

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



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

**Diplomová práce**

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

Hradec Králové 2023

Pavla Podhorná

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

V Hradci Králové

Podpis: .....

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Ivanu Vokřálovi, PhD. za odborné vedení této diplomové práce. Především za jeho cenné rady, ochotu, čas a trpělivost v průběhu celé naší spolupráce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Huličiakovi za pomoc s experimentální částí diplomové práce a odborné rady.

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

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Pavla Podhorná

Školitel: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

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

Dexametazon je kortikosteroid, který má protizánětlivé, imunosupresivní a antialergické účinky. Mechanismus účinku dexametazonu spočívá v jeho schopnosti vázat se na intracelulární glukokortikoidní receptory, které jsou přítomny v mnoha typech buněk, včetně buněk střevní sliznice. Po navázání na tyto receptory dochází k jeho translokaci do jádra buněk a ovlivňování genové exprese. Tímto mechanismem je ve střevní sliznici schopen ovlivňovat také expresi genů, které jsou důležité pro metabolismus a transport xenobiotik. Mezi nejdůležitější takovéto geny patří *ABCB1*, důležitý střevní transportér, a *CYP3A4* významný biotransformační enzym. Jejich lokalizace ve stěně tenkého střeva může významně ovlivňovat absorpci perorálně podaných léčiv. Studium lékových interakcí na tomto transportéru a biotransformačním enzymu je důležité pro bezpečnou a účinnou farmakoterapii.

Pro zjištění, zda má dexametazon vliv na expresi těchto genů ve střevní bariéře jsme využili metodu ultra-tenkých tkáňových lidských řezů. Tzv. precision-cut intestinal slices (PCIS) představují mini-model střevní bariéry a obsahují všechny typy buněk studované tkáně. Touto metodou lze studovat chování střevní bariéry v reálném čase a ve fyziologickém prostředí, což může přispět k lepšímu pochopení mechanismů, které ovlivňují farmakokinetiku léčiv. Zatím však existují jen omezené informace o využití této techniky ve studiu indukce genové exprese.

Nejprve jsme se zaměřili na vliv dexametazonu na ovlivnění životaschopnosti střevních řezů v průběhu inkubace. Dále jsme pak zjišťovali, zda dexametazon má vliv na expresi *ABCB1*, *CYP3A4* a glukokortikoidního receptoru v námi zvoleném modelu střevní bariéry. Jako poslední cíl bylo zjistit, zda případné ovlivnění exprese má vliv na transport modelového substrátu rhodaminu123 prostřednictvím *ABCB1* v neovlivněných a ovlivněných střevních řezech.

Střevní řezy jsme inkubovali s dexametazonem o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  po dobu 48 hodin. Jako kontrolní látka byl použit známý induktor rifampicin o koncentraci 30  $\mu\text{M}$ . Expres genů byla hodnocena metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Ze získaných měření koncentrace ATP plyne, že dexametazon nemá negativní vliv na viabilitu tkáně. U inkubace s dexametazonem byl (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) zaznamenán nárůst exprese pro *CYP3A4* i *ABCB1*. K signifikatnímu nárůstu došlo především u *CYP3A4*, a to v časech 24 a 48 h. U glukokortikodního receptoru byly všechny časy i sledované skupiny pod úrovní kontroly, včetně dexametazonu 50  $\mu\text{M}$  a rifampicinu 30  $\mu\text{M}$ . Pouze u dexametazonu 100  $\mu\text{M}$  po 12 h, byla exprese mírně nad úrovní kontroly. Intracelulární koncentrace rhodaminu123 nebyla indukcí ve většině případů ovlivněna. Ke snížení koncentrace došlo pouze u dexametazonu 100  $\mu\text{M}$ , jednalo se však pouze o jeden experiment.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Pavla Podhorná

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of dexamethasone on ABCB1 and CYP3A4 expression in human precision-cut intestinal slices

Dexamethasone is a corticosteroid that has anti-inflammatory, immunosuppressive, and anti-allergic effects. The mechanism of dexamethasone action involves its ability to bind to intracellular glucocorticoid receptors, which are present in many types of cells, including intestinal mucosal cells. Upon binding to these receptors, it translocates to the nucleus of the cells and affects gene expression. This mechanism also affects the expression of genes important for the metabolism and transport of xenobiotics in the intestinal mucosa. The most important such genes include *ABCB1*, an important intestinal transporter, and *CYP3A4*, a significant biotransformation enzyme. Their localization in the wall of the small intestine can significantly affect the absorption of orally administered drugs. Studying drug interactions with this transporter and biotransformation enzyme is important for safe and effective pharmacotherapy.

To determine whether dexamethasone affects the expression of these genes in the intestinal barrier, we used the method of precision-cut tissue slices. Precision-cut intestinal slices (PCIS) represent a mini-model of the intestinal barrier and contain all types of cells in the studied tissue. This method allows the study of the behavior of the intestinal barrier in real-time and in a physiological environment, which can contribute to a better understanding of the mechanisms that affect the pharmacokinetics of drugs. However, there is limited information on the use of this technique in studying gene expression induction.

First, we focused on the effect of dexamethasone on the viability of intestinal slices during incubation. Then we investigated whether dexamethasone affects the expression of *ABCB1*, *CYP3A4*, and glucocorticoid receptor in our chosen model of the intestinal barrier. The last goal was to determine whether any effect on gene expression affects the transport of the model substrate rhodamine123 through *ABCB1* in unaffected and affected intestinal slices.

We incubated the intestinal slices with dexamethasone at concentrations of 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M for up to 48 hours. The known inducer rifampicin was used as a positive control at a concentration of 30  $\mu$ M. Gene expression was evaluated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Measurements of the ATP concentration show that dexamethasone has no negative effect on tissue viability. Its effect on *CYP3A4* and *ABCB1* was observed for both studied concentrations. A significant increase was observed for *CYP3A4* at 24 and 48 hours and *ABCB1* at 48 hours. Glucocorticoid receptor expression was below the control level at all times and in all groups, including 50  $\mu$ M dexamethasone and 30  $\mu$ M rifampicin. Only at 100  $\mu$ M of dexamethasone after 12 hours was the expression slightly above the control level. Intracellular rhodamine123 concentrations were not affected by induction in most cases. Only dexamethasone 100  $\mu$ M decreased the concentration, but this was only in one experiment.

# OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK .....	10
2	ÚVOD .....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1	Tenké střevo a jeho složení .....	12
3.2	Transportéry tenkého střeva .....	13
3.3	Membránové transportéry SLC a ABC .....	14
3.3.1	SLC transportéry .....	14
3.3.2	ABC transportéry .....	15
3.3.3	P-glykoprotein (ABCB1) .....	16
3.3.4	Multidrug resistance protein (MRP (ABCC)) .....	18
3.3.5	BCRP (ABCG2) .....	20
3.4	Metabolismus xenobiotik .....	21
3.4.1	Biotransformační enzymy z rodiny Cytochromu P450 .....	21
3.4.2	Synergické působení P-gp a CYP 3A4 .....	23
3.5	Intracelulární receptory .....	24
3.5.1	Rozdělení intracelulárních receptorů .....	25
3.5.2	Pregnanový X receptor .....	26
3.5.3	Glukokortikoidní receptor .....	27
3.6	Glukokortikoidy .....	29
3.6.1	Glukokortikoidy jako léčiva .....	29
3.6.2	Mechanismus působení glukokortikoidů .....	29
3.6.3	Dexametazon .....	30
3.7	Metody studia vlivu léčiv na střevní bariéru .....	32
3.7.1	<i>In vivo</i> metody .....	32
3.7.2	<i>In situ</i> metoda .....	32
3.7.3	<i>In vitro</i> metoda .....	33
3.7.4	Ultra-tenké střevní řezy (PCIS) – <i>ex vivo</i> metoda .....	34
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
4.1	Cíle práce .....	36
4.2	Chemikálie a reagenty, biologický materiál, přístroje .....	37
4.3	Pracovní postupy .....	40
4.3.1	Příprava inkubačního média .....	40
4.3.2	Příprava Krebs-Henseleitova pufru .....	40



4.3.3	Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení ATP (SONOP) .....	41
4.3.4	Příprava Tris/EDTA pufru pro stanovení hladiny ATP .....	41
4.3.5	Příprava 3 % roztoku agarózy .....	41
4.3.6	Příprava ultratenkých intestinálních řezů .....	42
4.3.7	Inkubace řezů s dexametazonem a rifampicinem.....	43
4.3.8	Inkubace řezů s RHD123 – studie funkce .....	44
4.3.9	Stanovení koncentrace ATP v řezech.....	44
4.3.10	Stanovení koncentrace s RHD123.....	45
4.3.11	Stanovení koncentrace bílkoviny .....	46
4.3.12	Izolace RNA .....	47
4.3.13	Reverzní transkripce.....	48
4.3.14	qPCR .....	48
4.3.15	Statistická analýza naměřených dat.....	49
5	VÝSLEDKY .....	50
5.1.1	Vliv dexametazonu na životnost tkáňových řezů .....	50
5.1.2	Vliv dexametazonu na expresi <i>CYP3A4</i> .....	51
5.1.3	Vliv dexametazonu na expresi <i>ABCB1</i> .....	52
5.1.4	Vliv dexametazonu na expresi <i>NR3C1</i> .....	53
5.1.5	Vliv dexametazonu na intracelulární koncentraci RHD123 .....	54
6	DISKUZE .....	56
7	ZÁVĚR .....	59
8	ZDROJE.....	60

# 1 SEZNAM ZKRATEK

ABC – ATP-binding cassette

ATP – adenosin trifosfát

BCRP/ABCG2 – breast cancer resistance protein

CP – CP100356 – modelový inhibitor ABCB1 transportéru

CYP – cytochrom

DEX – dexametazon

DMSO – dimethylsulfoxid

ER – estrogenový receptor

GK – glukokortikoidy

GPR – G-protein coupled receptor

GR – glukokortikoidní receptor

GRE – glukokortikoidní responzivní elementy

IR – intracelulární receptory

KHB – Krebs-Henseleitův roztok

mRNA – messengerová RNA

MRP1-5 – Multidrug resistance protein 1 – 5

NBD – nukleotidové vazebné doména (z angl. nucleotide-binding domain)

NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa B

NR3C1 – nuclear receptor subfamily 3 group C member 1

PCIS – ultra-tenké tkáňové lidské řezy (z angl. precision-cut intestinal slices)

P-gp/ABCB1 – P-glykoprotein

PPAR – peroxisome proliferator – activated receptor

PI3K – fosfatidylinositol – 3 – kináza

PXR – pregnanový X receptor

SLC – solute carrier family

OA – osteoartróza

qPCR – quantitative polymerase chain reaction

RA – revmatoidní artritida

RHD123 – rhodamin 123

RIF – rifampicin

TMD – transmembránové doména (z angl. transmembrane domain)

WME – Williams medium E

## 2 ÚVOD

Celá řada dnes užívaných léčiv je podávána perorální formou. Tato léčiva se pak většinou vstřebávají do systémového oběhu prostřednictvím střevní bariéry. Tato bariéra je vybavena řadou ochranných faktorů, které však mohou s léčivou interagovat a být i předmětem tzv. lékových interakcí. Mezi tyto ochranné faktory patří biotransformační enzymy (především *CYP3A4*) a efluxní transportéry (zejména ABC-transportéry) (Kalliokoski & Niemi, 2009). Tyto proteiny hrají důležitou roli ve farmakokinetice léčiv, protože vykazují širokou substrátovou specifitu (Liu, D. et al., 2013). Léčiva mohou vůči těmto dvěma proteinům vystupovat nejen jako substráty, ale také jako induktory nebo inhibitory, což může vést k řadě již zmíněných lékových interakcí (Mora Lagares et al., 2019).

Jedněmi z léčiv, které mohou střevní bariéru ovlivňovat a jsou zároveň podávány často perorální cestou, jsou kortikosteroidy (Oostendorp et al., 2009). Tyto syntetické analogy přirozených steroidních hormonů mají protizánětlivé a imunosupresivní účinky a mají tak široké uplatnění v medicíně v mnoha oborech, např. alergologii a pneumologii, dermatologii, endokrinologii, gastroenterologii, hematologii, revmatologii a oftalmologii. (Jia et al., 2019; Liu, D. et al., 2013).

Účinek kortikosteroidů je v tenkém střevě zprostředkován prostřednictvím glukokortikoidního receptoru (Jia et al., 2019). Ten reguluje např. vstřebávání glukózy nebo aminokyselin, ale pro nás je důležitý fakt, že aktivace glukokortikoidního receptoru může ovlivnit také expresi *ABCB1* nebo *CYP3A4*, které se podílí na omezení transportu přes střevní membránu a metabolismu celé řady xenobiotik (Schijvens et al., 2019).

Glukokortikoidní receptor je kódován genem *NR3C1* (nukleární receptor podrodiny 3 skupiny C číslo 1). Když se kortikosteroid (dexametazon) naváže na tento gen, dojde k aktivaci glukokortikoidního receptoru a přenosu signálu do jádra buňky, kde dochází k regulaci exprese genů (Palma-Gudiel et al., 2015).

Zjištění, jak výrazně dexametazon ovlivňuje expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevních tkáňových řezech může přispět nejen k pochopení některých typů lékových interakcí, ale zároveň i k lepší charakterizaci samotného použitého modelu.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Tenké střevo a jeho složení

Tenké střevo je součástí trávicího systému a podílí se na absorpci látek, které přechází přes střevní stěnu do krevního oběhu (Billat et al., 2017). Kromě vstřebávání živin a vody, má tento orgán významnou funkci při biotransformaci xenobiotik a lze jej v této oblasti považovat za nejdůležitější extrahepatální orgán (Dressman & Thelen, 2009).

Jeho délka se pohybuje kolem 5–6 metrů. Dělí se na tři části: duodenum, jejunum a ileum. Sliznice tenkého střeva je tvořena klky a mikrokilky, které mnohonásobně zvětšují jeho absorpční plochu (Billat et al., 2017). Na povrchu klků se nachází epitel s enterocyty, přes které dochází k absorpci látek (Oostendorp et al., 2009).

K transportu látek přes bariéru tenkého střeva dochází dvěma způsoby: paracelulárně (mezi buňkami) a transcelulárně (přes buňky). Paracelulární permeace je možná pouze pro malé molekuly a probíhá skrz mezery v epiteliální membráně. Transcelulární transport může být zprostředkován několika mechanismy. Mezi ně patří pasivní difúze, endocytóza a transportéry zprostředkovaný transport (Oostendorp et al., 2009).

Transportéry nacházející se ve střevě lze rozdělit do dvou hlavních nadrodin: Solute Carrier Family (SLC) a ATP-binding cassette (ABC) transportéry. Hlavní rozdíl mezi těmito transportéry je v samotném způsobu transportu. Transport látek prostřednictvím SLC probíhá pomocí iontového gradientu a transportuje látky proti koncentračnímu gradientu do buňky (Hong, 2017). Jedná se o tzv. influxní transportéry (Zhou et al., 2017). ABC transportéry umožňují přestup látek proti koncentračnímu gradientu pomocí hydrolýzy adenosin trifosfátu (ATP). Jedná se především o efluxní transportéry, které zajišťují přenos látek ven z buněk (Hong, 2017). Fungují tedy jako první linie při obraně proti toxickým látkám, u kterých ABC transportéry omezují absorpci a brání tak intracelulární akumulaci (Mora Lagares et al., 2019).

Dalším významným faktorem, který ovlivňuje přestup látek přes střevní stěnu jsou biotransformační enzymy. Ve střevě jsou obsaženy biotransformační enzymy první a druhé fáze. V rámci první fáze lze za nevýznamnější enzymy považovat cytochromy P450 (CYP). Jedná se o biotransformační enzymy, které se podílejí na detoxifikaci xenobiotik, buněčném metabolismu i homeostáze (Manikandan & Nagini, 2018). Ve střevě má z enzymů CYP největší zastoupení *CYP3A4* (Dressman & Thelen, 2009). Tento enzym je často odpovědný za lékové

interakce, při kterých dochází k indukci nebo inhibici tohoto enzymu. Důsledkem je pak zvýšená toxicita nebo snížená účinnost léčiv (Zhang et al., 1999).

### **3.2 Transportéry tenkého střeva**

Perorální podávání je nejčastějším způsobem podávání léků, protože dávkování je pohodlné a neinvazivní a mnoho léků se dobře prostřednictvím gastrointestinálního traktu vstřebává. Kromě toho, že střevní enterocyty napomáhají absorbovat živiny a rozpuštěné látky ze střevního lumen, tvoří selektivní bariéru pro xenobiotika. Tato bariérová funkce je ovlivněna krom jiného také membránovými transportními systémy. Míra absorpce střevním epitelem je proto důležitým faktorem pro určení biologické dostupnosti xenobiotik (Chan et al., 2004).

Jak už bylo výše zmíněno, existují dvě hlavní cesty, kterými mohou xenobiotika procházet střevním epitelem, paracelulární nebo transcelulární. Řada malých hydrofilních, ionizovaných molekul je absorbována prostřednictvím paracelulární dráhy. Absorpce touto cestou je však obecně nízká, protože mezibuněčná těsná spojení omezují volný transepiteliální pohyb mezi epiteliálními buňkami. Transcelulární absorpce z lumen do krve vyžaduje absorpci přes apikální membránu, následovanou transportem přes cytosol, poté následuje přechod přes bazolaterální membránu a do krve. Mnoho perorálně podávaných xenobiotik je lipofilních a podléhá pasivní transcelulární absorpci. Ty, které procházejí apikální membránou, mohou být substráty pro apikální efluxní transportéry, které transportují sloučeniny zpět do lumen. Ve střevě se vyskytují zástupci transportérů dvou nadrodin SLC a ABC a jsou umístěny tak, aby fungovaly jako první obranná linie při absorpci potenciálně toxických sloučenin. (Chan et al., 2004).

### 3.3 Membránové transportéry SLC a ABC

Molekuly léčiv mohou procházet membránami pasivní difuzí nebo za pomoci transportních procesů. Membránový transport lze rozdělit na facilitovaný a aktivní. Facilitovaný transport probíhá prostřednictvím transportérů, které umožňují průchod rozpuštěných látek (např. glukóza, aminokyseliny, močovina) přes membrány po jejich elektrochemickém gradientu a bez potřeby dodání energie. Opakem je aktivní transport, který pro transport látek přes membránu energii vyžaduje. Energie může být buď získána z hydrolýzy ATP, nebo díky iontovému gradientu (Hamman et al., 2007).

#### 3.3.1 SLC transportéry

SLC tvoří druhou největší rodinu membránových proteinů. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 40-90 kDa a obsahují 300-800 aminokyselinových zbytků (Estudante et al., 2013). Transportéry SLC se nacházejí v buněčných membránách ledvin, jater a střev a umožňují transport molekul jako jsou cukry, aminokyseliny, anorganické ionty, neurotransmitery, hormony, vitamíny a léky do buněk (Rives et al., 2017).

SLC transportéry fungují tak, že využívají rozdílných koncentrací iontů na obou stranách membrány. Transport substrátů probíhá buď pomocí facilitované difúze nebo sekundárně aktivního transportu. To znamená, že substráty přecházejí přes membránu pomocí elektrochemického gradientu anebo využívají iontového gradientu generovaného za pomoci ATP dependentních iontových pump (L. Lin et al., 2015).

V tenkém střevě jsou SLC transportéry hlavními influxními transportéry podílející se na absorpci, distribuci i eliminaci léčiv. Mezi nejdůležitější podrodiny, které mají vliv na absorpci léčiv řadíme SLC22, SLC15 a SLCO. V tenkém střevě jsou nejčastěji zmiňovány dva typy SLCO transportérů: OATP2B1 a OATP1A2 (OATP, z angl. Organic Anion Transporting Polypeptid) (Zař et al., 2008).

OATP2B1 transportér je lokalizován v epiteliálních buňkách tenkého střeva a je zodpovědný za transport jak endogenních látek (např. steroidní hormony), tak xenobiotik (Zař et al., 2008).

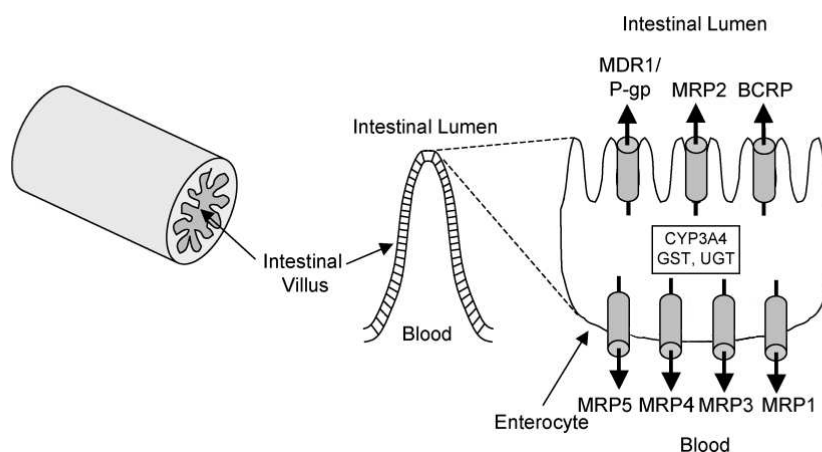
OATP1A2 transportér se nachází v enterocytech a podílí se na transportu mnoha endogenních látek (např. bilirubin). Dále může také transportovat řadu léčiv, jako jsou např. statiny nebo antibiotika (Zaïr et al., 2008).

### 3.3.2 ABC transportéry

Nadrodina ABC transportérů zahrnuje celkem 48 členů (Locher, 2009). Tyto membránové transportéry jsou rozřazeny do 7 podrodin (A-G), podle sekvence aminokyselin, genové struktury a organizaci domén. Tyto transportéry mají hmotnost 140-180 kDa a obsahují 1200-1500 zbytků (Estudante et al., 2013). Jsou exprimovány převážně v játrech, ledvinách, mozku a ve střevě (Liu, 2019).

Obecně lze říct, že ABC transportéry jsou třídou membránových efluxních transportérů ovlivňující širokou řadu procesů. Podílejí se na přenosu iontů, cukrů, aminokyselin, vitamínů, lipidů a xenobiotik až po větší molekuly, jako jsou oligosacharidy nebo oligopeptidy. Jejich role je významná i při příjmu živin, transportu lipidů a v neposlední řadě ovlivňují i genovou expresi (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). Transportéry, lokalizované na apikální straně membrány, jako je P-glykoprotein (P-gp, ABCB1), Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2, ABCC2) nebo Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2), se podílejí na i na mnohočetné lékové rezistenci a jsou tak považovány za první linii obrany proti toxickým látkám (viz Obr. 1) (Liu, 2019). Dysfunkce těchto transportérů může být důvodem k různým genetickým onemocněním jako např. cystická fibróza nebo Stargardtova choroba (Stefková et al., 2004).

Transport substrátů probíhá proti koncentračnímu gradientu pomocí energie získané z hydrolýzy ATP. Jejich struktura je tvořena čtyřmi doménami, které jsou součástí jednoho polypeptidového řetězce, tzv. celé transportéry. Zahrnuje dvě transmembránové domény (TMD) a dvě nukleotidové vazebné domény (NBD). TMD jsou tvořeny hydrofobními helixy a nacházejí se v membráně. Zprostředkovávají vazbu substrátu a jeho přenos přes membránu. NBD, které jsou na cytoplazmatické straně membrány buňky, na sebe váží ATP a umožňují přenos substrátu pomocí hydrolýzy ATP (Hollenstein et al., 2007).



Obr. 1 Schematický řez tenkým střevem, na kterém je enterocyt se střevními klky, lumen střeva. P-gp(MDR1)-P-glykoprotein, MRP1,2,3,5-Multidrug resistance protein 1,2,3,5. BCRP- Breast cancer resistance protein, CYP3A4-Cytochrom P450, GST-Glutathion S-transferase, UGT-UDP-glucuronosyltransferase. Upraveno a převzato z (Choudhuri & Klaassen, 2006)

### 3.3.3 P-glykoprotein (ABCB1)

P-gp je membránový protein o velikosti 170 kDa, který funguje jako energeticky závislá pumpa, která využívá ATP k efluxu látek z buněk. Je tvořen typickou strukturou pro transportéry obsahující dvě jednotky TMD a dvě jednotky NBD viz. Obr. 2 (Hollenstein et al., 2007). Je řazen mezi ABCB podrodinu v rámci nadrodiny ABC transportérů (Ceckova-Novotna, Pavek and Staud, 2006).

Nachází se převážně ve tkáních, které mají vylučovací nebo bariérovou funkci. Jedná se o apikální membránu tenkého střeva, hematoencefalickou bariéru, hepatocyty a proximální tubuly ledvin (J. H. Lin & Yamazaki, 2003).

Pokud se zaměříme na střevo, tak můžeme pozorovat odlišnou expresi P-gp v jednotlivých částech střeva. Bylo zjištěno, že hladina P-gp se zvyšuje směrem od duodena k tlustému střevu. Nejnižší koncentrace P-gp byla v duodenu a nejvyšší v ileu (Bruyère et al., 2010). Jelikož je hladina P-gp v proximální části tenkého střeva nižší oproti distální části, je proximální část střeva vhodnějším místem pro absorpci léčiv, které jsou substráty P-gp.



Další studie prokázala, že vliv na expresi P-gp ve střevě má i pohlaví. U mužů byla prokázána vyšší exprese P-gp v jejunu a ileu o 35 % oproti ženskému pohlaví (Mai et al., 2021).

V tenkém střevě hraje P-gp důležitou roli v ochraně organismu před řadou toxických sloučenin. To však může způsobovat a často způsobuje komplikace u perorálně podávaných léčiv, které jsou substrátem tohoto transportéru. Výsledkem je pak snížení střevní absorpce a biologické dostupnosti (Mora Lagares et al., 2019).

Krom toho, že celá řada léčiv je substrátem P-gp, tak také samotná funkce P-gp může být léčivou ovlivněna. Některá léčiva vystupují ve vztahu k P-gp jako inhibitory, některá jako induktory. V obou těchto případech může být následně ovlivněna farmakokinetika, účinnost i bezpečnost spolupodávaných léčiv (Kim, 2002).

### **3.3.3.1 P-gp substráty**

P-gp je schopen transportovat velmi širokou škálu chemicky a strukturně rozmanitých sloučenin. Substráty P-gp jsou obvykle organické molekuly s velikostí přibližně od 200 Da do 1900 Da. Většina z nich je nenabitých nebo slabě bazických, ale mohou být i kyselé povahy. Do skupiny substrátů P-gp spadá celá řada léčiv. Jedná se například o inhibitory HIV-proteáz, antibiotika, opioidy nebo antiemetika, (Ceckova-Novotna et al., 2006).

### **3.3.3.2 P-gp inhibitory**

Je obecně známo, že efluxní transportéry jako P-gp mohou snižovat vstřebání léčiv a tím ovlivnit jejich farmakokinetiku a bezpečnostní profil. Následující léčiva inhibují funkci P-gp, což způsobí zvýšení sérové koncentrace P-gp substrátů a jejich biologické dostupnosti a zároveň dojde ke snížení jejich eliminace. Důsledkem pak může být zvýšení nežádoucích účinků těchto substrátů (Kim, 2002).

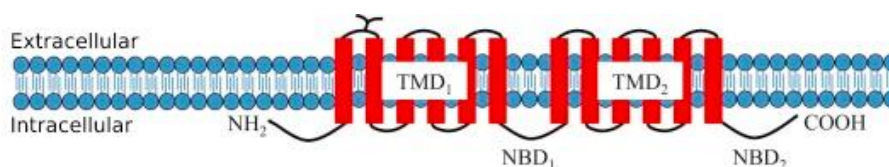
Mezi nejvíce známé inhibitory P-gp můžeme zařadit verapamil, amiodaron, karvedilol, dronedaron, cyklosporin A, klaritromycin, quinidin a ketokonazol (Liu, 2019).

### **3.3.3.3 P-gp induktory**

Jak již bylo zmíněno, P-gp má hlavní roli při eliminaci léčiv. P-gp ve střevě působí prostřednictvím efluxu léčiva z enterocytů zpět do střevního lumen, čímž se prodlužuje doba setrvání léčiva v lumen a snižují se průměrné koncentrace léčiva v enterocytech. Avšak může

docházet i k opačnému procesu, který nazýváme indukce. Díky ní se zvyšuje exprese P-gp ve střevě a u substrátů pak dochází k negativnímu ovlivnění. U silné indukce P-gp může docházet až k selhání terapie. Exprese P-gp i detoxikace mnoha xenobiotik během perorální absorpce je regulována pomocí pregnanového X receptorem (PXR). PXR je vysoce promiskuitní jaderný receptor, který hraje roli nejen v regulaci exprese P-gp, ale i mnoha dalších transportérů a xenobiotika metabolizujících enzymů. Vazbou přes PXR dochází ke zvýšené transkripci P-gp u léčiv jako např. rifampicin (RIF), nelfinavir, dabigatran nebo midazolam (Lutz et al., 2018).

Induktorem P-gp je také glukokortikoidní receptor (GR), který dokáže zvyšovat jeho expresi ve střevě i játrech. GR dokáže indukovat P-gp dvěma mechanismy. Prvním z nich je přímá interakce GR s genem *ABCB1*, která vede ke zvýšení transkripce genů pro P-gp. Druhým mechanismem je interakce GR s transkripčními faktory (např. nukleární faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)), které mají schopnost stimulovat expresi P-gp. Výsledkem obou mechanismů je aktivace genů pro P-gp a zvýšení produkce enzymu. Interakce mezi GR a P-gp jsou velmi komplexní a stále se zkoumají. Mezi faktory, které mohou ovlivňovat tuto interakci patří např. polymorfismy v genech pro GR nebo P-gp (Martin et al., 2008).



Obr. 2 Schéma struktury P-gp transportéru. NH<sub>2</sub> = N-konec proteinu, COOH = C – konec proteinu, NBD = Nukleotid vázající doménu, TMD = transmembránová doména. Upraveno a převzato z (Chen et al., 2016)

### 3.3.4 Multidrug resistance protein (MRP (ABCC))

MRP, podrodina C rodiny transportérů ABC, obsahuje 9 proteinů (MRP1-9), z nichž pouze MRP1-5 souvisí s membránovým transportem látek. Jejich lokalizace byla potvrzena u člověka jak v tenkém, tak v tlustém střevě (Lu et al., 2022). Exprese těchto transportérů na lumenální straně enterocytů umožňuje eflux xenobiotik zpět do lumen střeva a tím dochází ke snížení absorpce daného xenobiotika. Ve střevě je do lumen střeva orientován pouze jeden zástupce a to MRP2. Ostatní zástupci z rodiny MRP (1,3,4,5) jsou lokalizováni ve střevě na

basolaterální straně (Choudhuri & Klaassen, 2006). Struktura těchto transportérů je znázorněna na Obr. 3.

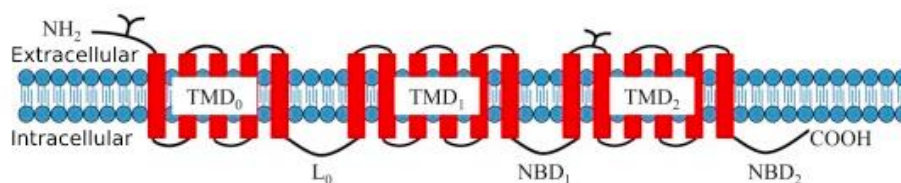
MRP1 je nejvíce rozšířeným transportérem v lidském těle. Nachází se ve střevě, v játrech, ledvinách, varlatech, vaječniku nebo plicích. MRP1 je exprimován na bazolaterální straně epitelových buněk a jeho funkcí je eflux xenobiotik přes buněčnou membránu za pomoci ATP (Sodani et al., 2012).

MRP2 je exprimován na apikální straně membrány buněk, jako jsou hepatocyty, renální proximální tubuly a střevní epitel. MRP2 zprostředkovává transport pro organické ionty, které jsou často konjugovány s glutathionem, glukuronátem nebo sulfátem (Sodani et al., 2012). Hraje tak roli v detoxikaci a lékové rezistenci u metotrexátu a snižuje biodostupnost perorálně podávaných beta-blokátorů a chinolonových antibiotik tím, že transportuje léčiva ze střevních buněk zpět do lumen (Kato *et al.*, 2009). Exprese MRP2 je v tenkém i tlustém střevě téměř shodná. V tenkém střevě jeho množství klesá od jejunu k ileu (Mottino et al., 2000).

MRP3 se nachází v bazolaterální membráně polarizovaných buněk ledvin, tenkého i tlustého střeva, slinivce a žlučníku. Má podobnou substrátovou specifitu jako MRP1 a MRP2, ale jeho afinita k těmto substrátům je o něco nižší. Je efluxním transportérem pro sloučeniny konjugované s glutathionem a glukuronátem, ale na rozdíl od MRP1 a MRP2 zprostředkovává transport i konjugovaných a nekonjugovaných žlučových kyselin (Choudhuri & Klaassen, 2006).

MRP4 je specifický tím, že je lokalizován na apikální (např. proximální tubuly ledvin) i bazální (např. hepatocyty nebo střevo) membráně buněk. Funguje jako efluxní transportér pro endogenní a xenobiotické organické anionty společně s jejich metabolity II. fáze (např. konjugace s glutathionem). Je známá řada substrátů, mezi které řadíme antivirotika (adefovir, tenofovir, ganciklovir), antibiotika (cefalosporiny) nebo cytostatika (metorexát, topotekan) (Sodani et al., 2012).

MRP5 je exprimován v bazolaterální membráně buněk střeva, jater, ledvin a kosterní svaloviny (Choudhuri & Klaassen, 2006). Jediným známým substrátem, který je transportován MRP5 je 5-fluorouracil. Jeho struktura je podobná nukleosidům, pro které je MRP5 efluxním transportérem (Sodani et al., 2012).



Obr. 3 Schéma struktury MRP transportéru.  $NH_2$  = N-konec proteinu,  $COOH$  = C-konec proteinu, NBD = Nukleotid vázající doménu, TMD = transmembránová doména. Upraveno a převzato z (Chen et al., 2016)

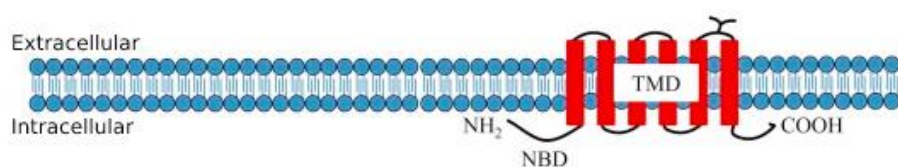
### 3.3.5 BCRP (ABCG2)

BCRP je druhým členem podrodiny G nadrodiny ABC (ABCG2) (Lu et al., 2022). Tento lidský protein je tzv. poloviční transportér, což znamená, že obsahuje pouze jednu NBD s jednou TMD (Chen et al., 2016). Základní struktura viz Obr. 4. Je vysoce exprimován na apikální straně enterocytů. Podobně jako v případě P-gp, ani u BCRP není exprese ve střevě všude stejná. Nejvyšší exprese BCRP byla zjištěna v duodenu a tlustém střevě. Dále pak koncentrace kontinuálně klesala od proximálního k distálnímu tračníku (Lai, 2013).

Stejně jako předchozí dva zástupci ABC efluxních transportérů ve střevě, tak i BCRP může ovlivňovat absorpci, distribuci a eliminaci léčiv. Zároveň slouží jako ochrana střevního epitelu před některými toxickými xenobiotiky (Mao and Unadkat, 2015).

Substrátová specifita BCRP je široká a mnoho substrátů se do určité míry překrývá s transportéry P-gp a MRP (Lai, 2013).

Mezi substráty BCRP patří například antracykliny, antraceny nebo také pantoprazol. K inhibitorům BCRP řadíme inhibitory HIV – proteázy, tamoxifen nebo omeprazol (Mao, 2005).



Obr. 4 Schéma struktury BCRP transportéru.  $NH_2$  = N-konec proteinu,  $COOH$  = C-konec proteinu, NBD = Nukleotid vázající doménu, TMD = transmembránová doména. Upraveno a převzato z (Chen et al., 2016)

## 3.4 Metabolismus xenobiotik

Metabolismus xenobiotik je proces, při kterém dochází k přeměně cizorodých látek (xenobiotik) na látky jednodušší, které tělo dokáže snadno vyloučit. Tento proces se skládá z několika fází a probíhá v játrech, ledvinách a tenkém střevě (Schwenk, 1988).

K metabolismu xenobiotik může docházet prostřednictvím biotransformačních a konjugačních reakcí. Metabolismus xenobiotik rozdělujeme do dvou fází (Zhou, 2008).

V I. fázi biotransformace dochází k modifikaci xenobiotika pomocí reakcí jako jsou oxidace, hydroxylace, redukce nebo hydrolýza. Při těchto reakcích jsou zavedeny, nebo odhaleny funkční skupiny, které umožní konjugační reakce ve II. fázi. Mezi enzymy podílející se na této fázi patří rodina CYP, nejčastěji CYP3A4 a CYP2D6. Dále pak aminooxidázy, alkohol– a aldehyd – dehydrogenázy, xantinoxidázy, peroxidázy, reduktázy a hydrolázy (Zhou, 2008).

Ve II. fázi dochází ke vzniku hydrofilních neaktivních sloučenin, kdy je na sloučeniny napojen zbytek rozpustný ve vodě, jako je glukuronid, sulfát nebo glutathion, a dojde k vytvoření konjugátu. Výsledný produkt je výrazně hydrofilnější, než původní léčivo a většinou postrádá biologickou aktivitu. V takovéto formě je vyloučeno často pomocí transportérů, které se nacházejí v játrech a ledvinách do žluči, resp. moči (Schwenk, 1988).

### 3.4.1 Biotransformační enzymy z rodiny Cytochromu P450

Existuje několik rodin biotransformačních enzymů, z nichž nejznámější je nadrodina cytochromu P450 (CYP), která je klíčová pro metabolismus jak endogenních látek, tak mají její zástupci významnou roli v metabolismu xenobiotik. Enzymy se dále dělí do jednotlivých podrodin (Lynch & Price, 2007). Nejrozšířenější podrodinou v rámci CYP je podrodina CYP3A, která obsahuje čtyři isoformy CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43 (Zhou, 2008).

CYP3A4 je dominantním enzymem celé rodiny CYP3A, který se účastní I. fáze metabolismu xenobiotik v játrech a ve střevě (Zhou, 2008). CYP3A5 je exprimován převážně v játrech a ve střevě. V menším množství jej nalezneme také prostatě a ledvinách. Podílí převážně na metabolismu imunosupresiv (např. takrolimu, cyklosporinu nebo sirolimu) (Rodriguez-Antona et al., 2022). CYP3A7 je exprimován hlavně v játrech novorozenců a v menší míře také v jejunu, plicích a ledvinách. Katalyzuje řadu xenobiotických reakcí

a podílí se na rovnováze steroidních hormonů v těle (H. Li & Lampe, 2019). CYP3A4 je detekován v játrech, ledvinách, střevě, slinivce a prostatě, avšak jen v nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu se nepředpokládá, že by měl významně zasahovat do metabolismu xenobiotik (Westlind et al., 2001).

Pokud se zaměříme na tenké střevo, tak v něm má největší zastoupení právě rodina CYP3A (82 %), na druhém místě je CYP2C9 (14 %) a třetí je CYP2C19 (2 %), následuje CYP2J2 (1,4 %) a poslední je CYP2D6 (0,7 %). Největší koncentrace CYP3A (CYP3A4 a 3A5) a CYP2C9 byla detekována v částech tenkého střeva ilea a jejunu (Paine et al., 2006).

### **3.4.1.1 CYP3A4**

Lidský cytochrom P450 (CYP) 3A4 z podrodiny CYP3A je tvořen aminokyselinovým řetězcem o délce přibližně 503 zbytků, které jsou uspořádány v jednom polypeptidovém řetězci. Vnitřní struktura enzymu obsahuje tzv. aktivní zónu, která umožňuje enzymu navázat se na substráty a katalyzovat jejich metabolismus (Manikandan & Nagini, 2018). CYP3A4 je nejrozšířenější jaterní a střevní enzym I. fáze a je velmi důležitý, protože metabolizuje přibližně 50 % všech xenobiotik. Hraje významnou roli v lékových interakcích (Zhou, 2008). Tyto interakce mohou vést k výskytu jak nežádoucích účinků léčiva, tak v opačném případě ke snížení plazmatické hladiny léčiva, resp. poklesu jeho hladiny v cílové tkáni na subterapeutickou úroveň. Tyto interakce vyplývají z faktu, že řada látek má schopnost inhibovat aktivitu některých CYP a jiné látky mohou naopak indukci CYP vyvolat (Pelkonen et al., 2008).

Inhibitory blokuji metabolickou aktivitu jednoho nebo více CYP450 enzymů. Míra, do jaké inhibitor ovlivňuje metabolismus léčiva, závisí na faktorech jako je dávka a schopnost inhibitoru vázat se na enzym. Účinky inhibitoru se obvykle projeví okamžitě. Mezi tyto inhibitory patří klarithromycin, diltiazem, erythromycin, grapefruitový džus, itraconazol, ketokonazol, ritonavir, telithromycin, verapamil (Lynch & Price, 2007).

Induktory zvyšují aktivitu enzymu CYP3A4 tím, že zvyšují jeho expresi. Na rozdíl od metabolické inhibice zde dochází ke zpoždění, než se aktivita enzymu zvýší. Mezi nejlépe popsané induktory řadíme RIF, fenytoin, fenobarbital, třezalku a karbamazepin (Lynch & Price, 2007). Tato skutečnost je molekulární podstatou jednoho z typů farmakokinetických interakcí na základě metabolismu zprostředkovaného CYP3A4. Důsledkem tohoto typu interakcí je snížení hladiny metabolizované látky a vzrůst hladiny metabolitu (Pelkonen et al., 2008).

Kvůli překrývání substrátové specifity mezi CYP3A4 a P-gp a kvůli podobnostem inhibitorů a induktorů CYP3A4 a P-gp mají mnoho společných lékových interakcí (Wacher et al., 1995).

### **3.4.2 Synergické působení P-gp a CYP 3A4**

Biologická dostupnost po perorálním podání může být omezena synergickým působením CYP3A a P-gp. Vzhledem k jejich společnému umístění v tenkém střevě v enterocytech a významnému překrývání jejich substrátových specifit lze říci, že jsou příčinou snížené perorální biologické dostupnosti substrátů pro CYP3A a P-gp (Wacher et al., 1995). CYP3A4 a P-gp mohou být také indukovány nebo inhibovány mnoha stejnými sloučeninami, jelikož hlavní regulační dráhy těchto dvou proteinů jsou, i přes některé spekulace, společné. Umístění P-gp, který se nachází na apikální plazmatické membráně a CYP3A4, který se nachází v endoplazmatickém retikulu v enterocytu může způsobit, že P-gp bude ovlivňovat přístup léčiv k intracelulárnímu metabolismu pomocí CYP3A4 (Kivisto et al., 2004).

Nepřímým důkazem společného působení CYP3A4 a P-gp je studie prováděná na zdravých dobrovolnících, ve které byl pomocí perfúzního katetru aplikován chinidin do tenkého střeva, který je substrátem CYP3A4 i P-gp. Plazmatická koncentrace léčiva chinidinu byla v důsledku efluxu zprostředkovaného P-gp a metabolismu zprostředkovaného CYP3A4 ve střevní stěně snížena a toto snížení korelovalo s množstvím těchto proteinů ve střevě. Jednalo se o tzv. negativní korelaci, kdy vyšší množství proteinu bylo spojeno s nižší hladinou chinidinu (Kivisto et al., 2004).

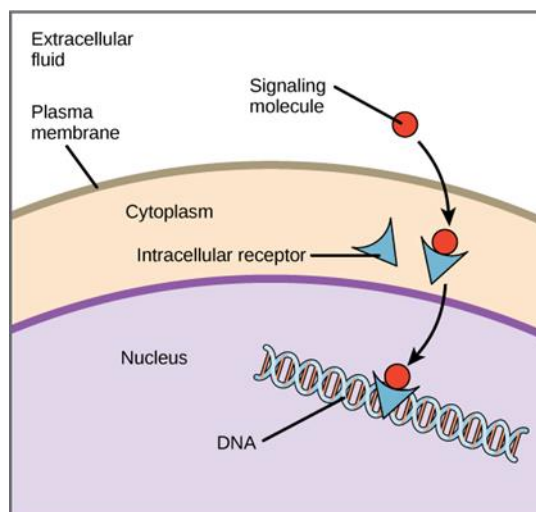
### 3.5 Intracelulární receptory

Genová exprese je komplexní proces, při kterém dochází k vytvoření funkčního proteinu z informace zakódované v genu. Proces zahrnuje transkripci, zpracování messengerové RNA (mRNA) a translace. Transkripce je proces přepisu informace z DNA do mRNA za účasti DNA dependentní RNA – polymerázy. V dalším kroku dojde ke zpracování mRNA, odstranění intronů a spojení exonů, a přepisu do formy proteinu, který probíhá v ribozomech. Na konci syntézy dojde k uvolnění proteinu z ribozomu a následně dochází již k posttranslačním modifikacím v buňce (Kapp and Lorsch, 2004). Samotná genová exprese neprobíhá náhodně a je v řadě případů řízena prostřednictvím intracelulárních receptorů (Robinson-Rechavi et al., 2003).

Intracelulární receptory (IR) jsou receptorové proteiny, které se nacházejí v cytoplazmě nebo jádře buňky. Váží se na ně různé endogenní molekuly jako jsou hormony, steroidy nebo vitamíny a ovlivňovat biologické procesy (vývoj buněk, imunitní odpověď, metabolismus). Regulace těchto procesů probíhá pomocí genové exprese, která je aktivována IR. IR mají schopnost aktivovat genovou expresi tím, že se na ně vážou specifické ligandy, viz Obr. 5. Vazba ligandu na receptor změni jeho tvar nebo aktivitu a umožní tak přenést signál nebo vyvolat změnu přímo uvnitř buňky. Například steroidní hormony se vážou na intracelulární receptory v jádře buněk a umožňují změny v transkripčních aktivitách, což vede k produkci proteinů, které jsou důležité pro různé fyziologické procesy (Robinson-Rechavi et al., 2003).

Mezi nejznámější signální molekuly interagující s intracelulárními receptory patří steroidní hormony (kortisol, estradiol, testosteron) a thyroïdní hormony (thyroxin) (Rye et al., 2016).





*Obr. 5 Procesy signálních molekul difundujících přes plazmatickou membránu a následná interakce s intracelulárními receptory v cytoplasmě, převzato z (Rye et al., 2016)*

### **3.5.1 Rozdělení intracelulárních receptorů**

IR patří do rodiny transkripčních faktorů, nadrodiny proteinů vážících DNA. Jedná se o proteiny umístěné uvnitř buňky, které se podílí na regulaci fyziologických procesů, jako jsou např. metabolismus, zánět nebo cirkadiánní rytmus (Weikum et al., 2018). Po aktivaci navázáním agonisty se přemístí do jádra buňky a rozpoznají specifická vazebná místa podél chromozomální DNA. Jakmile jsou tato místa aktivována, může dojít ke změně genové exprese (Raymon, 2013). Signální dysregulace intracelulárních receptorů může mít za následek metabolické poruchy nebo vést k zánětlivým onemocněním (Weikum et al., 2018).

Látky, včetně léčiv, které ovlivňují genovou expresi prostřednictvím vazby na intracelulární receptory, mají nejen pomalý nástup účinku (může trvat hodiny nebo dny), ale také mnohem delší dobu působení, pravděpodobně trvajících déle, než je samotná přítomnost léčivé látky v organismu (Raymon, 2013).

IR se aktuálně rozděluje do sedmi podrodin (Weikum et al., 2018).

Podrodina 0 obsahuje atypické intracelulární receptory, které neobsahují ligand vázající doménu. Patří sem např. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) nebo GPR55 (Weikum et al., 2018).

Do podrodiny 1 patří receptory retinoidů, tyroxinu, vitamínu D, jaterní X receptory, receptory aktivovány peroxisomovým proliferátorem (PPAR) a PXR (Weikum et al., 2018).

Podrodina 2 obsahuje pouze tři receptory. Retinoidní X receptor (RXR), upstream promotor transkripčního faktoru kuřecího ovalbuminu (COUP-TF) a jaterní nukleární faktor (HNF4) (Weikum et al., 2018).

Podrodina 3 zahrnuje steroidní receptory mezi které patří androgenní receptor (AR), estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), mineralokortikoidní receptor (MR) a GR, na který se níže zaměříme podrobněji (Weikum et al., 2018).

Podrodina 4 obsahuje sirotčí nukleární receptory, které jsou důležité pro funkci neuronů. Patří sem nukleární receptor pro nervový růstový faktor 1B (NGF1-B), faktor 1 související s nurr (NURR1) a sirotčí receptor-1 odvozený od neuronů (NOR-1) (Weikum et al., 2018).

Do podrodiny 5 řadíme steroidogenní faktor 1 (SF-1) 50 a jaterní receptor Homolog-1 (LRH-1), které jsou nezbytné pro metabolismus a vývoj (Weikum et al., 2018).

Poslední podrodina 6 obsahuje pouze nukleární faktor zárodečných buněk (GCNF), který má od ostatních odlišnou ligand vázající doménu a podílí se na snižování aktivity genů (gene silencing) (Weikum et al., 2018).

### **3.5.2 Pregnanový X receptor**

PXR je jaderný receptor, který se vyskytuje převážně v játrech, ale také v tenkém střevě. Reguluje expresi genů, které mají na starost metabolismus xenobiotik. V podstatě se podílí na odstraňování xenobiotik a endotoxinů z těla. Zatímco některé jaderné receptory jsou specifické pro hormony, jako např. ER, PXR se od ostatních jaderných receptorů liší tím, že se specializuje na látky, které jsou metabolizovány v játrech a ve střevě (Kota et al., 2010).

Tento receptor má ale i spoustu dalších úloh. PXR se účastní mnoha buněčných procesů. Je důležitý při buněčné proliferaci, buněčné migraci, apoptóze, při poškození DNA a při zánětu. Když dojde k zánětu v tenkém střevě, PXR hraje roli při udržování celistvosti střevní stěny. PXR je zapojen i do procesu apoptózy. Zde bylo pozorováno, že aktivátory PXR, například dexametazon (DEX), inhibují spontánní apoptózu v primárních kulturách hepatocytů zvýšením regulace antiapoptotických proteinů v lidských hepatocytech (Oladimeji & Chen, 2018).

PXR je zodpovědný za indukci enzymů CYP2B6 nebo CYP3A4. Tyto enzymy se podílejí na metabolismu až 80 % v současnosti podávaných léčiv. Indukce těchto enzymů tak způsobí zvýšenou metabolickou přeměnu léčiv, a tím potenciálně dojde ke snížení nebo ztrátě jejich účinku (Sinz, 2013).

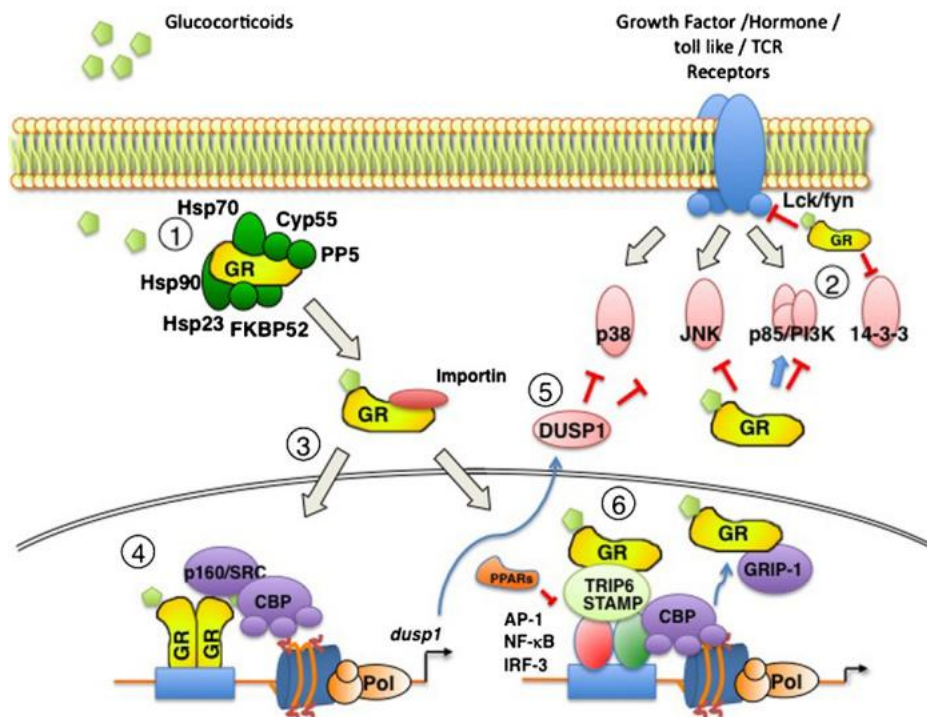
Důležitou roli hraje PXR také v indukci efluxních transportérů jako je P-gp. Známým aktivátorem PXR, který zvyšuje expresi P-gp i CYP3A4 je RIF (Martinec et al., 2021). Prostřednictvím PXR zvyšují expresi P-gp a CYP3A4 také například fenobarbital, statiny a třezalka tečkovaná, nebo kyselina valproová (Kullak-Ublick & Becker, 2003; Cerveny et al., 2007).

### 3.5.3 Glukokortikoidní receptor

GR je intracelulární receptorový protein. Jeho genový název je „podrodina jaderných receptorů 3, skupina C, člen 1: NR3C1“ (Nicolaidis et al., 2000). Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční jaderný faktor, který reguluje širokou škálu fyziologických funkcí, ale i metabolismus xenobiotik. Jeho přirozenými ligandy jsou steroidní hormony – glukokortikoidy (GK) (Yudt & Cidlowski, 2002). Na buněčné úrovni je působení glukokortikoidů zprostředkováno právě GR (Baschant & Tuckermann, 2010).

Regulace genové exprese GR může probíhat v jádře různými mechanismy viz Obr. 6. První zahrnuje vazbu dimerizovaného GR na elementy glukokortikoidní odpovědi (GRE) v promotoru genů. Vazba GR na GRE aktivuje nebo potlačuje transkripci genů (Baschant & Tuckermann, 2010).

Druhý způsob regulace transkripce je nezávislý na dimerizaci a vazbě na DNA. GR může interagovat s transkripčními faktory např. NF- $\kappa$ B. Tato vazba umožňuje synergickou nebo antagonistickou interakci s dalšími signálními drahami. Tyto interakce probíhají za přítomnosti kointegrátorů, které zprostředkovávají interferenci GR. Důsledkem tohoto děje je inhibice protizánětlivých genů. Ukázalo se, že existují synergické vazby GR se členy rodiny PPAR, konkrétně PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$ , které potlačují cílové skupiny genů NF- $\kappa$ B, což může zvýšit protizánětlivou účinnost GK, pokud jsou současně léčeny s PPAR ligandy (Baschant & Tuckermann, 2010).



Obr. 6 Molekulární mechanismy glukokortikoidních receptorů, (GR = Glucocorticoid receptor, Hsp 70,90,23 = Heat shock protein 70, 90, 23, dusp1 = dual specificity phosphatase 1, CBP = CREB binding protein), převzato z (Baschant & Tuckermann, 2010)

## **3.6 Glukokortikoidy**

GK jsou steroidní hormony produkované kůrou nadledvin v cirkadiánním rytmu a v reakci na environmentální nebo biologický stres. Jejich syntéza a sekrece jsou řízeny osou hypotalamus – hypofýza – nadledviny. V dospělosti GK regulují širokou škálu biologických procesů včetně energetického metabolismu, srdečního výdeje, zánětlivých procesů a imunity (Busada & Cidlowski, 2017).

### **3.6.1 Glukokortikoidy jako léčiva**

GK, skupina steroidních hormonů, používaná od 50. let 20. století k léčbě bolesti a zánětu u revmatoidní artritidy (RA) i osteoartrózy (OA), onemocnění spojených s degenerací chrupavky a kloubních zánětů (Creamer, 1999).

Na počátku dvacátého století se objevila nová léčba RA pomocí extraktů ze zvířecí kůry nadledvin, která vedla k potřebě většího množství syntetických steroidů. V šedesátých letech 20. století došlo k rychlému pokroku v chemické syntéze glukokortikoidů, které vyústily nejprve v syntetický kortizon, poté v hydrokortizon, fluorohydrokortizon a prednison, prednisolon, triamcinolonu, methylprednisolonu a nakonec DEX, přičemž posledně jmenovaný byl uznán za nejúčinnějšího člena skupiny glukokortikoidů (Burns, 2016).

### **3.6.2 Mechanismus působení glukokortikoidů**

Obecně mají GK protizánětlivé a imunosupresivní účinky, ovlivňují metabolismus sacharidů a bílkovin a blokují uvolňování histaminu. Mají genomický i nengenomický mechanismus účinku (Busada & Cidlowski, 2017).

Genomický mechanismus účinku je zprostředkován přes GR a výsledkem děje je protizánětlivý a imunosupresivní účinek. GR je intracelulární receptor, který se nachází v cytoplasmě a po navázání na ligand se translokuje do jádra, kde ovlivní genovou transkripci a způsobí inhibici genové exprese a translace pro zánětlivé leukocyty. Tento děj zároveň vede ke snížení protizánětlivých cytokinů, chemokinů a adhezních molekul zapojených do procesu zánětlivé reakce (Liu, D. et al., 2013).

Negenomický mechanismus je zprostředkován prostřednictvím interakcí mezi intracelulárním GR nebo membránově vázaným GR. Po aktivaci receptoru se spustí kaskáda dějů, která je kritická pro uvolňování zánětlivých cytokinů. Dojde k narušení uvolňování kyseliny arachidonové a regulaci apoptózy v thymocytech. Ve vysokých koncentracích dokáží GK také inhibovat produkci T – lymfocytů a B – lymfocytů (Liu, D. et al., 2013).

### **3.6.3 Dexametazon**

DEX je silný glukokortikoid s velmi malou mineralokortikoidní aktivitou. Je široce využíván pro své protizánětlivé a imunosupresivní účinky. Působí tak, že potlačuje migraci neutrofilů a snižuje proliferaci lymfocytů. Dále snižuje hladinu vitamínu A, prostaglandinu a některých cytokinů (interleukin-1, interleukin-12, interleukin-18, tumor nekrotizující faktor, interferon-gama a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (Johnson et al., 2022).

#### **3.6.3.1 Farmakokinetika**

Podle označení výrobce je farmakokinetika perorálního DEX úměrná dávce v rozmezí dávek 0,5 až 40 mg. Střední doba dosažení maximálních koncentrací ( $T_{max}$ ) DEX je 1 hodina (rozmezí: 0,5 až 4 hodiny). Dieta s vysokým obsahem tuku a kalorií snížila  $C_{max}$  o 23 %. DEX se in vitro váže na proteiny lidské plazmy asi ze 77 %. Průměrný terminální poločas DEX je 4 hodiny (18 %) a perorální clearance je 15,7 l/hod po jedné dávce DEX. Jeho metabolizace probíhá prostřednictvím CYP3A4, a to zejména v játrech. Vylučován je převážně močí (Johnson et al., 2022).

#### **3.6.3.2 Nežádoucí účinky**

Ačkoli je DEX obecně dobře tolerován, má jako lék své nevýhody. Nejčastěji hlášeným nežádoucím účinkem pacientů je přítomnost nespavosti po použití. Mezi další časté nežádoucí účinky patří akné, poruchy trávení, zadržování tekutin, nerovnováha elektrolytů, přírůstek hmotnosti, zvýšená chuť k jídlu, anorexie, nevolnost, zvracení, akné, neklid a deprese. Byly hlášeny adrenální suprese, arytmie, spermatogenní změny, glaukom, hypokalemie, plicní edém, pseudotumor cerebri a zvýšený intrakraniální tlak (Polderman et al., 2019).

### 3.6.3.3 Lékové interakce na úrovni absorpce z trávicího systému

V prováděných studiích bylo zjištěno, že vysoká dávka perorálně podávaného DEX silně potencuje perorální antikoagulancia (Sellam et al., 2007). Mezi významné lékové interakce patří také DEX a fenytoin. Uvádí se, že je potřeba zvýšit dávku fenytoinu k dosažení terapeutických koncentrací u pacientů, kterým je zároveň podáván DEX (Gattis & May, 1996). Dále bylo zjištěno, že DEX antagonizuje účinek hypoglykemických látek (konkrétně metformin nebo glitazony) (S K et al., 2022).

Indukční účinek DEX byl porovnáván na CYP3A4 a P-gp metabolismu ve střevech potkanů. Jako substrát pro P-gp a CYP3A4 byl použit indinavir. Výsledkem bylo, že DEX snížil biologickou dostupnost a maximální koncentraci indinaviru po perorálním podání. Z toho lze usuzovat, že DEX indukuje střevní P-gp a CYP3A4 (J. H. Lin et al., 1999). Vzhledem k tomu, že nebylo provedeno tolik studií se střevem jako s játry, můžeme si některé interakce na intracelulárních receptorech ukázat na datech získaných z hepatocytů.

Byla zkoumána interakce CYP3A4 a DEX v lidských hepatocytech. Zjistilo, že se DEX způsobuje indukci mRNA CYP3A4 v závislosti na koncentraci DEX. Indukce DEX s nízkou koncentrací (nmol) byla zprostředkována GR, který vedl ke změně exprese PXR a indukci CYP3A4. Indukce DEX s vyšší koncentrací ( $\mu\text{mol}$ ) byla zprostředkována vazbou na PXR, díky které došlo k aktivaci receptoru, který způsobil indukci CYP3A4. Na rozdíl od jiných xenobiotik, DEX má dvojí roli v expresi CYP3A4. Jednak reguluje expresi PXR a za druhé je schopen tento receptor i aktivovat (Pascussi et al., 2001).

## 3.7 Metody studia vlivu léčiv na střevní bariéru

Bylo vyvinuto mnoho různých modelů, které zkoumají vliv P-gp na farmakokinetiku léčiv ve střevě. Můžeme je rozdělit na *in situ*, *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo*.

### 3.7.1 *In vivo* metody

Tato metoda zkoumá vliv léčiva na střevní bariéru přímo v živém organismu, do kterého je léčivá látka podána perorálně, nebo přímo do střeva či žaludku. Metoda přináší nejrelevantnější informaci o celkovém vlivu léčiva na organismus. *In vivo* metoda zahrnuje fyziologické faktory jako jsou motilita střev, efekt prvního průchodu nebo vyprazdňování žaludku. Výhodou je také možnost léčiva podávat dlouhodobě. *In vivo* metody jsou však na své provedení poměrně komplikované a z jednoho jedince lze získat jen omezené množství informací (Dahlgren et al., 2018).

### 3.7.2 *In situ* metoda

*In situ* metoda je založená na intestinální perfúzi a využívá se zejména pro hodnocení přestupu léčiva přes střevní bariéru včetně zapojení transportérů a střevní biotransformace léčiva (van de Kerkhof et al., 2007).

U *in situ* střevní perfúze potkanů jsou vzorky získány z mezenterické žíly. Díky tomu lze hodnotit absorpci léčiv přes střevní bariéru včetně zapojení transportérů (Caldeira et al., 2018). Nevýhodou metody je její technická náročnost a pracnost a také potřeba velkého množství zvířat (van de Kerkhof et al., 2007). Navíc modely, které jsou odvozeny od laboratorních zvířat snižují přesnost pro předpověď absorpce u člověka vzhledem k druhovým rozdílům v expresi P-gp (M. Li et al., 2017).

Touto metodou lze zkoumat vliv transportérů na přestup léčiv *in situ* také pomocí perfúze lidského střeva. Výhodou metody je, že fyziologie a průtok krve jsou zachovány, ale je málo využívána z etických důvodů a nízkého počtu zdravých dobrovolníků (van de Kerkhof et al., 2007).



### 3.7.3 *In vitro* metoda

V současné době zůstávají široce používány ke stanovení biologické dostupnosti perorálně podávaného léčiva 2D kultivační systémy, zejména kvůli jejich nízkým nákladům, vysoké reprodukovatelnosti a snadné manipulaci (Fedi et al., 2021).

2D *in vitro* modely běžně používané ve farmakologii lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: syntetické modely založené na lipidických membránách, které nabízejí velkou reprodukovatelnost a stabilitu. Jsou využívány zejména ke studiu pasivních difúzních procesů. Druhý model představují kultury založené na buňkách, které jsou živými a spolehlivějšími systémy umožňujícími širší spektrum analýz střevní absorpce (Fedi et al., 2021).

Jako *in vitro* model pro hodnocení střevní propustnosti léčiv je nejčastěji používána monovrstva buněk Caco-2, odvozená z lidského kolorektálního adenokarcinomu. Tento systém *in vitro* se používá k identifikaci sloučenin, které podléhají efluxu zprostředkovanému P-gp, a následně k popisu toho, jak aktivita efluxu zprostředkovaná P-gp ovlivní transport léčiv přes střevní epitel. Výhodou této metody je, že na apikální straně Caco-2 buněk jsou struktury podobné mikrokřkům, takže dobře simuluje kartáčový lem střeva (Shirasaka et al., 2006). Nevýhodou této metody je její finanční náročnost, nízká exprese PXR a také fakt, že Caco-2 strukturou připomínají spíše epitel tlustého střeva (Sambuy et al., 2005). Je také třeba poznamenat, že exprese a aktivita P-gp může být v buněčných liniích ve srovnání se střevem velmi odlišná. Lze předpokládat, že v případě mnohem vyšší exprese P-gp, která je v buňkách Caco-2 ve srovnání s buňkami lidského střeva, hrozí riziko podhodnocení lidské střevní absorpce při použití této metody (Anderle et al., 1998).

Dalším vhodným modelem pro studii indukce P-gp a CYP3A4 je buněčná linie LS174T. Jedná se o lidskou epiteliální nádorovou linii tenkého střeva, která má vysokou expresi PXR, který zprostředkovává indukci P-gp a CYP3A4. Tato buněčná linie je vhodná pro zkoumání změny exprese, lokalizace a funkce P-gp, které ovlivňují distribuci léčiv ve střevě. Při použití této střevní linie bylo zjištěno, že indukce exprese P-gp je závislá na čase a dávce. K indukci byl použit známý aktivátor PXR RIF. Zároveň byla pozorována změna lokalizace P-gp, která je důležitá pro jeho transportní funkce. Ukázalo se, že RIF způsobil změnu lokalizace P-gp z intracelulární na plazmatickou membránu během 6 dnů. Charakterizace těchto vlastností v buněčné linii LS74T tak umožňuje zkoumat efekt PXR agonistů a antagonistů na transport substrátů P-gp a potenciální lékové interakce (Kota et al., 2010).

Další střevní buněčnou linií z adenokarcinomu vhodnou pro zkoumání indukce P-gp a CYP3A4 je LS180 (Kota et al., 2010). Jedná se o relativně snadno dostupnou buněčnou linii vhodnou pro zkoumání indukce CYP3A4 a P-gp zprostředkovanou PXR (Gupta et al., 2008). V porovnání s buněčnou linií Caco-2 vykazuje LS180 rozdílnou expresí cílových genů pro PXR. Zatímco exprese P-gp je podstatně vyšší, exprese CYP3A4 byla v buňkách LS180 nepatrně nižší. Tato linie byla použita například ve studii zkoumající vliv budesonidu na změnu intestinální exprese P-gp a CYP3A4. Po inkubaci s budesonidem byla prokázána zvýšená exprese u CYP3A4 i P-gp, přičemž se předpokládá, že indukce byla způsobena aktivací PXR (Maier et al., 2007).

### 3.7.4 Ultra-tenké střevní řezy (PCIS) – *ex vivo* metoda

Další metodou je použití ultra-tenkých střevních řezů (PCIS). Ty lze připravit ze zvířecích nebo lidských tkání. PCIS má velký potenciál pro studium farmakokinetiky léčiv, protože tato metoda dokáže zachovat aktivitu, funkčnost a životaschopnost tkáně po dobu několika dní inkubace. Tyto vlastnosti jsou důležité při provádění indukčních a toxikologických studií. Mezi výhody patří také efektivní využití tkáně, kdy z relativně malých vzorků lze získat sto a více řezů na jeden experiment (M. Li et al., 2016).

PCIS mohou být připraveny ze všech částí střeva (duodenum, ileum a jejunum a tlusté střevo). Tloušťka řezů se pohybuje v rozmezí 200–400  $\mu\text{m}$ . Na rozdíl od jaterních řezů, tloušťka PCIS neovlivňuje rychlost metabolismu ve střevních řezech, protože enterocyty jsou v přímém kontaktu s médiem (M. Li et al., 2016).

Zpočátku se tato metoda používala pouze pro játra a ledviny. Střevo pro tuto metodu nebylo nejprve vhodné, protože se ukázalo, že je tento orgán velmi obtížné krájet a inkubovat. Navíc velmi rychle ztrácelo svou životaschopnost. Později byla tato metoda modifikována. Střevo zalité do agarózy, která tuhne až při nízké teplotě nižší než 37 °C, bylo možné krájet na řezy potřebné velikosti poměrně snadno. Zároveň došlo k lepší reprodukovatelnosti a životaschopnosti tkáně. Markerem životnosti je hladina ATP, která se v dané tkáni vyskytuje v určité koncentraci (u lidského střeva 2  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein), podle které určíme, zda je tkáň vhodná pro další použití (M. Li et al., 2016).

Tato *ex vivo* metoda je jednoduchá, rychlá, spolehlivá a vhodná pro studium transportu, metabolismu a toxicity léčiv, které jsou substráty střevních transportérů. Hodnocení

transportérů *ex vivo* by mělo přinést přesnější předpovědi pro lékové interakce *in vivo* (M. Li et al., 2016).

Jako každý *ex vivo* a *in vitro* model, má i PCIS své omezení. Tím je vystavení apikální i basolaterální strany střeva stejnému médiu. V důsledku toho nelze pomocí PCIS zkoumat vektorový transport léčiv a jejich permeabilitu (M. Li et al., 2016).

Nedílnou součástí pro funkci tkáně a experimenty prováděné *in vitro* je kvalita tkáně. Střevní tkáň je vysoce citlivá na ischemii, a proto musí být všechny používané pufrы nasycené kyslíkem. Nejběžněji používaným médiem je Krebs – Henseleitův pufr (KHB), nasycený O<sub>2</sub> 95 % a 5 % CO<sub>2</sub> (M. Li et al., 2016).

Tato metoda se ukázala jako možná screeningová metoda inhibičního potenciálu P-gp léčiv. U PCIS je zachována struktura střeva a z malého kousku střeva lze připravit větší množství jednotlivých vzorků. Ve studiích došlo k rozšíření použití tohoto modelu pro inhibici P-gp na lidskou tkáň. Pomocí PCIS z různých částí lidského střeva (dvanáctník, jejunum, ileum a tlusté střevo) bylo možné zkoumat význam regionálních rozdílů v inhibici P-gp v lidském střevě (M. Li et al., 2017). Metoda PCIS byla v nedávné době použita také pro studium indukčního potenciálu léčiv. Při tomto studiu bylo prokázáno, že RIF, modelový induktor P-gp a CYP3A4 je schopen v tomto modelu indukci na molekulární a funkční úrovni vyvolat (M. Li et al., 2016).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Cíle práce

Cílem práce je studium vlivu dexametazonu na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevních řezech připravených z lidského jejunu.

Dílčí cíle:

- Studium vlivu dexametazonu na životnost střevních řezů
- Zjištění vlivu tohoto léčiva expresi *ABCB1*, *CYP3A4*, *GR* za použití metody q-PCR
- Ověření funkce *ABCB1* v neovlivněných a ovlivněných střevních řezech za použití modelového substrátu rhodaminu 123

## 4.2 Chemikálie a reagentia, biologický materiál, přístroje

### Chemikálie a reagentia

2 – propanol	(Sigma-Aldrich)
Acetonitril	(Sigma-Aldrich)
Amphotericin B	(Sigma-Aldrich)
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	(Merck)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	(ThermoFisher Scientific)
CP-100356 monohydrochloride	(Sigma-Aldrich)
D(+)-Glukóza monohydrát	(Merck)
Diethyl pyrokarbonát (DEPC)	(PanReac AppliChem)
Dexametazon	(Sigma-Aldrich)
DMSO	(dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich)
EDTA	(VWR)
Ethanol	(VWR)
TaqMan Gene Expression Assay (FAM) viz. Tab. 1	(ThermoFisher Scientific)

Tab. 1: Použité genové assaye.

Číslo genové assay	Gene symbol
Hs00353740	<i>NR3C1</i>
Hs00184500	<i>ABCBI</i>
Hs00604506	<i>CYP3A4</i>
Hs00984230	<i>B2M</i>

Gentamicin sulfate 50 mg.ml <sup>-1</sup>	(Sigma-Aldrich)
gb Basic Reverse Transcription Kit	(Generi Biotech)
Glycogen	(Roche® Life Science)

Chloroform	(VWR)
Krebs-Henseleitův roztok (viz kapitola 3.3.2)	
Low-gelling-temperature agarose type VII	(Sigma-Aldrich)
TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG	(ThermoFisher Scientific)
NaOH	(Penta Chemicals)
Pierce BCA Protein Assay Kit	(ThermoFisher Scientific)
Rhodamin 123	(Merck)
Rifampicin	(Sigma-Aldrich)
TRI Reagent	(ThermoFisher Scientific)
Tris – HCl	(VWR)
William's E Medium, GlutaMAX™	(ThermoFisher Scientific)

## **Přístroje**

Bio-rad Thermal cyklér T100

Centrifuga s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma (Laborentrifugen, Německo)

Homogenizátor FastPrep-24 5G (MPbio)

Inkubátor (Binder CB 60, napojení na O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> tlakové láhve)

Kráječ tkáňových řezů (Krumdieck tissue slicer MD 4001)

Laminární box (AURA 2000 M.A.C.)

Luminometr Genios Plus (Tecan)

Mini centrifuga (GUSTO, Heathrow Scientific)

Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)

Orbitální třepačka (Biosan PSU i10)

Přípravek pro zalití tkáně do agarózy

Přístroj pro Real-Time PCR QuantStudio 6 (Applied Biosystems)

Spektrofotometr (Tecan Infinite M200 PRO NanoQuant)

Termostat TCH 100

Termální cykler Quant Studio 6 Flex

Třepačka PSU-10i

Vortex (Genie 2, Scientific Industries)

## **Biologický materiál**

Vzorek lidského střeva, proximální část jejuny získaná při operaci typu pankreatoduodenektomii zachovávající pylorus. Vzorek byl získán anonymně na základě podepsaného informovaného souhlasu pacienta. Odběr vzorků byl schválen etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové pod číslem 202103 I67P.

## **Ostatní materiál**

24 jamkové destičky

Stříkačkový membránový filtr

96 jamkové destičky

mikrozkumavky (1,5 a 5 ml; Eppendorf)

mikrozkumavky se závitovým víčkem (2 ml, Sarstedt)

keramické kuličky (1,4-1,6; Ginzell)

opakovací pipeta

multikanálová pipeta

## 4.3 Pracovní postupy

### 4.3.1 Příprava inkubačního média

V laminárním boxu bylo z nové zásobní láhve média Williams E (WME) do sterilní kádinky odebráno menší množství média, ve kterém bylo následně rozpuštěno 1,387 g monohydrátu D-glukózy a nazpátek přefiltrováno přes injekční stříkačku s membránovým filtrem (0,22  $\mu\text{m}$ ) zpět do zásobní lahve WME (500 ml). Toto médium je skladováno v lednici. Do média jsou dále také v laminárním boxu přidány postupně již přímo sterilní antibiotikum Gentamicin (500  $\mu\text{l}$ ; koncentrace 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a antimykotikum Amfotericin B (5 ml; koncentrace 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 4.3.2 Příprava Krebs-Henseleitova pufru

#### Příprava zásobního roztoku Krebs-Henseleitova pufru

V rámci experimentů je třeba větší množství KHB, který se připravuje jako zásobní koncentrovaný. V den použití je pak doplněn o některé další sloučeniny a naředěn. Po rozpuštění všech sloučenin dle rozpisu v tabulce č.2 je roztok přefiltrován přes sterilní filtr (0,22  $\mu\text{m}$ ) a po 100 ml rozplněn do jednorázových sterilních kelímků. Do doby spotřeby je uchováván sterilní v lednici.

#### Příprava 10x koncentrovaného základního Krebs-Henseleitova roztoku

Látky dle Tab. 2 jsou rozpuštěny v 1 l vody. Následně je roztok přefiltrován pomocí PTEE filtru (0,22  $\mu\text{m}$ ;  $\text{Ø}$  25 mm) a uchováván v lednici.

Tab. 2: Příprava 10x koncentrovaného zásobního roztoku Krebs-Henseleitova pufru – rozpis na přípravu 1 litru.

Sloučenina	Navážka / Objem
NaCl	69,0 g
KCl	3,73 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,63 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,71 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,67 g
Doplnit vodou do objemu	1000 ml



### **Příprava pracovního roztoku Krebs-Henseleitova pufru**

Po rozpuštění všech sloučenin dle Tab. č. 2 a doplnění o další látky dle Tab. 3 je roztok 30 minut okysličen pomocí pneumoxidu (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). Následně je upraveno pH roztoku na 7,42 pomocí 5 M NaOH. KHB byl po celou dobu experimentu uchováván na ledu.

Tab. 3: Příprava pracovního roztoku Krebs-Henseleitova pufru – 1x koncentrovaný. Rozpis na přípravu 1 litru.

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

### **4.3.3 Příprava sonifikačního roztoku pro stanovení ATP (SONOP)**

Navážku EDTA (0,372 g) rozpustíme v přibližně 100 ml milliQ vody a pH upravíme pomocí 5 M roztoku NaOH na 10,9. Následně přidáme ethanol (96 %) a objem doplníme v odměrné baňce vodou do 500 ml.

### **4.3.4 Příprava Tris/EDTA pufru pro stanovení hladiny ATP**

Rozpustíme EDTA (6 g) a Tris HCl (0,37 g) v objemu cca 300 ml milliQ vody. Následně upravíme pH pomocí HCl na 7,6 a vodu doplníme do objemu 500 ml v odměrné baňce.

### **4.3.5 Příprava 3 % roztoku agarózy**

Pro přípravu 100 ml 3 % roztoku agarózy je třeba do skleněné lahve navážít postupně 3 g agarózy (Low-gelling-temperature agarose type VII) a 0,9 g NaCl. Následně je přidána milliQ voda a teflonové míchadlo. Směs je zahřata na teplotu cca 80 °C (musí být vyšší

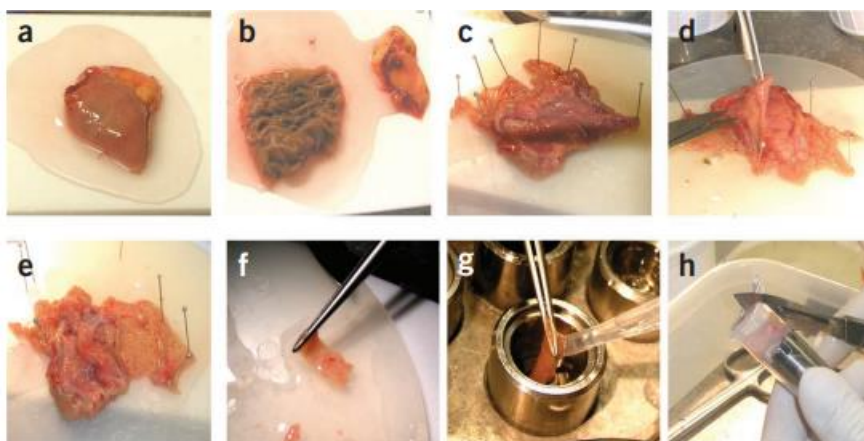
než 60 °C) a následně dojde k rozpuštění agarózy. Agaróza je následně zchlazena na 37 °C (zůstává stále tekutá) a je využita v experimentu. Alternativně může být uložena do lednice pro pozdější použití (nutné opět zahřát na teplotu vyšší než 60 °C pro převedení do tekuté formy).

#### **4.3.6 Příprava ultratenkých intestinálních řezů**

V den experimentu byl nejprve připraven pracovní KHB (4 °C). Ten byl před použitím ještě 0,5 h okysličován probubláváním pneumoxidem (9 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). Následně bylo upraveno pH za pomoci roztoku 5M NaOH na hodnotu 7,42.

Vzorek lidského střeva (horní část jejunu) byl získán od anonymního dárce z Fakultní nemocnice Hradec Králové a poté přeneseno do laboratoře v okysličeném KHB (na ledu, 4 °C).

Následně bylo umístěno na plastovou desku chlazenou ledem, kde došlo k jeho opláchnutí od žluči a krve. Následně byla tkáň podélně rozříznuta a pomocí špendlíků připevněna na silikonovou podložku. Postupně byla odstraněna vrstva svaloviny, která z důvodu tuhosti vadí při přípravě vlastních řezů. Zbytek střeva byl nařezán na malé proužky o velikosti 0,5 x 1 cm a vloženo přípravku pro zalévání vzorků do agarózy, který byl umístěn na ledu. Tkáň byla v přípravku držena za pomoci pinzety vertikálně a zalita agarózou. Ta následně ihned ztuhla a vytvořila tak váleček, který bylo možné vložit do kráječe. Tento postup je znázorněn na Obr. 7. Kráječ byl nastaven na tloušťku řezů 300 μm. Po nakrájení byly řezy vizuálně hodnoceny a vybrány pouze ty s pravidelným tvarem a optimální velikostí. Pomocí pinzety byly zbaveny zbytku agarózy. Řezy byly umístěny na Petriho misce umístěné na ledu. Očistěné řezy byly následně použity pro experiment. Entomologickou pinzetou byly vybrány vhodné řezy a přeneseny do inkubačního média na 24 jamkových destičkách. V jedné jamce bylo napipetováno 1,3 ml WME media s testovanou látkou. Kontroly pak namísto toho obsahovaly pouze stejný objem vehikula (DMSO) (M. Li et al., 2016).



Obr. 7 Příprava ultratenkých intestinálních řezů z lidského střeva. a) sešitý kus lidského střeva. b) Odstraní se svorky a tuková tkáň a střevo se rozřízne. c) Připínacími špendlíky se střevo připevní k silikonové podložce. d), e) na chlazené podložce je ze střeva odstraněna svalovina a je ponechána pouze vrstva sliznice. f) střevo je nařezáno na kousky o velikosti 10 x 20 mm. g), h) střevo je zalito agarózou. Převzato z (de Graaf et al., 2010)

#### 4.3.7 Inkubace řezů s dexametazomen a rifampicinem

Řezy byly inkubovány na 24 jamkových destičkách obsahujících 1,3 ml WME média v každé jamce. Inkubace probíhala v podmínkách zvýšeného obsahu kyslíku v inkubátoru na třepače (100 kmitů za minutu, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 80 % O<sub>2</sub>). V jamkách pro následnou izolaci RNA byly tři řezy, v jamkách určených pro funkční studii s RHD123 byly řezy dva. U inkubací pro stanovení hladin ATP byl v jamce jeden řez.

Řezy byly vždy v triplicátech inkubovány s DEX o koncentraci 100 μM a 50 μM. Jako pozitivní kontrola byl použit RIF o koncentraci 30 μM. Jako negativní kontrola bylo použito médium bez testované látky, pouze s DMSO.

Inkubace probíhala v čase 12, 24 a 48 hodin. Kontrolní vzorky byly odebrány v čase 0. Po této době byly vzorky odebrány. V časech 24 a 48 hodin byla také provedena funkční studie s RHD123. Vzorky určené pro stanovení ATP byly z média přendány do 2 ml zkumavek se šroubovacím závitem a keramickými kuličkami (přibližný objem 200 ul) a 0,2 ml SONOPu. Vzorky určené pro izolaci RNA byly přendány také do 2 ml zkumavek se šroubovacími víčky a keramickými kuličkami a 1 ml roztoku TriReagen. Po odebrání byly vzorky ihned zamrazeny na suchém ledu. Takto připravené vzorky byly pro pozdější zpracování uchovávány v hlubokomrazicím boxu (-80 °C).

### **4.3.8 Inkubace řezů s RHD123 – studie funkce**

Vzorky určené pro studium funkce byly po uplynutí stanoveného času nejprve přeneseny na 30 minut do preinkubace do čistého média, případně do média obsahujícího inhibitor P-gp (CP100356). V preinkubaci bylo v jamkách 0,5 ml média. Pro následnou inkubaci byly použity 24 jamkové destičky ve kterých bylo napipetováno 0,5 ml WME média se stejným množstvím s přidaným RHD123 o koncentraci 10  $\mu$ M. Inkubace probíhala dvě hodiny. Preinkubace i následná inkubace probíhala na třepačce v podmínkách 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 80 % O<sub>2</sub>. Inkubace probíhala v čase 0, 24 a 48 hodin. Následně byly řezy opláchnuty 2x v KHB a umístěny do předem připravených 2 ml zkumavek se šroubovacím víčkem a keramickými kuličkami. Objem kuliček byl 200  $\mu$ l. Tyto byly zamrazeny k pozdějšímu zpracování (-20 °C).

### **4.3.9 Stanovení koncentrace ATP v řezech**

Vzorky jsme nejprve nechali rozmrazit na ledu a následně byl u každého vzorku doplněn objem SONOPu na 1 ml. Dále jsme připravily centrifugu (s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma) a vychladili na 4°C. Homogenizovaly na homogenizátoru Fastprep-24 5G s přednastaveným programem pro intestinální řezy (parametry nastavení - 6,5 m/s, 40 s homogenizace, 20 sekund pauza, 40 s homogenizace). Takto zhomogenizované vzorky byly následně centrifugovány 5 minut při 13 200 rpm a 4 °C.

Dále byla připravena kalibrační křivka. Nejprve byl rozpuštěn ATP-standard dodávaný s kitem (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II) v milliQ vodě. Koncentrace naředěného standardu byla 10 mg/ml. Poté jsme si nachystali 5 zkumavek Eppendorf o objemu 1,5 ml do kterých se podle Tab. č. 4 pipetovalo předepsané množství ATP-standardu. Následně bylo přidáno předepsané množství Tris/EDTA pufru. Kalibrační křivka byla následně napipetována na 96 jamkovou černou destičku v duplikátu.

### Příprava kalibrační křivky pro stanovení koncentrace ATP

Tabulka 4.: Příprava kalibrační křivky pro zjištění koncentrace ATP v řezech. Roztok A byl použit pouze pro přípravu kalibrační křivky, neměří se.

Ředění	Množství (μl)	TRIS/EDTA pufr (μl)	Koncentrace (M)
A	10 μl ATP-standard	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	$1.65 \times 10^{-8}$

Od každého vzorku bylo na destičku dále pipetováno 5 μl vzorku v duplikátu. Nakonec jsme ke všem vzorkům přidali 45 μl Tris/EDTA pufru, aby se dosáhlo stejného objemu jako u kalibrační řady.

Dále byla k vzorkům přidána těsně před měřením luciferasa. Ta je v kitu ve formě liofyzátu a byla nejprve naředěna 10 ml milliQ vody a ponechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byla opatrně promíchána. Na destičku byla pipetována multikanálovou pipetou v objemu 50 μl do každé jamky. Poté byla změřena luminiscence v čase 0 a 5 minut. Z kalibračních vzorků byla následně sestavena kalibrační křivka vypočítány hodnoty ATP v jednotlivých jamkách.

Po změření ATP byl zbytek roztoku SONOP ve zkumavkách odpařen v suchém inkubátoru při 37 °C a bylo změřeno množství proteinu, na který se hodnoty ATP normalizovaly.

#### 4.3.10 Stanovení koncentrace s RHD123

Ke vzorkům řezů z funkční studie, umístěných ve zkumavkách s keramickými kuličkami, bylo přidáno opakovací pipetou 600 μl roztoku ACN (2:1 s vodou). Následně byly vzorky homogenizovány na homogenizátoru FastPrep24 5G (parametry nastavení - 6,5 m/s, 40 s homogenizace, 20 sekund pauza, 40 s homogenizace). Po homogenizaci byly vzorky stočeny na centrifuze (s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma) po dobu 10 minut při 10000 rpm.

Na 96 jamkovou destičku bylo napipetováno 150  $\mu$ l každého vzorku v duplikátu. Pro správné změření koncentrace RHD 123 byla vytvořena kalibrační křivka o koncentracích 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1 a 2  $\mu$ M. Následně byly změřeny hodnoty RHD123 na spektrofotometru Tecan infinity. Parametry měření byly excitační vlnová délka 485 nm a emisní vlnová délka 530 nm.

Poté byly otevřené zkumavky ponechány v suchém inkubátoru při 37 °C, aby došlo k odpaření zbylého ACN. Následně byla změřena koncentrace bílkoviny, na kterou byly hodnoty RHD123 v jednotlivých vzorcích normalizovány.

#### **4.3.11 Stanovení koncentrace bílkoviny**

Do odpařených vzorků bylo přidáno 200  $\mu$ l 5M NaOH. Toto činidlo vedlo k lýze bílkoviny, která pak byla v roztoku připravená pro další zpracování. Vzorky se následně inkubovaly po dobu 30 minut za stálého míchání při 37 °C při 300rpm. Po uplynutí této doby se do zkumavek přidalo 800  $\mu$ l destilované vody. Koncentrace NaOH tak byla naředěna na 1M. Poté byly vzorky zhomogenizovány na homogenizátoru FastPrep-24 5G (parametry nastavení - 6,5 m/s, 40 s homogenizace, 20 sekund pauza, 40 s homogenizace). Po homogenizaci se z každého vzorku nanoslo 10  $\mu$ l na 96 jamkovou destičku. Každý vzorek byl pipetován v duplikátu. Těsně před nanesením na destičku se každý vzorek ještě promíchal pro zachování homogenity.

Dále byla připravena kalibrační řada albuminu v 1M NaOH a k tomu se přidalo v různém objemu podle protokolu čistý roztok 1M NaOH. V 6 mikrozkušavkách tak vznikla kalibrační řada o koncentraci 0; 100; 200; 300; 400 a 500  $\mu$ l/ml.

Pro samotnou detekci koncentrace proteinu byl využit Pierce™ BCA Protein Assay Kit obsahující jak standard BSA, tak roztoky A a B. Roztok A obsahoval NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, kyselinu bicinchoninovou (BCA) v 0,1 M NaOH. Roztok B obsahoval 4 % CuSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O. Roztok C byl připraven z roztoku A a B v poměru 50 (A) : 1 (B). Do každého vzorku se pipetovalo 200  $\mu$ l roztoku C. Následně se destička zakryla a inkubovala 30 minut při 37 °C na třepače při 100 rpm. V přítomnosti proteinů vzniká barevná reakce. Po inkubaci byla změřena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite při vlnové délce 562 nm. Byla připravena kalibrační křivka vypočteny hodnoty v jednotlivých vzorcích.

### 4.3.12 Izolace RNA

Aby bylo možné provést stanovení qPCR, nejprve jsme museli izolovat RNA. Po rozmrznutí vzorků, které byly po inkubaci dány do 1 ml TriReagent, byly vzorky homogenizovány na homogenizátoru FastPrep-24 5G (parametry nastavení - 6,5 m/s, 40 s homogenizace, 20 sekund pauza, 40 s homogenizace). Po celou dobu byly vzorky uchovávány na ledu pro zajištění co nejvyšší stability RNA. TRI Reagent je jednofázový roztok fenolu a guanidinium isothiokyanátu, který současně solubilizuje biologický materiál a denaturuje protein (Rio et al., 2010).

Po homogenizaci bylo ke všem vzorkům přidáno 200  $\mu$ l chloroformu, po kterém následovalo 15 s intenzivní protřepání. Přidání chloroformu způsobí separaci fází (podobně jako extrakce směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol), kde se protein extrahuje do organické fáze, DNA se rozdělí na rozhraní a RNA zůstane ve vodné fázi (Rio et al., 2010).

Následně se vzorky daly do centrifugy na 15 minut při 4 °C a 12 000 g. Během centrifugace došlo k viditelnému rozdělení do 3 fází. V horní vodné fázi byla obsažena RNA, v mezifázi DNA a na dně zůstala organická fáze, obsahující proteiny a lipidy.

Do nových eppendorfek bylo odpipetováno co nejvíce vodné fáze, bez toho, aniž by došlo k narušení nebo nabrání ostatních dvou fází. Do vodné fáze byly následně přidány 2  $\mu$ l glycogenu. Glycogen má podobnou strukturu jako RNA a díky tomu vznikají umožňuje lepší vizualizaci pelety.

Dalším krokem byla precipitace RNA. Ke vzorkům bylo přidáno 500  $\mu$ l 2-propanolu, vzorky se promíchaly převrácením nahoru a dolů a nechaly se stát 10 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 min při 4 °C a 12 000 g.

Po stočení vzorků se na dně zkumavek ukázaly pelety RNA, které byly po odstranění supernatantu opláchnuty 1 ml 75 % ethanolu a znovu stočeny na centrifuze (s úhlovým rotorem 3K30H, Sigma) na 5 min při 4 °C a 12 000 g. Krok promytí byl opakován dvakrát.

Po posledním oplachu byl opatrně odsát všechn ethanol. Peleta se nechala volně osušit, avšak tak, aby nedošlo k vyschnutí pelety. Poté bylo k peletě přidáno 20  $\mu$ l DEPC vody a peleta se společně s DEPC vodou promíchala ve špičce pipety.

Po rozpuštění pelet byly odebrány 2  $\mu$ l izolované RNA pro změření koncentrace izolované RNA na přístroji Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) pomocí programu Nucleid acid –RNA 40. Koncentrace byla v jednotkách ng/ $\mu$ l. Optimální hodnota absorbance 260/280, která reflektovala čistotu byla v rozmezí 1.8–2.2. Nižší koncentrace by značila kontaminaci

proteinem nebo DNA. Druhou měřenou hodnotou byla absorbance 260/230, která má být větší než 1,7. Pokud je hodnota nižší, znamená to přítomnost organického rozpouštědla.

### 4.3.13 Reverzní transkripce

Před zahájením samotné reverzní transkripce došlo ke zpoolování vzorků z jednotlivých triplikátů. Z každého vzorku bylo odebráno do nové zkumavky 8  $\mu$ l a promícháno. Z konečného objemu 24  $\mu$ l byly následně odebrány 2  $\mu$ l a změřena koncentrace RNA na Nanodropu. Vzorky, které měly vyšší koncentraci než 500 ng/ml byly naředěny DEPC vodou. Následně byly připraveny nové 0,2 ml mikrozukavky Eppendorf, do kterých jsme přepipetovali objem odpovídající 1000 ng RNA. Objem vzorku byl doplněn DEPC vodou vždy na 10  $\mu$ l. K tomuto jsme přidali 10  $\mu$ l roztoku reverzní transkriptázy z RT kitu (gb Basic Reverse Transcription Kit). V tomto kitu jsou dvě zkumavky A a B. Obsah zkumavky A (obsahuje pufr, oligonukleotidy poly(dT) a degenerované hexamery) před použitím přeneseme do zkumavky B (obsahuje enzym Reverzní Transkriptázu) a promícháme ve špičce. Reverzní transkriptáza přepíše informaci z mRNA do cDNA (Bachman, 2013). Finální objem ve všech vzorcích byl 20  $\mu$ l a finální koncentrace RNA 50 ng/ $\mu$ l. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze a vloženy do přístroje BioRad T100 Thermal cycler. Přepis mRNA do cDNA probíhal 1 hodinu při 42 °C. Následně byly vzorky zchlazeny na 4 °C a naředěny DEPC vodou na koncentraci 25 ng/ $\mu$ l. Následně byly buď rovnou použity do PCR reakce, nebo zamrazeny při -20 °C.

### 4.3.14 qPCR

Vzorky jsme pipetovali do 384 jamkové destičky se v triplikátu. Do PCR reakce jsme pipetovali 25 ng cDNA. Konečný objem v každé jamce destičky byl 5  $\mu$ l. Z toho 2,5  $\mu$ l bylo Master Mixu (TaqMan<sup>TM</sup> Universal Master Mix II, no UNG), 0,25  $\mu$ l TaqMan assay (CYP 3A4, P-gp, NR3C1, B2M), 1  $\mu$ l cDNA a 1,25  $\mu$ l DPC vody. Jako negativní kontrola se všemi geny byla použita DEPC voda místo mRNA. B2M reprezentoval house-keeping gen.

V posledním kroku byla destička přelepena fólií a utěsněna pomocí těsnicí karty. Destička byla promíchána a následně stočena na centrifuze.

Destičku jsme následně vložili do Real-Time PCR systému Quant Studio 6 Flex (Applied Biosystems) a změřili při následujícím nastavení. V prvních 10 minutách, kdy byla teplota nastavena na 95 °C došlo k aktivaci termostabilní AmpliTaq Gold polymerázy, která dokáže amplifikovat DNA fragmenty s vysokou specifitou a citlivostí. Poté se opakovalo 40 cyklů:



denaturace 95 °C 15 s, hybridizace a elongace 60 °C 1 minuta. Naměřená data jsme vyhodnotili pomocí metody delta-delta ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), která nám umožnila porovnat změnu v expresi genů mezi dvěma skupinami vzorků. Principem metody je vypočítat rozdíl mezi cykly potřebnými k amplifikaci cílového genu a cykly potřebnými k amplifikaci referenčního genu v různých vzorcích. Tento rozdíl se označuje jako delta ct ( $\Delta Ct$ ). Dále se vypočítá delta delta ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) jako rozdíl mezi  $\Delta Ct$  vzorků z experimentální a kontrolní skupiny. Tento rozdíl se normalizuje k výchozí hodnotě a vypočítá se jako  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen & Livak, 2008).

#### **4.3.15 Statistická analýza naměřených dat**

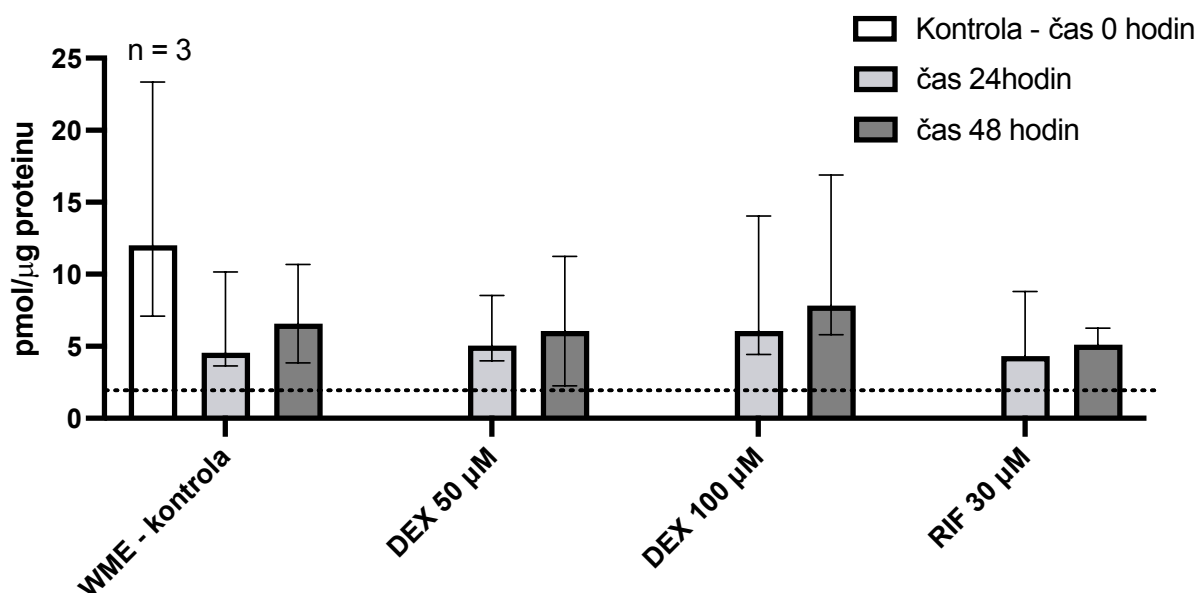
Výsledky vlivu studovaných látek na expresi vybraných genů byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Vliv studovaných látek na hladiny ATP byl hodnocen metodou one-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Statistická významnost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

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1.1 Vliv dexametazonu na životnost tkáňových řezů

V tomto experimentu jsme testovali, zda DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) ovlivňuje životaschopnost střevních řezů po 24 h a 48 h. RIF byl použit jako známý induktor o koncentraci 30  $\mu\text{M}$ . Jak je vidět na Obr. 8 životnost tkáně nebyla DEX snížena a zůstala zachována po celou dobu inkubace.

#### Dexametazon - vliv na životnost řezů - koncentrace ATP

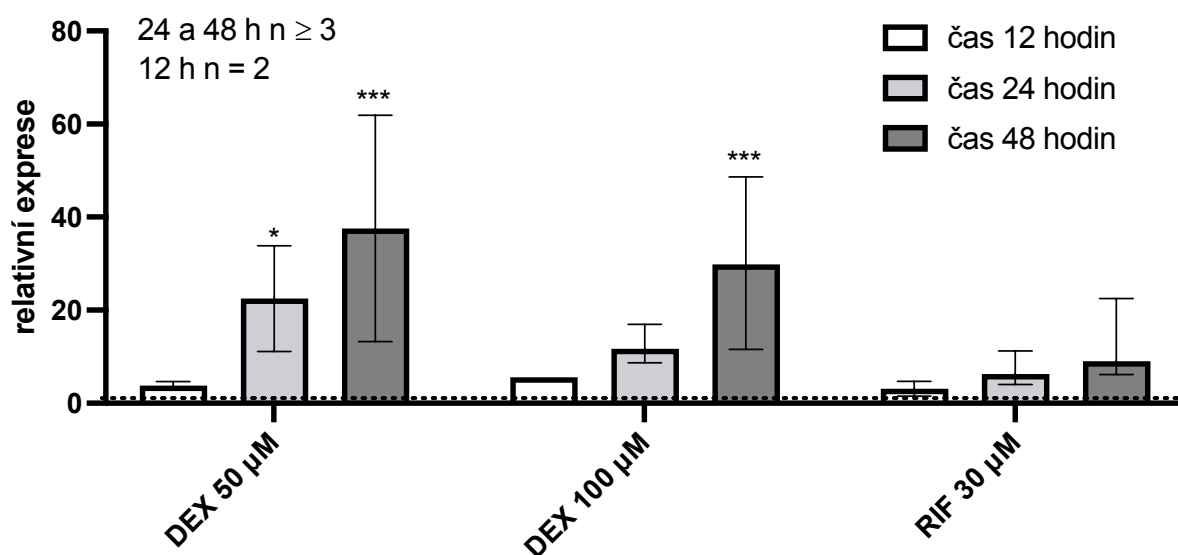


Obr. 8 Vliv DEX na životnost střevních řezů během 24 a 48hodinové inkubace. Tečkovaná čára značí hladinu ATP 2 pmol/ug proteinu. Pokud se koncentrace ATP drží nad touto hodnotou je tkáň považována za živou. Data v grafu jsou vyjádřena jako medián  $\pm$  rozsah (variační rozpětí). Výsledky byly hodnoceny metodou one-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem.

### 5.1.2 Vliv dexametazonu na expresi *CYP3A4*

Dále byl zjišťován vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na expresi *CYP3A4* v čase 12, 24 a 48 h. Pro srovnání jsme použili RIF (30  $\mu$ M), který byl použit již v předchozích studiích (Martinec et al., 2021). Z Obr. 9 je vidět, že největší vliv na expresi *CYP3A4* měl DEX po 48 h. Zároveň můžeme říci, že se zvyšující se koncentrací DEX a delší inkubační dobou roste vliv DEX na expresi *CYP3A4*. Míra, do jaké DEX ovlivňuje expresi u tohoto enzymu po 24 a 48 h, je značně vyšší ve srovnání s RIF.

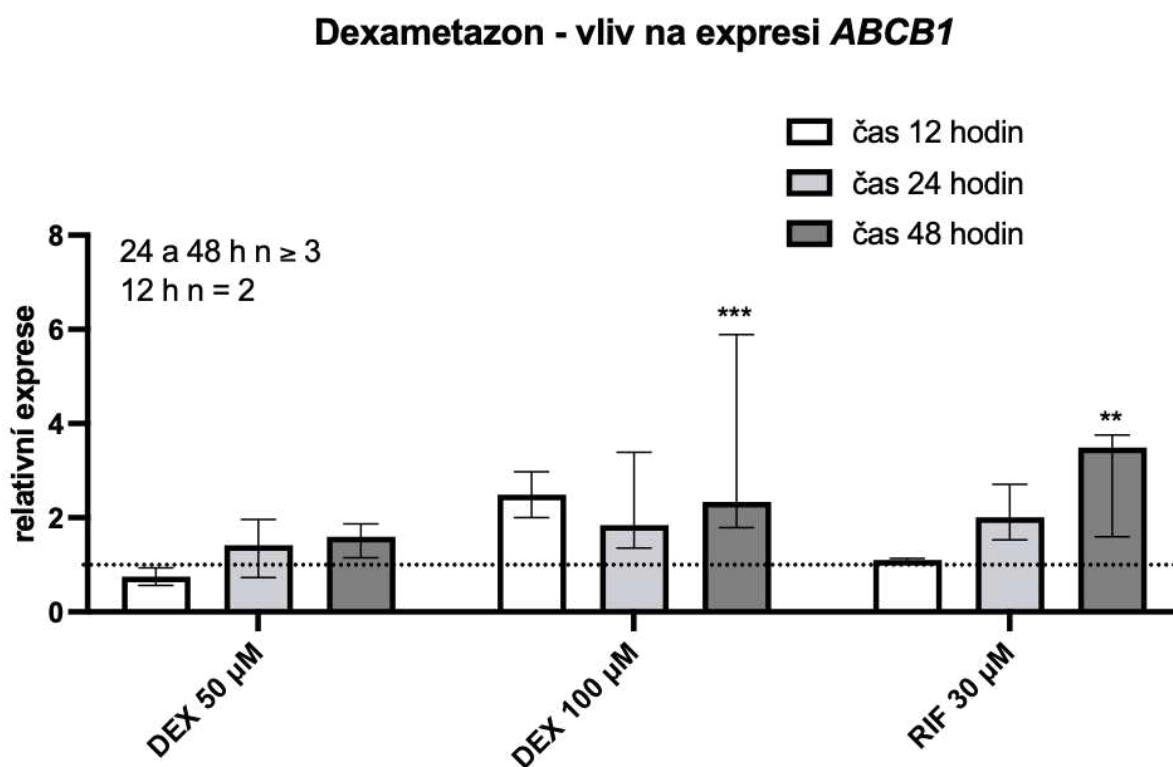
#### Dexametazon - vliv na expresi *CYP3A4*



Obr. 9 Vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na expresi *CYP3A4* po 12, 24 a 48 h. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. Výsledky byly statisticky hodnoceny metodou two-way ANOVA s následným Dunnetovým multiple comparison testem. Statistická významnost je v grafech vyznačena následovně: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 5.1.3 Vliv dexametazonu na expresi *ABCB1*

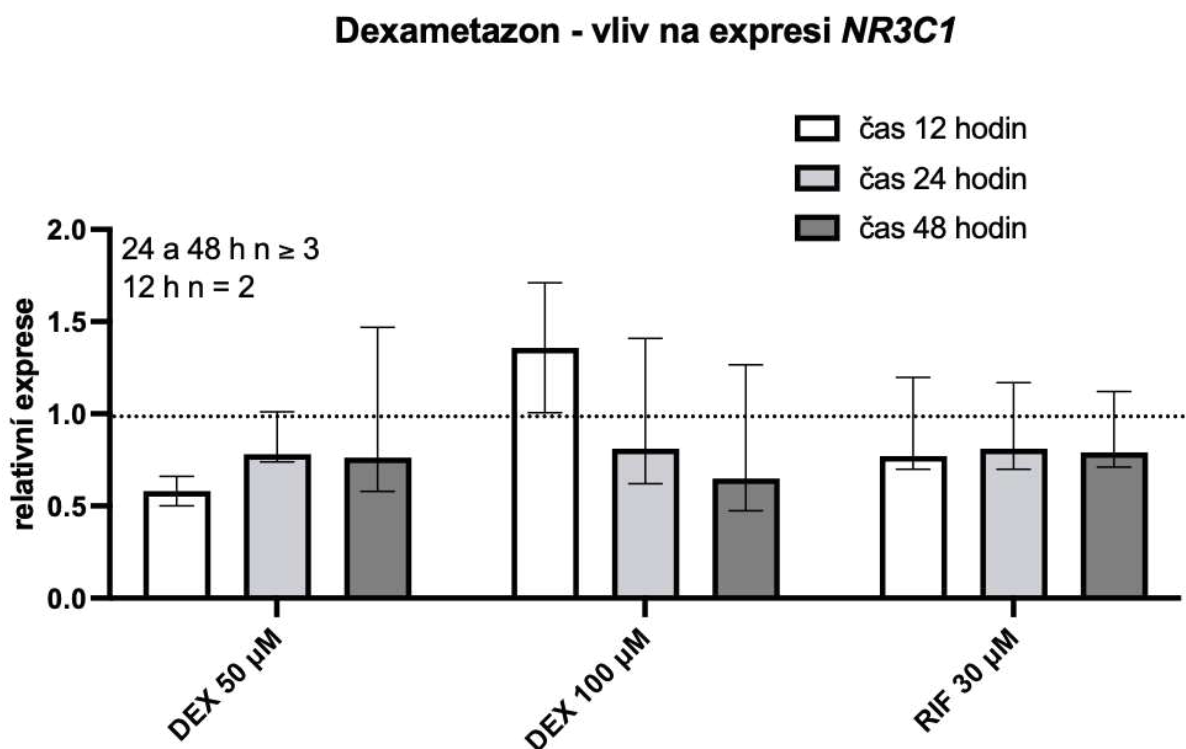
Zde jsme zkoumali vliv DEX na expresi *ABCB1* po 12, 24 a 48 h inkubaci. Pozorovali jsme nárůst exprese *ABCB1* u DEX (50  $\mu$ M) po 24 a 48 h. U DEX (100  $\mu$ M) došlo ke zvýšené expresi už po 12 h nicméně statisticky významné bylo pouze zvýšení po 48hodinové inkubaci. Obdobně se choval také RIF (30  $\mu$ M), který vykazoval postupný nárůst exprese s nejvyšším bodem v čase 48 hodin viz Obr. 10.



Obr. 10 Vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na expresi *ABCB1* po 12, 24 a 48 h. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. 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: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 5.1.4 Vliv dexametazonu na expresi *NR3C1*

Dále byl zjišťován vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na expresi *NR3C1* (*GR*) v čase 12, 24 a 48 h. Pro srovnání jsme použili RIF (30  $\mu$ M). Exprese tohoto genu byla mírně zvýšena u DEX (100  $\mu$ M) pouze po 12 h. V ostatních časech nebyla pozorována signifikantní indukce u DEX ani u RIF a naopak byl vůči kontrolám pozorován mírný pokles viz Obr. 11.



Obr. 11 Vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na expresi *NR3C1* po 12, 24 a 48 h. Přerušovaná čára vyjadřuje hodnotu kontroly. 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: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

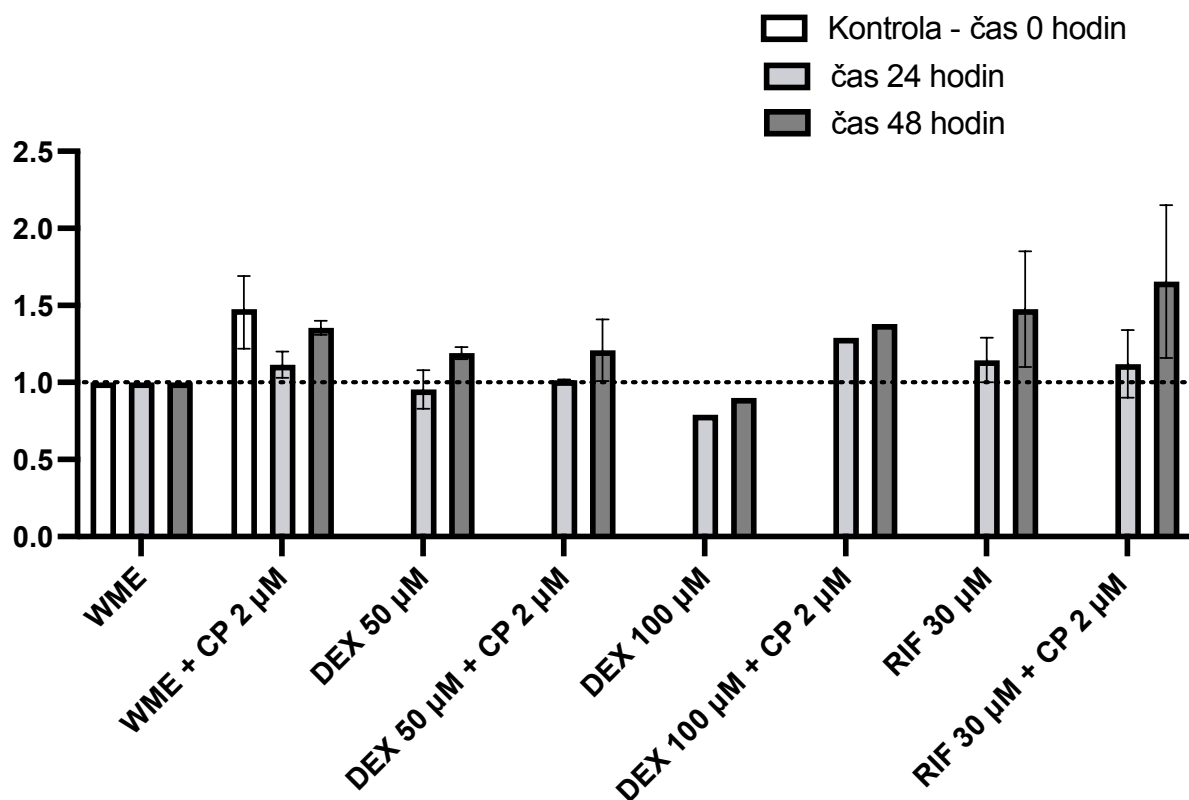
### 5.1.5 Vliv dexametazonu na intracelulární koncentraci RHD123

V tomto experimentu byl testován vliv DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) na intracelulární koncentraci RHD123. V případě, že by DEX indukoval ABCB1 na úrovni proteinu, výsledkem testu by byla snížená koncentrace RHD123 v řezu oproti kontrole v daném čase. Žádný signifikantní vliv však nebyl pozorován (Obr. 12). Určitou slabinou je zde počet opakování, který dosahoval pouze  $n=2$  a u DEX 100  $n=1$ .

V experimentu s DEX 100  $\mu\text{M}$  byla zaznamenána nižší koncentrace RHD123 oproti kontrole. V tomto případě se však nepodařilo experiment zopakovat a v grafu na Obr. 12 je tedy vyobrazen pouze jako  $n=1$ .

V rámci tohoto experimentu jsme také použili specifický inhibitor CP100356, který inhibuje aktivitu ABCB1. Po použití tohoto inhibitoru by měla být intracelulární koncentrace vyšší. Tím jsme chtěli potvrdit, že i po delší době inkubace zůstávají transportéry aktivní. Z důvodu vysoké variability však data opět nejsou vždy jednoznačná. Typický příklad, jak byl experiment zamýšlen je opět DEX 100  $\mu\text{M}$ , kde CP100356 inhibovalo transport RHD123 po 24 a 48 hodinách. V tomto experimentu byl tedy potvrzen, jak vliv DEX 100  $\mu\text{M}$  na zvýšený eflux RHD123 oproti kontrole, tak vliv CP100356 na inhibici tohoto transportu.

## Dexametazon - vliv a intracelulární koncentraci RHD123



Obr. 12 Vliv DEX (50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M) na intracelulární koncentraci RHD123. Pozitivní kontrola CP (2  $\mu$ M). Hodnoty jsou normalizovány vůči kontrole v daném čase. Přerušovaná čára vyjadřuje hladinu kontroly. Data v grafech jsou vyjádřena jako medián  $\pm$  rozsah (variační rozpětí). Experimenty byly opakovány pouze dvakrát ( $n = 2$ ). U DEX 100 pak pouze jednou  $n = 1$ . Data nebyla statisticky hodnocena.

## 6 DISKUZE

Perorální podávání je dnes nejčastější formou aplikace léčiv, která jsou následně vstřebávána do systémové cirkulace prostřednictvím intestinální bariéry (Oostendorp et al., 2009). Tato bariéra je vybavena celou řadou ochranných faktorů, které mají zabránit prostupu látek do systémové cirkulace. Těmito ochrannými faktory jsou biotransformační enzymy obou fází metabolismu (především CYP3A4) a efluxní transportéry (zejména ABC transportéry) (Kalliokoski & Niemi, 2009). Léčiva vůči těmto enzymům a transportérům mohou vystupovat jako substráty, ale také jako induktory nebo inhibitory. To může vést k řadě lékových interakcí (Liu, 2019).

Metody, kterými lze studovat transport léčiv a získat tak informace pro potenciální lékové interakce, mohou být následující. Nejrozšířenějším modelem zůstává *in vitro* buněčná kultura Caco-2 buněk, které jsou vhodným modelem pro studium intestinální absorpce a transportních mechanismů. Nevýhodou této metody je její finanční náročnost, nízká exprese PXR a také fakt, že Caco-2 strukturou připomínají spíše epitel tlustého střeva (Sambuy et al., 2005). Vhodnými modely pro studii transportních mechanismů jsou také buněčné linie LS174T a LS180. Jedná se o epiteliální nádorovou linii buněk tenkého střeva, která má vysokou expresi PXR, který zprostředkovává indukci P-gp a CYP3A4 (Gupta et al., 2008). Při porovnání buněčné linie Caco-2 a LS180 můžeme pozorovat rozdílnou expresi cílových genů pro PXR. Buňky LS180 vykazují zvýšenou expresi P-gp, ale sníženou expresi CYP3A4 (Maier et al., 2007). Vhodnější metodou pro tuto studii se jeví *ex vivo* metoda ultra-tenkých tkáňových řezů (de Graaf et al., 2010).

Tu jsme použili v naší práci, ve které bylo cílem zjistit, zda má DEX vliv na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevních řezech lidského jejunum. Pro tuto studii jsme využili výše zmíněnou metodu ultra-tenkých tkáňových řezů a připravili PCIS z jejunum lidského střeva. Jedná se o mini model střeva s fyziologickou strukturou, který lze využít ke studiu střevního metabolismu a aktivity transportéru na farmakokinetiku léčiv. Tato část střeva byla zvolena mimo jiné proto, protože má velmi vysokou absorpční kapacitu a oproti ostatním úsekům tenkého střeva vysokou expresi *ABCB1* (Huličiak et al., 2022).

Funkční studie *ABCB1* byly v minulosti prováděny nejčastěji na buněčné linii Caco-2. Nejčastěji se k tomuto účelu využívaly modelové substráty digoxin a RHD123 (Huličiak et al., 2022). Fluorescenční barvivo RHD123 jako referenční látka pro studium aktivity P-gp se jeví



jako relativně snadno použitelná, proto jsme ji použili i v naší práci. Zároveň byl RHD123 použit také v obdobné studii s RIF (Jouan et al., 2016; Martinec et al., 2021). Pro studium funkce jsme dále použili specifický inhibitor ABCB1 CP100356 (2  $\mu$ M). Tyto experimenty byly provedeny podle dříve popsaných metod (M. Li et al., 2016).

Vliv DEX na expresi *CYP3A4* a *ABCB1* ve střevě byl v minulosti popsán v řadě studií a u řady organismů. Expresce a funkce CYP3A a GR byla např. studována u ovcí, kterým byl podáván DEX injekčně po dobu sedmi dnů. Hodnoty exprese byly popsány na úrovni mRNA i proteinu. V játrech byl vliv na expresi *CYP3A* vyšší, než tomu bylo v tenkém střevě v oblasti jejunu a to jak na úrovni proteinu, tak mRNA. V jejunu se vliv dexametazonu neprojevil na žádné úrovni, což však mohlo být způsobeno injekčním podáním dexametazonu. Expresce GR nebyla podáváním DEX ovlivněna v žádné tkáni (Maté et al., 2012). V naší studii jsme oproti výše zmíněné práci vliv DEX na zvýšení exprese *CYP3A4* potvrdili, ale expresce GR ovlivněna nebyla. K jedinému zvýšení exprese GR v naší studii došlo v čase 12 h u DEX (100  $\mu$ M). Toto pozorování je však založeno jen na dvou experimentálních měřeních. Pozorované rozdíly v reakci na DEX mohou být dány rozdílností studovaných organismů i samotným způsobem provedení experimentu.

Pro porovnání našich výsledků může sloužit také studie na potkanech, ve které byl studován účinek léčby DEX. Potkanům byl aplikován DEX (100 mg/kg/den, orálně) po dobu 2 dnů. Následná analýza Western blot s monoklonální protilátkou pro P-gp, odhalila, že aplikace DEX zvýšilo hladinu P-gp ve střevě 1,9x. Při následné studii *in vitro* metabolismu erytromycinu v mikrozomálních frakcích z DEX ovlivněných potkanů, bylo zjištěno, že došlo k 9,7násobné zvýšení aktivity CYP3A v játrech, avšak ne ve střevě (Yumoto et al., 2001). Z těchto výsledků lze usuzovat, že léčba DEX může mnohonásobně zvýšit expresi *CYP3A4* a do jisté míry i expresi *ABCB1*. V jiné studii byl sledován vliv ritonaviru na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* v jejunu potkana. U této studie byly látky podávány již perorálně a DEX zde byl použit jako pozitivní kontrola pro indukci. U ritonaviru i DEX došlo ke zvýšení intestinální exprese na úrovni proteinu *CYP3A4* (asi 1,7krát pro ritonavir, asi 3,3krát pro DEX). Expresce P-gp pak byla indukována (2,8krát) jak ritonavirem, tak DEX (Perloff et al., 2004).

Pro porovnání našich výsledků je také nutné uvést studii provedenou na střevních řezech. V této studii byly řezy inkubovány pouze s DEX 100  $\mu$ M a to po dobu pouze 24 hod. Expresce *CYP3A4* byla v této studii signifikantně zvýšena 3,5krát. Expresce *ABCB1* pak pouze přibližně 2krát (E. G. van de Kerkhof et al., 2008).

Na základě výše zmíněných informací lze potvrdit správnost našich výsledků, ve kterém došlo ke zvýšené expresi *ABCB1* i *CYP3A4* v tkáňových řezech z lidského jejunu po vystavení DEX (50 a 100  $\mu$ M). Konkrétně v rámci našich experimentů byla exprese na úrovni mRNA *CYP3A4* zvýšena 37x (medián) a *ABCB1* 2,3x (medián). Exprese GR nebyla DEX ovlivněna.

V našich experimentech jsme se také pokusili studovat vliv DEX na aktivitu *ABCB1*, a to za pomoci substrátu RHD123 a specifického inhibitoru CP100356. Zde se nám potvrdil indukční vliv na aktivitu pouze u experimentu s DEX 100  $\mu$ M. Překvapivě jsme nepozorovali vliv RIF, který je potvrzeným induktorem *ABCB1* z předchozí studie. To může však být způsobeno pouze nedostatečným množstvím provedených experimentů, jelikož předchozí studie byla do rozsahu větší (Martinec et al., 2021).

## 7 ZÁVĚR

Hlavní úlohou této práce bylo zjistit vliv DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) na expresi *ABCB1* a *CYP3A4* ve střevních řezech lidského jejunu. K tomuto účelu byly použity ultra-tenké intestinální řezy lidského jejunu, *ex vivo* model používaný pro studium indukčního potenciálu léčiv. Byly provedeny také studie pro zjištění vlivu DEX na životnost střevních řezů a studie sledující samotnou aktivitu *ABCB1*.

Hraniční koncentrace ATP, kdy jsou střevní řezy považovány za viabilní je 2 pmol/ $\mu\text{g}$  proteinu. Ve všech časech byly hodnoty nad touto hranicí a životnost tkáně nebyla ani jednou z použitých koncentrací DEX signifikantně snížena.

Dalším dílčím cílem bylo zjistit vliv DEX na expresi *ABCB1*, *CYP3A4*, *GR* za použití metody q-PCR. Jako známý induktor pro kontrolu, zda byla metoda funkční, byl použit RIF (30  $\mu\text{M}$ ). U *CYP3A4* došlo k signifikantnímu nárůstu exprese po 48 h s DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ). U *ABCB1* došlo k signifikantnímu zvýšení exprese až u DEX (100  $\mu\text{M}$ ). DEX (50  $\mu\text{M}$ ) nevykazoval žádném čase významný vliv na expresi *ABCB1*. Dále jsme studovali vliv DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) na expresi *GR*. Kromě DEX (100  $\mu\text{M}$ ) po 12 h, kdy exprese byla mírně nad úrovní kontroly, byly všechny ostatní časy i sledované skupiny pod úrovní kontroly, a to včetně DEX 50  $\mu\text{M}$  a RIF 30  $\mu\text{M}$ . Tato změna nebyla signifikantní.

Jako poslední jsme sledovali vliv DEX (50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) na funkci P-gp. Jako modelový substrát P-gp jsme použili RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ), jako referenční inhibitor CP100356 (2  $\mu\text{M}$ ). Z naměřených výsledků neměl DEX vliv na intracelulární koncentraci RHD123. Pouze u DEX 100  $\mu\text{M}$  jsme pozorovali sníženou intracelulární koncentraci RHD123, avšak jednalo se pouze o jeden nezávislý experiment.

Lze tedy říci, že DEX má signifikantní vliv na expresi *CYP3A4* a do jisté míry i na *ABCB1*. Exprese *GR* ani funkce P-gp nebyla DEX výrazně ovlivněna. Pro potvrzení výsledků funkční studie by bylo nicméně vhodné provést další experimenty případně zvolit i další substrát.

## 8 ZDROJE

Anderle, P., Niederer, E., Rubas, W., Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Wunderli-Allenspach, H. *et al.* (1998) 'P-Glycoprotein (P-gp) Mediated Efflux in Caco-2 Cell Monolayers: The Influence of Culturing Conditions and Drug Exposure on P-gp Expression Levels', *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc., 87(6), pp. 757–762. doi: 10.1021/js970372e.

Bachman, J. (2013) 'Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)', *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., 530, pp. 67–74. doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.

Baschant, U. and Tuckermann, J. (2010) 'The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 120(2–3), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.

Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M. K. and Poolman, B. (2006) 'ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains', *FEBS Letters*, 580(4), pp. 1023–1035. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.079.

Billat, P. A., Roger, E., Faure, S., and Lagarce, F. (2017) 'Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going?' *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 22(5), pp. 761–775. doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.007.

Bruyère, A., Declèves, X., Bouzom, F., Ball, K., Marques, C., Treton, X. *et al.* (2010) 'Effect of Variations in the Amounts of P-Glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along the Human Small Intestine on PBPK Models for Predicting Intestinal First Pass', *Molecular Pharmaceutics*, 7(5), pp. 1596–1607. doi: 10.1021/mp100015x.

Burns, C. M. (2016) 'The History of Cortisone Discovery and Development', *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 42(1), pp. 1–14. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.001.

Busada, J. T. and Cidlowski, J. A. (2017) 'Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development', *Current Topics in Developmental Biology*, 125, pp. 147–170. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.12.004.

Caldeira, T. G., Ruiz-Picazo, A., Lozoya-Agullo, I., Saúde-Guimarães, D. A., González-Álvarez, M., de Souza, J. *et al.* (2018) 'Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin', *International Journal of Pharmaceutics*, 551(1–2), pp. 148–157. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.022.

Ceckova-Novotna, M., Pavek, P. and Staud, F. (2006) 'P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function' *Reproductive Toxicology*. Elsevier, 22(3), pp. 400–410. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.01.007.

Cervený, L., Svecová, L., Anzenbacherová, E., Vrzal, R., Staud, F., Dvorak, Z. *et al.* (2007) 'Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(7), pp. 1032–1041. doi: 10.1124/dmd.106.014456.

Chan, L. M. S., Lowes, S. and Hirst, B. H. (2004) 'The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V., 21(1), pp. 25–51. doi: 10.1016/j.ejps.2003.07.003.

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C. *et al.* (2016) 'Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 370(1), pp. 153–164. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.

Choudhuri, S. and Klaassen, C. D. (2006) 'Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters', *International Journal of Toxicology*, 25(4), pp. 231–259. doi: 10.1080/10915810600746023.

Rye, C., Wise, R., Jurujovski, V., Desaix, J., Choi, J. and Avissar Y. (2016) [online] *Biology*. [2022-08-15] Available at: <https://openstax.org/books/biology>.

Creamer, P. (1999) 'Intra-articular corticosteroid treatment in osteoarthritis', *Current Opinion in Rheumatology*, 11(5), pp. 417–421. doi: 10.1097/00002281-199909000-00016.

Dahlgren, D., Roos, C., Johansson, P., Tannergren, C., Lundqvist, A., Langguth, P. *et al.* (2018) 'The effects of three absorption-modifying critical excipients on the in vivo intestinal absorption of six model compounds in rats and dogs', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 547(1–2), pp. 158–168. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.029.

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

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

Estudante, M., Morais, J. G., Soveral, G. and Benet, L. (2013) 'Intestinal drug transporters: An overview', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 65(10), pp. 1340–1356. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.042.

Fedi, A., Vitale, C., Ponschin, G., Ayehunie, S., Fato, M. and Scaglione, S. (2021) 'In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review'. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 335, pp. 247–268. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.028.

Gattis, W. A. and May, D. B. (1996) 'Possible Interaction Involving Phenytoin, Dexamethasone, and Antineoplastic Agents: A Case Report and Review'. *Annals of Pharmacotherapy*, 30(5), pp. 520–526. doi: 10.1177/106002809603000516.

Gupta, A., Mugundu, G. M., Desai, P. B., Thummel, K. E. and Unadkat, J. D. (2008) 'Intestinal human colon adenocarcinoma cell line LS180 is an excellent model to study pregnane X receptor, but not constitutive androstane receptor, mediated CYP3A4 and multidrug resistance transporter 1 induction: studies with anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 36(6), pp. 1172–1180. doi: 10.1124/dmd.107.018689.

Hamman, J. H., Demana, P. H. and Olivier, E. I. (2007) 'Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery', *Drug Target Insights*, 2, pp. 71–81. doi: 10.33393/dti.2007.1301.

Hollenstein, K., Dawson, R. J., and Locher, K. P. (2007) 'Structure and mechanism of ABC transporter proteins', *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 17(4), pp. 412–418. doi: 10.1016/j.sbi.2007.07.003.

Hong, M. (2017) 'Biochemical studies on the structure-function relationship of major drug transporters in the ATP-binding cassette family and solute carrier family', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 116, pp. 3–20. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.003.

Huličiak, M., Vokřál, I., Holas, O., Martinec, O., Štaud, F. and 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 (Basel)*, 15(2), p. 242. doi: 10.3390/ph15020242.

Jia, K., Zhang, D., Jia, Q. and Zhang, Q.-Y. (2019) 'Regulation of Fgf15 expression in the intestine by glucocorticoid receptor', *Molecular Medicine Reports*, 19(4), pp. 2953–2959. doi: 10.3892/mmr.2019.9915.

Johnson, D.B., Lopez, M.J. and Kelley, B. *Dexamethasone*. [2022-05-15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482130>.

Jouan, E., Le Vée, M., Mayati, A., Denizot, C., Parmentier, Y., and Fardel, O. (2016) 'Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay', *Pharmaceutics*, 8(2), p. 12. doi: 10.3390/pharmaceutics8020012.

Kalliokoski, A. and Niemi, M. (2009) 'Impact of OATP transporters on pharmacokinetics', *British Journal of Pharmacology*, 158(3), pp. 693–705. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x.

Kim, R. B. (2002) 'Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers', *Drug Metabolism Reviews*, 34(1–2), pp. 47–54. doi: 10.1081/DMR-120001389.

Kivisto, K. T., Niemi, M. and Fromm, M. F. (2004) 'Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein' *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 18(6), pp. 621–626. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00291.x.

- Kota, B. P., Tran, V. H., Allen, J., Bebawy, M. and Roufogalis, B. D. (2010) 'Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells', *Pharmacological Research*, 62(5), pp. 426–431. doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.001.
- Kullak-Ublick, G. A. and Becker, M.-B. (2003) 'Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine' *Drug Metabolism Reviews*, 35(4), pp. 305–317. doi: 10.1081/dmr-120026398.
- Lai, Y. (2013) 'Breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2', *Transporters in Drug Discovery and Development*. Elsevier B.V, pp. 295–326. doi: 10.1533/9781908818287.295.
- Li, H. and Lampe, J. N. (2019) 'Neonatal cytochrome P450 CYP3A7: A comprehensive review of its role in development, disease, and xenobiotic metabolism', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 673, p. 108078. doi: 10.1016/j.abb.2019.108078.
- Li, M., de Graaf, I. A. M., de Jager, M. H. and Groothuis, G. M. M. (2017) 'P-gp activity and inhibition in the different regions of human intestine *ex vivo*', *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 38(2), pp. 127–138. doi: 10.1002/bdd.2047.
- Li, M., de Graaf, I. A. M. and Groothuis, G. M. M. (2016) 'Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. Informa Healthcare, 12(2), pp. 175–190. doi: 10.1517/17425255.2016.1125882.
- Lin, J. H., Chiba, M., Chen, I. W., Nishime, J. A., deLuna, F. A., Yamazaki, M. *et al.* (1999) 'Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 3A [correction of P-450 A] and p-glycoprotein induction', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 27(10), pp. 1187–1193. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497146>.
- Lin, J. H. and Yamazaki, M. (2003) 'Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications', *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1), pp. 59–98. doi: 10.2165/00003088-200342010-00003.
- Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. and Giacomini, K. M. (2015) 'SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(8), pp. 543–560. doi: 10.1038/nrd4626.
- Liu, D., Ahmet, A., Ward, L., Krishnamoorthy, P., Mandelcorn, E., Leigh, R. *et al.* (2013) 'A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy', *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 9(1), p. 30. doi: 10.1186/1710-1492-9-30.
- Liu, X. (2019) 'ABC Family Transporters', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141, pp. 13–100. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4\_2.
- Locher, K. P. (2009) 'Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1514), pp. 239–245. doi: 10.1098/rstb.2008.0125.

Lu, R., Zhou, Y., Ma, J., Wang, Y. and Miao, X. (2022) ‘Strategies and Mechanism in Reversing Intestinal Drug Efflux in Oral Drug Delivery’, *Pharmaceutics*, 14(6), p. 1131. doi: 10.3390/pharmaceutics14061131.

Lutz, J. D., Kirby, B. J., Wang, L., Song, Q., Ling, J., Massetto, B. *et al.* (2018) ‘Cytochrome P450 3A Induction Predicts P-glycoprotein Induction; Part 1: Establishing Induction Relationships Using Ascending Dose Rifampin’, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 104(6), pp. 1182–1190. doi: 10.1002/cpt.1073.

Lynch, T. and Price, A. (2007) ‘The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects’, *American Family Physician*, 76(3), pp. 391–396. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708140>.

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

Maier, A., Zimmermann, C., Beglinger, C., Drewe, J. and Gutmann, H. (2007) ‘Effects of budesonide on P-glycoprotein expression in intestinal cell lines’, *British Journal of Pharmacology*, 150(3), pp. 361–368. doi: 10.1038/sj.bjp.0706992.

Manikandan, P. and Nagini, S. (2018) ‘Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review’, *Current Drug Targets*, 19(1), pp. 38–54. doi: 10.2174/1389450118666170125144557.

Martin, P., Riley, R., Back, D. J. and Owen, A. (2008) ‘Comparison of the induction profile for drug disposition proteins by typical nuclear receptor activators in human hepatic and intestinal cells’, *British Journal of Pharmacology*, 153(4), pp. 805–819. doi: 10.1038/sj.bjp.0707601.

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

Maté, M. L., Lifchitz, A., Sallovitz, J., Ballent, M., Muscher, A. S., Wilkens, M. R. *et al.* (2012) ‘Cytochrome P450 3A expression and function in liver and intestinal mucosa from dexamethasone-treated sheep’, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(4), pp. 319–328. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01334.x.

Mora Lagares, L., Minovski, N. and Novič, M. (2019) ‘Multiclass Classifier for P- Glycoprotein Substrates, Inhibitors, and Non-Active Compounds’, *Molecules*, 24(10), p. 2006. doi: 10.3390/molecules24102006.

Mottino, A. D., Hoffman, T., Jennes, L. and Vore, M. (2000) ‘Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine’, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(3), pp. 717–723. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869369>.



Nicolaides, N. C., Chrousos, G. and Kino, T. (2000) [online] *Glucocorticoid Receptor*. [2020-11-21]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279171>.

Oladimeji, P. O. and Chen, T. (2018) 'PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor', *Molecular Pharmacology*, 93(2), pp. 119–127. doi: 10.1124/mol.117.110155.

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

Paine, M. F., Hart, H. L., Ludington, S. S., Haining, R. L., Rettie, A. E. and Zeldin, D. C. (2006) 'The human intestinal cytochrome P450 'pie'', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(5), pp. 880–886. doi: 10.1124/dmd.105.008672.

Palma-Gudiel, H., Córdova-Palomera, A., Leza, J. C. and Fañanás, L. (2015) 'Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 55, pp. 520–535. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.016.

Pascussi, J.-M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.-M., Maurel, P. and Vilarem, M.-J. (2001) 'Dual effect of dexamethasone on *CYP3A4* gene expression in human hepatocytes', *European Journal of Biochemistry*, 268(24), pp. 6346–6358. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02540.x.

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

Perloff, M. D., Von Moltke, L. L. and Greenblatt, D. J. (2004) 'Ritonavir and dexamethasone induce expression of CYP3A and P-glycoprotein in rats', *Xenobiotica*, 34(2), pp. 133–150. doi: 10.1080/00498250310001630215.

Polderman, J. A. W., Farhang-Razi, V., van Dieren, S., Kranke, P., DeVries, J. H., Hollmann, M. W. *et al.* (2019) 'Adverse side-effects of dexamethasone in surgical patients-an abridged Cochrane systematic review', *Anaesthesia*, 74(7), pp. 929–939. doi: 10.1111/anae.14610.

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J. and Nilsen, T. W. (2010) 'Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), p. 5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439.

Rives, M.-L., Javitch, J. A. and Wickenden, A. D. (2017) 'Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities', *Biochemical Pharmacology*, 135, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.010.

Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E. and Laudet, V. (2003) 'The nuclear receptor superfamily', *Journal of Cell Science*, 116(4), pp. 585–586. doi: 10.1242/jcs.00247.

Rodriguez-Antona, C., Savieo, J. L., Lauschke, V. M., Sangkuhl, K., Drögemöller, B. I., Wang, D. *et al.* (2022) 'PharmVar GeneFocus: *CYP3A5*', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 112(6), pp. 1159–1171. doi: 10.1002/cpt.2563.

S K, S. R., P A, A., B, S., Kalala, K. P., Pm, A. and Sabarathinam, S. (2022) 'Drug interaction risk between cardioprotective drugs and drugs used in treatment of COVID-19: A evidence-based review from six databases', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 16(3), p. 102451. doi: 10.1016/j.dsx.2022.102451.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A. and Zucco, F. (2005) 'The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture – related factors on Caco-2 cell functional characteristics', *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), pp. 1–26. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6.

Schijvens, A. M., ter Heine, R., de Wildt, S. N. and Schreuder, M. F. (2019) 'Pharmacology and pharmacogenetics of prednisone and prednisolone in patients with nephrotic syndrome', *Pediatric Nephrology*, 34(3), pp. 389–403. doi: 10.1007/s00467-018-3929-z.

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

Schwenk, M. (1988) 'Mucosal Biotransformation', *Toxicologic Pathology*, 16(2), pp. 138–146. doi: 10.1177/019262338801600206.

Sellam, J., Costedoat-Chalumeau, N., Amoura, Z., Aymard, G., Choquet, S., Trad, S. *et al.* (2007) 'Potentiation of fluindione or warfarin by dexamethasone in multiple myeloma and AL amyloidosis', *Joint Bone Spine*, 74(5), pp. 446–452. doi: 10.1016/j.jbspin.2006.12.006.

Shirasaka, Y., Kawasaki, M., Sakane, T., Omatsu, H., Moriya, Y., Nakamura, T. *et al.* (2006) 'Induction of Human P-Glycoprotein in Caco-2 cells: Development of a Highly Sensitive Assay System for P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(5), pp. 414–423. doi: 10.2133/dmpk.21.414.

Sinz, M. W. (2013) 'Evaluation of pregnane X receptor (PXR)-mediated CYP3A4 drug-drug interactions in drug development', *Drug Metabolism Reviews*, 45(1), pp. 3–14. doi: 10.3109/03602532.2012.743560.

Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J. and Chen, Z.-S. (2012) 'Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance', *Chinese Journal of Cancer*. BioMed Central, 31(2), pp. 58–72. doi: 10.5732/cjc.011.10329.

Stefková, J., Poledne, R. and Hubáček, J. A. (2004) 'ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases', *Physiological Research*, 53(3), pp. 235–243. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15209530>.

van de Kerkhof, E., de Graaf, I. and Groothuis, G. (2007) 'In Vitro Methods to Study Intestinal Drug Metabolism', *Current Drug Metabolism*, 8(7), pp. 658–675. doi: 10.2174/138920007782109742.

van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. A. M., Ungell, A.-L. B. and Groothuis, G. M. M. (2008) 'Induction of Metabolism and Transport in Human Intestine: Validation of Precision-Cut Slices as a Tool to Study Induction of Drug Metabolism in Human Intestine in Vitro', *Drug Metabolism and Disposition*, 36(3), pp. 604–613. doi: 10.1124/dmd.107.018820.

Wacher, V. J., Wu, C.-Y. and Benet, L. Z. (1995) 'Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy', *Molecular Carcinogenesis*, 13(3), pp. 129-134. doi: 10.1002/mc.2940130302.

Weikum, E. R., Liu, X. and Ortlund, E. A. (2018) 'The nuclear receptor superfamily: A structural perspective'. *Protein Science*, 27(11), pp. 1876–1892. doi: 10.1002/pro.3496.

Westlind, A. *et al.* (2001) 'Cloning and Tissue Distribution of a Novel Human Cytochrome P450 of the CYP3A Subfamily, CYP3A43', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(5), pp. 1349–1355. doi: 10.1006/bbrc.2001.4505.

Yumoto, R., Murakami, T., Sanemasa, M., Nasu, R., Nagai, J. and Takano, M. (2001) 'Pharmacokinetic interaction of cytochrome P450 3A-related compounds with rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats pretreated with dexamethasone', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(2), pp. 145–151. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159804>.

Zaïr, Z. M., Eloranta, J. J., Stieger, B. and Kullak-Ublick, G. A. (2008) 'Pharmacogenetics of OATP (SLC21 / *SLCO*), OAT and OCT (*SLC22*) and PEPT (*SLC15*) transporters in the intestine, liver and kidney', *Pharmacogenomics*, 9(5), pp. 597–624. doi: 10.2217/14622416.9.5.597.

Zhang, Q. Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J. and Kaminsky, L. S. (1999) 'Characterization of human small intestinal cytochromes P-450', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 27(7), pp. 804–809. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383924>.

Zhou, F., Zhu, L., Wang, K. and Murray, M. (2017) 'Recent advance in the pharmacogenomics of human Solute Carrier Transporters (SLCs) in drug disposition', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 116, pp. 21–36. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.004.

Zhou, S.-F. (2008) 'Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4', *Current Drug Metabolism*, 9(4), pp. 310–322. doi: 10.2174/138920008784220664.