

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Studium regulace genové exprese v ledvinách

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Aneta Trávníčková

„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

Aneta Trávníčková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce PharmDr. Lucii Smutné, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a věnovaný čas při zpracovávání diplomové práce.

Také bych ráda poděkovala PharmDr. Anně Ďurinové a Mgr. Márii Krutákové za pomoc při získávání experimentálních dat a na závěr děkuji i své rodině a příteli za podporu po dobu celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Aneta Trávníčková

Školitel: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Název diplomové práce: Studium regulace genové exprese v ledvinách

Během vývoje byl každý organismus nucen vytvořit si svůj vlastní komplexní obranný systém zabraňující hromadění endogenních a cizorodých látek, včetně léčiv, v těle. Tyto obranné systémy zahrnují biotransformační enzymy I. a II. fáze metabolismu a transportní proteiny. Jednu z hlavních rolí v regulaci metabolismu endogenních a biotransformaci exogenních látek má konstitutivní androstanový receptor (CAR).

Cílem této práce bylo stanovení vlivu aktivace lidského konstitutivního androstanového receptoru (hCAR) u humanizovaných myší na genovou expresi lékových transportérů a biotransformačních enzymů v ledvinách. A následně posoudit vliv aktivace CAR na expresi vybraných genů v HK2 buněčné linii. V obou případech byla základním principem izolace mRNA pomocí standardní fenol-chloroformové extrakce následované reverzní transkripcí a qRT-PCR reakcemi.

V první části byl zkoumán vliv CITCO, agonisty hCAR, na expresi genů biotransformačních a transportních proteinů v ledvinách humanizovaných myší. Ke statisticky významnému zvýšení exprese došlo u genů *Ugt1a1* a *Slc22a1*. V druhé části experimentů jsme se zaměřili na ovlivnění exprese genů v lidské HK2 buněčné linii po přidání látek působících na CAR. V jediném případě jsme zaznamenali významné zvýšení exprese – a to u genu *CYP2B6* po podání kombinace CITCO 10 μ M + PK11195 10 μ M. Významné snížení exprese bylo pozorováno u výsledků genu *CYP3A4*, a to po podání fenobarbitalu 500 μ M a kombinace PK11195 10 μ M + CITCO 10 μ M.

Porovnání získaných výsledků s daty zkoumající regulaci genové exprese CAR v játrech naznačuje, že CAR hraje i v ledvinné tkáni významnou roli, nicméně se do značné míry odlišuje a její přesná definice vyžaduje další výzkum.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Aneta Trávníčková

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Title of diploma thesis: Study of gene expression regulation in kidneys

During evolution, each organism was forced to create its complex defense system to prevent the accumulation of endogenous and foreign substances, including drugs, in the body. These defense systems are composed of Phase I and Phase II enzymes and transport proteins. One of the main roles in the metabolism of endogenous and biotransformation of exogenous substances is ensured by the constitutive androstane receptor (CAR).

This work aimed to determine the effect of activation of the human constitutive androstane receptor (hCAR) on the gene expression of drug transporters and biotransformation enzymes in the kidneys of humanized mice. Additionally, to examine the effect of CAR on the expression of selected genes in the HK2 cell line. In both cases, the isolation of mRNA was performed using the classic phenol-chloroform extraction followed by reverse transcription and the qRT-PCR reactions.

Firstly, we studied the influence of CITCO, an agonist of hCAR, on the expression of biotransformation and transport protein genes in the kidneys of humanized mice. The expression of *Ugt1a1* and *Slc22a1* genes was increased with statistical significance. In the second part, we focused on the influence of genes in the human HK2 cell line after the addition of substances affecting the CAR. In only one case, a significant increase of the *CYP2B6* gene after administration of CITCO 10 μ M + PK11195 10 μ M was apparent. A significant reduction of expression was observed for the *CYP3A4* gene after administration of phenobarbital 500 μ M and the combination PK11195 10 μ M + CITCO 10 μ M.

A comparison of the results with studies investigating the regulation of gene expression by CAR in the liver suggests that CAR also plays a significant role in kidneys, however, it differs and its exact definition requires further research.

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. ÚVOD	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. Farmakokinetické děje	12
3.2. Biotransformační procesy	12
3.3. Jaderné receptory	14
3.3.1. Struktura jaderných receptorů	15
3.3.2. Rozdělení jaderných receptorů	16
3.3.3. Mechanismus účinku jaderných receptorů.....	17
3.3.4. Sirotčí adoptované receptory – CAR a PXR	18
3.3.5. PXR receptor	19
3.4. CAR receptor	19
3.4.1. Aktivace CAR	20
3.4.2. Agonisté a antagonisté CAR	22
3.5. Lékové transportéry	26
3.5.1. SLC transportéry	27
3.5.2. ABC transportéry.....	28
4. CÍL PRÁCE	32
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
5.1. Použité materiály a přístroje	33
5.1.1. Zvířata.....	33
5.1.2. Buněčná linie HK2	34
5.1.3. Přístroje a pomůcky	34
5.1.4. Chemikálie a reagensy.....	35
5.1.5. Příprava fosfátového pufru (PBS)	36
5.2. Experimentální metody	37
5.2.1. Kultivace buněk a buněčné experimenty.....	37
5.2.2. Izolace RNA	38
5.2.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA.....	39
5.2.4. Reverzní transkripce	41
5.2.5. Kvantitativní Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)	42
5.2.6. Statistické zpracování dat	43
6. VÝSLEDKY	44

6.1. Ovlivnění exprese genů po aktivaci CAR receptoru podáním CITCO v ledvinách humanizovaných myší	44
6.1.1. Biotransformační enzymy	44
6.1.2. Lékové transportéry	45
6.2. Stanovení exprese genů po podání látek ovlivňujících CAR v HK2 buněčné linii	45
7. DISKUSE	47
8. ZÁVĚR	54
9. LITERATURA	55

1. Seznam zkratek

Actb	beta-aktin
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
AF-1	aktivační funkce 1
ABC	ATP-binding cassette
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
ASC-2	aktivační signální kointegrátor
BCRP	breast cancer resistance protein
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	CAR cytoplasmic retention protein
CITCO	6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim
DAX-1	dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, Gene 1
DBD	DNA vázající doména
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FXR	farnesoid X receptor
Gapdh	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GCNF	germ cell nuclear factor
GST	glutathion-S-transferáza

GRIP1/TIF2	protein 1 interagující s glukokortikoidním receptorem/transkripční intermediární faktor 2
hCAR	lidský konstitutivní androstanový receptor
hPXR	lidský pregnanový X receptor
HSP	heat shock protein
LBD	ligand vázající doména
MATE	mammal multidrug and toxin extrusion protein
mCAR	myší konstitutivní androstanový receptor
MDR1	multidrug resistance protein 1
mPXR	myší pregnanový X receptor
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
NCoR	korepresor jaderného receptoru
NBD	nukleotid vázající doména
NR	nukleární receptory
NTD	N-terminální doména
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
PB	fenobarbital
PBREM	phenobarbital responsive enhancer modules
PCN	5-pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -karbonitril
PGC-1	gamma koaktivátor 1 aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
P-gp	p-glykoprotein
PK11195	1-(2-chlorofenylmethylpropyl)-3-isochinolin-karboxamid
PP2A	proteinová fosfatáza 2A

PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PXR	pregnanový X receptor
RACK1	receptor pro aktivovanou C-kinázu 1
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
SF-1	steroidogenic Factor 1
SHP	small heterodimer partner
SLC	solute carrier
SLCO	solute carrier organic anion
SMC-1	protein udržující strukturu chromozomu 1
Sp1	specifický protein 1
SR	steroidní receptory
SRC-1	steroidní koaktivátor 1
SULT	sulfotransferáza
TCPOBOP	4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
TMD	transmembránová doména
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy

2. Úvod

Během evoluce si každý organismus vytvořil vlastní komplexní obranný systém zabráňující hromadění endogenních metabolitů a cizorodých látek, včetně léčiv, v těle. Tyto obranné systémy se sestávají z biotransformačních enzymů a transportních proteinů. Ačkoliv mnoho ve vodě rozpustných sloučenin je snadno eliminováno transportními proteiny, lipofilní látky mnohdy vyžadují biotransformaci pro zvýšení své rozpustnosti ve vodě. Mezi enzymy zodpovědné za biotransformaci řadíme enzymy I. fáze – zejména cytochromy P450, které jsou zodpovědné za vnesení polární funkční skupiny, a enzymy II. fáze metabolismu – tzv. transferázy, katalyzující konjugaci s ve vodě rozpustnými skupinami. Sloučeniny se tak transformují na ve vodě rozpustné, neaktivní metabolity, které mohou být pomocí transportérů vyloučeny žlučí nebo močí (Gao a Xie 2010).

Na udržování homeostázy organismu a rovněž i detoxifikaci organismu od metabolických zplodin ale i látek exogenního původu se podílí celá řada mechanismů. Mezi hlavní způsoby patří regulace genové exprese pomocí jaderných receptorů – konstitutivní androstanový receptor (CAR) a pregnanový X receptor (PXR), které reagují na potenciálně nebezpečné endogenní i exogenní látky a vylučují je z těla prostřednictvím regulace genové exprese biotransformačních enzymů a transportních proteinů. Udává se, že regulují přibližně 90 % veškerých metabolických reakcí II. fáze. Oba receptory jsou exprimovány v největší míře v játrech, dále v ledvinách, plicích, střevní sliznici a placentě a jsou aktivovány širokou škálou přírodních i syntetických sloučenin. Úlohy PXR a CAR se překrývají a mnohdy není možné odlišit, jakou měrou se každý z nich na regulaci podílí (Gao a Xie 2010, Zhao et al. 2021).

Jelikož je většina biotransformačních reakcí situována v játrech, je právě jim věnováno nejvíce studií, ačkoliv je známo, že biotransformace probíhá i v dalších tkáních, včetně ledvin (Zhao et al. 2021). Již starší studie prokázaly, že lidské ledviny mají významnou schopnost biotransformace xenobiotik, z nichž některá jsou dokonce biotransformována ve větší míře ledvinami než játry (Anders 1980). Ku příkladu bylo zjištěno, že glukuronidace propofolu lidskými ledvinovými mikrozomy je 3-4x vyšší než u lidských jaterních mikrozomů (Knights et al. 2013). Proto je velmi důležité v eliminaci cizorodých látek porozumět nejen roli jater, ale i úloze ledvin.

3. Teoretická část

3.1. Farmakokinetické děje

Jednou z oblastí farmakologie je farmakokinetika zabývající se pohybem léčiv v těle od jejich podání až po jejich vyloučení ven z organismu. Zároveň zkoumá i faktory a podmínky, které mohou pohyb léčiva ovlivnit. Tato věda se zabývá primárně léčivy, avšak stejné principy se uplatňují i pro další látky, jako jsou endogenní látky, toxiny nebo polutanty životního prostředí. Akronym ADME je tvořen počátečními písmeny hlavních farmakokinetických fází: Absorpce, Distribuce, Metabolismus a Exkrece. Poslední dvě zmíněné se dohromady označují jako eliminace a představují způsob detoxifikace organismu. Tyto čtyři procesy jsou hlavními determinantami průběhu lékového profilu v čase a určují tak průběh účinků po podání léčiva. Studium absorpce je důležité z hlediska rychlosti nástupu účinku a intenzity vstřebání. Distribuce léčiva na místo účinku je zásadní pro jeho požadovaný efekt. Rychlost eliminace je pak klíčová k odpovědi na otázku, jak často je potřebné podávat dané léčivo k udržení efektivní koncentrace. Hlavními eliminačními orgány jsou játra a ledviny, velikost potřebné dávky léčiva se odvíjí od funkce zmiňovaných orgánů (Hedaya 2012).

Všechny čtyři farmakokinetické fáze jsou ovlivněny nejen konkrétními parametry daného organismu (včetně věku, pohlaví, genetické výbavy), ale také vlastnostmi molekuly léčiva – jeho strukturou, velikostí, polaritou atd. (Hedaya 2012).

3.2. Biotransformační procesy

Metabolismus a biotransformace jsou souhrnem důležitých biotransformačních procesů, ve kterých jsou endogenní a exogenní látky obecně modifikovány na méně aktivní produkty ztrácející svůj účinek. Tyto produkty jsou mnohdy polárnější (hydrofilnější) než původní molekula a jsou tak snadněji vyloučeny močí nebo žlučí ven z organismu. Existují i výjimky v podobě proléčiv, kdy se přeměnou molekuly získává aktivní forma léčiva. Některá léčiva mohou být vyloučena, aniž by došlo k jejich strukturální změně, avšak většina léčiv biotransformačním změnám podléhá. K těm může docházet již v ústní dutině anebo až po distribuci krevním řečištěm do orgánů a tkání jako jsou játra, která hrají klíčovou úlohu v biotransformaci xenobiotik. V mnohem menší míře se na biotransformaci

podílejí i další tkáně jako jsou ledviny, plíce, intestinální sliznice, kůže nebo placenta (Gibson a Skett 2013, Matalova a Buchta 2020).

Biotransformaci můžeme rozdělit do dvou fází, při kterých dochází ke změně molekuly s cílem zvýšení její polariry. První fáze zahrnuje reakce jako je oxidace, redukce, hydrolýza nebo izomerizace. Obvykle jsou tak do molekuly zavedeny polární funkční skupiny jako např. -OH, -COOH, -SH nebo -NH₂. Nejdůležitějšími a nejznámějšími enzymy této fáze jsou cytochromy P450, které se nachází zejména v játrech, ale i v dalších orgánech včetně ledvin, placenty, gastrointestinálního traktu a kůže. Jedná se o membránově vázané hemoproteiny vyznačující se velmi širokou substrátovou specifitou. Účastní se okolo 75 % veškerých metabolických reakcí, což mnohdy může vést k různým lékovým interakcím z důvodu indukce nebo inhibice daného enzymu. CYP450 mimo jiné hraje důležitou roli při biosyntéze cholesterolu, prostacyklinů, tromboxanu A₂ a steroidních hormonů. Genetické polymorfismy a epigenetické změny v genech cytochromu mohou být příčinou interindividuálních rozdílů v terapeutické účinnosti léků. Mezi nejvýznamnější formy CYP patří CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4 (Lincová et al. 2006, Matalova a Buchta 2020, Zhao et al. 2021).

Gen *CYP2B6*, který se vyznačuje svou velmi širokou substrátovou specifitou, je vysoce polymorfním a podílí se na 3-12 % z celkové biotransformace léčiv. Jedná se o preferenční enzym pro mnoho klinicky významných léčiv, jakými jsou propofol, bupropion, metadon, cyklofosfamid, nevirapin nebo efavirenz. Expres tohoto enzymu byla dokázána nejen v játrech, ale i v dalších tkáních včetně ledvin, srdce, placenty, střeva a plic. Myším orthologem lidského enzymu CYP2D6 je enzym Cyp2b10 (Knights et al. 2013, Li et al. 2018).

Enzym CYP3A4, jehož původní úlohou byl zřejmě metabolismus endogenních steroidů, se účastní většiny známých přeměn léčiv, na kterých se podílí cytochromy P450 – jedná se přibližně o 35-42 % klinicky používaných léčiv. V lidských játrech tvoří v průměru 30 % obsahu všech CYP 450 a stává se tak nejvýznamnějším místem lékových interakcí. Kromě jater se nachází i v dalších tkáních, jakými jsou plíce, ledviny, nadledviny, tenké střevo, kůže a varlata. Typickými substráty enzymu jsou např. amlodipin, amiodaron, atorvastatin, simvastatin a diazepam. Mezi silné induktory CYP3A4 řadíme např. fenobarbital, fenytoin, rifampicin (RIF) či karbamazepin. A silnými inhibitory jsou ku příkladu klaritromycin, ketokonazol, itraconazol, ritonavir, indinavir, saquinavir nebo

grapefruit. Myším orthologem lidského enzymu CYP3A4 je enzym Cyp3a11 (Kousalová et al. 2003, Suchopár et al. 2023).

CYP2C19 je polymorfním genem enzymu, který je lokalizován převážně v játrech a tenkém střevě a účastní se biotransformace významných léčiv jako je omeprazol, citalopram, mefenytoin, diazepam a některé barbituráty. Tento enzym také katalyzuje bioaktivaci protidestičkového léčiva klopidogrelu. Myším orthologem lidských enzymů CYP2C19 a CYP2C9 je enzym Cyp2c29 (anonym 2024, Funck-Brentano et al. 2024).

V druhé fázi biotransformace, tzv. konjugační, jsou metabolity vzniklé v první fázi konjugovány kovalentní vazbou s polárními endogenními sloučeninami za vzniku ještě polárnějšího metabolitu. Podle navázaného konjugátu můžeme reakce rozdělit do několika typů. Nejčastější z nich je glukuronidace, ve které dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, a sulfatace, při které metabolit reaguje se zbytkem kyseliny sírové – tzv. sulfátem. Dalšími reakcemi jsou N-acetylace, methylace apod. Tyto reakce jsou katalyzovány transferázami, mezi nejvýznamnější z nich řadíme UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) a sulfotransferázy (SULT), dále se na reakcích podílí N-acetyltransferázy, glutathion S-transferázy (GST) a methyltransferázy (zejména thiopurin S-methyltransferáza a katechol O-methyltransferáza). Sloučeniny vzniklé v důsledku biotransformačních reakcí mohou být transportovány zpět do krve a následně být vyloučeny ledvinami, nebo jsou eliminovány žlučí za pomoci efluxních ABC-transportérů (ATP-binding cassette) (Lincová et al. 2006, Matalova a Buchta 2020, Anzenbacher 2023).

UGT1A1 je genem enzymu nazývaného bilirubin-uridin-difosfát-glukuronosyltransferáza patřícího mezi UGT, které provádí glukuronidaci. Jedná se o jediný enzym provádějící glukuronidaci bilirubinu, látku produkovanou při rozpadu červených krvinek, na jeho netoxickou formu, která může být vyloučena z těla. Některé polymorfismy *UGT1A1* jsou spojovány s onemocněními jako je Gilbertův syndrom nebo Crigler-Najjardův syndrom I. a II. typu (Gong et al. 2001, Suchopár et al. 2023).

3.3. Jaderné receptory

Jaderné neboli nukleární receptory (NR) jsou definovány jako ligandem aktivované transkripční faktory, které regulují klíčové funkce v organismu jako je metabolismus, reprodukce, vývoj, cirkadiánní rytmus nebo zánět, a proto jsou také významným

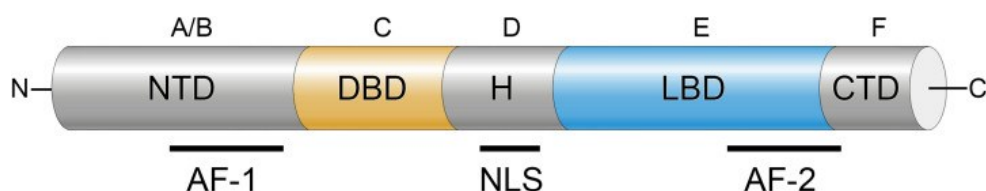
terapeutickým cílem. Jejich dysregulace může vést ke kardiovaskulárním, neurodegenerativním nebo nádorovým onemocněním. Důležitou roli hrají i při biodegradaci xenobiotik. Většina ligandů jaderných receptorů je malými lipofilními molekulami, které mohou snadno difundovat přes membránu buněk a vázat se na receptor – přirozeně se jedná o steroidy, retinoidy a fosfolipidy. Avšak existují i další ligandy, typicky hormony štítné žlázy, které jsou do buněk importovány aktivně. NR mohou být aktivovány také xenobiotiky z vnějšího prostředí včetně léčiv – např. syntetická analoga hormonů, RIF nebo glitazony (Weikum et al. 2018, Frigo et al. 2021).

3.3.1. Struktura jaderných receptorů

Kromě dvou atypických receptorů DAX-1 (Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, Gene 1) a SHP (Small heterodimer partner), jsou jaderné receptory tvořeny ze čtyř nebo pěti domén A-F (viz Obr. 1), z nichž každá má svou specifickou roli. Hmotnost NR se může lišit, ale obecně se pohybuje mezi 66 a 100 kD.

- A/B doména: N-terminální doména (NTD): Tato doména je velmi neuspořádanou. Obsahuje aktivační funkci-1 (AF-1), která interaguje s množstvím koregulačních proteinů. NTD je cílem mnoha post-translačních modifikací včetně fosforylace, SUMOylace a acetylace.
- C doména: DNA vázající doména (DBD): Je tvořena dvěma poddoménami. Obě se skládají ze čtyř cysteinových zbytků, které koordinují zinkový iont a vytváří motiv zinkového prstu vázající DNA.
- D doména (tzv. Hinge region): Jedná se o krátký, flexibilní linker mezi DBD a ligand vázající doménou (LBD), který obsahuje hlavní jadernou lokalizační sekvenci.
- E doména: Tato strukturně konzervovaná doména běžně obsahuje 11 α -helixů a 4 β -listy. Hlavní součástí je LBD, která vytváří hydrofobní kapsu vázající nejen ligandy, ale také koregulační proteiny v místě aktivační funkce 2 (AF-2). Tato kapsa je složená přibližně ze 75 % hydrofobními zbytky, ale zároveň obsahuje kritické polární zbytky, které jsou klíčem k tvorbě vodíkových vazeb mezi receptorem a ligandem a pomáhají ke správné orientaci ligandu. E-doména je zvláště důležitá pro dimerizaci NR, které tvoří heterodimery.

- F doména: Některé receptory obsahují krátkou variabilní C-koncovou doménu. Ve většině případů má neznámé funkce, avšak nedávné studie naznačují její klíčové role v odpovědi estrogenního receptoru α na selektivní modulátory estrogenových receptorů (Weikum et al. 2018, Arao a Korach 2021, Frigo et al. 2021).



Obr. 1 Strukturní domény nukleárních receptorů. A/B doména: N-terminální doména (NTD) s aktivační funkcí 1 (AF-1); C doména: DNA-vázací doména (DBD); D doména (Hinge region): obsahuje nukleární lokalizační sekvenci; E doména obsahuje ligand vázací doménu (LBD) a aktivační funkci 2 (AF-2); F doména: C-koncová doména. Převzato z: Frigo et al. (2021)

3.3.2. Rozdělení jaderných receptorů

V lidském těle se nachází 48 jaderných receptorů rozdělených do 7 podrodin. U více než poloviny jaderných receptorů není znám endogenní ligand, proto se tyto receptory označují jako sirotčí. U některých z těchto receptorů byl však později objeven jejich pravděpodobný ligand, a proto jsou označovány jako sirotčí adoptované receptory.

- Podskupina 0: Tato skupina zahrnuje dva atypické receptory: DAX-1 a SHP. Tyto proteiny jsou unikátní svou strukturou sestávající se pouze z LBD, která obsahuje běžné motivy pro koaktivátory NR. Díky nim mohou interagovat s LBD jiných receptorů v procesu regulace transkripce.
- Podskupina 1: Jedná se o početnou rodinu tvořenou receptory hormonů štítné žlázy, CAR, PXR, receptory kyseliny retinové, receptory skupiny peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), reverse-Erb receptory, farnesoid X receptorem (FXR), jadernými X receptory a receptorem vitamínu D. Tyto receptory jsou regulovány různými lipofilními molekulami, jakými jsou např. thyroïdní hormony, steroly, žlučové kyseliny a mastné kyseliny.
- Podskupina 2: Podrodina zahrnující sirotčí receptory – retinoidní X receptory (RXR), hepatocyte nuclear factor 4 a chicken ovalbumin upstream promoter

transcription factors. U všech těchto NR bylo prokázáno, že vážou mastné kyseliny, avšak není jasné, zda právě tyto ligandy hrají roli v regulaci genové exprese, typické pro ostatní skupiny NR. RXR je ve skupině jediným receptorem se známým aktivačním ligandem, kterým je kyselina 9-cis-retinová.

- Podskupina 3: Tuto podrodinu tvoří steroidní receptory (SR), které regulují metabolické, reprodukční a vývojové procesy. Řadíme sem androgenní receptor, progesteronový receptor, glukokortikoidní receptor, mineralokortikoidní receptor a estrogenní receptory α a β . Hormony odvozené od cholesterolu, jako je estrogen a kortizol, regulují SR přímou vazbou.
- Podskupina 4: Jedná se o podrodinu tvořenou sirotčími receptory: nerve growth Factor 1B, nurr-related Factor-1 a neuron-derived orphan Receptor-1. Zmíněné receptory jsou důležité pro vývoj a udržení funkce neuronů.
- Podskupina 5: Tato podrodina zahrnuje steroidogenic Factor 1 (SF-1) a liver receptor Homolog-1. Obecně jsou tyto receptory stále klasifikovány jako sirotčí, ale důkazy naznačují, že jsou regulovány fosfolipidy. LRH-1 a SF-1 jsou důležité při vývoji a metabolismu.
- Podskupina 6: Do této podrodiny spadá pouze jeden sirotčí receptor – germ cell nuclear factor (GCNF) hrající významnou roli při ontogenetickém vývoji. GCNF má v porovnání s ostatními velmi odlišnou LBD a nemá aktivační funkci hormonálních receptorů, proto je řazen do samostatné skupiny (Weikum et al. 2018).

3.3.3. Mechanismus účinku jaderných receptorů

Jak již bylo řečeno dříve, jaderné receptory se nachází uvnitř buňky, a proto je většina ligandů malými lipofilními látkami, které snadno prochází buněčnou membránou, případně mají v membráně svůj přenašeč. V cytoplazmě jsou receptory udržovány jako monomery v neaktivním stavu pomocí proteinů tepelného šoku (v angl. heat shock proteins (HSP)). Jakmile se ligand dostane do buňky, dojde k jeho navázání přes LBD, což vyvolá konformační změnu vedoucí k uvolnění proteinů tepelného šoku a translokaci receptoru do jádra buňky. V jádře dochází pomocí DBD k navázání receptoru, který může být buď ve formě monomeru, homodimeru nebo heterodimeru, na specifické sekvence DNA

označované jako DNA-responzivní elementy. Po tomto navázání přichází na scénu různé proteiny souhrnně označované jako koregulátory, které s NR interagují v místě AF-1 a AF-2. Je jich známo přibližně 200 a podle jejich funkce je můžeme rozdělit do dvou kategorií – aktivující koaktivátory a potlačující korepresory. Tímto způsobem dochází k regulaci genové exprese (Frigo et al. 2021, Honkakoski 2022).

3.3.4. Sirotčí adoptované receptory – CAR a PXR

Konstitutivní androstanový receptor a pregnanový X receptor jsou dva blíže příbuzné jaderné receptory patřící do skupiny sirotčích adoptovaných receptorů. V roce 1994 byl objeven lidský CAR receptor (hCAR), jehož častým heterodimerním partnerem je RXR. Tento heterodimer se váže do responzivních elementů pro CAR – např. direct repeat 4 nebo everted repeat separated by 8 nucleotides. O tři roky později, v roce 1997, byl objeven myší CAR (mCAR). Další výzkumy následně vedly k identifikaci PXR, u kterého byla prokázána aktivace deriváty dexametazonu a pregnenolonu (Stoner et al. 2007, Dash et al. 2014).

Oba receptory fungují jako senzory endogenních a exogenních sloučenin i jejich biotransformačních produktů. Jejich hlavním úkolem je zvýšení eliminace těchto toxických látek pomocí regulace transkripce biotransformačních enzymů a transportérů. Funkce receptorů PXR a CAR se mohou překrývat – některé geny mohou být regulovány oběma. Avšak mohou se lišit rozdílnou preferencí, ku příkladu CAR je selektivnější pro lidský CYP2B6. Oba receptory se také podílí na ovlivňování energetické homeostázy skrz regulaci metabolismu glukózy a lipidů v játrech (Dash et al. 2014).

Kritický problém při studiu funkce PXR a CAR spočívá v selektivitě ligandu mezi lidmi a myšmi kvůli výrazným mezidruhovým rozdílům v aminokyselinových sekvencích jejich LBD. Například RIF a SR12813 jsou silnými agonisty pro lidský PXR (hPXR), ale ne pro myší PXR (mPXR), zatímco silný agonista mPXR 5-pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -karbonitril (PCN) je špatným agonistou pro hPXR.

Na druhou stranu 6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim (CITCO) je silným agonistou pro hCAR, ale ne pro mCAR, zatímco 4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP) je selektivní pro mCAR. Pro překonání druhových rozdílů v rozpoznávání ligandů a pro usnadnění studií lidských

receptorů na zvířecích modelech byly vytvořeny humanizované myší modely (Wang et al. 2012).

3.3.5. PXR receptor

PXR je exprimován převážně v játrech a střevech a je aktivován širokou škálou přírodních a syntetických sloučenin. RIF je silným aktivátorem hPXR, selektivním agonistou mPXR je PCN. Po aktivaci vytváří heterodimer s RXR a aktivuje transkripci cílových genů, kterými jsou: geny z 1. fáze metabolismu např. *CYP3A4* a *CYP2C*, z 2. fáze pak *UGT* (konkrétně gen *UGT1A1*) a *SULT*. Dále ovlivňuje geny transportérů léčiv, jakými jsou Multidrug resistance protein 1 (MDR1, také známý jako P-glykoprotein (P-gp)) a multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) (Gao a Xie 2010, Oladimeji a Chen 2018).

3.4. CAR receptor

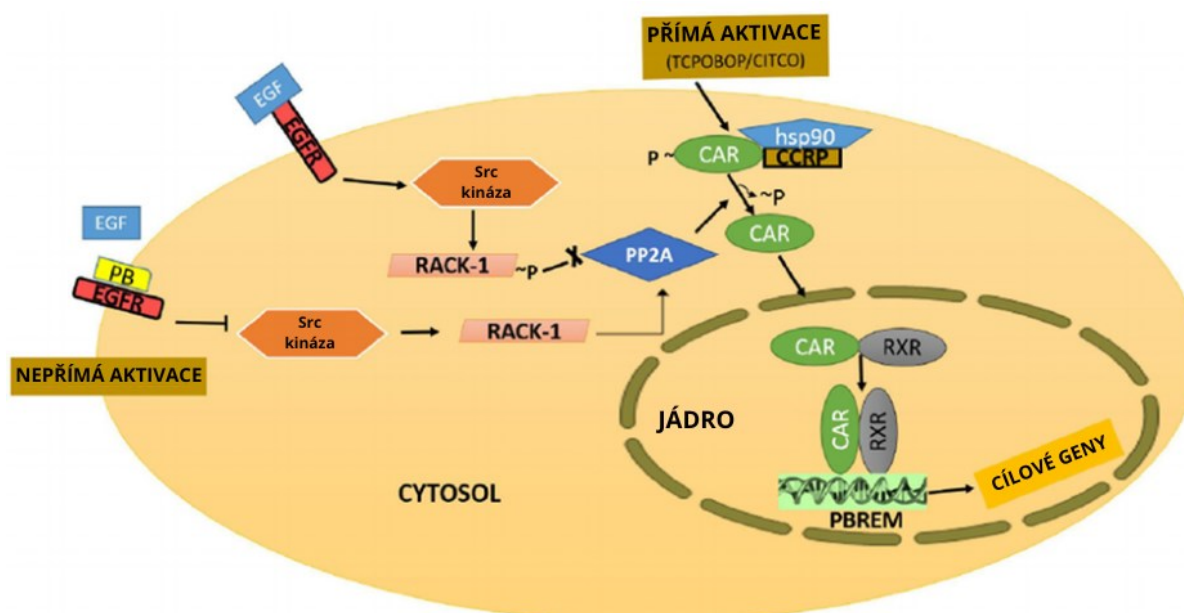
Konstitutivní androstanový receptor, který se stal naším hlavním tématem, je jaderným receptorem patřícím do podrodiny 1 skupiny I (*NR1I3*). Původně byl charakterizován jako xenosenzor indukující expresi genu *CYP2B6*, který se podílí na biotransformaci širokého spektra xenobiotik. Později však bylo prokázáno, že CAR reguluje více než 2000 genů kódujících klíčové enzymy metabolismu léčiv a xenobiotik. Mezi cílové enzymy 1. fáze řadíme *CYP3A4*, *CYP2C19*, *CYP2C8*, *CYP2B6* (i jeho myší ortholog *Cyp2b10*), *CYP1A1* a *CYP1A2* (poslední dva zmíněné jsou hlavními cílovými geny aryl hydrokarbonového receptoru). Regulovanými enzymy 2. fáze jsou *SULT*, *GST* a *UGT*, mezi které se řadí *UGT1A1*. Navíc bylo zjištěno, že transportéry léků provádějící eflux biotransformovaných xenobiotik jsou CAR receptorem regulovány také. Mezi nejvýznamnější regulované transportéry patří MDR1 (gen *ABCB1*), MRP2 (gen *ABCC2*), u kterého se ukázalo, že je nezávisle na sobě regulován třemi jadernými receptory (CAR, PXR a FXR), dále MRP4, BCRP (breast cancer resistance protein) a OATP2 (organic anion transporting polypeptide 2), který zajišťuje transport aniontových sloučenin a bilirubinu (Dash et al. 2014, Pustylnyak et al. 2020).

Dále se zjistilo, že CAR ovlivňuje homeostázu glukózy a metabolismus lipidů. Nachází se převážně v cytoplazmě hepatocytů, ale v menší míře ho můžeme najít i ve střevě,

srdci, mozku či ledvinách. Jeho exprese může být modifikována patofyziologickými stavy (trauma, sepse, zánět), genetikou, jinými NR, hladověním nebo odchylkou od cirkadiálního rytmu (Dash et al. 2014, Kublbeck et al. 2020).

CAR, podobně jako většina členů nadrodiny, má klasickou doménovou strukturu, která zahrnuje LBD a DBD se dvěma zinkovými prsty. DBD se podílí na interakci receptoru s úseky DNA, nazývanými jako responzivní elementy, v regulačních oblastech cílových genů. LBD slouží k navázání ligandu a obsahuje domény aktivující transkripci jako je AF-2 (Pustylnyak et al. 2020).

3.4.1. Aktivace CAR



Obr. 2 Přímá a nepřímá aktivace CAR receptoru vedoucí k ovlivnění genové exprese v jádře. EGF – epidermální růstový faktor, EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru, RACK1 – receptor pro aktivovanou C-kinázu 1, PP2A – proteinová fosfatáza 2A, hsp90 – heat shock protein 90, CCRP – cytoplazmatický CAR retenčním proteinem, PB – fenobarbital, PBREM – Phenobarbital responsive enhancer modules

Modifikováno dle: Dash et al. (2014)

Aktivace CAR je několikakrokovým procesem. V neaktivním stavu se CAR nachází v buněčné cytoplazmě v komplexu s několika proteiny: s HSP90, s cytoplazmatickým CAR

retenčním proteinem (CCRP) a s membránou asociovanou podjednotkou proteinové fosfatázy 1β . Navíc je ještě stabilizován chaperonovým proteinem HSP70 (Mottino a Catania 2008, di Masi et al. 2009, Dash et al. 2014, Pustyl'nyak et al. 2020).

Přímá aktivace: Jakmile dojde k interakci s ligandem, HSP90 a CCRP, které udržují neaktivní stav receptoru, se oddělí a CAR je přemístěn do jádra. Zásadní úlohu má proteinová fosfatáza 2A (PP2A), která defosforyluje CAR a umožňuje tak jeho translokaci. Zároveň může aktivace zahrnovat navázání koaktivátorů, mezi které patří GRIP1/TIF2 (Protein 1 interagující s glukokortikoidním receptorem/transkripční intermediární faktor 2), PGC-1 (gama koaktivátor 1 aktivovaný peroxisomovým proliferátorem), SRC-1 (steroidní koaktivátor 1), Sp1 (Specifický protein 1), ASC-2 (aktivační signální kointegrátor) a SMC-1 (protein udržující strukturu chromozomu 1), nebo disociaci korepresorů (např. NCoR (korepresor jaderného receptoru)). Následně dojde k tvorbě heterodimeru s RXR, vazbě na PBREM (Phenobarbital responsive enhancer modules) a indukci genové exprese (viz Obr. 2) (Mottino a Catania 2008, di Masi et al. 2009, Dash et al. 2014, Pustyl'nyak et al. 2020).

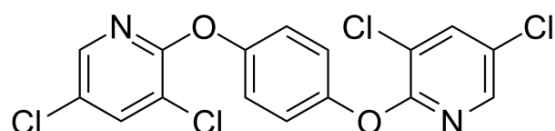
Nepřímá aktivace: Řada sloučenin, které aktivují transkripční aktivitu, nejsou přímými ligandy CAR, nedochází tedy k interakci s LBD receptorem, ale mohou ho aktivovat nepřímo prostřednictvím signálních transdukčních drah. Tato aktivace zahrnuje defosforylaci pomocí PP2A. Předpokládá se, že PP2A je aktivována prostřednictvím jiné dráhy zahrnující EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru) a RACK1 (receptor pro aktivovanou C-kinázu 1). V nepřítomnosti aktivující látky se EGF (epidermální růstový faktor) váže na EGFR, čímž aktivuje Src kinázu, která fosforyluje RACK1 a nedochází tak k aktivaci CAR. Pokud však dojde k expozici nepřímému ligandu – např. PB, ligand se naváže na EGFR, což vede k inaktivaci Src kinázy. V důsledku toho nefosforylovaný RACK1 interaguje s PP2A a CAR je aktivován. Jelikož se PB účastní aktivace AMPK (AMP-aktivovaná proteinkináza), předpokládá se, že AMPK aktivuje PP2A. Klasickým příkladem nepřímého aktivátoru jak myšáho, tak lidského CAR receptoru je PB a bilirubin. Dalšími látkami patřící mezi léčiva a zároveň aktivující lidský CAR jsou např. valproová kyselina, efavirenz, karbamazepin, sulfonamidy nebo nevirapin (Mottino a Catania 2008, di Masi et al. 2009, Dash et al. 2014, Pustyl'nyak et al. 2020).

3.4.2. Agonisté a antagonisté CAR

CAR je aktivován mnoha endogenními (viz Tab. 1) a chemickými látkami ze skupin léků, pesticidů (např. pyretroidy a karbamáty) a sekundárních metabolitů rostlin (viz Tab. 2) (Pustylnyak et al. 2020).

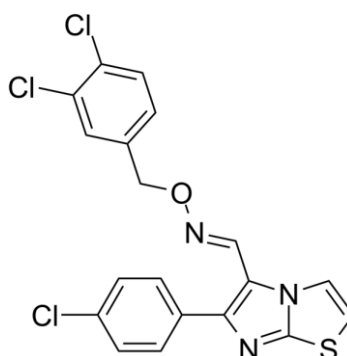
Zatímco endogenní ligandy hCAR nejsou známy, řada přirozeně se vyskytujících steroidů jako např. androstanol, androstenol a 5β -pregnan-3,20-dion působí na CAR jako inverzní agonisté, kteří podporují korepresory a tím snižují transkripční aktivitu. Od nich byl odvozen i samotný název receptoru. Estrogenové deriváty vykazují agonistickou i antagonistickou povahu tím, že po vazbě na CAR indukují navázání jak koaktivátoru SRC-1, tak korepresoru NcoR (Mottino a Catania 2008, Mejdrova et al. 2023).

Doposud byly popsány dvě sloučeniny, které vykazují přímou interakci s ligand-vázající kapsou: TCPOBOP – modelový agonista myšího CAR (struktura je zobrazena na Obr. 3), a CITCO – modelový agonista lidského CAR (struktura CITCO je znázorněna na Obr. 4, Obr. 5 pak vyobrazuje 3D znázornění LBD lidského CAR spolu se svým modelovým ligandem CITCO) (Pustylnyak et al. 2020).



Obr. 3 TCPOBOP neboli 4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen

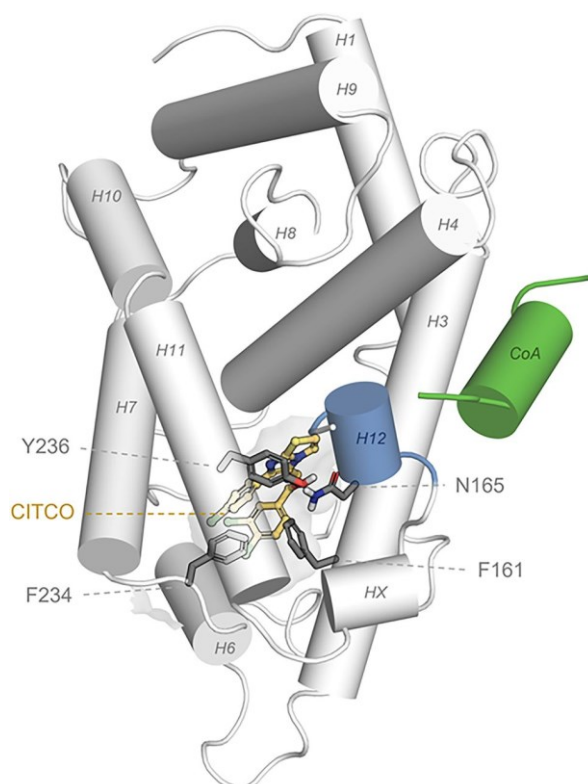
Převzato z: <https://www.medchemexpress.com/tcpobop.html>



Obr. 4 CITCO neboli 6-(4-chlorofenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim

Převzato z: <https://www.medchemexpress.com/citco.html>

CITCO je velmi lipofilní sloučeninou, která má limitovanou selektivitu, ta se odvíjí od použité koncentrace. V nízkých koncentracích (přibližně $1\mu\text{M}$) je čistě agonistou CAR. Jakmile však koncentraci zvýšíme, dochází k postupné ztrátě specifity. V $10\mu\text{M}$ koncentraci se stává zároveň částečným agonistou PXR – výsledný pozorovaný efekt je tedy smíšený (viz Tab. 3). Odlišit v jaké míře se jedná o efekt CAR a PXR receptoru není možné, respektive to doposud nebylo odhaleno. Rozlišit to lze pouze vhodně nastavenými experimentálními podmínkami – nízkou koncentrací (Lin et al. 2020).



Obr. 5 Model ligand-vázající domény (LBD) CAR receptoru s navázaným agonistou CITCO. Šroubovice jsou znázorněny jako označené cylindry (H1 – H12). Aktivační šroubovice H12 je znázorněna modře. Zeleně je pak znázorněn koaktivátorový peptid (CoA). CITCO je zobrazeno ve zlaté barvě, jeho klíčové aminokyselinové zbytky šedě zbarvené jsou označeny jako F161, N165, F243 a Y326. Světle šedý mrak v pozadí je způsoben strukturou β -listu LBD. Převzato z: Honkakoski 2022

1-(2-chlorfenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isochinolinkarboxamid neboli PK11195, typický periferní ligand benzodiazepinového receptoru, byl prokázán jako silný selektivní antagonist hCAR, zatímco aktivita mCAR nebyla změněna. Mechanismus spočívá v inhibici interakce hCAR s koaktivátory SRC-1 a GRIP1. Jedna ze studií dokázala,

že PK11195 je následně metabolicky přeměněn z antagonisty na agonistu hCAR, což přispívá k indukci CYP2B6 a CYP3A4 v primárních hepatocytech a HepaRG buňkách (Li et al. 2008, Mackowiak et al. 2017).

Je třeba také poznamenat, že některé chemikálie aktivující CAR se mohou vázat i na jiné NR, zejména na PXR a PPAR.

Tab. 1 Endogenní látky ovlivňující CAR a PXR

Název sloučeniny	Receptor	Účinek
3,17β-estradiol	hCAR	inverzní agonista
5α-androst-16-en-3α-ol	hCAR	inverzní agonista
5α-androstan-3α-ol	hCAR	inverzní agonista
5β-pregnan-3,20-dion	hPXR hCAR	agonista inverzní agonista
Bilirubin	hCAR	agonista
Estradiol	hPXR	agonista
Žlučové kyseliny	hCAR h/mPXR	agonista agonista

hCAR – lidský konstitutivní androstanový receptor, hPXR – lidský pregnanový X receptor, mPXR – myší pregnanový X receptor

Modifikováno dle: Dash et al. (2014)

Tab. 2 Sekundární rostlinné metabolity ovlivňující CAR a PXR

Název sloučeniny	Zdroj	Receptor	Účinek	Klinické využití
Artemisinin	Pelyněk roční	mCAR	agonista	malárie
Diallylsulfid	Česnek kuchyňský	mCAR	agonista	antiseptikum, posílení obranyschopnosti
Ginkgolid A	Jinan dvoulaločný	hPXR	agonista	prokrvení
Hyperforin	Třezalka tečkovaná	hPXR	agonista	lehké deprese
Kumestrol	Fytoestrogen z čeledi Fabaceae	hPXR	antagonista	menopauza
Paklitaxel	Čeľad' tisovité	mCAR	agonista	karcinomy
Schizandrin A a B	Schizandra čínská	hPXR	agonista	adaptogen

mCAR – myší konstitutivní androgenový receptor, hPXR – lidský pregnanový X receptor

Modifikováno dle: Gao a Xie (2012)

Tab. 3 Syntetické a semisyntetické látky ovlivňující CAR a PXR

Název sloučeniny	Receptor	Účinek	Klinické využití
17 α -ethinylestradiol	hCAR	inverzní agonista	antikoncepce
Androstanol	hCAR	inverzní agonista	-
CITCO 1 μ M	hCAR	agonista	-
CITCO 10 μ M	hCAR hPXR	agonista částečný agonista	-
Efavirenz	hCAR	agonista	HIV/AIDS
Fenobarbital	h/mCAR h/mPXR	agonista agonista	záchvaty a úzkosti
Fenytoin	hCAR	agonista	epilepsie
Karbamazepin	hCAR	agonista	epilepsie, neuropatická bolest
Meklizin	mCAR hCAR	agonista inverzní agonista	nauzea, zvracení
Nevirapin	hCAR	agonista	HIV/AIDS
PCN	mPXR	agonista	-
PK11195	hCAR	antagonista	-
Pyrethroidy	hCAR	agonista	insekticidy
Rifampicin	hPXR	agonista	tuberkulóza a psoriáza
Rifaximin	hPXR	agonista specifický pro střevo	průjem a idiopatické střevní záněty
SR12813	hPXR	agonista	-
Sulfonamidy	hCAR	agonista	chemoterapeutika
TCPOBOP	mCAR	agonista	-
Valproová kyselina	hCAR	agonista	epilepsie

hCAR – lidský konstitutivní androstanový receptor, mCAR – myší konstitutivní androstanový receptor, hPXR – lidský pregnanový X receptor, mPXR – myší pregnanový X receptor

Modifikováno dle: Dash et al. (2014)

3.5. Lékové transportéry

Vzhledem k tomu, že se buněčné membrány skládají z lipidové dvojvrstvy, která umožňuje volný průnik pouze lipofilním sloučeninám menší velikosti, je pro život buňky nutná přítomnost transportérů. Obvykle se jedná se o membránové proteiny primárně zodpovědné za transmembránový přenos velkých a hydrofilních látek endogenního původu a xenobiotik, včetně řady léků, dovnitř a ven z buněk. Tyto děje jsou zásadní v udržení homeostázy a pro přenos léčiv do cílových tkání nebo eliminačních orgánů. Mnoho lékových transportérů má široké spektrum strukturně nezávislých substrátů, což se stává častou příčinou lékových interakcí (viz Tab. 4). Vzájemná soutěž léčiv o vazbu na přenašeč může způsobit neočekávané změny hladin léku a možné toxické nežádoucí účinky. Transportéry jsou exprimovány v celém těle, zejména se však nachází v epitelu jater, ledvin, střeva, a orgánů s bariérovou funkcí, jako je mozek, placenta nebo varlata (Lin et al. 2015, Nigam 2015, Zhang a Hagenbuch 2019).

Tab. 4 Příklady léčiv, které interagují s ABC a SLC (solute carrier) transportéry

Léčivo	Název transportéru			
	ABC	SLC22	SLCO	SLC47
Metotrexát (antirevmatikum, cytostatikum)	<i>ABCC1</i> (MRP1)	<i>SLC22A6</i> (OAT1)	<i>SLCO1A2</i> (OATP1A2)	
	<i>ABCC2</i> (MRP2)	<i>SLC22A8</i> (OAT3)	<i>SLCO1B3</i> (OATP1B3)	
	<i>ABCC3</i> (MRP3)	<i>SLC22A11</i> (OAT4)		
	<i>ABCC4</i> (MRP4)			-
	<i>ABCC5</i> (MRP5)			
	<i>ABCG2</i> (BCRP)			
Acyklovir (antivirotikum)		<i>SLC22A1</i> (OCT1)		<i>SLC47A1</i>
		<i>SLC22A6</i> (OAT1)		(MATE1)
	-	<i>SLC22A7</i> (OAT2)	-	<i>SLC47A2</i>
		<i>SLC22A8</i> (OAT3)		(MATE2)
Rosuvastatin (statin)	<i>ABCG2</i>	<i>SLC22A8</i> (OAT3)	<i>SLCO1A2</i> (OATP1A2)	
			<i>SLCO1B1</i> (OATP1B1)	
			<i>SLCO1B3</i> (OATP1B3)	-
			<i>SLCO2B1</i> (OATP2B1)	
Cimetidin (antagonista histaminového H ₂ receptoru)		<i>SLC22A2</i> (OCT2)		<i>SLC47A1</i>
		<i>SLC22A8</i> (OAT3)		(MATE1)
	-		-	<i>SLC47A2</i>
			(MATE2)	
Metformin (antidiabetikum)		<i>SLC22A1</i> (OCT1)		<i>SLC47A1</i>
		<i>SLC22A2</i> (OCT2)		(MATE1)
	-	<i>SLC22A3</i> (OCT3)	-	<i>SLC47A2</i>
			(MATE2)	

ABC – ATP-binding cassette, SLC – solute carrier, SLCO – solute carrier organic anion, OAT – Organic anion transporter, OATP – Organic anion transporting polypeptide, OCT – Organic cation transporter, MATE – mammal multidrug and toxin extrusion protein
Modifikováno dle: Nigam (2015)

Transportéry lze podle jejich energetické spotřeby rozdělit na pasivní a aktivní. Pasivní transportéry pohybují substráty dle elektrochemického gradientu, zatímco aktivní přenášejí své substráty proti gradientům a spotřebovávají při tom energii. Ta je zpravidla poskytnuta ve formě ATP. Aktivní transportéry můžeme dále rozdělit na primární, které využívají energii přímo získanou z hydrolýzy ATP – např. ABC transportéry, a sekundární, které využívají elektrochemických gradientů (zpravidla Na^+ nebo H^+ iontů) vytvořených primárními transportéry – např. SLC transportéry (Zhang a Hagenbuch 2019).

Mezi hlavní skupiny lékových transportérů, kterým je ve farmakokinetice věnována větší pozornost, patří dvě nadrodiny zahrnující více než 400 proteinů. Jedná se o již zmiňované SLC a ABC transportéry, které hrají důležitou roli v procesech ADME. Jejich substrátová specifita je často široká. Obě skupiny transportérů jsou ve velké míře exprimovány v játrech a ledvinách. Celkově u několika desítek ABC transportérů a SLC transportérů byla popsána přímá účast při translokaci léčiv. Transportéry jsou rovněž důležitou součástí biologických bariér (Nigam 2015).

3.5.1. SLC transportéry

SLC transportéry přenášejí molekuly většinou dovnitř buněk, ale některé z nich mají i opačnou funkci. U lidí bylo odhaleno 395 membránových SLC transportních proteinů, které jsou organizovány do 52 rodin. Hrají velmi významnou roli v lidské fyziologii – např. při absorpci a reabsorpci aminokyselin, glukózy, ve vodě rozpustných vitamínů, zinku či železa. Rovněž transport léčiv je zprostředkovaný těmito proteiny, z čehož mohou pramenit významné lékové interakce. Mají různou specifitu, existují jak vysoce selektivní, interagující s úzkou skupinou substrátů, tak méně selektivní, přijímající širokou škálu chemicky různorodých substrátů (např. OAT (organic anion transporter) v rodině SLC22) (Lin et al. 2015, Nigam 2015).

Podrodiny lékových transportérů ze skupiny SLC, kterým se zatím ve farmakokinetice dostalo největší pozornosti, jsou: SLC21 (polypeptidy transportující

organické anionty OATP), SLC22A (transportéry organických aniontů OAT, transportéry organických kationtů OCT a transportéry organických kationtů/karnitinu OCTN), SLC15A (peptidové transportéry PEPT) a SLC47A (extruze více léčiv a toxinů, MATE) (Liu 2019). Konkrétně jsou to pak *SLC22A6* (také známý jako OAT1), *SLC22A8* (OAT3), *SLC22A1* (OCT1), *SLC22A2* (OCT2), *SLCO1B1* (OATP1B1) a *SLCO1B3* (OATP1B3) (Nigam 2015).

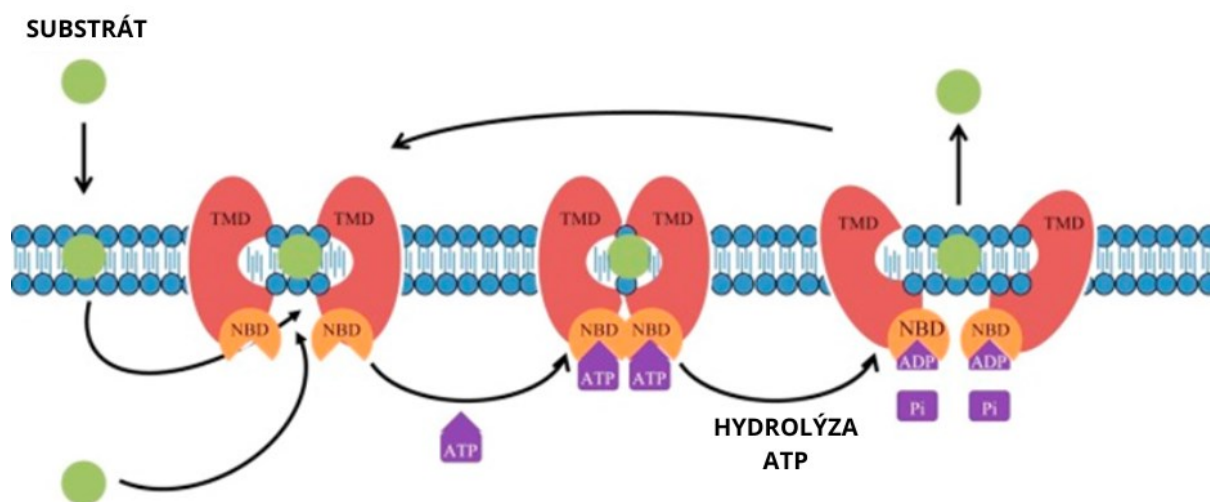
Jedním z genů, jehož expresi jsme zkoumali v myších ledvinách, je *Slc22a1* (Oct1). Byl objeven jako první savčí organický kationtový transportér, později byly odhaleny i další. Tento transportér je vysoce exprimován v lidských i hlodavčích játrech, dále střevech a ledvinách. V lidské ledvině je OCT1 lokalizován na luminálních membránách proximálních a distálních tubulů. Transportuje širokou škálu substrátů, včetně léků, toxinů a endogenních sloučenin. *In vitro* bylo dokázáno, že zprostředkovává transport strukturně odlišných kationtových sloučenin, mezi které patří prototyp organického kationtu – tetraethylamonium, metformin, cimetidin, imatinib, oxaliplatin, tramadol a různé endogenní sloučeniny jako jsou cholin, serotonin a dopamin (Jonker et al. 2003, Nie et al. 2005, Goswami et al. 2014, Hyrsova et al. 2016).

3.5.2. ABC transportéry

ABC transportéry jsou jednou z největších rodin membránových přenašečů. Doposud bylo odhaleno 48 genů rozdělených do 7 rodin: ABCA (12), ABCB (11), ABCC (13), ABCD (4), ABCE (1) a ABCG (5). Členové podrodiny ABCB jsou označováni jako MDR transportéry a členové podrodiny ABCC jako MRP transportéry. Převážně se jedná o efluxní pumpy. Nachází se téměř ve všech živých organismech od bakterií až po eukaryota. Jejich funkce je klíčová, ovlivňuje absorpci, distribuci i eliminaci. Účastní se primárně efluxu jak endogenních sloučenin (živin, peptidů pro prezentaci antigenu, žlučových kyselin, lipidů a polysacharidů), tak xenobiotik, včetně toxinů a léčiv. Zároveň jsou spojovány s rezistencí vůči některým léčivům v bakteriálních i eukaryotických buňkách.

Mezi ABC transportéry interagující s léčivy patří MDR1 (také známý jako p-glykoprotein, *ABCB1*) a BCRP (breast cancer resistance protein) známý jako *ABCG2*, dále jsou to MRP1 (*ABCC1*), MRP2 (*ABCC2*) a MRP4 (*ABCC4*, myší ortholog *Abcc4*) (Choudhuri a Klaassen 2006, Beis 2015, Nigam 2015, George 2023, Moore et al. 2023).

Základní struktura ABC transportérů je složena ze dvou transmembránových domén (TMD), které obsahují vazebné místo pro ligand, a dvou nukleotid vazajících domén (NBD), které jsou umístěny intracelulárně a pohání translokaci ligandu díky hydrolýze ATP (viz Obr. 6). U většiny ABC transportérů jsou domény uspořádány střídavě: TMD-NBD-TMD-NBD. Uptakeové transportéry mají navíc substrát vazající protein, který váže ligandy a přenáší je do konkrétního TMD k transportu. Sekvence NBD je vysoce konzervovaná část, naopak TMD je mezi jednotlivými transportéry variabilní, jelikož obsahuje substrátově specifické úseky pro translokaci konkrétní molekuly (Beis 2015, George 2023).



Obr. 6 Mechanismus transportu molekul pomocí ABC transportérů. Po navázání substrátu, hydrolýze ATP a následné konformační změně dochází k přesunu látky na druhou stranu membrány. Modifikováno dle: Chen (2016)

MDR1 (P-glykoprotein)

Je efluxním transportérem, který významně ovlivňuje farmakokinetiku některých sloučenin. Byl identifikován Torontskou skupinou (Juliano a Ling) roku 1976 v kolchicin rezistentních buňkách vaječníků čínského křečka a stal se tak prvním objeveným transportérem z této skupiny. V současnosti je nejznámějším a stále velmi studovaným kvůli své roli při selhání chemoterapie u onkologických pacientů. Hlavní příčinou rezistence je zvýšená exprese MDR1 na membránách nádorových buněk, které pumpují molekuly léčiv zpět do extracelulárního prostoru, čímž snižují akumulaci cytostatika v rakovinných buňkách. Příčinou zvýšení exprese MDR1 je samotná léčba (Juliano a Ling 1976, Ficková et al. 2009, Chen et al. 2016).

V lidských buňkách je MDR1 kódován genem *ABCB1* lokalizovaném na 7. chromozomu, konkrétně 7q21.12. U hlodavců je kódován dvěma geny, a to *Abcb1a* a *Abcb1b*. Myší gen *Abcb1a* je inducibilní a více exprimovaný ve střevě, zatímco *Abcb1b* je dominantní v ledvinách. V expresi MDR1 se však uplatňují výrazné mezidruhové rozdíly. Protein se skládá přibližně z 1280 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 170 kDa. Transportér je tvořen z 12 transmembránových α -helixů a v těle je lokalizován na apikálních membránách různých buněk, jako jsou hepatocyty, buňky proximálního tubulu ledvin, enterocyty, buňky placenty a varlat nebo endoteliální buňky mozkových kapilár. Jeho hlavní úlohou ve střevě je omezení absorpce perorálně podávaných léčiv do systémové cirkulace, v mozku omezuje průnik léků a toxinů přes hematoencefalickou bariéru (HEB), v placentě je jeho přítomnost klíčová pro ochranu plodu. V hlavních eliminačních orgánech, konkrétně v hepatocytech a buňkách proximálního tubulu ledvin, usnadňuje exkreci látek a jejich metabolitů do žluče a moče a tím i jejich vyloučení z těla. Obecně tedy hlavní úkol MDR1 spočívá v ochraně orgánů a plodu před škodlivými účinky exogenních látek a zároveň usnadňuje exkreci endogenních a exogenních látek z těla (Choudhuri a Klaassen 2006, Klaassen a Aleksunes 2010, Su et al. 2017, Elmeliogy et al. 2020, George 2023).

Mnoho léčiv interaguje s MDR1 transportérem, obecně je můžeme rozdělit do tří skupin na substráty, induktory a inhibitory. Jejich kombinací pak může docházet k lékovým interakcím, které mohou vést k nedosaženým terapeutickým nebo naopak až toxickým hladinám léčiva. Typickými příklady substrátů MDR1 jsou digoxin, fexofenadin, kortizol, aldosteron, antracykliny, atorvastatin, diltiazem, chinolony nebo dabigatran etexilát. Inhibitory způsobují akumulaci substrátu uvnitř buňky, která může dosáhnout až toxických koncentrací spojenými s nežádoucími účinky. Mezi nejvýznamnější inhibitory řadíme klaritromycin, itakonazol, verapamil atd. Oproti tomu induktory způsobují aktivací PXR a CAR nadměrnou expresi proteinu vedoucí ke zvýšené exkreci a snížené koncentraci léčiv v plazmě. K induktorům patří rifampicin, fenytoin, karbamazepin nebo extrakt z třezalky tečkované (Ficková et al. 2009, Elmeliogy et al. 2020).

Další ABC transportéry

MRP2 (*ABCC2*) je organickým aniontovým transportérem exprimovaným v játrech, ledvinách, střevech a placentě. Podílí se na vylučování širokého spektra organických aniontů včetně konjugátů glutathionu, glukuronových konjugátů a sulfatovaných konjugátů

žlučových solí stejně tak jako nekonjugovaných sloučenin do žluči, moči nebo střevního lumen (Ito 2008).

MRP3 (*ABCC3*) je efluxním transportérem, který hraje zásadní úlohu v transportu bilirubinu, xenobiotik a v lékové rezistenci. V největší míře je exprimován v intrahepatálních žlučových cestách a nadledvinách, dále v tenkém střevě, ledvinách a slinivce břišní. Na rozdíl od MRP1 a MRP2, které mají vyšší afinitu ke glutathionovým konjugátům, má MRP3 větší afinitu ke glukuronidovým konjugátům bilirubinu a léčiv. Dalšími typickými substráty MRP3 jsou žlučové soli (Zelcer et al. 2001).

MRP4 (*ABCC4*) je ATP-dependentním transportérem exprimovaným v ledvinách, játrech, hematoencefalické bariéře, prostatě, varlatech a dalších tkáních. Jeho funkce spočívá v podílení se na vylučování žlučových kyselin, ochraně tkání před xenobiotiky a v transportu buněčných signálních molekul (včetně eikosanoidů a cyklických nukleotidů), žlučových kyselin, urátů a konjugovaných steroidních hormonů (Renga et al. 2011).

4. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit vliv aktivace lidského konstitutivního androstanového receptoru u humanizovaných myší na genovou expresi vybraných lékových transportérů a biotransformačních enzymů I. a II. fáze v myších ledvinách. Dále bylo cílem posoudit vliv aktivace CAR *in vitro*, v lidských imortalizovaných buňkách proximálního tubulu, v HK2 buněčné linii.

5. Experimentální část

Naši experimentální práci můžeme rozdělit do dvou částí. V první jsme se věnovali sledování změn genové exprese v ledvinách myši po aplikaci CITCO vzhledem ke kontrolní skupině.

V druhé části práce jsme pracovali s HK2 buněčnou linií, kdy jsme opět pozorovali vliv aplikace látek ovlivňující CAR na změny genové exprese v této lidské ledvině buněčné linii.

5.1. Použité materiály a přístroje

5.1.1. Zvířata

Pro experiment byly použity humanizované myši s lidským *NR1I3*, *NR1I2* a *CYP3A4* genem (tedy geny pro CAR, PXR a CYP3A4), které byly připraveny ve spolupráci se společností Biocev. Po dobu tří dnů bylo třem myším podáváno CITCO (10 mg/kg) a dalším třem (kontrolní) vehikulum skládající se z roztoku 50% PEG400 ve směsi s 10% EtOH podávaný v dávce 100 μ l na 25 g hmotnosti. Látky byly aplikovány intraperitoneálně, tedy do břišní dutiny. Následně byly myši usmrceny, všechny orgány jim byly odebrány a bezprostředně zamrazeny pomocí tekutého dusíku. V našem experimentu jsme využili pouze ledviny, a to cca 20 mg z každé. Přesné hmotnosti jsou uvedeny v Tab. 5.

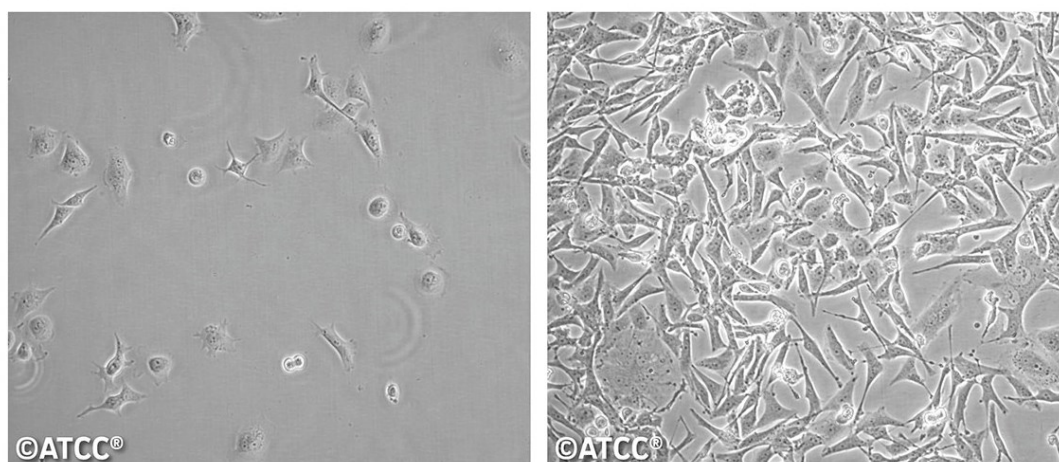
Tab. 5 Hmotnost myši, jejich ledvin a vzorku použitého v dalších krocích experimentu

Vzorek	Hmotnost myši [g]	Hmotnost ledvin [g]	Hmotnost odebraného materiálu [mg]
752 (ctrl)	22,4	0,32	18,45
468 (ctrl)	26,1	0,38	19,19
310 (ctrl)	25,5	0,36	18,23
676 (CITCO)	25,7	0,36	17,17
469 (CITCO)	27,4	0,40	19,06
755 (CITCO)	25,8	0,33	18,82

Ctrl – kontrolní vzorek, CITCO – vzorek po podání CITCO

5.1.2. Buněčná linie HK2

HK2 buňky (viz Obr. 7) pochází z epitelu proximálních tubulů lidské ledviny dospělého muže. Buňky byly imortalizovány transdukcí geny E6/E7 lidského papilomaviru 16 (HPV-16) a jsou hojně využívány ke studiu jejich fyziologie, poškození a reparace (Ryan et al. 1994). Buněčná linie byla zakoupena od American Type Culture Collection, USA.



Obr. 7 Buněčná linie HK2 buněk nalevo s nízkou a napravo s vysokou denzitou
Převzato z: <https://www.atcc.org/products/crl-2190#detailed-product-information>

5.1.3. Přístroje a pomůcky

96jamková plata vhodná pro účely PCR (Applied Biosystems, USA)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatické pipety se špičkami s filtrem a bez filtru (Eppendorf, Německo)

Homogenizátor Fastprep-24 5G (MP Biomedicals, USA)

Chladicí stojan na mikroskopické mikroskopické (Eppendorf, Německo)

Chlazená centrifuga 3K3OH (Sigma Laboratory Centrifuges, USA)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Kuličky oxidu zirkoničitého vhodné pro homogenizaci (Benchmark Scientific, USA)

Kultivační lahve 75 cm² (TPP, Švýcarsko)

Kultivační plato 24jamkové (Thermo Fisher Scientific, USA)

Laminární box TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Itálie)

Mikrozkumavky (Eppendorf, Německo)

Mikrozkumavky pro účely PCR (Eppendorf, Německo)

Nitrilové rukavice

Optické fólie vhodné pro účely PCR (Applied Biosystems, USA)

Optické stripy vhodné pro účely PCR (Applied Biosystems, USA)

Petriho misky (TPP, Švýcarsko)

Pinzeta

Plynový kahan

Sérologické pipety (TPP, Švýcarsko)

Skalpel

Spektrofotometr NanoDrop 1 000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Tepelný cycler QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA)

Třepačka Lab Dancer (IKA, Německo)

Vakuová odsávačka

Vodní lázeň (Julabo, Německo)

Zkumavky se šroubovacím víčkem (TPP, Švýcarsko)

5.1.4. Chemikálie a reagensie

96% ethanol (Penta, Česká republika)

CITCO (Merck, Německo)

Dihydrogenfosforečnan sodný (Merck, Německo)

DMSO (dimethylsulfoxid, Merck, Německo)

Fenobarbital (Merck, Německo)

Hydrogenfosforečnan sodný (Merck, Německo)

Hydroxid sodný (Merck, Německo)

Chlorid draselný (Merck, Německo)

Chlorid sodný (Merck, Německo)

Chloroform (Penta, Česká republika)

Isopropanol (Sigma Aldrich, USA)

Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

PK 11195 (Merck, Německo)

RevertAid RT Reverse Transcription Kit RevertAid RT (200 U/ μ l)

Rifampicin (Merck, Německo)

TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, USA)

TaqMan sondy (Life Technologies, USA)

TRI Reagent (Merck, Německo)

Trypsin-EDTA (0,25 %) (Merck, Německo)

Voda pro injekce (B. Braun, Německo)

5.1.5. Příprava fosfátového pufru (PBS)

Pro naši práci byla nutná příprava fosfátového pufru o fyziologickém pH. Soli byly naváženy a rozpuštěny v destilované vodě do objemu 1 l dle následující tabulky 6. Hydroxid sodný byl přidán do hotového roztoku pro úpravu výsledného pH na hodnotu 7,4. Poté byl pufr sterilizován v autoklávu a využit k oplachu buněk.

Tab. 6 Složení fosfátového pufru

	g/l	koncentrace
KCl	0,21	2,7 mM
NaCl	8,01	137 mM
Na ₂ HPO ₄	3,58	10 mM
NaH ₂ PO ₄	1,56	10 mM
NaOH		pro úpravu pH na 7,4

5.2. Experimentální metody

5.2.1. Kultivace buněk a buněčné experimenty

HK2 buněčná linie byla kultivována v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s vysokým obsahem glukózy obohaceném o 2mM L-glutamin a 10 % fetálního bovinního séra. Inkubovány byly při 37 °C a 5 % CO₂ ve vlhčené atmosféře.

Pasážování buněk bylo prováděno po dosažení přibližně 80 % konfluence. Nejprve bylo pomocí vakuové odsávačky odsáto staré médium (adherentní buňky zůstávají přichyceny ke dnu kultivační lahve) a buňky byly opláchnuty PBS, které bylo následně odsáto. Poté byly do lahve přidány 3 ml roztoku trypsinu-EDTA pro uvolnění buněk a lahev byla umístěna na 2 min do inkubátoru. Po inkubaci byly přidány 3 ml média pro inaktivaci trypsinu. Obsah lahve byl pomocí sérologické pipety dostatečně promíchán do vzniku homogenní suspenze. Část byla přenesena do nové lahve a umístěna do inkubátoru pro zachování buněčné linie. Zbytek suspenze bylo použito pro nasazení 24jamkového platu (v hustotě 10⁵ buněk na jamku), které nám posloužilo k následným experimentům. Plato bylo vloženo do inkubátoru.

Po 24 hodinách inkubace bylo plato vyjmuto z inkubátoru a pomocí vakuové odsávačky bylo odsáto staré médium. V pořadí jamek, ve kterém jsme odsávali, bylo přidáváno předem připravené nové médium s testovanými látkami ovlivňujícími CAR. Pracovali jsme v triplicátech – tedy každé tři jamky obsahovaly jednu podmínku, případně jejich kombinaci. Testovanými látkami byly zvoleny:

- Fenobarbital 500 μM
- CITCO 10 μM
- CITCO 1 μM
- PK11195 10 μM
- PK11195 10 μM + CITCO 10 μM
- Rifampicin 10 μM

Takto připravené plato bylo uloženo zpět do inkubátoru.

Po dalších 24 hodinách inkubace bylo plato vyjmuto ven, médium bylo odsáto a pomocí PBS opatrně omyty buňky. PBS jsme následně odsáli a do každé jamky s buňkami přidali TRI Reagent, díky němuž byly buňky lyzovány. Plato bylo uloženo do mrazáku.

Buněčné experimenty byly prováděny ve třech na sobě nezávislých experimentech prováděných za stejných podmínek – v technických triplikátech.

5.2.2. Izolace RNA

Zásadním cílem některých laboratorních výzkumů, včetně našeho, je RNA, jejíž izolace a purifikace jsou prvními kritickými kroky mnoha analytických metod. Pro relevantní výsledky jsou potřebné čisté, nepoškozené molekuly RNA. Její zisk by měl být efektivní a reprodukovatelný. Získává se z různých heterogenních materiálů, jakými jsou čerstvé či zmražené tkáně, buněčné linie nebo dlouhodobě chemicky zachovalé vzorky. Existuje více metod, kterými lze izolaci a následnou purifikaci RNA provést. Při naší práci byla použita metoda založená na využití standardní organické fenol-chloroformové extrakce (Vomelova et al. 2009).

Princip

Pro lýzu buněk byl využit TRI Reagent. Jedná se o roztok guanidin izothiokyanátu a fenolu, který je schopný rozrušit buňky, aniž by poškodil RNA. Po přidání chloroformu dojde k oddělení vodní a organické fáze. RNA je rozpuštěna v horní vodní vrstvě, mezifáze obsahuje DNA a v organické vrstvě jsou obsaženy zbytky buněk – proteiny, lipidy, polysacharidy, ...). Díky rozdělení do fází lze RNA, DNA a protein teoreticky purifikovat z jednoho vzorku – odtud název TRI Reagent. Po přidání isopropanolu k odebrané vodné fázi dochází k vysrážení RNA, po následném stočení tvoří bílý shluk tzv. peletku. Následně je nutné peletky přechytit ledově chladným ethanolem a rozpustit ve vodě zbavené DNAs a RNAs (Rio et al. 2010).

Postup

Nejprve bylo z myších ledvin skalpelem uříznuto 6 jednotlivých vzorků o hmotnosti cca 20 mg. Vzorky při tom byly umístěny na ledu z důvodu zabránění denaturace. Poté byly přeneseny do šesti uzavíratelných zkumavek, přičemž každá již obsahovala pět homogenizačních kuliček. Následně byl do každé zkumavky přidán 1 ml TRI Reagentu, vzorky byly umístěny do homogenizátoru a zhomogenizovány při rychlosti 7 m/s po dobu 50 s.

Většina následné práce probíhala v laminárním boxu. Po homogenizaci byly vzorky s TRI Reagentem přepipetovány do nových mikrozkušavek bez kuliček, do kterých jsme

přidali 150 μ l chloroformu a protřepali na třepačce po dobu 15 s. Vzorky jsme nechali 5 min inkubovat při pokojové teplotě. Dále byly zkumavky umístěny do předchlazené centrifugy a zcentrifugovány (12 000G, 15 min, 4 °C). Během toho došlo k rozdělení fází na vodnou vrstvu s RNA, mezifázi a narůžovělou organickou fází. Do nových mikrozkuvek bylo z každého vzorku přeneseno 350 μ l vodné fáze. (Zbylé dvě fáze jsou pro nás odpadem.) Poté bylo do každé mikrozkuvky se vzorkem přidáno 350 μ l isopropanolu, promícháno 2 s na třepačce a 10 min jsme nechali vzorky inkubovat při pokojové teplotě pro precipitaci RNA. Po inkubaci byly vzorky znovu zcentrifugovány (12 000G, 15 min, 4 °C), přičemž se nám na dně vytvořily bílé peletky RNA. Roztok, ve kterém se peletka nacházela, byl odsán do odpadní lahve, peletka se udržela na dně. K peletce bylo přidáno 900 μ l vychlazeného 70% ethanolu k promytí RNA a mikrozkuvka byla promíchána pomocí třepačky po co nejkratší dobu s cílem uvolnění peletky ode dna. Vzorky byly poté inkubovány 1 hod na ledu umístěném v lednici. Po uplynutí této doby byly vzorky znovu zcentrifugovány (12 000G, 15 min, 4 °C) a celé promývání bylo zopakováno ještě jednou – odsátí 70% ethanolu, přidání 900 μ l nového 70% ethanolu, protřepání pro odlepení peletky ode dna, inkubace 1 hod v lednici a centrifugace (12 000G, 15 min, 4 °C). Po promytí peletek byl 70% ethanol pomocí špičky kompletně odsán, přitom jsme si dávali velký pozor na to, abychom omylem neodsáli peletku. Vzorky jsme nechali 10 min stát při pokojové teplotě, aby došlo k odpaření zbytkového ethanolu a tím k úplnému vysušení peletek. (Suchá peletka zprůsvitněla.) Po odpaření byly peletky rozpuštěny ve 30 μ l RNase a DNase free vodě. Z každého vzorku byly odebrány 2 μ l ke spektrofotometrickému změření čistoty a koncentrace RNA.

5.2.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty RNA

Do uzavíratelných 0,5ml mikrozkuvek byly z každého vzorku odebrány 2 μ l a pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000 bylo provedeno měření koncentrace RNA. Jako slepý vzorek byla využita voda zbavená DNase a RNase. Pro všechny vzorky byly změřeny hodnoty absorbance při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm, dále čistota I, čistota II a koncentrace RNA. Čistota I je ovlivněna kontaminací bílkovinami a její hodnota se rovná poměru absorbancí A_{260}/A_{280} , ideálně by se měla pohybovat nad 1,8. Čistota II vychází z míry kontaminace fenolem, vypočítává se z poměru A_{260}/A_{230} a hodnota by se měla blížit 2. Podle zjištěných hodnot koncentrací RNA bylo jednoduchým výpočtem dopočítáno, kolik vody je nutné přidat, abychom získali u všech vzorků stejnou koncentraci

250 ng/ μ l. Spektrofotometrie byla prováděna u vzorků z myších ledvin (viz Tab. 7) i z HK2 buněk (viz Tab. 8).

Tab. 7 Výsledky spektrofotometrického měření po izolaci mRNA z myších buněk

Vzorek	A230	A260	A280	Čistota I	Čistota II	Naměřená koncentrace [ng/ μ l]
752 (ctrl)	11,581	27,562	13,887	1,98	2,38	1102,47
468 (ctrl)	10,265	23,404	11,933	1,96	2,28	936,16
310 (ctrl)	10,766	25,299	12,710	1,99	2,35	1011,98
676 (CITCO)	9,480	21,805	11,065	1,97	2,30	872,18
469 (CITCO)	12,964	30,466	15,391	1,98	2,35	1218,6
755 (CITCO)	14,080	32,807	16,551	1,98	2,33	1312,30

A – absorbance při určité vlnové délce, ctrl – kontrolní vzorky, CITCO – vzorky po podání CITCO

Tab. 8 Výsledky spektrofotometrického měření po izolaci mRNA z HK2 buněčné linie.

V tabulce jsou uvedené pouze výsledky z jedné izolace jako reprezentativní stanovení.

Vzorek	A230	A260	A280	Čistota I	Čistota II	Naměřená koncentrace [ng/ μ l]
DMSO 1 ‰	6,392	13,807	7,265	1,90	2,16	552,29
RIF 10 μ M	6,690	14,450	7,461	1,94	2,16	578,00
CITCO 1 μ M	6,163	12,818	6,642	1,93	2,08	512,71
CITCO 10 μ M	12,657	27,086	13,746	1,97	2,14	1083,46
Fenobarbital 500 μ M	6,708	13,618	7,088	1,92	2,03	544,73
PK11195 10 μ M	7,326	13,919	7,177	1,94	1,90	556,76
PK11195 10 μ M + CITCO 1 μ M	6,654	12,843	6,654	1,93	1,93	513,73
PK11195 10 μ M + CITCO 10 μ M	6,815	13,562	7,094	1,91	1,99	542,47

A – absorbance při určité vlnové délce

5.2.4. Reverzní transkripce

Při reverzní transkripci dochází k syntéze cDNA (DNA komplementární ke studované RNA) z izolované mRNA pomocí RNA-dependentní DNA polymerázy. Získání cDNA je nutný pro další pokračování experimentu.

Postup

Do větší zkumavky byla napipetována směs náhodných hexamerů, voda zbavená DNas a RNas, směs nukleotidů, pufr, RevertAid RT (reverzní transkriptáza) a inhibitor RNas. Obvykle se tato směs připravuje v trochu větším množství, avšak musí být zachován správný poměr složek. Celý postup je prováděn na ledu, aby bylo zabráněno poškození mRNA, transkriptázy a inhibitorů RNas, které jsou velmi citlivé na teplotu. Následně byly připraveny mikrozkušavky, do kterých bylo napipetováno 16 μl reakční směsi a 4 μl mRNA (viz Tab. 9). Pomocí pipety byly vzorky opatrně promíchány a krátce stočeny v centrifuze. Poté byly vzorky vloženy do tepelného cycleru, ve kterém proběhl přepis mRNA na cDNA za následujících podmínek:

- 5 min při teplotě 25 °C
- 60 min při teplotě 42 °C
- 5 min při teplotě 70 °C

Po skončení reakce byly vzorky ochlazeny pomocí předchlazeného stojánku a naředěny přidáním vody zbavené DNas a RNas.

Tab. 9 Objem jednotlivých složek pro 1 reakci (4 μl mRNA + 16 μl reakční směsi)

Složka	Objem [μl]
mRNA templát	4
Náhodné hexamery	1
Voda zbavená DNas/RNas	7
Pufr	4
RiboLock RNase inhibitor (20 U/ μl)	1
dNTP mix	2
RevertAid RT (200 U/ μl)	1

RevertAid RT – reverzní transkriptáza, dNTP mix – směs nukleotidů

5.2.5. Kvantitativní Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je poměrně jednoduchou metodou, která umožňuje amplifikaci (zmnožení) požadovaného fragmentu DNA z templátu cDNA. Velkými výhodami této metody jsou jednoduchost, rychlost, velká citlivost, která se však může stát i negativem v případě kontaminace, a fakt, že k provedení reakce stačí velmi malé množství vzorku DNA. V současnosti se této metody využívá v mnoha oborech, včetně molekulární biologie a forenzní medicíny.

Postup

Do nachystaných mikrozkušavek byla napipetována voda zbavená RNas, TaqMan Fast Advanced Master mix a TaqMan sonda zkoumaného genu. Tyto složky se dohromady označují jako mastermix. Dále bylo připraveno 96jamkové plato, do kterého byl dle předem připravené mapky napipetován mastermix a následně byly přidány jednotlivé vzorky cDNA (viz Tab. 10). Destička byla přelepena fólií, krátce stočena v centrifuze a umístěna do tepelného cycleru, ve kterém proběhla PCR reakce. Před spuštěním reakce byly nastaveny požadované podmínky (viz Tab. 11).

Tab. 10 Objemy jednotlivých složek pro 1 reakci

Složky	Objem [μl]
Voda zbavená RNas	4,0
TaqMan Fast Advanced	10,0
TaqMan sonda	1,0
Templát DNA	5,0
Celkový objem	20,0

Tab. 11 Podmínky průběhu PCR

	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [min]
Holding stage	1	50	2:00
		95	0:20
Cycling stage	40	95	0:01
		60	0:20

5.2.6. Statistické zpracování dat

Data získaná z tepelného cycleru byla nejprve zpracována pomocí MS Excel. V tomto programu byly podle speciálního vzorce (viz Obr. 8) vypočítány průměry hodnot jednotlivých vzorků, které udávají buď zvýšení nebo snížení exprese konkrétního genu, a jejich směrodatné odchylky. U myších vzorků byly navíc ještě spočítány průměry kontrolních a CITCO treatovaných myší.

$$fold = \frac{2,081955^{Ct(DMSO)-Ct(vzorek)}}{2,081955^{Ct(housekeeping DMSO)-Ct(housekeeping vzorku)}}$$

Obr. 8 Vzorec využitý k výpočtu průměrných hodnot exprese genů vzorků
Ct – cycle treshold

Ke statistickému a grafickému zpracování dat byl využit program GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software Inc., USA). Ke zhodnocení statistické významnosti u vzorků ledvin získaných z humanizovaných myší byl použit Wilcoxonův test. V případě *in vitro* experimentů na HK2 buněčné linii byla pro statistickou analýzu zvolena jednosměrná ANOVA analýza s Dunnettovým post-hoc testem, kdy všechny hodnoty byly porovnávány vzhledem k hodnotám 1% DMSO. Jako statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$.

Buněčné experimenty byly prováděny ve třech na sobě nezávislých biologických opakováních provedených v technických triplikátech. Experimenty prováděné na myších ledvinách byly provedeny na celkem 6 ledvinách získaných od 6 různých myší (3 pro každou podmínku), qRT-PCR bylo provedeno v technických duplikátech.

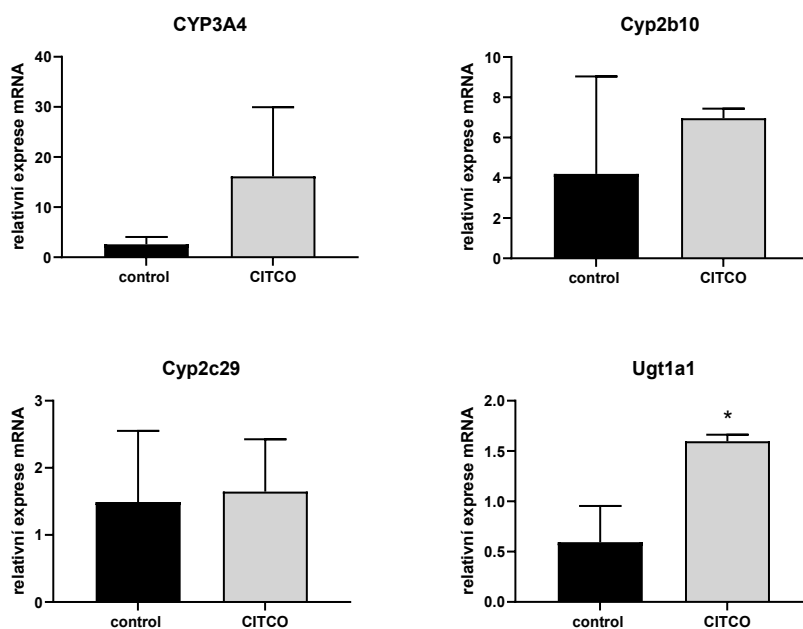
6. Výsledky

6.1. Ovlivnění exprese genů po aktivaci CAR receptoru podáním CITCO v ledvinách humanizovaných myší

V první části experimentů bylo pozorováno, jakým způsobem ovlivní CITCO v dávce 10 mg/kg expresi genů biotransformačních enzymů a lékových transportérů u PXR-, CAR- a CYP3A4-humanizovaných myších modelů. Sledovány byly myší geny i lidský gen *CYP3A4*. Konkrétně se jednalo o geny *CYP3A4*, *Cyp2b10*, *Cyp2c29*, *Slc22a1*, *Abcc4*, *Abcb1a* a *Ugt1a1*. Hodnoty byly vztaženy k průměru dvou housekeeping genů – *Actb* (beta-aktin) a *Gapdh* (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza).

6.1.1. Biotransformační enzymy

Na následujícím grafu (Obr. 9) můžeme pozorovat vliv CITCO na expresi genů biotransformačních enzymů *CYP3A4*, *Cyp2b10*, *Cyp2c29* a *Ugt1a1*. Výsledky ukazují statisticky významné zvýšení exprese genu *Ugt1a1*. Změna exprese genu lidského enzymu *CYP3A4* a myších genů *Cyp2b10* a *Cyp2c29* nebyla ovlivněna se statistickou významností, data však naznačují indukční trend.

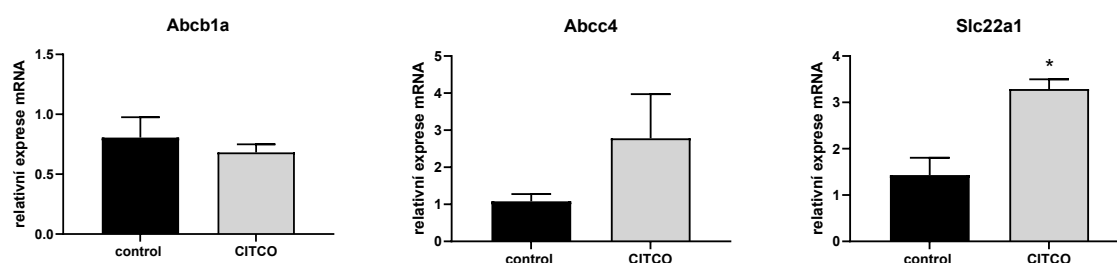


Obr. 9 Graf zobrazující vliv CITCO na expresi genů biotransformačních enzymů. Experimentální metodou byly qRT-PCR reakce, které proběhly v technických duplikátech.

Hodnoty vzorků ovlivněné CITCO jsou vyjádřeny jako násobky hodnot kontrolních vzorků, které byly stanoveny jako 1. Jako statisticky významná byla považována hodnota $*P < 0,05$.

6.1.2. Lékové transportéry

V dalším grafu (Obr. 10) můžeme vidět ovlivnění exprese myších genů lékových transportérů *Abcb1a* (Mdr1a), *Abcc4* (Mrp4) a *Slc22a1* (Oct1). Po aktivaci CAR došlo ke zvýšení hladiny exprese genů *Slc22a1* a *Abcc4*. Avšak pouze u *Slc22a1* byla zaznamenána statistická významnost. Exprese genu *Abcb1a* byla po podání CITCO mírně snížena, snížení však nebylo statisticky významné.



Obr. 10 Graf zobrazující vliv CITCO na expresi genů kódujících lékové transportéry. Experimentální metodou byly kvantitativní PCR reakce, které proběhly v technických duplikátech. Hodnoty vzorků ovlivněné CITCO jsou vyjádřeny jako násobky hodnot kontrolních vzorků, které byly stanoveny jako 1. Jako statisticky významná byla považována hodnota $*P < 0,05$.

6.2. Stanovení exprese genů po podání látek ovlivňujících CAR v HK2 buněčné linii

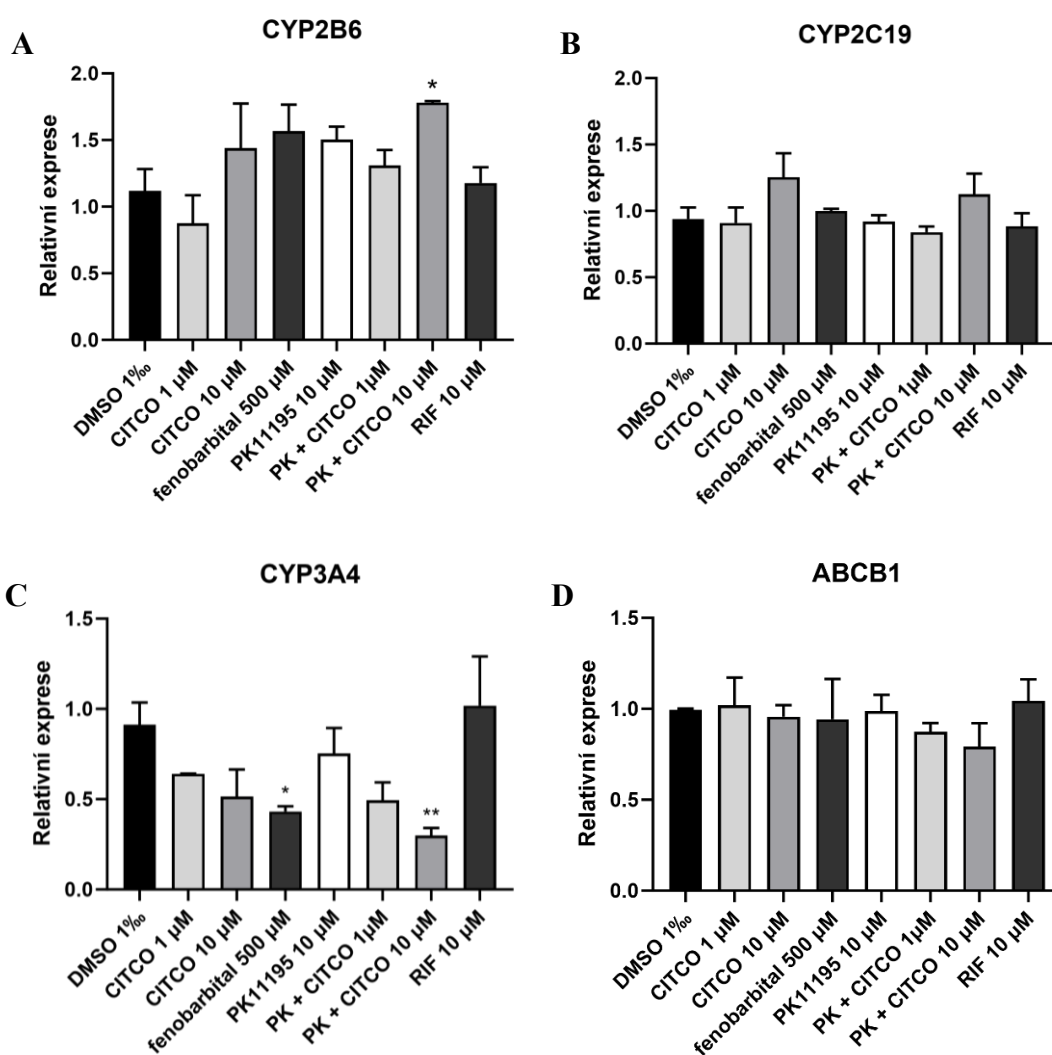
V druhé části experimentů jsme se zaměřili na změny exprese genů v HK2 buněčné linii vlivem látek působících na CAR, a to konkrétně CITCO (1 a 10 μM), fenobarbital 500 μM , PK11195 10 μM , rifampicin 10 μM a jejich kombinace.

V případě genu *CYP2B6* (viz Obr. 11 A) byl zaznamenán jediný statisticky významný výsledek, a to u vzorku, ke kterému byla přidána kombinace PK11195 10 μM a CITCO 10 μM . U zbylých vzorků nebyl pozorován významný vliv na změnu genové exprese.

Expresa genu *CYP2C19* (viz Obr. 11 B) nebyla námi vybranými látkami v daných koncentracích významně ovlivněna.

Co se týče exprese genu *CYP3A4* (viz Obr. 11 C), tak k jejímu statisticky významnému snížení došlo po podání fenobarbitalu 500 μM a kombinace PK11195 + CITCO 10 μM . U ostatních vzorků jsme nepozorovali statisticky významnou změnu exprese *CYP3A4*.

Jak můžeme vidět v posledním grafu, podobně jako u genu *CYP2C19*, ani v případě MDR1 transportéru – gen *ABCB1*, (viz Obr. 11 D) nedošlo ke změně v expresi.



Obr. 11 A-D Graf zobrazující vliv látek působících přes CAR na regulaci genové exprese genů biotransformačních enzymů *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP3A4* a lékového transportéru *ABCB1*. Jako statisticky významná byla považována hodnota * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

7. Diskuse

Během dlouhého období evoluce si živé organismy vytvořili detoxifikační systémy sloužící k ochraně před poškozením cizorodými látkami. Tyto systémy zahrnují biotransformační enzymy I. i II., tzv. konjugační, fáze a transportéry, jejichž exprese je regulována mj. nukleárními receptory PXR a CAR. Tyto receptory jsou exprimovány převážně v játrech, ale můžeme je v menší míře najít i v jiných orgánech (Wang et al. 2012).

Konstitutivní androstanový receptor hraje klíčovou roli v regulaci mnoha fyziologických procesů včetně metabolismu endogenních a biotransformace exogenních molekul. CAR může být aktivován přímým navázáním ligandu i nepřímo prostřednictvím signalizačních transdukčních drah. Vazbou na specifické responzivní elementy DNA CAR indukuje expresi svých cílových genů kódujících jak enzymy I. (primárně CYP450) a II. fáze (např. UGT, SULT, GST) metabolismu, tak transportních proteinů z rodiny ABC (např. MDR1) i SLC (např. OAT1). Vliv aktivace CAR na expresi těchto genů může vést ke vzniku lékových interakcí, které mohou ovlivnit všechny fáze farmakokinetiky, což může vést až k selhání terapie některých často užívaných léčiv. Je třeba také upozornit na výrazné mezidruhové rozdíly v aminokyselinových sekvencích ligand vázajících domén, od kterých se odvíjí i jejich strukturně odlišné ligandy (Dash et al. 2014, Matalova a Buchta 2020, Pustylnyak et al. 2020).

Že lidské ledviny mají významnou schopnost biotransformace xenobiotik, dokázaly již starší studie. Některé látky jsou dokonce biotransformovány v největší míře ledvinami (Anders 1980). Jasným příkladem je glukuronidace propofolu, která z největší části probíhá v ledvinách (Knights et al. 2013). Z toho jasně vyplývá, že funkce ledvin má v biotransformaci léčiv důležitou úlohu.

Výhodou i nevýhodou, se kterou jsme se střetávali během naší práce, je nedostatek relevantních studií, se kterými bychom mohli naše výsledky porovnávat, poukazuje však na nezbytnost dalšího výzkumu. Většina výzkumných skupin se primárně zabývá studiem jater, přestože bylo prokázáno, že ledviny hrají v metabolismu xenobiotik také významnou úlohu. Z tohoto důvodu jsme byli nuceni porovnávat naše výsledky s výsledky výzkumů prováděných převážně na játrech a jak se ukázalo v druhé části experimentů, cesta regulace genové exprese v ledvinách se zřejmě od jater významně liší.

V první části práce byl sledován účinek CITCO, agonisty lidského CAR, na expresi biotransformačních a transportních genů v ledvinách humanizovaných myši (lidský *NR1I3*

(CAR), *NR1I2* (PXR) a *CYP3A4*). Podle toho byly vybrány geny, jejichž exprese je prozkoumána zejména v játrech, avšak o expresi v ledvinách existuje jen velmi málo informací. Konkrétně jsme zvolili myší geny biotransformačních enzymů *Cyp2c29*, *Cyp2b10*, *Ugt1a1*, dále myší geny transportérů *Slc22a1*, *Abcb1*, *Abcc4* a v neposlední řadě lidský gen biotransformačního enzymu *CYP3A4*. Pro normalizaci výsledků byly použity standardní housekeeping geny *Gapdh* a *Actb*.

Nukleární receptory CAR a PXR mají podobné funkce. Oba regulují celou řadu genů a jejich účinky se mnohdy překrývají, proto je náročné odlišit, jakou měrou se každý z nich podílí na výsledném efektu. U některých genů byla však prokázána preference jednoho z receptorů. Maglich et al. (2003) dokázali, že CITCO, přímý agonista hCAR, vykazuje větší efekt na expresi genu *CYP2B6*, zatímco rifampicin, ligand PXR, měl větší účinek na *CYP3A4*. Tento fakt potvrdili i Lin et al. (2020), kteří prováděli studii na lidských progenitorových jaterních buňkách HepaRG. Po podání CITCO, které je i částečným agonistou PXR, o různých koncentracích (0,2; 1 a 10 μ M) došlo ke zvýšení exprese genu *CYP3A4*. Aktivita CITCO byla následně blokována specifickým antagonistou hPXR SPA70. Při jejich experimentech byly využity i HepaRG buňky, ve kterých byl vypnut gen *NR1I3*, tedy gen kódující hCAR. Zjištění jednoznačně potvrdila, že při indukci genu *CYP3A4* CITCO primárně působí přes hPXR.

Jelikož námi testované myši měly gen pro lidský enzym CYP3A4, rozhodli jsme se pro jeho testování. Po podání CITCO (10 mg/kg) bylo pozorováno značné zvýšení exprese – přibližně 15násobné, které však v důsledku vysoké interindividuální variability nebylo statisticky významné. Pro potvrzení statistické významnosti výsledků by bylo potřebné otestovat větší množství tkání získaných z většího počtu testovaných myší.

Cyp2b10 je jedním z hlavních biotransformačních enzymů podílejícím se na I. fázi metabolismu. Jedná se o myší ortholog lidského CYP2B6, který se podílí na biotransformaci 3-12 % klinicky využívaných léčiv. Tento enzym, ať už jeho lidská či myší varianta, patří mezi hlavní cílové geny CAR v hepatocytech, v menší míře se na regulaci podílí i PXR. Díky těmto poznatkům a skutečnosti, že je velmi málo dostupných relevantních studií zabývajících se touto problematikou v ledvinách, jsme vybrali právě *Cyp2b10* jako jeden z testovaných genů. Výzkum Jarukamjorna et al. (2001) dokazuje, že gen *Cyp2b10* se v myších ledvinách skutečně nachází. Při našem testování došlo ke zvýšení exprese genu přibližně 1,8násobně, avšak statistická významnost, pravděpodobně kvůli

interindividuální variabilitě kontrolní skupiny myši, potvrzena nebyla. Výsledky získané z ledvin humanizovaných myši bychom mohli porovnat se studií, kterou uskutečnili Kurian et al. (2020), avšak prováděnou na primárních hepatocytech získaných z humanizovaných myši (hCAR), ve kterých došlo po expozici CITCO (20 mg/kg váhy) k téměř 20násobnému zvýšení exprese *Cyp2b10*. Jarukamjorn et al. (2001) se primárně zabývali expresí Cyp2b enzymů v játrech a ledvinách. Jejich pozorování naznačují, že induktory exprese působí na Cyp2b10 různou měrou v ledvinách a v játrech. Vysvětlení této skutečnosti spočívá v odlišných regulačních cestách mezi játry a ledvinami. Proto není možné naše výsledky zcela porovnávat s výsledky získanými z jater. Je možné, že v játrech je odezva na podnět silnější a zároveň bylo v první zmíněné studii s hepatocyty využito CITCO v množství 20 mg/kg, při naší práci pouze 10 mg/kg (Kurian et al. 2020).

Dalším námi studovaným genem se stal gen biotransformačního enzymu Cyp2c29, který je myším orthologem lidských enzymů CYP2C19 a CYP2C9. Po podání CITCO (10 mg/kg) nebylo pozorováno statisticky významné ovlivnění exprese genu. Toto zjištění je v souladu s výsledky regulace exprese lidského genu *CYP2C19* v HK2 buňkách. Žádná studie se stejnou nebo alespoň podobnou problematikou nezabývala.

Ugt1a1 je myším genem enzymu II. fáze metabolismu podílejícího se na detoxifikaci látek. Naše data ukazují na přibližně trojnásobné statisticky významné zvýšení exprese tohoto genu po podání CITCO v ledvinách humanizovaných myši. Niu et al. (2020), kteří pracovali s lidskými primárními hepatocyty, ke kterým bylo přidáno CITCO (5 μ M), zdokumentovali 2,9násobné zvýšení exprese *UGT1A1* oproti kontrole. V této koncentraci působí CITCO výhradně přes CAR receptor. Z toho můžeme vyvodit, že nejen v játrech, ale i v ledvinách hraje CAR významnou roli a v tomto případě námi získaná data z myších ledvin korelují s výše zmiňovanými daty z lidských hepatocytů.

OCT1 (*SLC22A1*) je dominantním transportérem organických kationtových léčiv a některých pozitivně nabitých endogenních látek. Tento transportér je u lidí v největší míře exprimován v sinusových membránách hepatocytů, v menší míře i v dalších tkáních (ledviny, nadledviny, varlata, slezina, plíce) a jejich nádorech. Oproti tomu je exprese u myši dominantní právě v ledvinách (Klaassen a Aleksunes 2010). Niu et al. (2020) se zabývali regulací transportních genů v lidských hepatocytech od různých dárců kultivovaných v tzv. sendviči a došlo k mírnému snížení exprese *SLC22A1* po podání CITCO 5 μ M. Naopak naše data získaná z ledvin humanizovaných myši ukazují na více

než dvojnásobné statisticky významné zvýšení exprese genu *Slc22a1*. Mezi touto a právě zmíněnou prací však existují rozdílné parametry včetně využití odlišného druhu a odlišné tkáně.

Regulace OCT1 a jeho orthologů je druhově a tkáňově velmi specifická. Exprese v lidských ledvinách je ve srovnání s lidskými játry o 4-5 řádů nižší, tedy je spíš zanedbatelná. Přičemž zatímco v lidské ledvině je OCT1 lokalizován na luminálních membránách proximálních a distálních tubulů, u myši je silná exprese proteinu Oct1 lokalizována na bazolaterálních membránách proximálních tubulů. To dokazuje rozdíly nejen mezi druhy, ale i mezi tkáněmi, které mohou být příčinou rozdílného ovlivnění exprese. Kromě toho dochází u většiny nádorových buněčných linií k významné down-regulaci, což do jisté míry omezuje studium regulace *SLC22A1* (Hyrsova et al. 2016).

Jedním z transportérů, kterými jsme se zabývali, byl MRP4 (*ABCC4*) patřící mezi ABC transportéry. Tento transportér se v lidském organismu nachází v játrech i v ledvinách a jeho hlavní úlohou je transport řady endogenních molekul – cyklických nukleotidů, ADP, eikosanoidů, konjugovaných steroidních hormonů, žlučových kyselin, urátů, a také xenobiotik. Během experimentů Massona et al. (2008), kteří se zabývali snižováním HDL aktivací CAR receptoru u myši, byla sledována i jaterní exprese typického cílového genu CAR – *Abcc4* u wild type myši a u myši s deficitem CAR po podání TCPOBOP (3 mg/kg), modelového agonisty myšního CAR. V prvním případě došlo k výrazné – přibližně 10násobné, indukci exprese transportéru, zatímco v druhém případě zůstala exprese téměř nezměněna, což poukazuje na zásadní roli CAR receptoru. Naše výsledky z ledvin ukazují cca 2,9násobný nárůst průměru oproti kontrole. V obou pracích tedy došlo k nárůstu exprese *Abcc4*, avšak v rozdílné míře. Hlavním důvodem je zřejmě použití různých orgánů, různých agonistů a také fakt, že ve zmiňované studii byly použity nehumanizované myši. V případě působení TCPOBOP na myši játra může být exprese sledovaného genu ovlivněna citlivěji oproti působení CITCO na transgenní myši ledviny.

P-glykoprotein je jedním z nejznámějších efluxních transportérů závislých na ATP. U lidí je kódován genem *ABCB1*, u prasat genem *Abcb1* a u hlodavců dvěma geny – *Abcb1a* a *Abcb1b*. Bylo zdokumentováno, že MDR1 je vysoce exprimován ve střevech, játrech a ledvinách lidí a hlodavců a že má zásadní roli v biologické dostupnosti a lékových interakcích některých xenobiotik. Myši geny doposud nebyly dostatečně prozkoumány, co se týče vlivu CAR na jejich expresi. Objevila se však studie Lemmena et al. (2013)

zabývající se regulací *Abcb1* a *Abcg2* (gen kódující efluxní transportér BCRP) v prasečí hematoencefalické bariéře po podání CITCO. Hlavním úkolem MDR1 v této bariéře je ochrana mozku před působením xenobiotik. Jejich výzkum ukázal, že po aktivaci prasečího CAR receptoru (pgCAR) pomocí ligandu hCAR CITCO došlo k upregulaci obou transportérů, kdežto specifický mCAR ligand TCPOBOP neměl žádný vliv na expresi transportérů (Guo a Huang 2016). Také Gray et al. (2009) potvrdili toto zjištění skutečností, že LBD pgCAR je z 84 % homologní s LBD hCAR, zatímco mezi mCAR a hCAR byla odhalena pouze 71% homologie aminokyselin.

Při našich experimentech jsme nezaznamenali prakticky žádný vliv na regulaci exprese *Abcb1a*, což neodpovídá původním předpokladům vyvozeným na základě výše zmíněné práce. Nejedná se však o nikterak statisticky signifikantní rozdíl. Příčinou našich odlišných výsledků oproti zmíněné studii by mohlo být použití rozdílných tkání a druhů. Mozek je obzvláště náchylnou tkání, a proto je propustnost hematoencefalickou bariérou velmi omezená. Je tedy možné, že ke zvýšení exprese *Mdr1* dochází primárně zde.

V druhé části našich experimentů jsme se zabývali ovlivněním exprese genů biotransformačních enzymů *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP3A4* a transportéru MDR1 po treatování HK2 buněk vybranými látkami.

Co se týče genu *CYP2B6*, po podání CITCO 1 μM nedošlo k nikterak významnému ovlivnění exprese, které však bylo pozorováno v játrech v práci (Kurian et al. 2020), v ledvinách je situace zřejmě jiná. S výjimkou buněk ovlivněných zároveň CITCO 10 μM a PK11195 10 μM jsme v HK2 buňkách nepozorovali žádný statisticky významný vliv na regulaci exprese *CYP2B6*. Po podání kombinace CITCO 10 μM a PK11195 10 μM došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese *CYP2B6* – tuto hodnotu můžeme porovnat s hodnotou kombinace CITCO 1 μM a PK11195 10 μM , která sice nedosáhla statistické významnosti, ale i v tomto případě byl pozorován trend zvýšení exprese vzhledem ke kontrole. Zmíněná skutečnost je podpořena fakty, že PK11195 může být v buňkách transformováno na agonistu CAR a také tím, že CITCO v koncentraci 10 μM je nejen agonistou hCAR, ale i částečným agonistou hPXR, což mohlo agonistické působení CITCO ještě podpořit (Mackowiak et al. 2017). Poslední testovanou látkou byl rifampicin, modelový agonista PXR. Jelikož je *CYP2B6* preferenčně ovlivňován přes CAR, proto jsme u něj nepozorovali vliv na expresi.

CYP2C19 je biotransformačním enzymem, který je převážně lokalizován v játrech a tenkém střevě a účastní se biotransformace některých významných léčiv. Doposud byla publikovaná pouze jedna studie Knightse et al. (2013) hodnotící expresi CYP2C19 v lidských ledvinách, kde jeho exprese detekována nebyla. Během experimentů s HK2 buňkami jsme však expresi tohoto genu detekovali (dokonce byla CT hodnota o 4 cykly nižší než u genu *CYP3A4*), nicméně není působením látek nikterak ovlivněna. Toto zjištění je v souladu s výsledky regulace exprese myšního orthologu *Cyp2c29*.

Biotransformační enzym CYP3A4 se podílí až na 42 % známých přeměn klinicky významných léčiv a představuje tak jeden z dominantních mechanismů lékových interakcí. Jedná se o typický cílový gen PXR, který je však v menší míře rovněž ovlivněn prostřednictvím CAR. Aktivací zmiňovaných receptorů dochází ke zvýšení exprese CYP3A4 v lidských játrech (Suchopár et al. 2023).

Výsledky exprese genu biotransformačního enzymu *CYP3A4* v HK2 buňkách naznačují, že vlivem působení známého přímého agonisty hCAR CITCO v koncentracích 1 μM a 10 μM , dochází ke snižování exprese, což je v souladu i s dále diskutovaným působením fenobarbitalu. Dle našich výsledků se zdá, že CITCO působí v ledvinách jiným způsobem než v játrech.

Po podání fenobarbitalu 500 μM , který je obecně znám jako nepřímý aktivátor CAR receptoru a agonista PXR, jsme zaznamenali statisticky významné snížení exprese *CYP3A4* přibližně na polovinu oproti kontrole. V jiných výzkumech – např. výzkumu Niua et al. (2020), avšak prováděných na lidských hepatocytech, obvykle docházelo k významnému zvýšení exprese *CYP3A4*. Námi popsáný efekt v lidských HK2 buňkách je tedy v rozporu s regulací v lidských hepatocytech, ale i v myších ledvinách. U kombinací PK11195 + CITCO 1 μM a PK11195 + CITCO 10 μM můžeme pozorovat snížení exprese, v druhém případě dokonce snížení se statistickou významností. Rifampicin 10 μM hladinu exprese vůči kontrole nijak významně neovlivnil, což značí, že PXR nehraje z hlediska regulace biotransformace léčiv v ledvinách významnou roli. Objasnění přesného mechanismu regulace exprese *CYP3A4* v ledvinách však vyžaduje další rozsáhlé zkoumání, které převyšuje možnosti této diplomové práce. Vzhledem k našim výsledkům exprese genu *CYP3A4* se znovu zdá, že ledviny fungují v expresi biotransformačních enzymů a transportérů odlišným způsobem než játra. Studie zabývající se regulací *CYP3A4* v lidských ledvinách nejsou dostupné.

ABCB1 je genem kódujícím efluxní protein MDR1. Jedná se o jeden z nejznámějších transportérů, který je exprimován ve střevě, HEB, játrech, ledvinách, placentě, varlatech a mimo jiné i v nádorových buňkách, jimž mnohdy zajišťuje rezistenci vůči farmakoterapii. Stejně jako testovaný gen *CYP2C19*, ani gen *ABCB1* nebyl vůči kontrole nijak významně ovlivněn, což odpovídá našim poznatkům zjištěným studiem myších ledvin, avšak je v rozporu s výše zmiňovanou studií Lemmena et al. (2013), která popisuje zvýšení exprese *Abcb1* v prasečí hematoencefalické bariéře po podání CITCO. I v tomto případě lze možnou příčinu odlišných výsledků ledvin a HEB spatřit v hodnocení rozdílných tkání a živočišných druhů.

Většina námi získaných výsledků z ledvin humanizovaných myší odpovídala předpokladům zjištěných jinými studii na játrech. Avšak z důvodu velké interindividuální variability statistická analýza ukázala významnou CAR dependentní regulaci pouze v případě *Ugt1a1* a *Slc22a1*. Možným řešením by mohlo být zvýšení počtu testovaných tkání studovaných myší. Výsledky získané z HK2 buněk nám naopak ukázaly, že hCAR v ledvinách se chová jiným způsobem než v játrech. Pro lepší porozumění dané problematice je nutné provedení dalších výzkumů.

Naší prací jsme dokázali že CAR receptor hraje významnou roli nejen v játrech, ale i v ledvinách. A je proto důležité se i nadále věnovat jeho výzkumu v obou orgánech, a to nejen z důvodu studia lékových interakcí, ale i kvůli zapojení CAR do homeostázy energetického metabolismu a dalších fyziologických funkcí. V budoucnu by se nové poznatky mohly stát např. potenciálním novým přístupem v prevenci a léčbě obezity a diabetu mellitu (Kublbeck et al. 2020).

8. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo prozkoumat vliv CITCO, agonisty lidského CAR, na expresi vybraných genů v ledvinách humanizovaných myší. Zjistili jsme, že CITCO významně zvyšuje expresi genů *Ugt1a1* a *Slc22a1*. Indukční trend jsme pozorovali i u genů *Abcc4*, *CYP3A4*, *Cyp2b10*, avšak z důvodu interindividuální variability nebylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení. Řešením by mohlo být zvýšení počtu testovaných myších tkání. Na zbylé geny *Abcb1a* a *Cyp2c29* nemělo podání CITCO nikterak významný vliv.

Dalším cílem bylo posouzení vlivu aktivace CAR *in vitro* v HK2 buněčné linii. V případě *CYP2B6* jsme zaznamenali významné zvýšení exprese po podání kombinace CITCO 10 μM a PK11195 10 μM . Zbylé látky expresi tohoto genu nijak významně neovlivnily. Výsledky exprese genů *CYP2C19* a *ABCBI* po podání látek neukázaly významné ovlivnění oproti kontrolnímu vzorku DMSO 1%. Jako poslední byl testován gen *CYP3A4*, u kterého jsme po podání fenobarbitalu 500 μM a kombinace PK11195 10 μM + CITCO 10 μM pozorovali statisticky významné snížení exprese, z čehož můžeme vyvodit, že regulace genové exprese prostřednictvím lidského CAR v ledvinách probíhá jiným způsobem, resp. se jí účastní větší množství faktorů, které zatím nebyly identifikovány.

Výsledky našich experimentů přináší nové poznatky o vlivu aktivace CAR na regulaci genové exprese v ledvinách a mohou se tak stát podkladem pro další výzkumy regulace genové exprese prostřednictvím aktivace jaderných receptorů. Pro plné porozumění regulační role CAR v ledvinách a dalších extrahepatálních tkáních je třeba ještě dalšího výzkumu, který přesahuje rámec této diplomové práce.

9. Literatura

1. Anders, M. W. (1980). "Metabolism of drugs by the kidney." Kidney Int **18**(5): 636-647.
2. Anzenbacher, P. (2023). "Nejvýznamnější enzymy druhé fáze metabolismu léčiv: UDP-glukuronosyltransferázy a sulfottransferázy." Klinická farmakologie a farmacie **2**.
3. Arao, Y. and K. S. Korach (2021). "The physiological role of estrogen receptor functional domains." Essays Biochem **65**(6): 867-875.
4. Beis, K. (2015). "Structural basis for the mechanism of ABC transporters." Biochem Soc Trans **43**(5): 889-893.
5. Dash, A., A. Yende, S. Kumar, S. Kala, D. Kotiya, M. Rana and R. Tyagi (2014). "The Constitutive Androstane Receptor (CAR): a nuclear receptor in health and disease." J Endocrinol Reprod **18**: 59-74.
6. di Masi, A., E. De Marinis, P. Ascenzi and M. Marino (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." Mol Aspects Med **30**(5): 297-343.
7. Elmeliegy, M., M. Vourvahis, C. Guo and D. D. Wang (2020). "Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug-Drug Interaction Studies." Clin Pharmacokinet **59**(6): 699-714.
8. Ficková, D., E. Topinková and J. Vlček (2009). "Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích." Remedia.
9. Frigo, D. E., M. Bondesson and C. Williams (2021). "Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics." Essays Biochem **65**(6): 847-856.
10. Gao, J. and W. Xie (2010). "Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism." Drug Metab Dispos **38**(12): 2091-2095.
11. George, A. M. (2023). "ABC Transporters 45 Years On." Int J Mol Sci **24**(23).
12. Gibson, G. G. and P. Skett (2013). Introduction to Drug Metabolism. New York, Springer US.
13. Gong, Q. H., J. W. Cho, T. Huang, C. Potter, N. Gholami, N. K. Basu, S. Kubota, S. Carvalho, M. W. Pennington, I. S. Owens and N. C. Popescu (2001). "Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus." Pharmacogenetics **11**(4): 357-368.

14. Goswami, S., L. Gong, K. Giacomini, R. B. Altman and T. E. Klein (2014). "PharmGKB summary: very important pharmacogene information for SLC22A1." Pharmacogenet Genomics **24**(6): 324-328.
15. Gray, M. A., J. N. Peacock and E. J. Squires (2009). "Characterization of the porcine constitutive androstane receptor (CAR) and its splice variants." Xenobiotica **39**(12): 915-930.
16. Guo, T., J. Huang, H. Zhang, L. Dong, D. Guo, L. Guo, F. He, Z. A. Bhutto and L. Wang (2016). "Abcb1 in Pigs: Molecular cloning, tissues distribution, functional analysis, and its effect on pharmacokinetics of enrofloxacin." Sci Rep **6**: 32244.
17. Hedaya, M. A. (2012). Basic Pharmacokinetics, Taylor & Francis Group.
18. Honkakoski, P. (2022). "Searching for Constitutive Androstane Receptor Modulators." Drug Metab Dispos **50**(7): 1002-1009.
19. Hyrsova, L., T. Smutny, F. Trejtnar and P. Pavek (2016). "Expression of organic cation transporter 1 (OCT1): unique patterns of indirect regulation by nuclear receptors and hepatospecific gene regulation." Drug Metab Rev **48**(2): 139-158.
20. Chen, Z., T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, M. Deng, C. Huang, T. Hu, L. Jiang and J. Li (2016). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade." Cancer Lett **370**(1): 153-164.
21. Choudhuri, S. and C. D. Klaassen (2006). "Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters." Int J Toxicol **25**(4): 231-259.
22. Ito, K. (2008). "ABCC2/Abcc2 transport property in different species and its modulation by heterogeneous factors." Drug Metab Pharmacokinet **23**(6): 394-405.
23. Jarukamjorn, K., T. Sakuma, M. Yamamoto, A. Ohara and N. Nemoto (2001). "Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones." Biochem Pharmacol **62**(2): 161-169.
24. Jonker, J. W., E. Wagenaar, S. Van Eijl and A. H. Schinkel (2003). "Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations." Mol Cell Biol **23**(21): 7902-7908.
25. Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.
26. Klaassen, C. D. and L. M. Aleksunes (2010). "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation." Pharmacol Rev **62**(1): 1-96.

27. Knights, K. M., A. Rowland and J. O. Miners (2013). "Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT)." Br J Clin Pharmacol **76**(4): 587-602.
28. Kousalová, L., J. Baranová and P. Anzenbacher (2003). "Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4." Klinická farmakologie a farmacie **3**.
29. Kublbeck, J., J. Niskanen and P. Honkakoski (2020). "Metabolism-Disrupting Chemicals and the Constitutive Androstane Receptor CAR." Cells **9**(10).
30. Kurian, R., W. Hedrich, B. Mackowiak, L. Li and H. Wang (2020). "CITCO as an Adjuvant Facilitates CHOP-Based Lymphoma Treatment in hCAR-Transgenic Mice." Cells **9**(11).
31. Lemmen, J., I. E. Tozakidis, P. Bele and H. J. Galla (2013). "Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation." Brain Res **1501**: 68-80.
32. Li, L., T. Chen, J. D. Stanton, T. Sueyoshi, M. Negishi and H. Wang (2008). "The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenyl-methylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor." Mol Pharmacol **74**(2): 443-453.
33. Li, L., Q. Y. Zhang and X. Ding (2018). "A CYP2B6-humanized mouse model and its potential applications." Drug Metab Pharmacokinet **33**(1): 2-8.
34. Lin, L., S. W. Yee, R. B. Kim and K. M. Giacomini (2015). "SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities." Nat Rev Drug Discov **14**(8): 543-560.
35. Lin, W., M. Bwayi, J. Wu, Y. Li, S. C. Chai, A. D. Huber and T. Chen (2020). "CITCO Directly Binds to and Activates Human Pregnane X Receptor." Mol Pharmacol **97**(3): 180-190.
36. Lincová, D., H. Farghali and L. Hein (2006). Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. . Praha, Galén.
37. Liu, X. (2019). "SLC Family Transporters." Adv Exp Med Biol **1141**: 101-202.
38. Mackowiak, B., L. Li, M. A. Welch, D. Li, J. W. Jones, S. Heyward, M. A. Kane, P. W. Swaan and H. Wang (2017). "Molecular Basis of Metabolism-Mediated Conversion of PK11195 from an Antagonist to an Agonist of the Constitutive Androstane Receptor." Mol Pharmacol **92**(1): 75-87.
39. Maglich, J. M., D. J. Parks, L. B. Moore, J. L. Collins, B. Goodwin, A. N. Billin, C. A. Stoltz, S. A. Kliewer, M. H. Lambert, T. M. Willson and J. T. Moore (2003).

- "Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes." *J Biol Chem* **278**(19): 17277-17283.
40. Masson, D., M. Qatanani, A. L. Sberna, R. Xiao, J. P. Pais de Barros, J. Grober, V. Deckert, A. Athias, P. Gambert, L. Lagrost, D. D. Moore and M. Assem (2008). "Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice." *J Lipid Res* **49**(8): 1682-1691.
41. Matalova, P. and M. Buchta (2020). "Specifika metabolismu léčiv v dětském věku." *Klinická farmakologie a farmacie* **4**.
42. Mejdrova, I., J. Dusek, K. Skach, A. Stefela, J. Skoda, K. Chalupsky, K. Dohnalova, I. Pavkova, T. Kronenberger, A. Rashidian, L. Smutna, V. Duchoslav, T. Smutny, P. Pavek and R. Nencka (2023). "Discovery of Novel Human Constitutive Androstane Receptor Agonists with the Imidazo[1,2-a]pyridine Structure." *J Med Chem* **66**(4): 2422-2456.
43. Moore, J. M., E. L. Bell, R. O. Hughes and A. S. Garfield (2023). "ABC transporters: human disease and pharmacotherapeutic potential." *Trends Mol Med* **29**(2): 152-172.
44. Mottino, A. D. and V. A. Catania (2008). "Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents." *World J Gastroenterol* **14**(46): 7068-7074.
45. Nie, W., S. Sweetser, M. Rinella and R. M. Green (2005). "Transcriptional regulation of murine Slc22a1 (Oct1) by peroxisome proliferator agonist receptor-alpha and -gamma." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(2): G207-212.
46. Nigam, S. K. (2015). "What do drug transporters really do?" *Nat Rev Drug Discov* **14**(1): 29-44.
47. Niu, C., B. Smith and Y. Lai (2020). "Transporter Gene Regulation in Sandwich Cultured Human Hepatocytes Through the Activation of Constitutive Androstane Receptor (CAR) or Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)." *Front Pharmacol* **11**: 620197.
48. Oladimeji, P. O. and T. Chen (2018). "PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor." *Mol Pharmacol* **93**(2): 119-127.
49. Pustyl'nyak, Y. A., L. F. Gulyaeva and V. O. Pustyl'nyak (2020). "Noncanonical Constitutive Androstane Receptor Signaling in Gene Regulation." *Int J Mol Sci* **21**(18).
50. Renga, B., M. Migliorati, A. Mencarelli, S. Cipriani, C. D'Amore, E. Distrutti and S. Fiorucci (2011). "Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter." *Biochim Biophys Acta* **1809**(3): 157-165.

51. Rio, D. C., M. Ares, Jr., G. J. Hannon and T. W. Nilsen (2010). "Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent)." Cold Spring Harb Protoc **2010**(6): pdb prot5439.
52. Ryan, M. J., G. Johnson, J. Kirk, S. M. Fuerstenberg, R. A. Zager and B. Torok-Storb (1994). "HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney." Kidney Int **45**(1): 48-57.
53. Stoner, M. A., S. S. Auerbach, S. M. Zamule, S. C. Strom and C. J. Omiecinski (2007). "Transactivation of a DR-1 PPRE by a human constitutive androstane receptor variant expressed from internal protein translation start sites." Nucleic Acids Res **35**(7): 2177-2190.
54. Su, L., Y. C. Cheng, W. M. Lee, M. Zhang, F. Yang, B. Zhao, D. Han, Y. Liu and D. Hu (2017). "Abcb1a and Abcb1b genes function differentially in blood-testis barrier dynamics in the rat." Cell Death Dis **8**(9): e3038.
55. Suchopár, J., M. Prokeš, Š. Suchopár and DrugAgency (2023). Lékové interakce DrugAgency: 1a. Obecné aspekty lékových interakcí. 2023. 1096 stran, DrugAgency, a.s.
56. Vomelova, I., Z. Vanickova and A. Sedo (2009). "Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome." Folia Biol (Praha) **55**(6): 243-251.
57. Wang, Y. M., S. S. Ong, S. C. Chai and T. Chen (2012). "Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism." Expert Opin Drug Metab Toxicol **8**(7): 803-817.
58. Weikum, E. R., X. Liu and E. A. Ortlund (2018). "The nuclear receptor superfamily: A structural perspective." Protein Sci **27**(11): 1876-1892.
59. Zelcer, N., T. Saeki, G. Reid, J. H. Beijnen and P. Borst (2001). "Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3)." J Biol Chem **276**(49): 46400-46407.
60. Zhang, Y. and B. Hagenbuch (2019). "Protein-protein interactions of drug uptake transporters that are important for liver and kidney." Biochem Pharmacol **168**: 384-391.
61. Zhao, M., J. Ma, M. Li, Y. Zhang, B. Jiang, X. Zhao, C. Huai, L. Shen, N. Zhang, L. He and S. Qin (2021). "Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans." Int J Mol Sci **22**(23).

Internetové zdroje

1. anonym. (2024, 25.04.2024). "National Library of Medicine." Retrieved 08.05.2024, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1557>.
2. Funck-Brentano, C., R. S. Sandler, S. E. Kimmel and M. J. Gomori. (2024). "ScienceDirect." Retrieved 08.05.2024, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/cyp2c19>.