi & Omote, 2005). TMD a NBD jsou spojeny za pomoci dvou intracelulárních spojovacích helixů (viz Obrázek 4). Ve střevě je exprimován na apikální membráně kartáčového lemu enterocytů (Estudante et al., 2013).



Obrázek 4: Model P-gp, zobrazující dvě homologní poloviny, každou s jednou transmembránovou doménou (TMD), obsahující šest vysoce hydrofobních transmembránových α -helixů (TMH) a jednu nukleotidovou vazebnou doménu (NBD) umístěnou na cytoplazmatické straně membrány. Upraveno a převzato z Silva et al. 2015.

P-gp je typickým zástupcem ABC transportérů. Transportuje řadu strukturně nepříbuzných sloučenin směrem ven z buněk pomocí energie získané hydrolyzou ATP. Většina transportovaných substrátů je hydrofobních a mnoho z nich má kladný náboj spolu s charakteristickými vzory akceptorů vodíkových vazeb. Kvůli této hydrofobnosti se substráty rozdělují do lipidové dvojvrstvy nebo se pevně vážou na proteiny nebo chromozomy a mají nízké volné koncentrace v cytosolu. Obecně přijímaný model "hydrofobního vysavače" (hydrophobic vacuum cleaner) (Sharom, 2014) vychází z principu, že P-gp rozpoznává hydrofobní sloučeniny nacházející se ve vnitřní straně plazmatické membrány (poté, co se rozdělí do dvojvrstvy), a odčerpává je z membrány přímo do vnějšího vodního prostředí. Při tomto čerpání vzniká koncentrační gradient přes plazmatickou membránu, přičemž vyšší koncentrace léčiva je ve vnější vodné fázi. Důležité je, že transportér je schopen zachytit substráty před jejich vstupem do cytosolu, a chrání tak buňku před vystavením potenciálně toxickým molekulám (Silva et al., 2015). Alternativní model funkce P-gp, tzv. "flippase" (Sharom, 2014), předpokládá, že substráty P-gp jsou převráceny z vnitřního listu lipidové dvojvrstvy buď na vnější list plazmatické membrány, nebo přímo do extracelulárního prostředí, což vyžaduje, aby se substráty léčiv lokalizovaly na jednom listu dvojvrstvy, a nikoli na hydrofobním jádru membrány (viz Obrázek 5). Podle tohoto modelu je také nutná nízká rychlost spontánního

pohybu substrátů mezi oběma listy dvojvrstvy, aby P-gp mohl vytvářet koncentrační gradient léčiva (Silva et al., 2015).



Obrázek 5: Princip funkce P-glykoproteinu. „Hydrophobic vacuum cleaner“ a model „flippasy“. Převzato a upraveno z Sharom, 2014.

Jak už bylo zmíněno P-gp se nachází na apikální membráně enterocytů celého střeva od duodena až po colon. Expres P-gp se však mezi jednotlivými úseky liší. Vyšší výskyt byl zaznamenán v ileu. Zajímavostí je také rozdíl mezi pohlavím, kde signifikantně vyšší exprese P-gp byla zaznamenána u mužů (Mai et al., 2021).

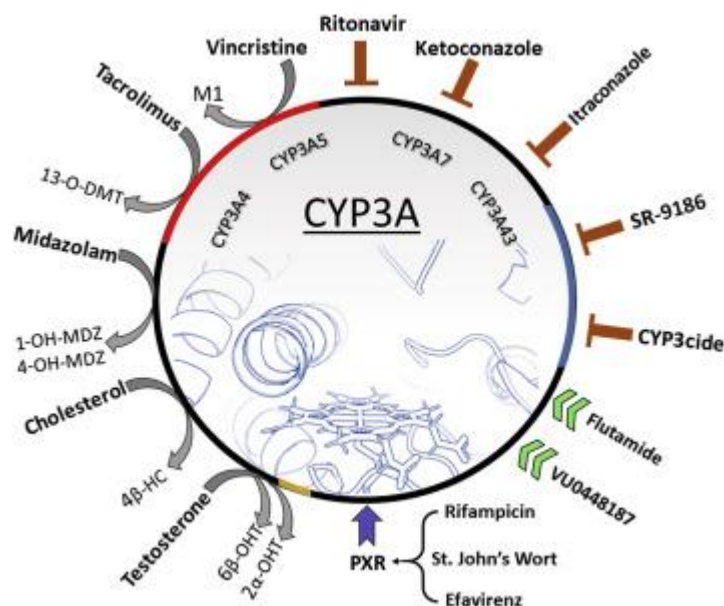
Xenobiotika včetně léčiv mohou na P-gp potenciálně působit také jako jeho inhibitory nebo induktory. Některé látky pak působí ve více rolích zároveň. Ve vztahu k léčivu inhibice P-gp může vést ke zvýšení jeho biologické dostupnosti. Indukce P-gp naopak biologickou dostupnost snižuje. Mezi typické inhibitory P-gp patří například: klarithromycin, erytromycin, ritonavir nebo verapamil. K induktorům řadíme rifampicin nebo třezalku tečkovanou (Finch, 2014). Substráty P-gp zahrnují například protirakovinná léčiva (vinkristin, vinblastin, doxorubicin, daunorubicin, etoposid a paklitaxel), imunosupresiva (cyklosporin A), verapamil, digoxin a steroidy (aldosteron a kortizol) a řadu dalších (Estudante et al., 2013). Některé látky pak mohou vystupovat ve více rolích, tedy jako substráty, inhibitory nebo induktory.

3.4 Cytochrom CYP 3A4

Cytochromy P450 (CYPs) představují různorodou skupinu hem-thiolátových proteinů nacházejících se téměř ve všech organismech. CYPs sdílí společnou proteinovou skladbu, avšak liší se selektivitou k jednotlivým substrátům (Sevrioukova & Poulos, 2013).

Na základě podobnosti aminokyselinové sekvence jsou CYPs uspořádány do jednotlivých rodin a podrodin. CYPs se účastní životně důležitých procesů tím, že oxidují endogenní nebo exogenní sloučeniny (např. léky, chemikálie, steroidy, žlučové a mastné kyseliny, vitamín D, a další přírodní produkty a xenobiotika). Prokaryotické CYP jsou rozpustné proteiny, zatímco eukaryotické protějšky jsou vázané na endoplazmatické retikulum nebo na vnitřní mitochondriální membránu (Sevrioukova & Poulos, 2013).

V lidském genomu bylo identifikováno celkem 57 genů a 33 pseudogenů CYP uspořádaných do 18 rodin a 42 podrodin. Nejhojněji zastoupenou izoformou u člověka je pak CYP3A4. Exprimována je především v játrech a gastrointestinální traktu. CYP3A4 je vysoce variabilní v substrátové specifitě a může metabolizovat sloučeniny různých velikostí a chemických struktur. Díky této substrátové variabilitě CYP3A4 metabolizuje více než polovinu všech podávaných léků. Prostřednictvím této metabolické přeměny zprostředkované CYP3A4 může být snížena biologická dostupnost a terapeutická účinnost léčiv. Toto se děje zejména pokud je enzym z nějakého důvodu indukován. Naopak plazmatické hladiny léčiva mohou být zvýšeny v případě, pokud dojde k jeho inhibici, např. dalším společně podávaným léčivem. Lékové interakce, jak ve vztahu k inhibici, tak ve vztahu k indukci tohoto enzymu jsou poměrně časté (Sevrioukova & Poulos, 2013) (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Účinky různých sloučenin na CYP3A.

Několik relevantních endogenních sloučenin, léčivých přípravků nebo nástrojových sloučenin je označeno jako substráty (šedé zakřivené šipky), inhibitory (oranžové zploštělé šipky), enzymatické aktivátory (zelené dvojité šipky) nebo induktory (fialová šipka) CYP3A. Známé informace o selektivitě jsou podél kruhu označeny červeně (selektivní pro CYP3A5), modře (selektivní pro CYP3A4), žlutě (selektivní pro CYP3A7) nebo černě (neznámé nebo neselektivní).

Zkratky: PXR, pregnane X receptor; 2 α -OHT, 2 α -hydroxytestosterone; 6 β -OHT, 6 β -hydroxytestosterone; 4 β -HC, 4 β -hydroxycholesterol; 4-OH-MDZ, 4-hydroxymidazolam; 1-OH-MDZ, 1-hydroxymidazolam; 13-O-DMT, 13-O-desmethyltacrolimus; M1, vincristine metabolite 1; CYP3A, cytochrome P450 3A; VU0448187, 5-(4-fluorobenzyl)-2-((3-fluorophenoxy)methyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrazine; SR-9186, 1-(4-imidazopyridinyl-7phenyl)-3-(40-cyanobiphenyl) urea; CYP3cide, 1-methyl-3-[1-methyl-5-(4-methylphenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-4-[(3S)-3-piperidin-1-ylpyrrolidin-1-yl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine. Upraveno a převzato z Wright et al. 2019.

Expresse CYP3A4 v gastrointestinálním traktu, podobně jako v případě P-gp není ve všech úsecích stejná. Nejvyšší exprese CYP3A4 v lidském střevě byla zaznamenána v duodenu a jejunu. Následně výrazně klesá a nejnižší hodnoty jsou v části tlustého střeva (Bauters, 2019). Rozsah střevní biotransformace a absorpce může být ovlivněn místem absorpce léčiva, které je dáno podanou lékovou formou, ale také změnami ve střevní motilitě souvisejícími s onemocněním, lékem nebo po střevním bypasse (Fritz et al., 2019).

Jak již bylo uvedeno, mezi substráty CYP3A4 patří celá řada léčiv jako například atovarstatin, simvastatin, kodein, fentanyl, haloperidol, indanivir, lansoprazol, lidokain,

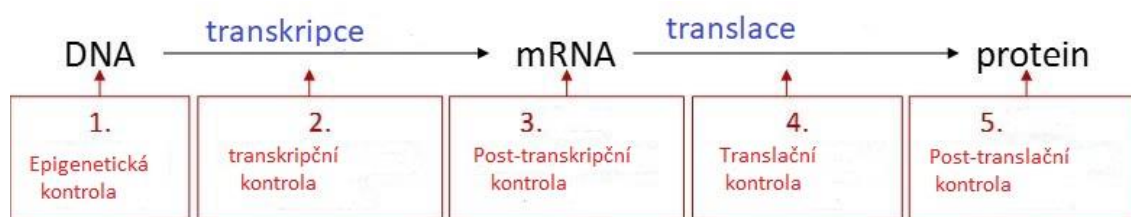
methadon, omeprazol, nifedipin, ondasetron, pantoprazol, quetinapin, propranolol, ritonavir, rivaroxaban, saquinavir, sildenafil a tacrolimus (Bauters, 2019).

Mezi inhibitory tohoto enzymu řadíme amiodaron, aprepitant, klarithromycin, ciprofloxacin, itraconazol, ketokonazol, verapamil, fluconazol, voriconazol, erythromycin, diltiazem nebo grepfruitový džus (Bauters, 2019).

K induktorům CYP3A4 patří: fenobarbital, karbamazepin, fenytoin a rifampicin (Bauters, 2019).

3.5 Regulace genové exprese

Expese specifických genů je vysoce regulovaný proces s mnoha úrovněmi a stádii kontroly. Tato komplexnost zajišťuje expresi každého proteinu ve správných buňkách ve správný čas. V eukaryotických buňkách je DNA obsažena v jádře buňky, kde se přepisuje na mRNA. Nově syntetizovaná mRNA je poté modifikována a transportována z jádra do cytoplazmy, kde ribozomy překládají mRNA na protein (viz Obrázek 7). Procesy transkripce a translace jsou fyzicky odděleny jadernou membránou. K transkripci dochází pouze v jádře a k translaci pouze v cytoplazmě (Katherine Mattaini, 2020).



Obrázek 7: Regulace genové exprese. Převzato a upraveno z Katherine Mattaini, 2020.

Eukaryotické geny nejsou organizovány do operonů (jako je tomu u prokaryot), takže každý gen musí být regulován nezávisle. Navíc eukaryotické buňky mají mnohem více genů než prokaryotické buňky. Regulace genové exprese může nastat v kterékoli fázi, kdy je DNA transkribována na mRNA a mRNA je překládána na protein. Pro usnadnění je regulace rozdělena do pěti úrovní: epigenetická, transkripční, posttranskripční, translační a posttranslační (Katherine Mattaini, 2020).

3.5.1 Indukce

Současná celosvětová spotřeba léků je obrovská a neustále se zvyšuje, což zvyšuje riziko lékových interakcí (drug-drug interactions, DDIs). Nejčastěji používanou cestou

podání léčiva je podání *per os*, jelikož je považováno v porovnání s ostatními způsoby za pohodlnou a bezpečnou. Po perorálním podání je však střevní absorpce ovlivněna pre-systémovou eliminací, která může zahrnovat aktivity P-gp a CYP3A4 (Martinec et al., 2021).

Možné farmakokinetické důsledky indukce enzymu nebo transportéru závisí na konkrétní lokalizaci. Obecně zahrnují sníženou nebo chybějící biologickou dostupnost perorálně podávaných léků, zvýšenou hepatální clearance nebo zrychlenou tvorbu reaktivních metabolitů, což obvykle souvisí s lokální toxicitou (Fuhr, 2000). To je také důvod, proč by před uvedením léčiv na trh měla být testována schopnost léčiva tyto enzymy a transportéry indukovat (Cole et al., 2020).

Zásadní význam pro indukci má aktivace nukleárních receptorů (NR) různými endo- a exogenními látkami. Mezi hlavní NR ovlivňované xenobiotiky patří pregnanový X receptor (PXR) a androstanový receptor (AR), které mají zásadní význam pro počáteční rozpoznání ligandu a nastartování metabolického procesu (Wallace & Redinbo, 2013).

Samotné indukční účinky jedné látky mohou být zprostředkovány více než jedním mechanismem. Proto se zdá, že každý induktor má svůj vlastní vzor indukce. Znalost hlavního mechanismu často ale nestačí k předpovědi rozsahu a časového průběhu indukce (Fuhr, 2000).

V současné době se pro biotransformační enzymy rozlišuje 5 základních mechanismů indukce. Zvláštním typem je ethanolový typ indukce, který je zprostředkován stabilizací enzymu ligandem. Ostatní způsoby indukce jsou pak zprostředkovány intracelulárními „receptory“. Jedná se zejména o aryl uhlovodíkový receptor (AHR), peroxisomovým proliferátorem aktivovaný receptor (PPAR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový X receptor (PXR) a další (Fuhr, 2000).

3.5.4.1 Indukce zprostředkovaná aryl uhlovodíkovým receptorem

Tento mechanismus indukce je založen na zvýšené syntéze proteinů, iniciované především vazbou induktoru na intracelulární AHR. Tento komplex spolu s dalším proteinem, jaderným translokátorem AHR (Arnt), zvyšuje expresi vazbou na promotor. Hlavními proteiny ovlivněnými indukcí přes AHR jsou cytochrom P450 (CYP) 1A1 a

1A2, ale zvýšená je i koncentrace dalších enzymů, včetně glutathion-S-transferázy a UDP-glukuronosyltransferázy (UGTs) (Fuhr, 2000).

3.5.4.2 Indukce zprostředkovaná peroxisomovým proliferátorem

Existují dvě třídy léků, glitazony a fibráty, u kterých je známo, že se váží na receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPAR), PPAR α a PPAR γ . Z dalších látek jsou to pak například ftaláty, nebo herbicidy (Hakkola et al., 2018). PPAR α se podílí na transkripci genů kódujících proteiny, které kontrolují metabolismus lipoproteinů a mastných kyselin, zatímco PPAR γ řídí diferenciaci a adipogenezi adipocytů (Fuhr, 2000).

Ačkoli mechanismus účinku peroxisomových proliferátorů byl rozsáhle prozkoumán u myši a králíků, u lidí jsou molekulární mechanismy prozkoumány méně. Zdá se, že enzymy metabolizující léky nejsou ve větší míře regulovány tímto typem indukce (Fuhr, 2000).

3.5.4.3 Indukce zprostředkovaná konstitutivním androstanovým receptorem /fenobarbitalový typ indukce

Fenobarbital byl mezi prvními léčivy, u kterých bylo popsáno, že zvyšují expresi enzymů CYP a snižují u lidí účinek léků metabolizovaných těmito enzymy. K dosažení indukce fenobarbitalového typu jsou ve srovnání s jinými typy obvykle vyžadovány vysoké koncentrace induktoru. Molekulárním cílem a mediátorem indukce fenobarbitalového typu je CAR (Fuhr, 2000). Prostřednictvím aktivace tohoto receptoru jsou také indukovány některé transportéry (ABCC2, ABCC4) a biotransformační enzymy druhé fáze (UGT) (Hakkola et al., 2018).

3.5.4.4 Indukce zprostředkovaná pregnanovým X receptorem

Indukce, dříve nazývaná rifampicin/glukokortikoidního typu je zprostředkována přes sirotčí receptor, takzvaný lidský pregnanový X receptor (hPXR). Tento receptor se váže na rifampicin/dexamethason responsivní element v promotoru *CYP3A4*. V případě indukce *CYP3A4* je postižena celá řada léčiv (Fuhr, 2000). Krom *CYP3A4* je prostřednictvím PXR indukována také řada biotransformačních enzymů druhé fáze a transportérů (Hakkola et al., 2018).

3.5.4.5 Indukce ethanolového typu

Indukce ethanolového typu je omezena na jeden hlavní cíl, a to CYP2E1. Ačkoli transkripční nebo posttranskripční aktivace a stabilizace informace se mohou podílet na zvýšené de novo syntéze CYP2E1. Induktory, které jsou vázány na vazebné místo a mohou působit jako kompetitivní inhibitory. S tímto mechanismem ihned při expozici induktoru ethanolového typu bude obvykle převládat inhibice enzymu (Fuhr, 2000).

Jak můžeme vidět oxidace, konjugace a transport potenciálně škodlivých xenobiotických a endobiotických sloučenin dosahovaných těmito katalytickými systémy jsou významně regulovány na úrovni genové exprese členy rodiny NR ligandem modulovaných transkripčních faktorů (Wallace & Redinbo, 2013). A proto si je v kapitole níže přiblížíme.

Mezi látky s významným indukčním potenciálem pak lze zařadit například: rifampicin, saquinavir, ritonavir, clotrimazol, darunavir, atazanavir, lopinavir, dexamethazon (Kim, 2002).

3.5.2 Nukleární receptory

Superrodina nukleárních receptorů (NR) se skládá z rodiny transkripčních faktorů, které hrají důležitou roli v řadě biologických procesů včetně metabolismu, reprodukce a zánětu. První člen této rodiny byl identifikován v roce 1985 a v současnosti je známo u člověka celkem 48 jednotlivých zástupců (Weikum et al., 2018).

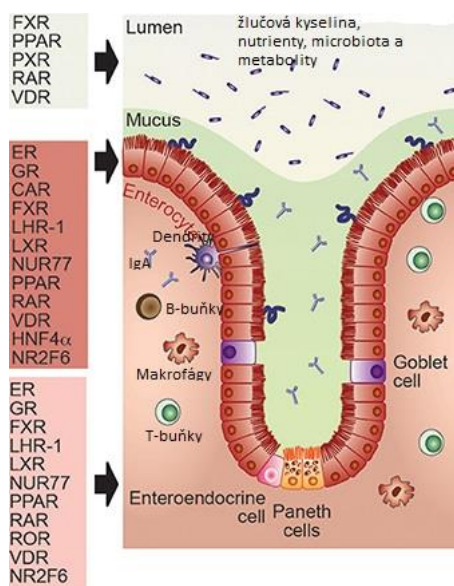
Většina NR je regulována endogenně malými lipofilními ligandy, jako jsou steroidy, retinoidy a fosfolipidy. U některých NR však dosud žádné ligandy nebyly identifikovány. Takové NR označujeme jako „osiřelé“ (Weikum et al., 2018).

Vazba ligandu indukuje konformační změny v receptoru, který následně váže specifické sekvence DNA v celém genomu. Jakmile dojde k navázání na DNA, koregulační proteiny, remodelátory chromatinu a obecný transkripční aparát jsou rekrutovány do DNA za účelem aktivace nebo potlačení exprese cílového genu (Weikum et al., 2018).

Navzdory různorodé velikosti, tvaru a nábojů aktivačních ligandů, sdílejí téměř všichni členové superrodiny jaderných receptorů společnou strukturu modulárních domén. S výjimkou atypických receptorů SHP a DAX je celková architektura složena z pěti domén: A–E, kdy každá z těchto subdomén hraje specifickou roli v biologii

receptorů. Hmotnost NR se může lišit, ale obecně se pohybuje mezi 66 a 100 kDa (Weikum et al., 2018).

Fyziologie střev je regulována několika jadernými receptory, jako je Er β , GR, FXR, PPAR γ , PXR, RAR α , VDR nebo HNF4 α (viz Obrázek 8), u kterých bylo prokázáno, že hrají zásadní roli v integritě epiteliálních střevních buněk, a to zejména při formování složení střevních imunitních buněk a jejich funkce (Klepsch et al., 2019). NR hrají také zásadní roli v regulaci exprese enzymů a transportérů (Urquhart et al., 2007).



Obrázek 8: Nukleární receptory.

PXR, RAR nebo VDR jsou dobře známými senzory živin, toxických produktů stravy, specifických metabolitů hostitele a bakterií a žlučových kyselin. Funkce střevní bariéry a integrity epitelových střevních buněk závisí na vhodné funkci ER, GR, CAR, FXR, LHR-1, LXR, NUR77, PPAR, RAR, VDR, HNF4 α a NR2F6, které regulují sekreci hlenu, expresi proteinů těsných spojů, autofagii, cirkadiánní hodiny a také počet pohárkových a Panethových buněk. Také NR, jako jsou ER, GR, FXR, LHR-1, LXR, NUR77, PPAR, RAR, ROR, VDR, HNF4 α a NR2F6, přispívají k homeostáze střeva tím, že formují vývoj střevních imunitních buněk a složení a efektorové funkce makrofágů, dendritických buněk, T a B buněk. Převzato a upraveno z Klepsch et al., 2019

V průběhu mé diplomové práce jsem se věnovala receptoru pro vitamin D (VDR), pregnanovému X receptoru (PXR) a glukokortikoidnímu receptoru (GR), a ovlivnění jejich exprese v přítomnosti antivirotek, proto se níže budu věnovat právě jim.

3.5.3 Receptor pro vitamin D

Vitamin D3 (VD3) je multifunkční nutrient, který může být v těle buď přímo syntetizován, nebo je absorbován ze stravy. Hraje klíčovou roli v homeostáze vápníku a fosforu, stejně jako v různých fyziologických a patologických procesech. VD3 je postupně převáděn na aktivní formu 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-D3), cytochromem P450 2R1 (CYP2R1)/CYP27A1 a CYP27B1 a deaktivován řadou enzymů včetně CYP3A4. Na druhé straně je 1,25-D3 schopen transkripci genů CYP3A aktivovat, což bylo prokázáno u lidí, myši a potkanů. Tato transaktivace je zprostředkována VDR a podobá se transaktivaci receptorem PXR (Qin & Wang, 2019).

VDR se nachází v cytosolu buněk citlivých na VD3. Když je na VDR navázán 1,25-D3, komplex tvoří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), translokuje se do buněčného jádra, váže se na specifické sekvence DNA označované jako vitamin D-responsivní elementy (VDRE) a aktivuje nebo potlačuje transkripci příbuzných genů. VDR a PXR také sdílejí podobné responzivní prvky v promotoru genu *CYP3A4* (Qin & Wang, 2019). Klasickým účinkem VDR v tenkém střevě je regulace transcelulárního transportu vápníku (Li et al., 2015). Krom indukce CYP3A4 (Urquhart et al., 2007) byl prokázán také vliv na indukci P-gp (Tachibana et al., 2009).

3.5.4 Pregnanový receptor X

PXR je člen superrodiny jaderných receptorů, má hlavní roli v regulaci genů zapojených do transportu a metabolismu léčiv (Cheng et al., 2012). Má stejně jako ostatní členové superrodiny jaderných receptorů N-terminální doménu vázající DNA a C-terminální doménu vázající ligand a funguje jako heterodimer s receptorem 9-cis retinové kyseliny, také známý jako retinoidní X receptor α (RXR α ; NR2B1), ke kontrole genové transkripce (Cheng et al., 2012).

Indukce CYP3A4 xenobiotiky je do značné míry závislá právě na PXR, který reguluje expresi CYP3A4 vazbou jako heterodimer s RXR. Tvorba heterodimerů PXR a RXR je při aktivaci CYP 3A4 a P-gp klíčová (Martinec et al., 2021).

3.5.5 Glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidy patří mezi steroidní hormony velkého fyziologického významu, které modulují četné procesy, jako je metabolismus, vývoj, reakce na stres, krevní tlak nebo imunomodulace. Předpokládá se, že GR zprostředkovává působení glukokortikoidů prostřednictvím genomických a také negenomických cest (Arredondo-Amador et al., 2021).

GR se účastní regulace exprese cytochromu P450 prostřednictvím alespoň tří mechanismů: přímou vazbou GR na specifické promotorové sekvence nazývané glukokortikoidní responzivní elementy (GREs), nepřímou vazbou GR na specifické promotorové sekvence jako součást multiproteinového komplexu a up- nebo down-regulací dalších transkripčních faktorů, aryluhlovodíkových nebo jaderných receptorů: PXR, CAR a RXR. Konečný účinek glukokortikoidů na transkripci genu CYP je obvykle výsledkem několika mechanismů (Czekaj & Skowronek, 2012).

Regulace exprese P-gp pomocí GR (za použití dexametazonu) byla potvrzena v placentárním trofoblastu (Pavek et al., 2007). Dále studie autorů Narang a spol., 2008 prokázala zvýšení hladin i aktivity P-gp v mozkových mikrocévách potkana při léčbě dexamethasonem (Narang et al., 2008).

3.6 **Antivirotika**

Léčiv, které jsou schopny ve větší, či menší míře indukovat expresi biotransformačních enzymů nebo efluxních transportérů je celá řada. Z klinického pohledu jsou významnější taková léčiva, která jsou podávána dlouhodobě. Jedněmi z takových léčiv jsou i anti-retrovirotika, léčiva užívaná pacienty trpícími infekcí HIV. Odhaduje se, že na celém světě je více než 36 milionů lidí nakažených virem HIV a přibližně 1 milion z nich každoročně umírá (Martinec et al., 2019). Léčba probíhá převážně v kombinaci dvou až tří anti-retrovirotik, kde dochází k významným interakcím. V některých případech to jsou interakce žádané, kdy jedno léčivo slouží jako booster (de Maat et al., 2003).

Anti-retrovirotika se rozdělují do několika skupin, z nichž v některých těchto skupinách lze nalézt zástupce se schopností indukovat biotransformační enzymy a transportéry.

První skupinou jsou nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI). K zástupcům této skupiny patří zidovudin, zalcitabin, lamivudin, a abacavir. Další skupinou jsou nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI). Do této skupiny patří efavirenz, nevirapin a delaviridin. Efavirenz a nevirapin jsou substráty a jsou zároveň schopni indukovat CYP3A4. Třetí skupinou jsou inhibitory proteázy HIV (PI), mezi které patří ritonavir, saquinavir, darunavir, lopinavir, indinavir a atazanavir. Zástupci této skupiny jsou substráty CYP3A4, inhibitory a zároveň mají někteří schopnost CYP3A4 indukovat. Kromě toho jsou substráty a inhibitory P-gp (de Maat et al., 2003). Někteří zástupci jsou i induktory P-gp, jak se popisují v kapitolách níže.

3.6.1 Darunavir

Darunavir (DRV) je antiretrovirotikum s mechanismem účinku založeným na inhibici HIV proteáz. Tato inhibice zabraňuje replikaci HIV vazbou na enzym a zastavuje tím tak dimerizaci a katalytickou aktivitu HIV-1 proteázy. Zejména inhibuje štěpení HIV kódovaných Gag-Pol proteinů v buňkách, které byly infikovány virem, a zastavuje tvorbu zralých virových částic, které šíří infekci. (Davis et al., 2012)

Stejně jako u jiných PI je metabolismus DRV závislý na cytochromu P450 (CYP) 3A4. V klinické praxi se proto darunavir podává perorálně současně s inhibitorem CYP3A4, ritonavirem. Tato kombinace je bezpečná a dobře snášená (Sekar et al., 2008). Z pohledu interakcí bylo zjištěno, že DRV inhibuje P-gp jak na buňkách Caco-2, tak v hPCIS. Proto lze předpokládat, že tento lék má vysoký potenciál způsobit na úrovni střevních P-gp transportérů lékové interakce (Huličiak et al., 2022). DRV má také indukční potenciál. V minulosti byl studován za použití buněčné linie LS180, kde po čtyřtýdenní expozici zvýšil aktivitu P-gp 3,6násobně. Ve stejné studii byl indukční potenciál porovnáván s rifampicinem (RIF), který za stejnou dobu indukoval aktivitu P-gp 4,5násobně. Zajímavostí je, že v krátkodobé tří denní studii indukoval DRV aktivitu P-gp také 3,6násobně, avšak RIF pouze přibližně 1,5násobně. Indukční potenciál DRV byl potvrzen na buněčné linii L180, kdy DRV zvýšil expresi genu pro *CYP3A4* (König et al., 2010).

3.6.2 Ritonavir

Ritonavir (RTV) je inhibitor HIV proteáz (Hull & Montaner, 2011). Jeho uvedení na trh v 90. letech minulého století umožnilo vznik první vysoce účinné kombinace anti-retrovirotik. Stejně jako ostatní zástupci této skupiny, patří i RTV mezi léčiva s

potenciálem k DDI. Je prokázaným substrátem/kompetitivním inhibitorem P-gp a enzymu CYP3A4 a zároveň induktor P-gp (Kis et al., 2010).

Ačkoli byl původně vyvinut jako nezávislé anti-retrovirotikum, ukázalo se, že má výhodné vlastnosti v kombinovaných režimech s nízkými dávkami RTV a jinými PI. Nyní se častěji používá v nižších než terapeutických dávkách (100–400 mg denně) jako tzv. booster jiných PI (Hull & Montaner, 2011). Princip boostování je založený na inhibici CYP3A4 přítomného jak ve střevním traktu, tak v játrech, díky čemuž dojde ke zvýšení biologické dostupnosti (zvýšení C_{min} , AUC, $t_{1/2}$) současně podávaného PI. Zároveň je RTV inhibitorem i P-gp, což dále zlepšuje absorpci společně podávaných PI. Na základě zvýšené expozice léku a prokázané účinnosti by měly být režimy s boostovaným RTV mezi prvními zvažovanými možnostmi použití v klinické praxi (Hull & Montaner, 2011).

RTV posílené PI jsou nyní jedním z režimů první linie doporučených pro dosud neléčené pacienty a hrají primární roli v režimech druhé linie a terapii u již dříve léčených pacientů (Hull & Montaner, 2011).

3.6.3 Saquinavir

Saquinavir (SQV) je peptidový derivát, který inhibuje enzym HIV proteázu a zabraňuje tak posttranslačnímu zpracování virových polyproteinů. Je prvním agents své třídy, který byl dostupný pro léčbu infekce HIV (Noble et al., 1996).

SQV je obecně dobře snášen, buď v monoterapii, nebo v kombinaci s nukleosidovými inhibitory reverzní transkriptázy například zidovudinem nebo zalcitabinem.

Z pohledu lékových interakcí působí SQV jako induktor jak CYP3A4, tak P-gp a je také substrátem P-gp. Co se týče významnosti, indukce CYP3A4 byla nižší než u rifampicinu, naproti tomu SQV indukoval v porovnání s rifampicinem i některé další transportéry například SLCO transportéry (König et al., 2010).

3.6.4 Atazanavir

Atazanavir (ATV) je inhibitor proteázy viru lidské imunodeficiency (HIV-1), který je v současné době doporučován v režimech první volby pro pacienty infikované virem HIV nebo v režimech pro pacienty s nesnášenlivostí jiných anti-retrovirotik. V režimech první linie se ATV podává v kombinaci se dvěma nukleosidovými/nukleotidovými inhibitory reverzní transkriptázy, tenofovir disoproxil

fumarátem a emtricitabinem. Kromě toho se s režimy obsahujícími ATV doporučuje další PI, například ritonavir, který zlepšuje jeho špatnou biologickou dostupnost tím, že inhibuje metabolickou clearance ATV enzymy cytochromu P450 (Kis et al., 2013).

ATV je substrátem P-gp a CYP3A4 (Kis et al., 2013). Sám může působit také jako inhibitor P-gp. Jeho inhibice je významná a má tak vysoký potenciál vyvolat DDIs (Martinec et al., 2019). V *in vitro* provedených studiích na buněčné linii LS180V bylo dokázáno, že může působit i jako induktor P-gp (Perloff et al., 2005). Nejsou známy údaje o jeho vlivu na indukci CYP3A4.

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium vlivu léčiv Darunaviru a Atazanaviru na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevních řezech připravených z lidského jejunu.

Dílčí cíle:

- Studium vlivu Darunaviru a Atazanaviru na životnost střevních řezů
- Zjištění vlivu těchto léčiv na expresi *ABCB1*, *CYP3A4*, a vybraných intracelulárních receptorů za použití metody q-PCR
- Ověření funkce *ABCB1* v neovlivněných a ovlivněných střevních řezech

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie:

ACN	(VWR chemicals)
Agaróza low gelling typ VII-A	(Sigma-Aldrich)
Amfotericin B	(Sigma-Aldrich)
Assay PCR Taq man	(Thermo Fisher Scientific)

Tabulka 1.: Assaye PCR Taq man použité v této práci

Název genu	Číslo assaye	Fluorescenční barvivo
<i>CYP3A4</i>	Hs00604506_m1	FAM
<i>ABCB1</i>	Hs00184500_m1	FAM
<i>PXR</i>	Hs01114267_m1	FAM
<i>VDR</i>	Hs01045843_m1	FAM
<i>DXR</i>	Hs00353740_m1	FAM
<i>B2M</i>	Hs00984230_m1	FAM

Atazanavir	(Sigma-Aldrich)
ATP-standard	(Sigma-Aldrich)
Pierce TM BCA Protein Assay	(Thermo Fisher Scientific)
CaCl ₂ *2 H ₂ O	(Penta chemicals)
CP-100356 monohydrochlorid (CP)	(Sigma-Aldrich)
Darunavir	(Sigma-Aldrich)
Diethyl pyrokarbonát (DEPC)	(PanReac Applichem)
D-glukóza	(Penta chemicals)
EDTA	(Sigma-Aldrich)
Ethanol 96%	(VWR chemicals)
Gb Basic Reverse Transcription Kit	(Generi Biotech)

Gentamycin	(Thermo Fisher Scientific)
Glycogen	(Sigma-Aldrich)
HEPES	(Carl Roth)
Chloroform	(Thermo Fisher Scientific)
KCl	(Pentachemicals)
KH ₂ PO ₄	(Pentachemicals)
Luciferasa	(Thermo Fisher Scientific)
MilliQ voda	(Millipore)
NaCl	(Penta chemicals)
NaHCO ₃	(Penta chemicals)
NaOH	(Lachner)
2-propranolol	(Sigma-Aldrich)
Rhodamin123 (RHD123)	(Sigma-Aldrich)
Rifampicin	(Sigma-Aldrich)
TaqMan Universal Master Mix II, no ung	(Thermo Fisher Scientific)
Trizol	(Bio-rad)
Tris-HCl	(Sigma-Aldrich)
Williams E medium - GlutaMax™	(Thermo Fisher Scientific)

5.2 Příprava roztoků:

5.2.1 Zásobní roztok Krebs-Henseleitova pufru

Po rozpuštění všech sloučenin dle rozpisu v tabulce č.1 je roztok přefiltrován přes sterilní filtr (0,22 μm) a po 100 ml rozplněn do jednorázových sterilních kelímků. Do doby spotřeby je uchováván v lednici.

Tabulka 1.: Příprava zásobního roztoku Krebs-Henseleitova pufru (KHB) - 10x koncentrovaný – rozpis na přípravu 1 litru.

Sloučenina	Navážka / Množství
NaCl	69,0 g
KCl	3,73 g
KH ₂ PO ₄	1,63 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	2,71 g
CaCl ₂ *2 H ₂ O	3,67 g
Doplnit vodou do objemu	1000 ml

5.2.2 Pracovní roztok Krebs-Henseleitova pufru

Po rozpuštění všech sloučenin dle tabulky č. 2 je roztok 30 minut oksyločen pomocí pneumoxidu (95 % O₂, 5 % CO₂). Následně je upraveno pH roztoku na 7,42 pomocí 5 M NaOH.

Tabulka 2.: Příprava pracovního roztoku Krebs-Henseleitova pufru – 1x koncentrovaný. Rozpis na přípravu 1 litru.

Sloučenina	Navážka / Množství
NaHCO ₃	2,10 g
D-glukóza	4,95 g
HEPES	2,38 g
Zásobní roztok KHB	100 ml
Doplnit vodou do objemu	1000 ml

5.2.3 Příprava pracovního roztoku inkubačního média Williams medium E (WME)

Pro přípravu pracovního roztoku inkubačního média je třeba do komerčně zakoupeného WME média doplnit antibiotika, antimykotika a D-glukózu. Gentamycin a Amfotericin B jsou ve formě sterilních roztoků pipetovány do média přímo dle tabulky č. 3. D-glukóza je nejprve odvážena nesterilně a v laminárním boxu rozpuštěna v malém množství WME. Následně je takto vzniklý roztok v laminárním boxu přefiltrován přes sterilní filtr (0,22 µm) a vrácen zpět do zásobní lahve WME. Takto připravené médium je v den experimentu ohřáto na 37 °C na vodní lázni a pipetováno do destiček, případně v mezikroku je do média přidána studovaná látka.

Tabulka 3.: Příprava inkubačního média pro inkubace střevních řezů – rozpis na přípravu 500 ml média

Sloučenina	Navážka / Množství
WME + L-glutamin	500 ml
Gentamycin (50 mg ml ⁻¹)	500 µl
Amfotericin B (250 µg ml ⁻¹)	5 ml
D-glukóza	1,375 g

5.2.4 Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení ATP

Nejprve je rozpuštěna navážka EDTA v přibližně 100 ml vody a pH pomocí 5 M roztoku NaOH upraveno na 10,9. Následně je přidán ethanol (96 %) a objem doplněn v odměrné baňce vodou do 500 ml.

Tabulka 4.: Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení hladiny ATP (SONOP) – rozpis na přípravu 500 ml roztoku - (70 % (vol/vol) ethanol, 2 mM EDTA, pH 10.9)

Sloučenina	Navážka / Množství
EDTA	0,372 g
Ethanol 96 %	370 ml
NaOH pro úpravu pH na 10,9	dle potřeby
milliQ-voda	k doplnění do 500 ml

5.2.5 Příprava Tris/EDTA pufru pro stanovení hladiny ATP

Nejprve jsou rozpuštěny EDTA a Tris HCl v objemu cca 300 ml milliQ vody. Následně je upraveno pH pomocí HCl na 7,6 a voda doplněna do objemu 500 ml v odměrné baňce.

Tabulka 5.: Příprava Tris pufru pro stanovení hladiny ATP – rozpis na přípravu 500 ml roztoku (100 mM TrisHCl, 2 mM EDTA, pH 7.6)

Sloučenina	Navážka / Množství
Tris HCl	6 g
EDTA	0,37 g
milliQ-voda	Doplnit do 500 ml

5.2.6 Příprava 3 % roztoku agarózy

Nejprve jsou naváženy jednotlivé sloučeniny dle tabulky č. 6. Následně je přidána voda a teflonové míchadlo. Směs je zahřata na teplotu cca 80 °C (musí být vyšší než 60 °C) a následně dojde k rozpuštění agarózy. Takto připravená agaróza je následně buď zchlazena na 37 °C (zůstává stále tekutá) a využita v experimentu, nebo je uložena do lednice pro pozdější použití (nutné opět zahřát na teplotu vyšší než 60 °C).

Tabulka 6.: Příprava 3 % agarózy pro fixaci vzorků před krájením

Sloučenina	Navážka / Množství
NaCl	0,9 g
Agaróza low gelling typ VII-A	3 g
milliQ-voda	doplnit do 100 ml

5.3 Experimentální metody:

5.3.1 hPCIS (Human Precision-Cut Intestinal Slices)

Pro přípravu řezů byla s mírnými modifikacemi použita metoda publikovaná de Graaf a kolektivem z roku 2010 (De Graaf et al., 2010). Tkáň pro přípravu řezů byla získána ve spolupráci s Chirurgickou klinikou fakultní nemocnice v Hradci Králové od dobrovolných dárců, kteří podepsali informovaný souhlas. Experimenty byly povoleny etickou komisí pod číslem 202103 I67P.

Pracovní postup:

Před obdržení vzorku lidské tkáně z operačního sálu je nutné nastavit inkubátor, aby inkubace probíhala za předepsaných podmínek: teplota 37 °C, 80 % O₂ a 5 % CO₂. Dále je nutné připravit média: KHB a WME (viz kapitola Příprava roztoků). Inkubační médium rozpipetujeme do inkubačních 24jamkových destiček (Sarstedt), kde v každé destičce bude 1,3 ml WME. Destičky prozatím uklidíme do inkubátoru, aby došlo k nasycení média kyslíkem a oxidem uhličitým. Dalším krokem je rozehrátí 3 % agarózy ve vodní lázni 60 °C, aby došlo k převedení gelové formy na kapalinu. Následně agarózu zchladíme ve vodní lázni na 37 °C. Za této teploty agaróza zůstává stále tekutá po neomezeně dlouhou dobu.

Nyní můžeme sestavit kráječ Krumdieck typ MD 4000 (Alabama R&D, Munford, AL, USA) (viz Obrázek 9) a předchladit za pomoci recirkulačního chlazeného čerpadla na 4 °C.



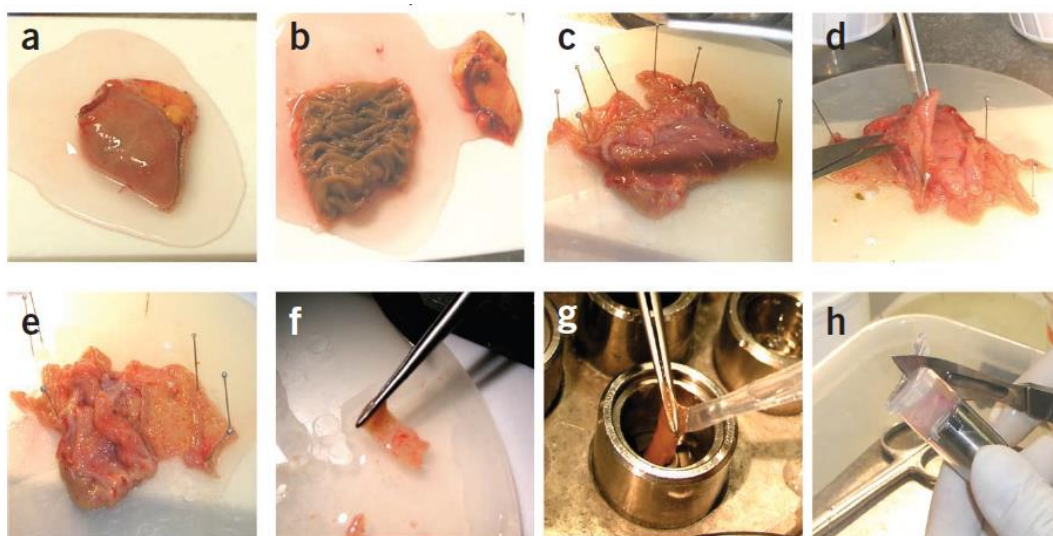
Obrázek 9: Kráječ Krumdieck typ MD 4000 (Alabama R&D, Munford, Al, USA). Zdroj vlastní.

Vzorek lidské tkáně je odebrán v průběhu operace typu pankreatoduodenektomie zachovávající pylorus. Odebraná lidská tkáň je z operačního sálu přenesena v ledovém (4 °C) a okysličeném KHB do laboratoře, kde je ihned zpracována. Všechny další kroky, je nutné provádět na ledu (4 °C), aby se zamezilo degradaci tkáně.

Před samotnou přípravou řezů je nutné z odebraného vzorku lidského střeva odstranit svorky a přiléhající tukovou tkáň (Obrázek 10, b). Po odstranění svorek a přebytečné tkáně je vzorek podélně rozstřížen, otevřen a odhalena luminální část. Odstraníme zbytky tráveniny propláchnutím luminálního povrchu okysličeným KHB. Tkáň následně připevníme slizniční stranou směrem dolů pomocí špendlíků k silikonové podložce v Petriho misce (Obrázek 10, c). Tkáň průběžně oplachujeme okysličeným KHB. Postupně opatrně nařízneme muskulární vrstvu a oddělíme od střevní sliznice pomocí chirurgických nůžek (Obrázek 10, d). Odstranění muskulární vrstvy zjednodušuje přípravu řezů a zkracuje difuzní vzdálenost pro živiny a kyslík v řezech. Po odstranění muskulární vrstvy zůstane na silikonové podložce mukózní vrstva (Obrázek 10, e), kterou dále nařezeme za pomoci skalpelu na proužky o rozměrech přibližně 10 × 20 mm (Obrázek 10, f). Jednotlivé proužky přeneseme do předem na ledu vychlazené válcové formy s pístem umístěným na spodu (Obrázek 10, g). Formu postupně naplníme tekutou agarózou (37 °C) za pomoci Pasteurovy pipety, přičemž se snažíme za pomoci pinzety

nebo špendlíku držet proužek tkáně svisle, dokud agaróza neztuhne. Celý výše uvedený postup je detailně zobrazen na obrázku 10.

Kráječ naplníme vychlazeným okysličeným KHB. Z válcové formy nyní vyjmeme píst s tkání zalitou v nyní již ztuhlé agaróze. Takto vzniklý váleček s tkání vložíme přímo do kráječe. Řezy následně nakrájíme pomocí Krumdieckova tkáňového kráječe při následujícím nastavení: tloušťka řezu: 300 μm , rychlost krájení 5-10. Řezy se zachytávají do skleněného nástavce, odkud jsou následně vypouštěny do připravené kádinky.



Obrázek 10: Příprava lidských řezů (jejunum). Převzato a upraveno z de Graaf, 2010.

Po nakrájení agarózového válečku vypustíme řezy ze skleněného nástavce společně s KHB do kádinky a ihned uložíme na led. Řezy pro experiment vybíráme na základě vizuálního stavu. Pro experiment vhodné řezy mají jednotnou tloušťku, stejnoměrnou barvu a hladké okraje. Vybrané řezy jsou přeneseny do okysličeného KHB a uloženy na led. Na začátku experimentu jsou řezy přenášeny za pomoci malé lžičky nebo entomologické pinzety do předem připravených destiček s médiem a testovanými látkami. Pro jednotlivé experimenty se množství řezů v jamkách liší (PCR 3 řezy, ATP 1 řez, RHD123 2 řezy).

Řezy v destičkách jsou při inkubaci umístěny v inkubátoru na orbitální třepačce (90 cyklů za minutu) a inkubovány dle typu experimentu 2, 12, 24 a 48 hodin. V případě, že experiment probíhá po dobu delší jak 24 hodin, je médium po této době měněno.

Po ukončení experimentu jsou vzorky řezů odebrány do 2 ml zkumavky (Sarstedt, šroubovací víčko). V případě odběru řezů pro stanovení ATP jsou zkumavky předem naplněny roztokem SONOP (200 μ l), pro izolaci RNA jsou zkumavky předem naplněny roztokem TriReagent[®] a zirkonovými kuličkami (přibližný objem kuliček 200 μ l). Po odběru jsou vzorky ihned zamrazeny v kapalném dusíku nebo suchém ledu. Vzorky jsou do následné analýzy skladovány při teplotě -80 °C. V případě odběru vzorků pro funkční studii za použití RHD123 jsou řezy odebrány do zkumavek předplněných pouze zirkonovými kuličkami a zamrazeny při teplotě -20 °C.

5.3.2 Analýza ATP

Stanovení hladiny ATP je nutné pro potvrzení kvality vzorků. Hladina ATP u řezů, které jsou považovány za viabilní, by měla být 2 nmol. mg⁻¹ proteinu (De Graaf et al., 2010). K měření hladiny ATP je využit ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (výrobce: Roche Diagnostics GmbH) standardně skladovaný při teplotě -20 °C. Tento kit obsahuje Luciferázu a lyofilizované standardy ATP.

Postup měření hladin ATP:

Vychladíme si centrifugu (Hettich zentrifugen, rotor 1195-A radius 87 mm) na 4 °C. Dále připravíme vzorky (umístěny v -80 °C) a umístíme na led (4 °C) a luciferasu (lyofilizát), kterou necháme při pokojové teplotě. Rozmrzlé vzorky homogenizujeme na homogenizátoru FastPrep-24 5G za daných podmínek (6,5 m/s, 2x 40 sekund homogenizace, 20 sekund pauza mezi homogenizacemi). Po homogenizaci přemístíme vzorky do vychlazené centrifugy na 5 minut při 13 200 g. Na 96 jamkovou destičku s plochým dnem (Sarstedt) přeneseme 5 μ l supernatantu a poté 45 μ l TRIS/EDTA pufru, který byl připraven podle tabulky č. 5 výše. Dále rozpustíme v milliQ vodě v kitu přiložený ATP-standard. Výchozí koncentrace standardu po naředění je 10 mg/ml ($1,65 \times 10^{-2}$ M). Tento standard je dále ředěn dle tabulky č. 7. 50 μ l takto připraveného kalibračního roztoku se napipetuje do destičky a je vytvořena kalibrační křivka. V dalším kroku jsme rozpustili luciferasu v 10 ml milliQ vody a za mírného kroužení nechali inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. 50 μ l takto připravené luciferázy jsme za použití multikanálové pipety přidali do jednotlivých jamek. Následně jsme změřili luminiscenci v destičce na luminometru HIDEX. Výsledné hodnoty pro jednotlivé vzorky byly vypočítány za pomoci kalibrační křivky a normalizovány na množství proteinu (viz stanovení bílkoviny BCA metodou).

Tabulka 7.: Příprava kalibračních roztoků pro měření hladin ATP

Ředění	množství (μl)	TRIS/EDTA (μl)	Koncentrace (M)
A	10 μl ATP standardu	990	$1,65 \times 10^{-4}$
1	10 μl (A)	990	$1,65 \times 10^{-6}$
2	100 μl (1)	400	$3,30 \times 10^{-7}$
3	50 μl (1)	450	$1,65 \times 10^{-7}$
4	100 μl (3)	400	$3,30 \times 10^{-8}$
5	50 μl (3)	450	$1,65 \times 10^{-8}$

5.3.3 Stanovení Rhodaminu123 – studium funkce

Principem tohoto stanovení je zjištění funkce P-gp. RHD123 zde funguje jako modelový substrát, který je prostřednictvím P-gp transportován. Pro experiment byla použita koncentrace 10 μM.

Postup stanovení RHD123 ve vzorcích:

Vzorky z experimentu jsou připraveny ve zkumavkách (Sarstedt) o objemu 2 ml se zirkonovými kuličkami (přibližný objem 200 μl, velikost kuliček 1,4 – 1,6 mm). Ke každému vzorku přidáme 600 μl roztoku ACN (ACN ve vodě 2:1), který je potřeba připravit si předem v objemu odpovídajícím počtu vzorků. Vzorky následně zhomogenizujeme v homogenizátoru FastPrep-24 5G za daných podmínek (6,5 m/s, 2x 40 sekund homogenizace, 20 sekund pauza mezi homogenizacemi) a zkontrolujeme, případně homogenizaci opakujeme. Po homogenizaci vzorky stočíme na 10000 g po dobu 10 minut v centrifuze (Hettich zentrifugen, rotor 1195-A radius 87 mm). To vede ke zformování pelety sraženého proteinu. Z každého vzorku odebereme pipetou 150 μl supernatantu a nanese na 96 jamkovou destičku (Sarstedt). Každý vzorek je měřen v duplikátu. Při odběru supernatantu je potřeba postupovat opatrně a nenasát peletu. Dále připravíme kalibrační roztoky v koncentracích: 0 μM, 0,125 μM, 0,250 μM, 0,5 μM a 1 μM. Roztoky jsou také připraveny v ACN (ACN ve vodě 2:1) a napipetují se na destičku v duplikátech. Zkumavky s peletou necháme odpařit do sucha v termostatu TCH-100 (37 °C). Takto připravenou destičku měříme v přístroji TECAN infinite M200 při nastavené excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 530 nm. Hodnoty v jednotlivých jamkách vypočteme dle zhotovené kalibrační křivky. Výsledné naměřené hodnoty jsou dále normalizovány na množství proteinu (viz stanovení bílkoviny BCA metodou).

5.3.4 BCA stanovení bílkovin

Principem tohoto je stanovení množství proteinu, na jehož hodnotu ve vzorků jsou následně normalizovány naměřené hodnoty ATP a RHD123. Pro stanovení množství proteinu byl použit kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (výrobce Thermo Scientific). V přítomnosti proteinů dochází v alkalickém prostředí k redukci Cu^{2+} na Cu^{1+} (biuretová reakce), které následně zbarví v přítomnosti bicinchoninové kyseliny roztok do fialova.

Postup stanovení množství proteinu ve vzorcích:

Vzorky musí být před začátkem odpařeny do sucha (odpaření při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v suchém termostatu TCH-100). Ke všem vzorkům přidáme $200\ \mu\text{l}$ 5M NaOH, zkumavky zašroubujeme a inkubujeme 30 minut na orbitální třepačce (Scientific Industries) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (300 rpm). Po uplynutí inkubační doby ke každému vzorku přidáme $800\ \mu\text{l}$ MilliQ vody, a vzorky se tak zředí na finální koncentraci (NaOH 1M). Vzorky zhomogenizujeme na homogenizátoru FastPrep-24 5G dle doporučených podmínek (6,5 m/s, 2x 40 sekund homogenizace, 20 sekund pauza mezi homogenizacemi). Po homogenizaci se z každého vzorku nanáší na 96 jamkovou destičku (Sarstedt) $10\ \mu\text{l}$. Zhotovíme kalibrační roztoky (viz tabulka č. 8) a napipetujeme na destičku v objemu $10\ \mu\text{l}$. Každý vzorek i kalibrační křivku pipetujeme na destičku v duplikátu.

Dále si připravíme roztok C a do každé jamky napipetujeme multikanálovou pipetou $200\ \mu\text{l}$. Pro přípravu roztoku C vezmeme 50 dílů roztoku A (bicinchoninová kyselina) a 1 díl roztoku B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (dle návodu výrobce, poměr 50 (A) : 1 (B)). Roztok C připravujeme těsně před použitím. Inkubujeme 30 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v suchém inkubátoru na třepačce (Scientific Industries) (100 rpm). Následně změříme na absorbanci při vlnové délce 562 nm na přístroji TECAN infinite M 200.

Tabulka 8.: Příprava kalibračních roztoků pro měření koncentrace bílkoviny

Bod kalibrace	Finální koncentrace	0,1% roztok BSA v 1M NaOH	Čisté 1 M NaOH
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	100 µg/ml	10 µl	90 µl
3	200 µg/ml	20 µl	80 µl
4	300 µg/ml	30 µl	70 µl
5	400 µg/ml	40 µl	60 µl
6	500 µg/ml	50 µl	50 µl

Pozn.: jelikož koncentrace NaOH ovlivňuje rychlost reakce

5.3.5 Izolace RNA

Principem tohoto postupu je izolace celkové RNA ze vzorků střeva lidské tkáně, která bude následně použita pro transkripci.

Postup:

Tkáňové řezy byly po experimentu dány do 1 ml roztoku TriReagent[®] s přibližně 200 µl zirkonových kuliček a ihned zamrazeny. Vzorky vyndáme z mrazícího boxu (-80 °C) a necháme na ledu rozmrazit. Po rozmrznutí vzorky zhomogenizujeme za předepsaných podmínek (6,5 m/s, 2x 40 sekund homogenizace a 20 sekund pauza mezi homogenizací). Ke zhomogenizovaným vzorkům přidáme 200 µl chloroformu a důkladně protřepeme v ruce po dobu 15 sekund. Vzorky stočíme na vychlazené (4 °C) centrifuze (Hettich zentrifugen, rotor 1195-A radius 87 mm) na 12 000 g po dobu 15 minut. Obsah zkumavky se nám rozdělí na 3 fáze: fázi obsahující RNA (vodní fázi), mezifázi (fáze s DNA) a organickou fázi obsahující lipidy a proteiny.

V mezičase si připravíme 1,5 ml PCR clear zkumavky (Eppendorf), do kterých napipetujeme 2 µl glykogenu. Nyní do připravených zkumavek s glykogenem sbíráme pipetou tolik vodní fáze, kolik můžeme. Nesmíme však nabrat mezifázi nebo fázi organickou. Dále přidáme 500 µl 2-propranololu a párkrát zkumavku převrátíme. Zkumavky necháme stát 10 minut při pokojové teplotě. Poté je umístíme do centrifugy tak, aby panty víček zkumavek směřovaly stejným směrem ven, a stočíme na 12 000 g po

dobu 10 minut. Po tomto kroku se zprecipitovaná RNA objeví na stěně zkumavky ve formě bílé pelety.

Nyní odstraníme supernatant pomocí odsávačky nebo pipety a opatrně opláchneme peletu 1 ml 75 % ethanolu. Vzorky stočíme na centrifuze, kam je ukládáme opět stejným směrem, na 12 000 g po dobu 5 minut. Krok oplachu opakujeme. To znamená, že odebereme supernatant, opláchneme 1 ml 75 % ethanolu a stočíme na 5 minut v centrifuze.

Posledním krokem je odstranění veškerého ethanolu pipetou nebo pomocí odsávačky. K peletě přidáme 20 μ l milliQ vody ošetřené a pomocí promíchávání ve špičce dojde k rozpuštění pelety. Poté odebereme 2 μ l do předem připravených 200 μ l PCR clear zkumavek (Sarstedt) a změříme koncentraci a čistotu RNA na NanoDropu (Thermo Fisher Scientific). Finálně naředíme na koncentraci 500 ng/ μ l vhodnou pro reverzní transkripci.

5.3.6 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce (RT) je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly mRNA do DNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou. Reverzní transkripcí získáme molekulu, která je označována jako cDNA (complementary DNA). Pro reverzní transkripci byl použit kit gb Basic Reverse Transcription Kit (Generi Biotech).

Postup:

Připravíme si RT kit (200 μ l části A napipetujeme do části B) a smícháme. Opatrně promícháme špičkou. Do 200 μ l PCR clear zkumavky napipetujeme 2 μ l RNA o koncentraci 500 ng/ μ l (celkem 1000 ng v reakci), 10 μ l připraveného RT kitu a 8 μ l milliQ vody ošetřené DEPC a promícháme špičkou.

RT se provádí Thermal cycleru (Bio-rad). Proces probíhá při 42 °C 60 minut. Získaná cDNA je poté naředěna milliQ vodou ošetřenou DEPC na koncentraci 25 ng/ μ l a uložena v -20 °C.

5.3.7 qPCR

Principem tohoto stanovení je kvantifikace sledovaného úseku DNA v reálném čase. Detekce množství DNA je umožněna přítomností fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA. Fluorescence je vyzařovaná substrátem až po jeho navázání na DNA. Hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA je detekovaná detektorem a odráží množství přítomné DNA, tj. i množství výchozího templátu.

Postup:

Do PCR reakce jsme pipetovali cDNA v koncentraci 25 ng/μl. Do jedné jamky na destičce (384 jamkové) přijde: 2,5 μl master mixu (TaqMan Universal Mater Mix II, no UNG), 0,25 μl gene assay, 1 μl cDNA (c=25 ng/ μl) a 1,25 μl milliQ vody (ošetřená DEPC). Podle počtu vzorků si vypočítáme objemy jednotlivých složek s 10 % rezervou. Do předem připravených a nadepsaných 1,5 ml PCR clear zkumavek pipetujeme nejdřív požadované množství vody, master mixu a gene assay. Směs důkladně špičkou promícháme.

Do 384 jamkové destičky (Applied Biosystem) pipetujeme 1 μl cDNA do každé jamky. Poté napipetujeme vyhotovenou směs master mixu, milliQ vody a gene assay. V jamkách by neměly být žádné vzduchové bublinky. Pokud je vše správně, destička se uzavře fólií, promíchá na míchačce (Vortex, BioSan) a stočí se na centrifuze (PCR Plate Centrifuge II, VWR) při 550 g po dobu 20 sekund. Měření probíhalo na v přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied biosystem). PCR měření probíhá ve 40 cyklech. Nejprve je nastaven 10minutový interval a teplota 95°C. V tomto kroku dochází k aktivaci polymerázy obsažené v mastermixu. Následně pokračuje již 40 cyklů kdy v každém cyklu je vzorek zahřát na 95 °C (15 s) a následně ochlazen na 60 °C (60 s). Schématické znázornění nastavení přístroje je na obrázku 11. Výsledky jsou vyhodnoceny metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Jako referenční gen pro naše měření byl zvolen B2M (beta-2-microglobulin, Hs00984230_m1, FAM), který byl použit i ve studii Martince a kol (2021).



Obrázek 11: Nastavení přístroje QuantStudioTM 6 Flex Real-Time PCR System pro kvantitativní PCR. Zdroj vlastní.

5.3.8 Statistická analýza

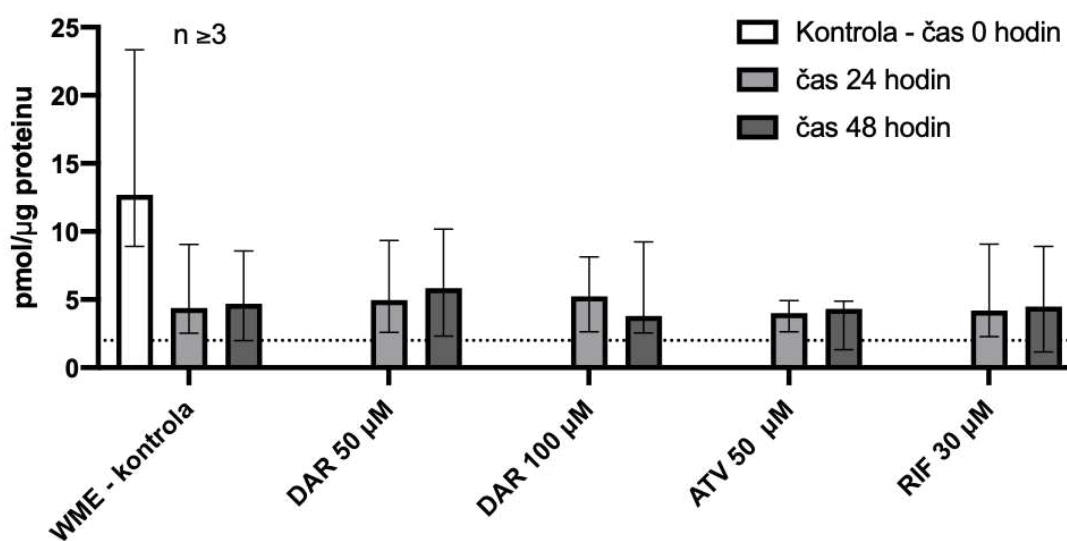
Výsledky vlivu studovaných látek na expresi vybraných genů a transport RHD123 byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Data v grafech jsou vyjádřena jako medián \pm rozsah (variační rozpětí). Vliv studovaných látek na hladiny ATP byl hodnocen metodou two-way ANOVA s následným Bonferroniho multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena následovně: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6 VÝSLEDKY

6.1 Vliv antivirotik na životnost střevních řezů

Prvním krokem v naší studii bylo ověřit, zda námi studované látky nemají vliv na životnost vlastních řezů (viz Obrázek 12). Provedli jsme tedy stanovení hladiny ATP (viz kapitola 5.3.2), které nám vyjadřuje, zda si řezy inkubované po dobu 24 a 48 hodin zachovaly svoji životnost a neztratily funkci. Dle publikace De Graaf et al 2010 je řez považován za životaschopný, pokud se hladina ATP pohybuje okolo 2 pmol/μg proteinu (De Graaf et al., 2010). Jako kontrola byly odebrány také řezy v čase 0 hodin, tedy ihned po nakrájení řezů. Tato kontrola sloužila zejména k ověření vlastního stavu tkáně a obvykle byla vyšší v porovnání s následnými odběry v časech 24 a 48 hodin. Testovali jsme koncentrace DAR 50 a 100 μM, ATV 50 μM a RIF 30 μM. Tyto koncentrace byly použity i v dalších experimentech.

Vliv studovaných látek na životnost střevních řezů - koncentrace ATP



Obrázek 12: Grafické znázornění vlivu antivirotik na životnost střevních řezů. Počet experimentů je roven nebo více než 3. Koncentrace ATP byla měřena v jednotkách pmol/μg proteinu, přičemž limitní koncentrací (dle de Graaf, 2010) je 2 pmol/μg proteinu. Odběr vzorků byl pro analýzu ATP proveden v čase 0 dále po 24 a 48 hodinách. Z grafu je patrné, že si všechny vzorky zachovaly svou životnost a hladina ATP byla nad limitem. Data v grafu jsou vyjádřena jako medián ± rozsah (variační rozpětí).

6.2 Vliv antivirotik na expresi genů

Dále jsme zjišťovali, zda mají testované látky vliv na expresi genů *CYP3A4*, *ABCB1*, *PXR*, *GR*, *VDR* (Obrázky 13-25). Řezy lidského jejunu byly inkubovány po dobu 48 hodin v roztocích jednotlivých látek. Odběry byly prováděny po 12, 24 a 48 hodinách. Ze získaných vzorků jsme izolovali RNA, která byla následně použita pro reverzní transkripci. Při reverzní transkripci došlo k přepisu mRNA do komplementární cDNA. Tato cDNA byla následně použita v metodě qPCR viz kapitola 5.3.7. Výsledkem je amplifikace výsledného genu a porovnání CT hodnot mezi indukovaným a kontrolním vzorkem po korekci na referenční gen. Ovlivněné vzorky byly porovnávány vždy vůči kontrole v daném čase.

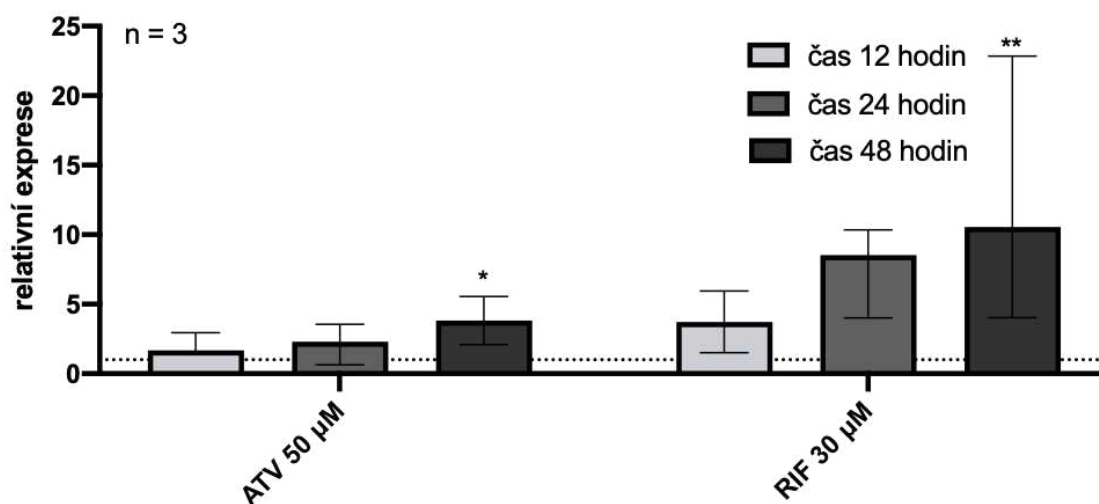
Jako pozitivní kontrola byl ve všech našich experimentech použit rifampicin (RIF, 30 μ M), který byl použit v předchozí studii využívající střevní tkáňové řezy (Martinec et al., 2021).

Signifikantní zvýšení bylo pozorováno u ATV jak pro *CYP3A4* (Obrázek 13) po 48hodinové, tak pro *ABCB1* (Obrázek 14). U DRV bylo signifikantní zvýšení patrné pro *CYP3A4* (Obrázek 19) po 24 hodinách a pro *ABCB1* (Obrázek 20) také po 24 hodinách. Nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi použitými koncentracemi DAR. U RIF bylo signifikantní zvýšení pro *CYP3A4* po 24 a 48 hodinách (Obrázek 13, 19). Dále měl signifikantní vliv na expresi *ABCB1* po 24 a 48 hodinách (Obrázek 20).

6.2.1 Vliv atazanaviru na genovou expresi *CYP3A4*, *ABCB1*, *PXR*, *GR* a *VDR*

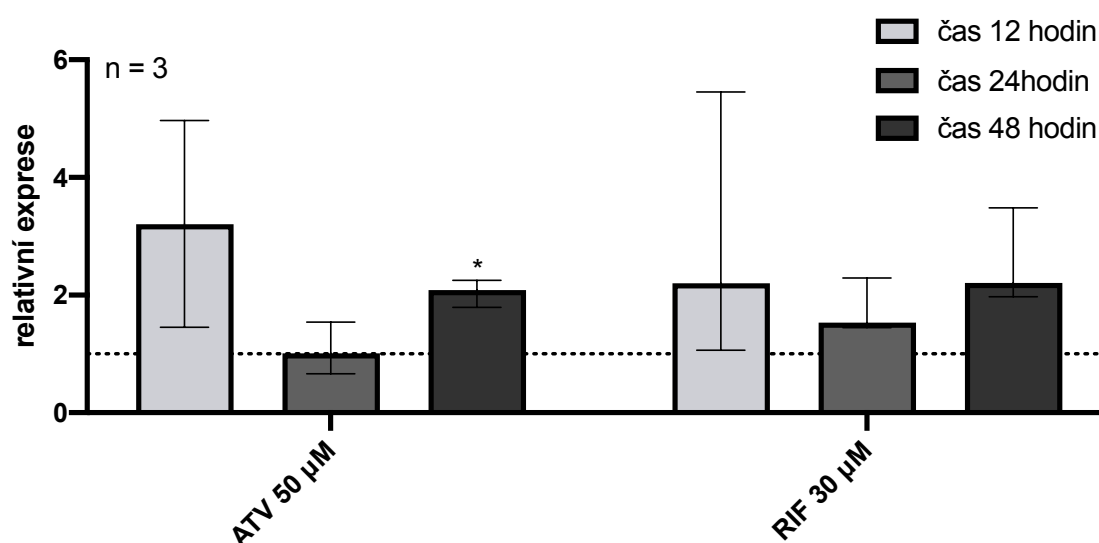
ATV byl použit v koncentraci 50 μ M a RIF v koncentraci 30 μ M. Koncentrace 50 μ M u ATV je dána limitem rozpustnosti. Koncentrace RIF vychází z předchozí studie (Martinec et al., 2021).

Vliv atazanaviru (50 μ M) na expresi *CYP3A4*



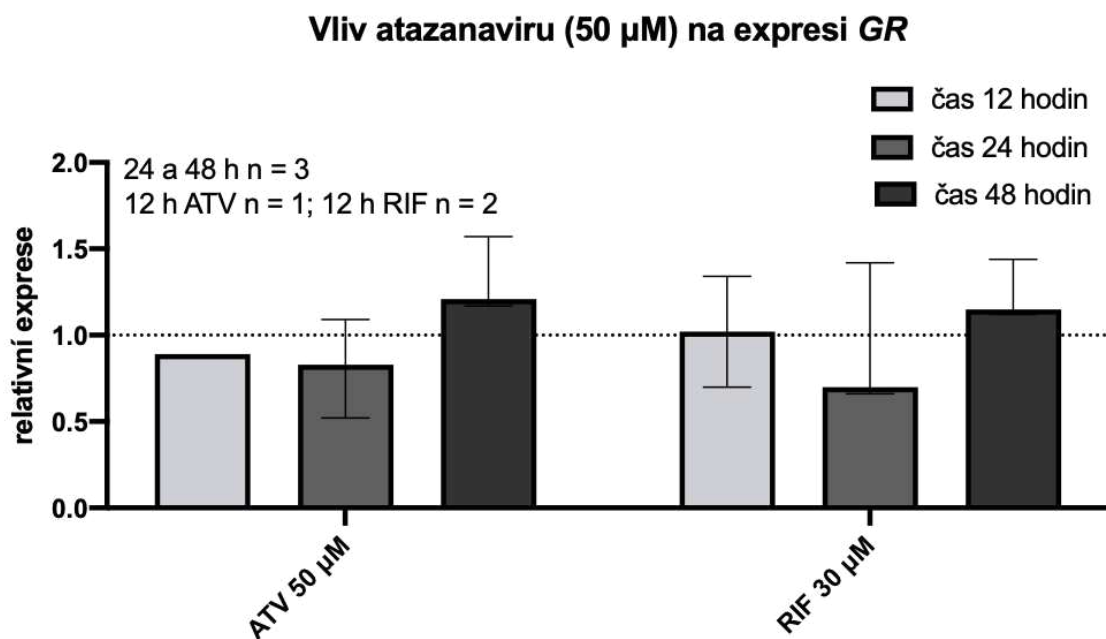
Obrázek 13: Grafické zobrazení vlivu ATV (50 μ M) na expresi genu *CYP3A4*. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. ATV zvýšil oproti kontrole expresi signifikantně po 48 hodinách (3,8násobně, medián), RIF zvýšil signifikantně expresi toho genu také po 48 hodinách (10,55násobně, medián). S rostoucím časem byl pozorován trend postupného zvyšování exprese. Výsledky jsou zpracované ze tří měření a byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv atazanaviru (50 μ M) na expresi *ABCB1*



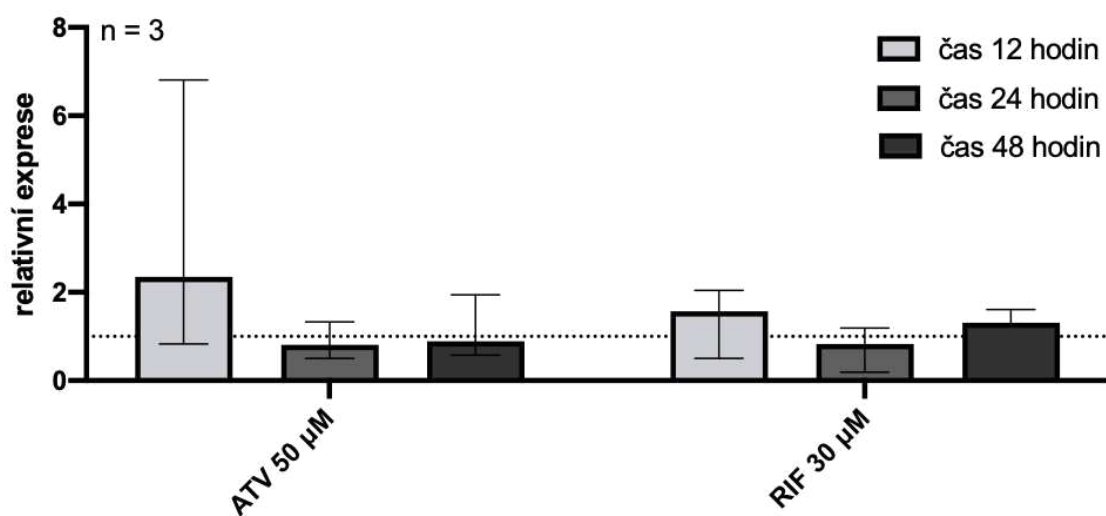
Obrázek 14: Grafické zobrazení vlivu ATV (50 μ M) na expresi genu *ABCB1*. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. *ABCB1* byl nejvíce exprimován v čase 12 hodin a to 3,2 \times (medián). Poté došlo po 24

hodinách k poklesu a opětovnému zvýšení po 48 hodinách. Statisticky významné bylo pouze zvýšení u ATV v čase 48 hodin. To samé můžeme pozorovat u RIF. Výsledky jsou zpracované ze tří měření a byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



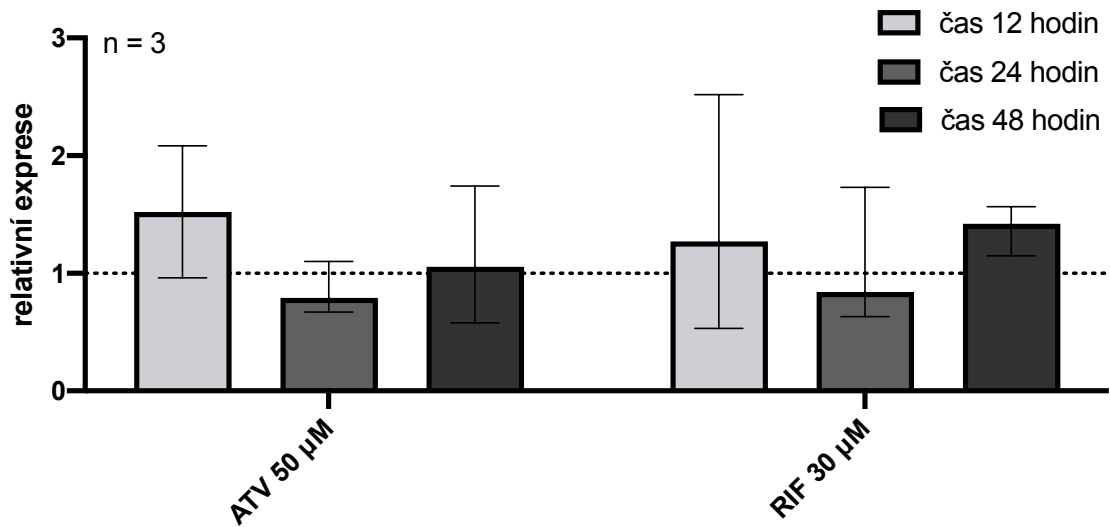
Obrázek 15: Grafické zobrazení vlivu ATV (50 μ M) na expresi GR. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Expresie GR je mírně ovlivněna pouze v 48hodinové inkubaci, kdy došlo u ATV k zvýšení 1,21 \times (medián). Toto zvýšení však není statisticky významné. Výsledky jsou zpracované ze tří měření v čase 24 a 48 hodin. U 12hodinových odběrů n = 1 u ATV, resp. 2 u RIF. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv atazanaviru (50 μ M) na expresi *PXR*



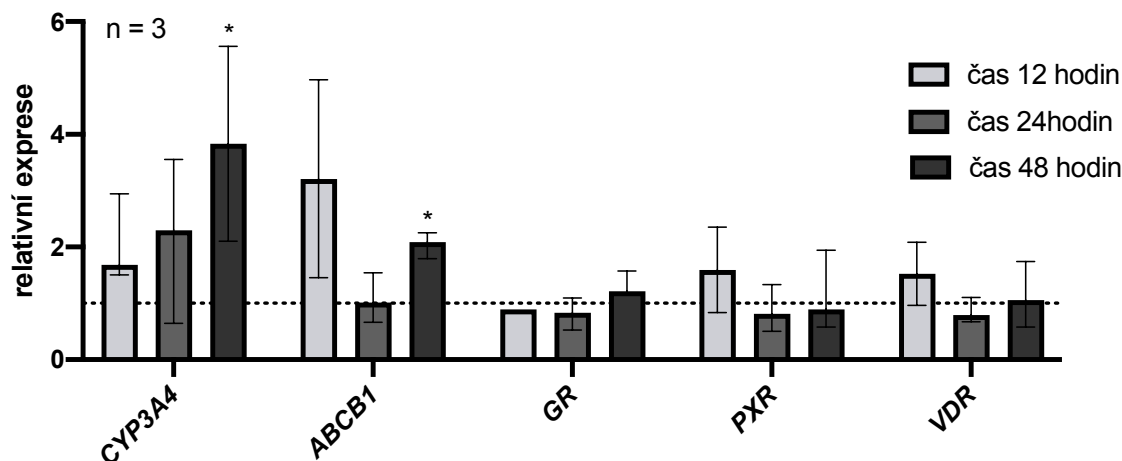
Obrázek 16: Grafické zobrazení vlivu ATV (50 μ M) na expresi *PXR*. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Jako kontrolní léčivo s potvrzenou indukční schopností použit RIF. Vliv ATV na expresi *PXR* je patrný pouze po 12 hodinách, kdy zvýšil expresi 2,3 \times (medián). Toto zvýšení však není statisticky významné. Výsledky jsou zpracované ze tří měření a byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv atazanaviru (50 μ M) na expresi *VDR*



Obrázek 17: Grafické zobrazení vlivu ATV (50 μ M) na expresi *VDR*. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Mírný vliv ATV byl pozorován pouze na inkubaci po 12 hodinách, kdy exprese *VDR* byla zvýšena 1,5 \times (medián). Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. Výsledky jsou zpracované ze tří měření a statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

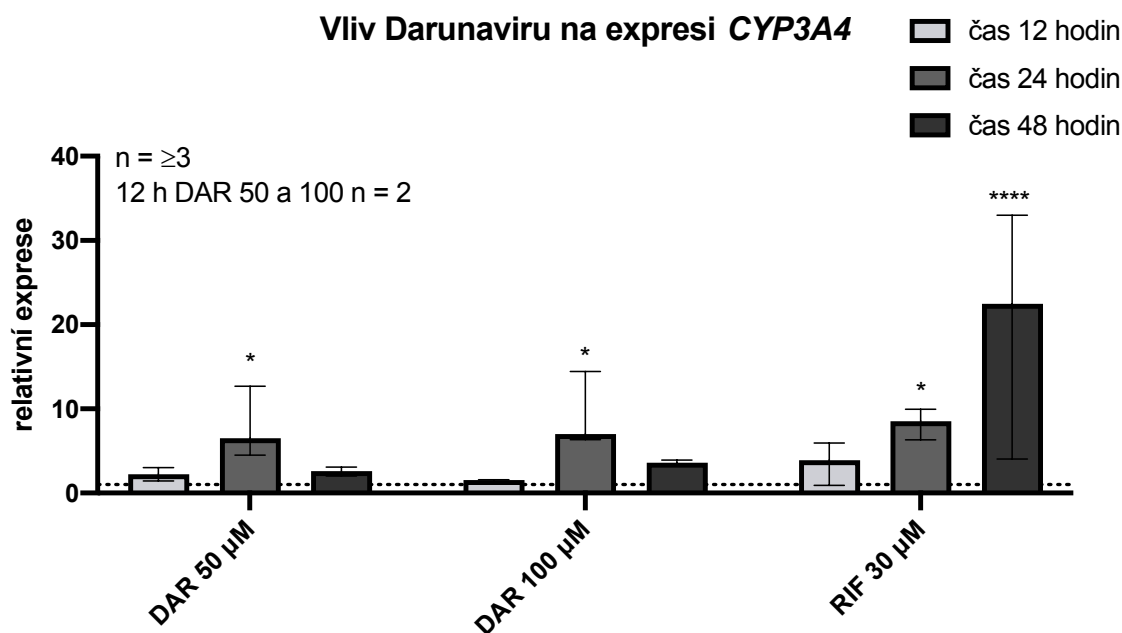
Vliv Atazanaviru (50 μ M) na expresi vybraných genů



Obrázek 18: Grafický souhrn vlivu ATV (50 μ M) na expresi vybraných genů. Graf byl vytvořen na základě dat ze tří nezávislých experimentů. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Odběry probíhaly po 12, 24 a 48 hodinách. Ze získaných výsledků vyplývá že ATV signifikantně zvyšuje expresi *CYP3A4* po 48 hodinách. Expze *CYP3A4* měla v čase stoupající trend. Dále jsme pozorovali vliv ATV na expresi *ABCB1*. Statisticky významné však bylo zvýšení pouze po 48 hodinách. Můžeme pozorovat velmi mírný vliv na expresi *GR* po 48 hodinách. Dále pozorujeme mírné zvýšení expze *PXR* a *VDR*, ale pouze po 12 hodinách. Statisticky významné však toto zvýšení nebylo ani u jednoho ze sledovaných intracelulárních receptorů. Výsledky jsou zpracované ze tří měření a statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

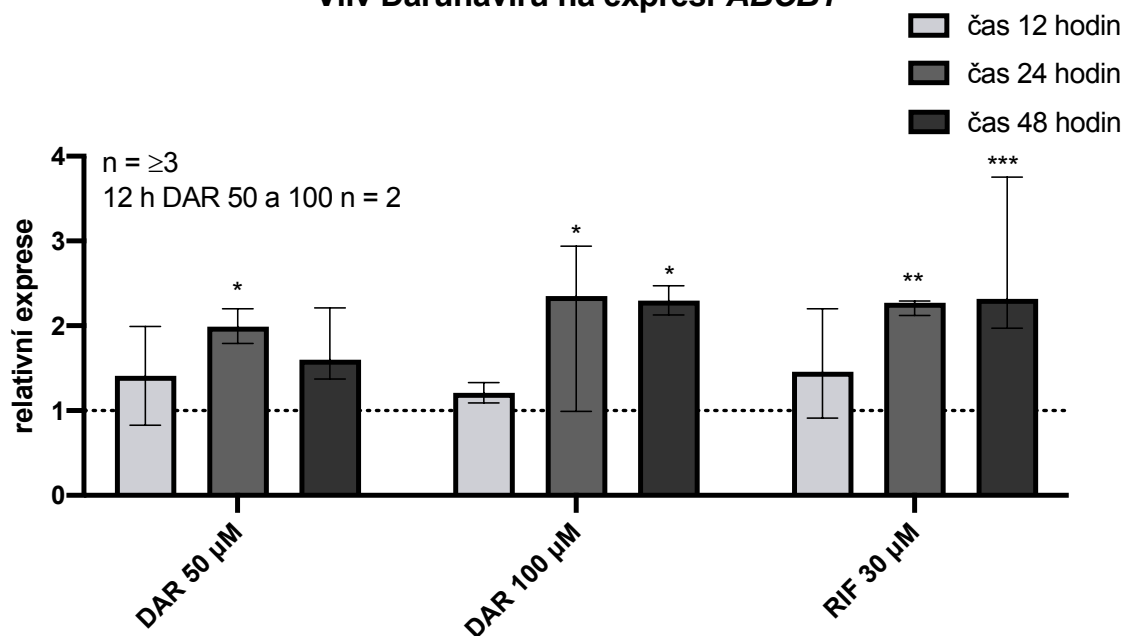
6.2.2 Vliv darunaviru na genovou expresi *CYP3A4*, *ABCBI*, *PXR*, *GR* a *VDR*

U DAR byly použity dvě koncentrace 100 μM (limit rozpustnosti) a 50 μM pro otestování vlivu koncentrační závislosti. RIF byl použit v koncentraci 30 μM jako pozitivní kontrola.



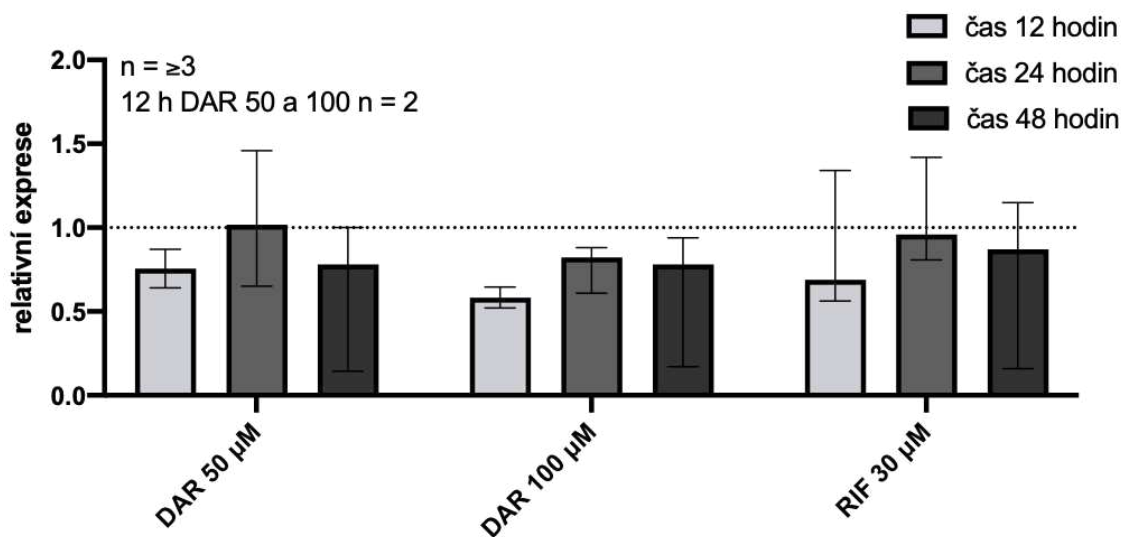
Obrázek 19: Grafické zobrazení vlivu DAR 100 μM a 50 μM na expresi genu *CYP3A4*. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. K signifikantnímu zvýšení genové exprese dochází po 24 hodinách. DAR 50 μM zvýšil expresi 6,5245 \times (medián) a DAR 100 μM 7,031 \times (medián). Mezi koncentracemi DAR a jejich vlivu na expresi není statisticky významný rozdíl. Oproti RIF dochází u DAR u obou koncentrací po 48 hodinách k poklesu exprese. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv Darunaviru na expresi *ABCB1*



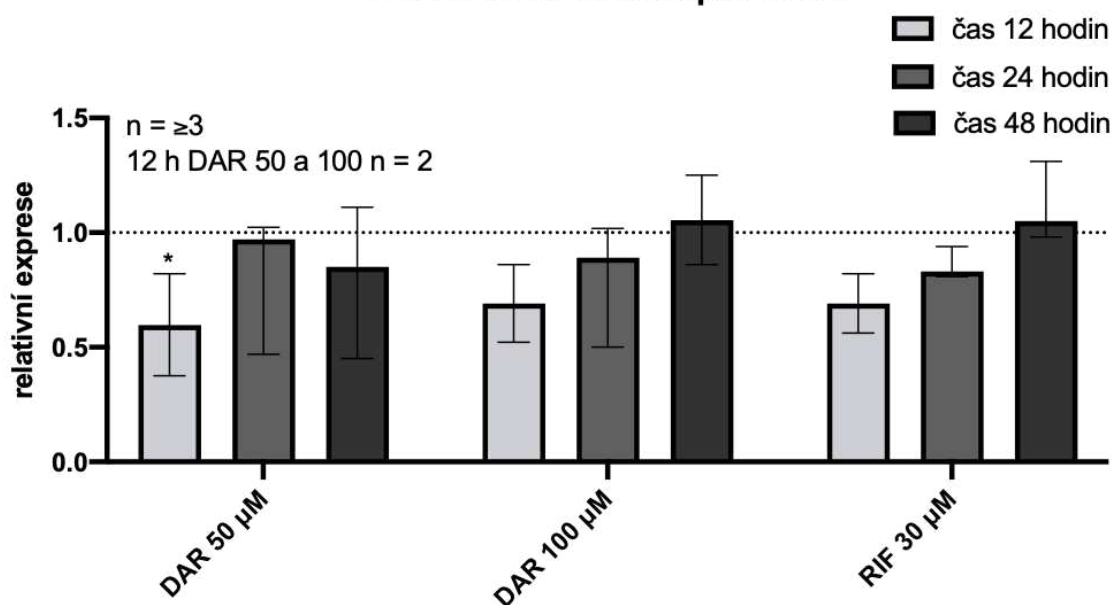
Obrázek 20: Grafické zobrazení vlivu DAR 100 µM a 50 µM na expresi genu *ABCB1*. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Z grafu je patrné, že dochází ke zvýšení exprese *ABCB1*. Významnější vliv má DAR v koncentraci 100 µM, který signifikantně zvyšuje expresi v čase 24 a 48 hodin. Jeho vliv je srovnatelný s RIF. DAR 50 µM signifikantně zvyšuje expresi pouze po 24 hodinách. Výsledky byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Data v grafu jsou vyjádřena jako medián ± rozsah (variační rozpětí). Statistická významnost je v grafech vyznačena následovně: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Vliv Darunaviru na expresi GR



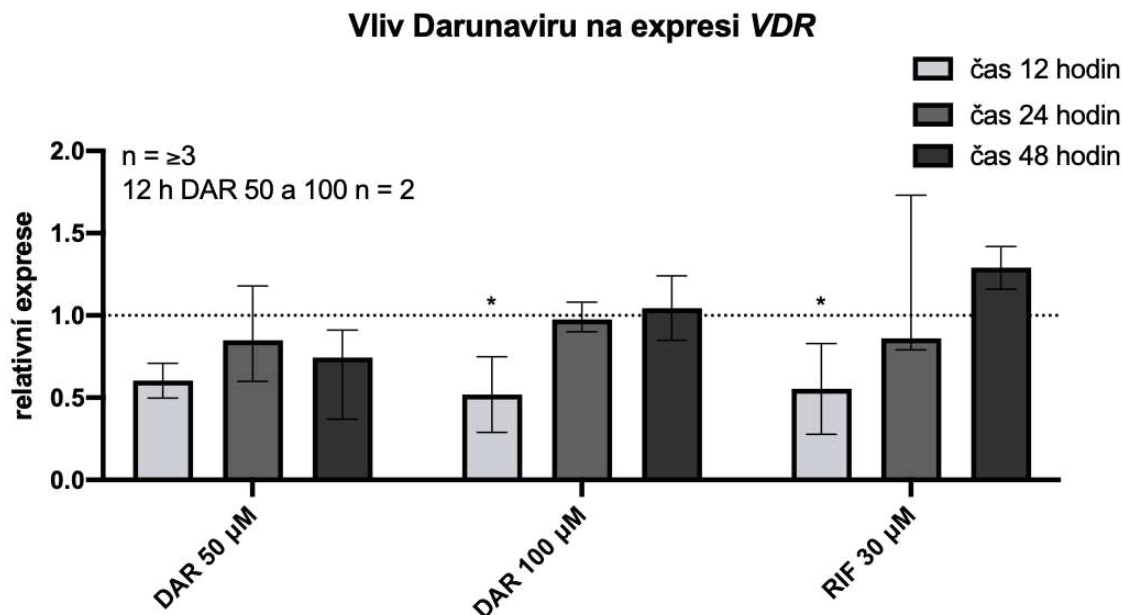
Obrázek 21: Grafické zobrazení vlivu DAR 100 µM a 50 µM na expresi genu *GR*. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. DAR ani v jedné koncentraci nemá vliv na expresi *GR*. Výsledky byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnettovým multiple comparison testem. Data v grafu jsou vyjádřena jako medián ± rozsah (variační rozpětí). Statistická významnost je v grafech vyznačena následovně: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv Darunaviru na expresi PXR



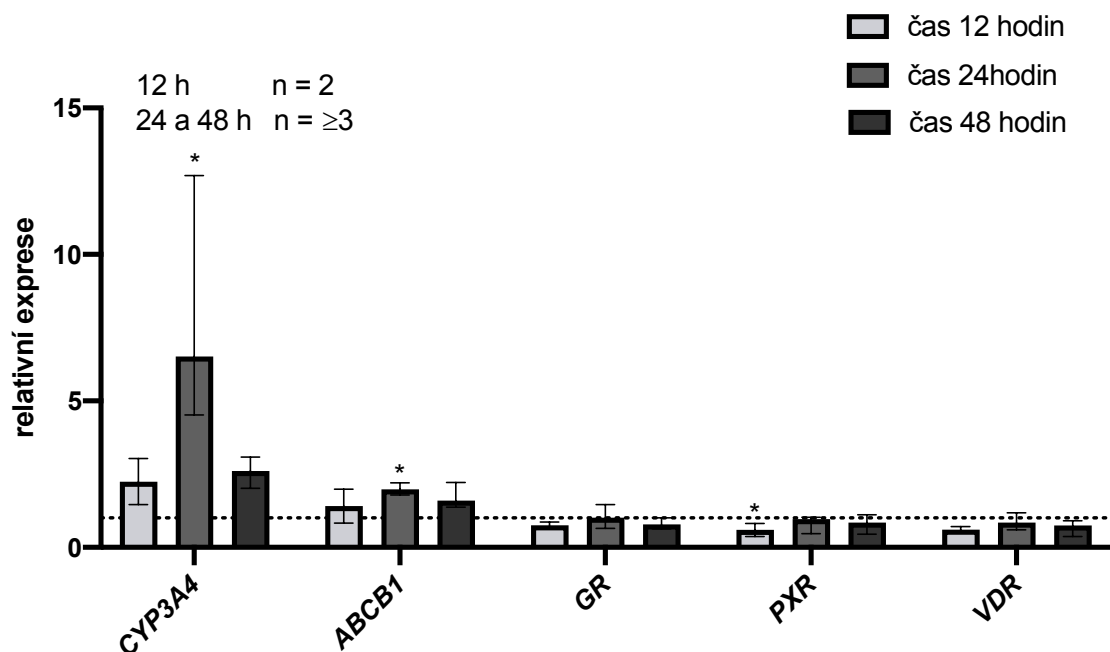
Obrázek 22: Grafické zobrazení vlivu DAR 100 µM a 50 µM na expresi genu *PXR*. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. DAR 100 µM a 50 µM

nemají výrazný vliv na zvýšení exprese *PXR*. Velmi mírně jeho expresi zvyšuje DAR 100 μM , stejně jako RIF. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



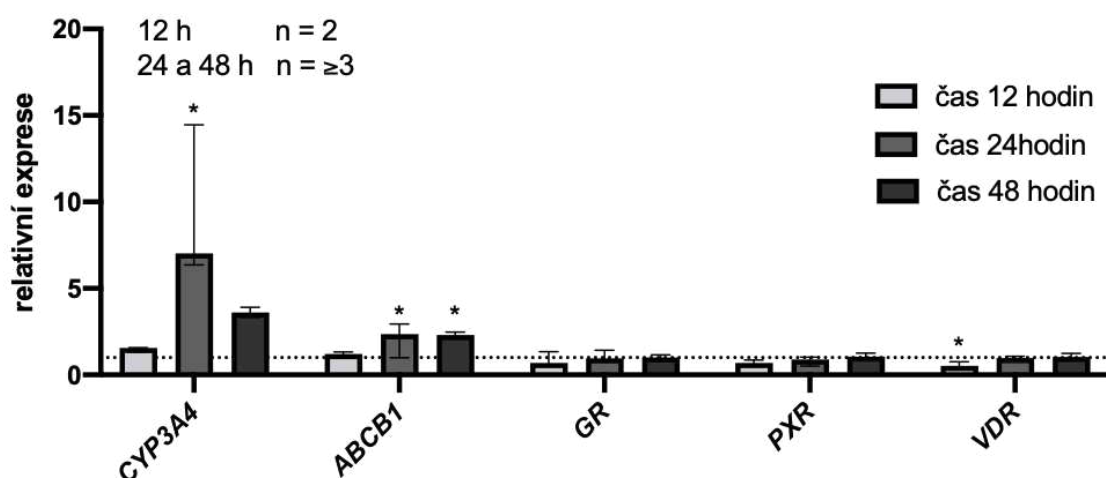
Obrázek 23: Grafické zobrazení vlivu DAR 100 μM a 50 μM na expresi genu *VDR*. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Z grafu můžeme vidět, že ani jedno z léčiv nemá výrazný vliv na zvýšení exprese *VDR*, avšak je zde patrný vliv na snížení exprese v čase 12 hodin. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv darunaviru (50 μ M) na expresi vybraných genů



Obrázek 24: Grafický souhrn vlivu DAR 50 μ M na expresi vybraných genů. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Z grafu je patrné, že DAR 50 měl signifikantní vliv na zvýšení exprese *CYP3A4* po 24 hodinách. Ke zvýšení exprese došlo i u *ABCB1* po 24 hodinách. K signifikantnímu snížení exprese *PXR* došlo po 12 hodinách. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Vliv darunaviru (100 μM) na expresi vybraných genů



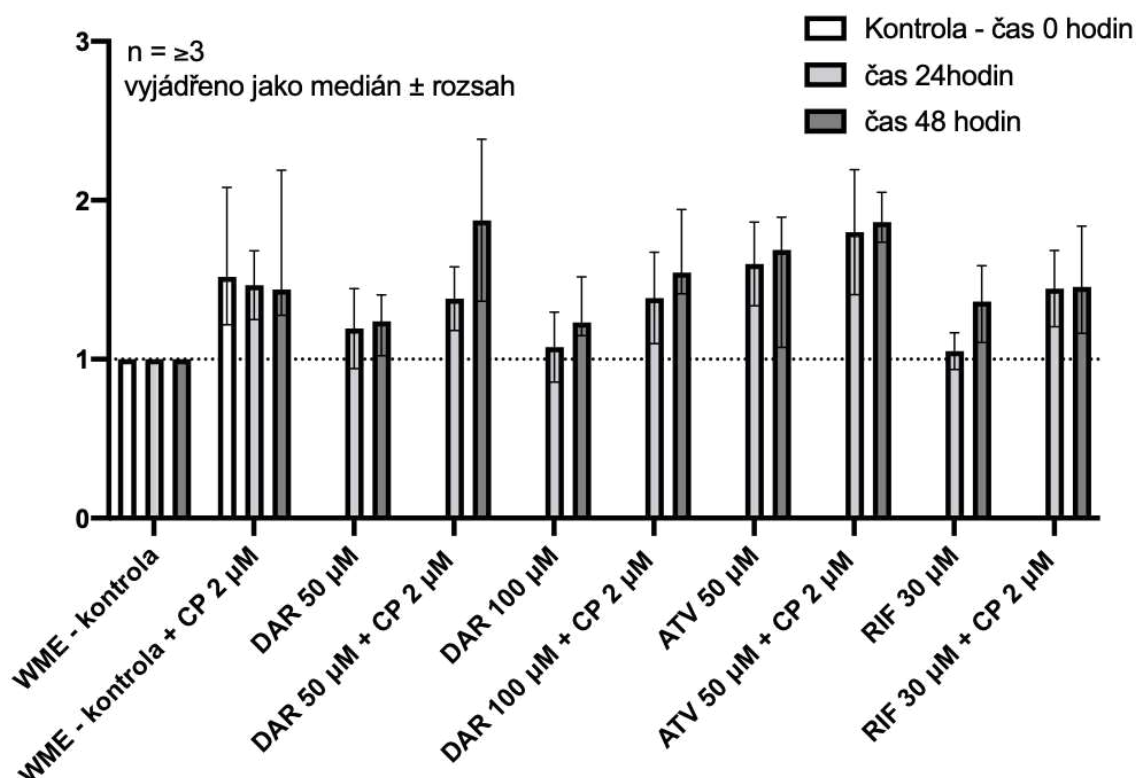
Obrázek 25: Grafický souhrn vlivu DAR 100 μM na expresi vybraných genů. Výsledky jsou zpracované ze tří a více nezávislých experimentů pro časy 24 a 48 hodin. V čase 12 hodin byly provedeny u DAR pouze dva experimenty. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. U DAR 100 μM můžeme pozorovat signifikantní zvýšení exprese u *CYP3A4* po 24 hodinách. Na rozdíl od DAR 50 μM pozoruje signifikantní vliv na zvýšení exprese *ABCB1* i po 48 hodinách a vliv na snížení exprese *VDR*. Výsledky byly statisticky hodnoceny 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: * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.3 Vliv studovaných látek na intracelulární koncentraci Rhodaminu123

Posledním krokem bylo zjištění, zda DAR a ATV ovlivňují intracelulární koncentraci RHD123. RHD123 je modelovým substrátem pro efluxní transportér P-gp. Pokud by docházelo k indukci tohoto transportéru na úrovni transportu, intracelulární koncentrace RHD123 by měly být oproti kontrole sníženy. V experimentu jsme použili dále inhibitor CP-100356 (dále jen CP), který specificky inhibuje transport P-gp (Obrázek 26). Transport a jeho ovlivnění jsme měřili v čase 24 a 48 hodin. V čase 0 byl proveden kontrolní experiment. Data byla normalizována na množství RHD123 v kontrolách. Po uplynutí stanovené doby inkubace, jsou řezy přesunuty z média obsahujícího studovanou látku do čistého média, kde dojde k jejich oplachu. To je důležitý krok, protože studovaná léčiva mohou zároveň působit jako inhibitory P-gp a jejich přítomnost v následném testu je nežádoucí. Oplach probíhá po dobu 30 minut. V oplachovém médiu je již v polovině vzorků přítomen inhibitor CP. Po 30 minutách v oplachovém médiu jsou řezy přesunuty

do média obsahujícího modelový Pg-p substrát RHD123 (10 μM), případně kombinaci inhibitoru CP a RHD123. Inkubace probíhá po dobu 2 hodin. Následně jsou vzorky dvakrát opláchnuty v KHB a extrahovány dle postupu v kapitole 5.3.3.

Vliv studovaných látek na intracelulární koncentraci RHD123



Obrázek 26: Grafické zobrazení vlivu studovaných látek na intracelulární koncentraci RHD123. Počet experimentů rovný nebo vyšší než tři. Funkce řezů byla studována v čase 24 a 48 hodin po ovlivnění léčivy. Zároveň byla v čase $t=0$ provedena funkční kontrola společně kontrolou s modelovým inhibitorem. Pokud je tkáň v pořádku, koncentrace RHD123 by měla být oproti kontrole bez CP zvýšeny. Z grafu je patrné, že nedošlo ke snížení intracelulární koncentrace RHD123 ani jedním z léčiv pod úroveň neovlivněné kontroly. Pouze v některých konkrétních experimentech s DAR 50 μM , DAR 100 μM , RIF 30 μM byla intracelulární koncentrace mírně nižší než kontrola. U ATV pak byla intracelulární koncentrace na úrovni inhibovaných kontrol, z čehož lze usuzovat, že ATV patrně nebyl dostatečně vymyt z vazby na P-gp a stále působil jako inhibitor. Získaná data byla statisticky hodnocena 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

Současná celosvětová spotřeba léků je obrovská a neustále se zvyšuje, což zvyšuje i riziko lékových interakcí (drug-drug interactions, DDIs). Nejčastěji používanou cestou podání léčiva je podání *per os*, jelikož je považováno v porovnání s ostatními způsoby za pohodlnou a bezpečnou. Po perorálním podání je však střevní absorpce ovlivněna pre-systémovou eliminací, která může zahrnovat aktivity P-gp a CYP3A4 (Martinec et al., 2021). Možné farmakokinetické důsledky indukce tohoto transportéru nebo enzymu závisí na konkrétní lokalizaci. Obecně zahrnují sníženou nebo chybějící biologickou dostupnost perorálně podávaných léčiv, zvýšenou hepatální clearance nebo zrychlenou tvorbu reaktivních metabolitů, což obvykle souvisí s lokální toxicitou (Fuhr, 2000). To je také důvod, proč by před uvedením léčiv na trh měla být testována schopnost léčiva tyto enzymy a transportéry indukovat (Cole et al., 2020). Zásadní význam pro indukci má aktivace nukleárních receptorů (NR) různými endo- a exogenními látkami. Mezi hlavní NR ovlivňované xenobiotiky patří pregnanový X receptor (PXR) a androstanový receptor (AR), které mají zásadní význam pro počáteční rozpoznání ligandu a nastartování metabolického procesu (Wallace & Redinbo, 2013).

Anti-retrovirotika jsou léčiva užívaná pacienty trpícími infekcí HIV. Odhaduje se, že na celém světě je více než 36 milionů lidí nakažených virem HIV a přibližně 1 milion z nich každoročně umírá (Martinec et al., 2019). Někteří ze zástupců těchto léčiv jsou schopny ve větší, či menší míře indukovat expresi biotransformačních enzymů nebo efluxních transportérů. Jednou ze skupin, kde je tento interakční potenciál znám jsou inhibitory proteáz (de Maat et al., 2003).

Pro studium schopnosti námi zvolených anti-retrovirotik ovlivnit expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevě jsme zvolili unikátní model lidských střevních tkáňových řezů použitý ve studii Martinec a spol., 2021. V této studii byla prokázána indukční schopnost RIF indukovat expresi *ABCB1* a *CYP3A4* v řezech získaných z lidského střeva, čímž se získané výsledky přibližují realitě lidského těla (Martinec et al., 2021). hPCIS jsou velmi tenké (250–400 μm) řezy připravené ze střevní sliznice. Každý řez tak reprezentuje střevo jako samostatný miniorgán (De Graaf et al., 2010). Z tkáně od jednoho dárce je možné připravit větší množství těchto řezů, což umožňuje realizovat i relativně komplexní studie. V minulosti byly hPCIS využity k analýze toxicity, metabolismu léčiv a také studiu interakcí na úrovni transportu (Martinec et al., 2019, 2021).

Naším cílem v této diplomové práci bylo vyhodnotit indukční potenciál reálných léčiv používaných v terapii HIV za použití výše zmíněného *ex vivo* modelu. Jelikož díky současné efektivní léčbě populace HIV pozitivních pacientů stárne, u pacientů se často vyskytují další komorbidity. Jejich léčba pak dále zvyšuje potenciál pro lékové interakce. Námi zvolená anti-retrovirotika DAR a ATV spadají do skupiny inhibitorů proteázy (PI). U DAR již byla indukční schopnost potvrzena za použití buněčné linie LS180. Na této buněčné linii zvýšil aktivitu P-gp a expresi genu *CYP3A4* (König et al., 2010). Druhým zvoleným léčivem byl ATV. V *in vitro* provedených studiích na buněčné linii LS180V bylo dokázáno, že může působit jako induktor P-gp (Perloff et al., 2005).

Nejdříve bylo nutno prokázat životnost řezů. Životnost řezů se prokazovala stanovením koncentrace ATP. Bylo prokázáno, že námi zvolené koncentrace nejsou pro řezy toxické a řezy si zachovávají svou životnost i po 48hodinové inkubaci. To je klíčové pro další prováděné experimenty.

DAR 50 μM , 100 μM a ATV 50 μM byly testovány na modelu hPCIS. Vzorky pro studium exprese byly odebírány v časech 12, 24 a 48 hodin. Jako kontrolní látku jsme použili RIF 30 μM , kvůli již zmíněné prokázané indukční schopnosti. Hodnotili jsme i expresi některých vybraných intracelulárních receptorů *PXR*, *VDR* a *GR*.

Z naší studie vyplývá, že ATV zvyšoval expresi *CYP3A4* v čase. Signifikantní bylo toto zvýšení po 48 hodinách (relativní zvýšení exprese 3,8x), stejně jako u RIF (relativní zvýšení exprese 10,5x). Expresi u *ABCB1* byla zvýšena nejvíce po 12 hodinách, avšak s velkými odchylkami mezi experimenty. Po následném snížení v čase 24 hodin došlo opět ke zvýšení. Po 48 hodinách byla exprese opět zvýšena a to signifikantně (2,0x). Obdobná situace panovala u RIF. Vliv na intracelulární receptory nebyl významný. Tyto výsledky potvrzují a rozšiřují předchozí informace o vlivu ATV na střevní bariéru popsané *in vitro*, kde byl na LS180V buněčné linii popsán výrazný vliv na expresi *ABCB1*, avšak na úrovni proteinu (Perloff et al., 2005). Data o jeho vlivu na indukci *CYP3A4* nebyly dosud známy.

DAR byl měřen ve dvou koncentracích, 50 μM a 100 μM . Vliv DAR na expresi *CYP3A4* byl nejvíce patrný po 24 hodinách a byl signifikantní pro obě koncentrace (relativní zvýšení exprese 6,5x resp. 7,0x). Jeho vliv na expresi byl srovnatelný s vlivem RIF (relativní zvýšení exprese 8,5x). Zajímavé je, že po 48 hodinách exprese *CYP3A4* v DAR ovlivněných skupinách poklesla (na 2,6x resp. 3,6x), což u RIF za stejných

podmínek pozorováno nebylo, a naopak RIF indukoval výrazně více (relativní zvýšení exprese 22,4x). Patrně tak DAR a RIF působí na regulaci exprese *CYP3A4* odlišně. DAR dále zvyšoval expresi *ABCB1* signifikantně po 24 hodinách v obou koncentracích a po 48 hodinách u DAR 100 μM . Zvýšení exprese po 24 hodinách bylo srovnatelné s RIF (DAR 2,0x resp. 2,3x; RIF 2,3x). U inkubace po dobu 48 hodin pak byl vliv DAR 50 μM nižší (relativní zvýšení exprese 1,6x), avšak u DAR 100 μM zůstává relativní exprese *ABCB1* srovnatelná s RIF (relativní zvýšení exprese u obou 2,3x). Dále jsme pozorovali i mírný vliv DAR na některé intracelulární receptory, kde byly signifikantně sníženy exprese *PXR* po 12hodinové inkubaci případně *VDR*, taktéž po 12hodinové inkubaci. Následně došlo dalších časových bodech k navrácení exprese intracelulárních receptorů na úroveň kontroly. Ve studii König a spol., 2010 provedené na buněčné linii LS180 také nebyl pozorován vliv DAR (10 μM) na expresi *PXR*. Inkubace však v této studii probíhaly déle a první vzorky byly odebrány až po třech dnech. Naše výsledky dále potvrzují vliv DAR na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* a jsou v souladu s pozorováním ze studie König a spol., 2010, ve které došlo k signifikantnímu zvýšení *ABCB1* i *CYP3A4*. Tato pozorování byla nicméně provedena po 3denní inkubaci a nejvyšší signifikantní nárůst byl patrný až po jednom týdnu inkubace (König et al., 2010). Metoda hPCIS však takto dlouhou dobu inkubace neumožňuje.

Dále jsme testovali vliv DAR a ATV na intracelulární koncentraci modelového substrátu P-gp RHD123. Tento substrát byl již ověřený na modelu střeva ve studii Martinec a spol, 2021. Jako modelový inhibitor substrátu jsme použili CP. Odběry vzorků byly prováděny po 24 a 48 hodinách. Bohužel se nepotvrdil vliv na funkci ani u jednoho z léčiv. Koncentrace RHD123 jsou ve všech případech buď na úrovni neovlivněné kontroly, nebo jsou dokonce zvýšeny. U ATV je možné, že nedošlo k dokonalému oplachu a převážila jeho inhibiční funkce, jelikož rozdíl mezi koncentracemi RHD123 u léčiva bez CP a s CP je velmi malý. ATV je známý silný inhibitor P-gp (Perloff et al., 2005). Koncentrace RHD123 v přítomnosti DAR 100 μM velmi mírně klesla pod úroveň kontroly po 24 hodinách jen v některých experimentech, nicméně tento pokles nebyl signifikantní. Zajímavé je, že stejný trend se ukazuje i u RIF, u kterého jsme vliv na transport očekávali, jelikož je potvrzeným induktorem a koncentrace RDH123 by měly být nižší než v kontrolách. Bylo by proto vhodné ověřit ještě metodou western blot, zda skutečně došlo ke změně exprese i na úrovni samotného proteinu, jelikož jak RIF, tak DAR a ATV zvyšovali expresi na úrovni mRNA přibližně dvojnásobně. Dále by bylo

vhodné zařadit také některou z funkčních kontrol pro CYP3A4, aby se potvrdilo, že zvýšená exprese na úrovni mRNA má vliv i na samotnou funkci tohoto enzymu.

8 ZÁVĚR

Naše práce se věnuje vlivu vybraných anti-retrovirotik na expresi genů *CYP3A4* a *ABCB1*. Studovali jsme léčiva DAR a ATV, ze skupiny inhibitorů proteáz, které mají prokázaný interakční potenciál. Jako *ex vivo* model střevní bariéry jsme použili lidské tkáňové řezy připravené z jejunu. Jako kontrolní modelovou látku jsme použili RIF o koncentraci 30 μM , který na tomto modelu prokazatelně zvyšuje expresi *CYP3A4* a *ABCB1* (Martinec et al., 2021).

Nejdříve jsme hodnotili životnost střevních řezů pomocí stanovení koncentrace ATP. Námi testované koncentrace léčiv DAR 50 μM , 100 μM , ATV 50 μM a RIF 30 μM , nejsou ani po 48hodinové inkubaci vůči střevním řezům toxické.

V experimentální části se nám podařilo potvrdit předchozí data z *in vitro* studií, že DAR zvyšuje expresi *CYP3A4* (König et al., 2010). Dále jsme zjistili, že mírně zvyšuje také expresi *ABCB1*. Na ostatní intracelulární receptory, které by mohly ovlivňovat expresi, působil v prvních 12 hodinách mírným snížením exprese, a to konkrétně u *PXR* a *VDR*. DAR byl použit ve dvou koncentracích 50 μM a 100 μM . V expresi nebyly patrné výrazné rozdíly mezi použitými koncentracemi. U ATV byl zjištěn signifikantní vliv na expresi *CYP3A4*, která se zvyšovala v čase, stejně jako u kontroly RIF. Určitý vliv ATV na expresi *ABCB1* byl nejvíce patrný po 12 hodinách. Po 24 hodinách došlo k poklesu exprese a po 48 hodinách opět k jejímu zvýšení. Tyto změny však nebyly, zejména z důvodu vysoké variability mezi experimenty signifikantní.

V naší práci se nám nepodařilo potvrdit vliv na aktivitu P-gp ani u ATV (Perloff et al., 2005) ani u DAR (König et al., 2010). Koncentrace RHD123 jsou ve všech případech inkubací buď stejné nebo vyšší než u kontrol. Jak už bylo zmíněno výše, je možné, že u ATV nedošlo k dostatečnému oplachu a převážila jeho inhibiční funkce. Koncentrace RHD123 v přítomnosti DAR 100 μM velmi mírně klesla po 24 hodinách, a to pouze u některých experimentů. Zajímavé je, že stejný trend se ukazuje i u RIF, který je potvrzeným induktorem a koncentrace RDH123 by měly být nižší než v kontrolách. Reálné vysvětlení pro tento pozorování však nemáme.

LITERATURA

- Al-Shawi, M. K., & Omote, H. (2005). The Remarkable Transport Mechanism of P-Glycoprotein: A Multidrug Transporter. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(6), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-9497-5>
- Arredondo-Amador, M., Aranda, C. J., Ocón, B., González, R., Martínez-Augustin, O., & Sánchez de Medina, F. (2021). Epithelial deletion of the glucocorticoid receptor (Nr3c1) protects the mouse intestine against experimental inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 178(12), 2482–2495. <https://doi.org/10.1111/bph.15434>
- Bauters, T. (2019). Clinically Relevant Drug Interactions in HSCT. In *The EBMT Handbook* (Vol. 7, pp. 229–235). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5_31
- Cheng, J., Shah, Y. M., & Gonzalez, F. J. (2012). Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 33, Issue 6, pp. 323–330). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.003>
- Cole, S., Kerwash, E., & Andersson, A. (2020). A summary of the current drug interaction guidance from the European Medicines Agency and considerations of future updates. In *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (Vol. 35, Issue 1, pp. 2–11). Japanese Society for the Study of Xenobiotics. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.11.005>
- Czekaj, P., & Skowronek, R. (2012). Transcription Factors Potentially Involved in Regulation of Cytochrome P450 Gene Expression. In *Topics on Drug Metabolism*. InTech. <https://doi.org/10.5772/27817>
- Davis, D. A., Soule, E. E., Davidoff, K. S., Daniels, S. I., Naiman, N. E., & Yarchoan, R. (2012). Activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors against the initial autocleavage in Gag-Pol polyprotein processing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3620–3628. <https://doi.org/10.1128/AAC.00055-12>
- De Graaf, I. A. M., Olinga, P., De Jager, M. H., Merema, M. T., De Kanter, R., Van De Kerkhof, E. G., & Groothuis, G. M. M. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. In *Nature Protocols* (Vol. 5, Issue 9, pp. 1540–1551). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.111>
- de Maat, M. M. R., Ekhart, G. C., Huitema, A. D. R., Koks, C. H. W., Mulder, J. W., & Beijnen, J. H. (2003). Drug Interactions Between Antiretroviral Drugs and Comedicated Agents. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(3), 223–282. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342030-00002>
- Degorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J., & Kim, R. B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529>

- Estudante, M., Morais, J. G., Soveral, G., & Benet, L. Z. (2013). Intestinal drug transporters: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1340–1356. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.042>
- Finch, A. (2014). P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Australian Prescriber*, 37, 137–139.
- Fritz, A., Busch, D., Lapczuk, J., Ostrowski, M., Drozdziak, M., & 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 and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 124(3), 245–255. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13137>
- Fuhr, U. (2000). Induction of Drug Metabolising Enzymes. *Clinical Pharmacokinetics*, 38(6), 493–504. <https://doi.org/10.2165/00003088-200038060-00003>
- Hakkola, J., Bernasconi, C., Coecke, S., Richert, L., Andersson, T. B., & Pelkonen, O. (2018). Cytochrome P450 Induction and Xenosensing Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α at the Crossroads of Toxicokinetics and Toxicodynamics. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 123, 42–50. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13004>
- Huličiak, M., Vokřál, I., Holas, O., Martinec, O., Štaud, F., & Červený, L. (2022). Evaluation of the Potency of Anti-HIV and Anti-HCV Drugs to Inhibit P-Glycoprotein Mediated Efflux of Digoxin in Caco-2 Cell Line and Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Pharmaceuticals*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020242>
- Hull, M. W., & Montaner, J. S. G. (2011). Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Annals of Medicine*, 43(5), 375–388. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.572905>
- Ikemura, K., Iwamoto, T., & Okuda, M. (2014). MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: Implication for intestinal barrier function. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 143, Issue 2, pp. 217–224). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.002>
- Katherine Mattaini. (2020). *Introduction to Molecular and Cell Biology*.
- Kim, R. B. (2002). *DRUGS AS P-GLYCOPROTEIN SUBSTRATES, INHIBITORS, AND INDUCERS*. www.dekker.com
- Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N. Y., & Bendayan, R. (2010). The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(1), 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.10.001>
- Kis, O., Zastre, J. A., Hoque, M. T., Walmsley, S. L., & Bendayan, R. (2013). Role of drug efflux and uptake transporters in atazanavir intestinal permeability and drug-drug interactions. *Pharmaceutical Research*, 30(4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0942-y>

- Klepsch, V., Moschen, A. R., Tilg, H., Baier, G., & Hermann-Kleiter, N. (2019). Nuclear receptors regulate intestinal inflammation in the context of IBD. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01070>
- Kong, S., Zhang, Y. H., & Zhang, W. (2018). Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>
- König, S. K., Herzog, M., Theile, D., Zembruski, N., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2010). Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(11), 2319–2328. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq324>
- Li, Y. C., Chen, Y., & Du, J. (2015). Critical roles of intestinal epithelial vitamin D receptor signaling in controlling gut mucosal inflammation. In *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 148, pp. 179–183). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.011>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mai, Y., Dou, L., Yao, Z., Madla, C. M., Gavins, F. K. H., Taherali, F., Yin, H., Orlu, M., Murdan, S., & Basit, A. W. (2021). Quantification of P-Glycoprotein in the Gastrointestinal Tract of Humans and Rodents: Methodology, Gut Region, Sex, and Species Matter. *Molecular Pharmaceutics*, *18*(5), 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00574>
- Martinec, O., Biel, C., de Graaf, I. A. M., Huliciak, M., de Jong, K. P., Staud, F., Cecka, F., Olinga, P., Vokral, I., & Cervený, L. (2021). Rifampicin Induces Gene, Protein, and Activity of P-Glycoprotein (ABCB1) in Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.684156>
- Martinec, O., Huliciak, M., Staud, F., Cecka, F., Vokral, I., & Cervený, L. (2019). Anti-HIV and anti-hepatitis C virus drugs inhibit P-glycoprotein efflux activity in Caco-2 cells and precision-cut rat and human intestinal slices. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00910-19>
- Murakami, T. (2017). Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1219–1232). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1378176>
- Narang, V. S., Fraga, C., Kumar, N., Shen, J., Throm, S., Stewart, C. F., & Waters, C. M. (2008). Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *295*(2), C440–C450. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00491.2007>
- Neuhoff, S., Ungell, A. L., Zamora, I., & Artursson, P. (2005). pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *European*

- Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(2–3), 211–220.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.02.009>
- Noble, S., Faulds, D., Bowie, W. R., Collier, A., Hirsch, M., & Jefferies, D. J. (1996). DRUG EVALUATION A Review of its Pharmacology and Clinical Potential in the Management of HIV Infection. In *Drugs* (Vol. 52).
- Oise Ingels, F. M., & Augustijns, P. F. (n.d.). *MINIREVIEW Biological, Pharmaceutical, and Analytical Considerations with Respect to the Transport Media Used in the Absorption Screening System, Caco-2*.
<https://doi.org/10.1002/jps.10408>
- Pavek, P., Cervený, L., Svecová, L., Brysch, M., Libra, A., Vrzal, R., Nachtigal, P., Staud, F., Ulrichová, J., Fendrich, Z., & Dvorak, Z. (2007). Examination of Glucocorticoid Receptor α -Mediated Transcriptional Regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 Genes in Placental Trophoblast Cell Lines. *Placenta*, 28(10), 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.05.001>
- Perloff, E. S., Duan, S. X., Skolnik, P. R., Greenblatt, D. J., & von Moltke, L. L. (2005). ATAZANAVIR: EFFECTS ON P-GLYCOPROTEIN TRANSPORT AND CYP3A METABOLISM IN VITRO. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(6), 764–770. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002931>
- Press, A. G., Hauptmann, I. A., Hauptmann, L., Fuchs, B., Fuchs, M., Ewe, K., & Ramadori, G. (1998). Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 12(7), 673–678.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1998.00358.x>
- Qin, X., & Wang, X. (2019). Role of vitamin D receptor in the regulation of CYP3A gene expression. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1087–1098). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.005>
- Roberts, A. G. (2021). The Structure and Mechanism of Drug Transporters. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2342, pp. 193–234). Humana Press Inc.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1554-6_8
- Sekar, V. J., Lefebvre, E., de Pauw, M., Vangeneugden, T., & Hoetelmans, R. M. (2008). Pharmacokinetics of darunavir/ritonavir and ketoconazole following co-administration in HIV-healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66(2), 215–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03191.x>
- Sevrioukova, I. F., & Poulos, T. L. (2013). Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: Recent advances and remaining problems. In *Dalton Transactions* (Vol. 42, Issue 9, pp. 3116–3126).
<https://doi.org/10.1039/c2dt31833d>
- Sharom, F. J. (2014). Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00041>
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., De Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump:

- Induction and activation as a therapeutic strategy. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 149, pp. 1–123). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Tachibana, S., Yoshinari, K., Chikada, T., Toriyabe, T., Nagata, K., & Yamazoe, Y. (2009). Involvement of Vitamin D Receptor in the Intestinal Induction of Human ABCB1. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(8), 1604–1610.
<https://doi.org/10.1124/dmd.109.027219>
- Urquhart, B. L., Tirona, R. G., & Kim, R. B. (2007). Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: Implications for interindividual variability in response to drugs. In *Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 47, Issue 5, pp. 566–578).
<https://doi.org/10.1177/0091270007299930>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. In *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 821–834). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Varma, M. V. S., Sateesh, K., & Panchagnula, R. (2005). Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: Contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport. *Molecular Pharmaceutics*, 2(1), 12–21. <https://doi.org/10.1021/mp0499196>
- Wallace, B. D., & Redinbo, M. R. (2013). Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: A structural perspective. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 45, Issue 1, pp. 79–100).
<https://doi.org/10.3109/03602532.2012.740049>
- Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. In *Protein Science* (Vol. 27, Issue 11, pp. 1876–1892). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>