UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA TRANSPORT LÉKOVÝMI OATP TRANSPORTÉRY

Dizertační práce

Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2018

Mgr. Lucie Zemčíková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Františka Trejtnara, CSc. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové .....

Mgr. Lucie Zemčíková

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala všem svým kolegům, kteří mi byli nápomocní nejen pracovně, ale i po práci, a to nejen z Katedry farmakologie a toxikologie, ale také z Katedry biochemických věd a z Lékařské fakulty. Velký dík patří Janě Ramos Mandíkové, Marušce Volkové a Pavlovi Bártovi, kteří mě zasvětili do tajů vědecké práce, dále Danči Číhalové, Zuzce Ptáčkové a Edovi Jirkovskému, kteří mi jako první ukázali krásy postgraduálního studia, a rovněž Rudovi Andrýsovi, Jirkovi Janouškovi a Lence Applové, kteří se mnou překonávali útrapy se studiem spojené.

Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc. za vedení v průběhu studia a hodnotné rady během celé mé práce.

Obrovské poděkování míří také na Moravu „mému“ souboru Olšava, který mi poskytl nejen odreagování, ale i možnost vidět věci z odstupu. A největší dík patří mé rodině a hlavně manželovi, který se mnou velmi trpělivě snášel mé studium, a zejména závěrečné sepisování celé práce.

Děkuji také za finanční podporu grantovým projektům GAUK 30216/C/2016 a SVV 260 414.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidátka: Mgr. Lucie Zemčíková

Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Název dizertační práce: Vliv přírodních látek na transport lékovými OATP transportéry

Membránové transportéry ze skupiny OATP (organic anion-transporting polypetides) patří mezi přenašeče odpovědné za transport některých léčiv (např. hypolipidemik ze skupiny statinů) a dalších xenobiotik přes biologické membrány a bariéry v organismu. Tyto transportní proteiny tedy hrají důležitou úlohu při farmakokinetických procesech jako je absorpce, distribuce a eliminace. Potenciální modulace jejich transportní funkce přírodními látkami běžně se vyskytujícími v potravě rostlinného původu či potravních doplňcích může mít za následek změny koncentrací jejich substrátů (léčiv) v buňkách a tělních tekutinách, což může ovlivnit účinek i toxicitu těchto léčiv.

Cílem práce bylo získat údaje o interakci vybraných přírodních látek s lidskými transportéry OATP2B1 a OATP1A2, které se podílejí na uptake léčiv na významných farmakokinetických bariérách organismu, a o jejich schopnosti ovlivnit transport lékových substrátů těmito transportéry. Pro studium byly vybrány přírodní látky ze skupiny flavonoidů a isoflavonů. Společnou charakteristikou zkoumaných flavonoidů (fisetin, galangin, chrysin, myricetin, pinobanksin, pinocembrin) je výskyt ve včelím medu; studované isoflavony (daidzin, daidzein, genistin, genistein, glycitin, glycitein, biochanin A, formononetin) jsou obsaženy především v sóji a sójových produktech. U isoflavonů byla zkoumána i interakce nejvýznamnějších metabolitů vznikajících v GIT (*S*-equol, *O*-desmethylangolensin) s těmito transportéry. Modelovým lékovým substrátem OATP transportérů bylo široce používané hypolipidemikum rosuvastatin.

Jako experimentální model byly v práci použity vybrané buněčné linie přechodně transfekované příslušným OATP transportérem s ověřenou vysokou expresí sledovaného

transportéru. S těmito modely byly provedeny inhibiční studie zkoumající vliv vybraných flavonoidů a isoflavonů na transportní funkci studovaných transportérů. Ke kvantitativní charakteristice inhibičního efektu byly použity standardní parametry IC_{50} a K_i. Jako komparátor sloužil flavonoid quercetin, jehož inhibiční aktivita vůči studovaným OATP transportérům již byla popsána dříve. U látek byla provedena rovněž analýza mechanismu inhibice zkoumaných transportérů. Potence ovlivnit transport lékového substrátu byla studována sledováním vlivu vybraných flavonoidů na uptake radioaktivně značeného rosuvastatinu. Pro nepřímé zjištění, zda jsou zkoumané flavonoidy potenciálními substráty transportérů, byla porovnána jejich cytotoxicita u buněk exprimujících a neexprimujících sledované transportéry.

Výsledky inhibičních studií na buněčných modelech *in vitro* ukázaly, že chrysin, galangin a pinocembrin mohou inhibovat OATP2B1, resp. OATP1A2 v nižších či srovnatelných koncentracích jako quercetin. Galangin, chrysin a pinocembrin účinně inhibovaly uptake rosuvastatinu prostřednictvím OATP2B1 s IC_{50} v rozmezí 1-10 μM. Inhibice transportu rosuvastatinu prostřednictvím OATP1A2 těmito flavonoidy byla méně intenzivní. V případě sójových isoflavonů byla prokázána schopnost statisticky významně inhibovat přenos transportérem OATP2B1 u zkoumaných aglykonů a hlavního biologicky aktivního metabolitu *S*-equolu s hodnotami K_i 1–20 μM. Naopak, glukosidové formy neměly významný vliv na akumulaci standardního substrátu pomocí OATP2B1. Kinetickou analýzou bylo zjištěno, že mechanismus inhibice OATP zkoumanými přírodními látkami není uniformní, i když, hlavně u isoflavonů, převažoval mechanismus kompetitivní. Transport zkoumaných flavonoidů do buněk zprostředkovaný OATP transportéry nebyl cytotoxickým testem prokázán.

Získaná data ukazují na významnou schopnost řady zkoumaných přírodních látek inhibovat transport prostřednictvím transportéru OATP2B1 a/nebo OATP1A2 *in vitro*, což naznačuje potenci pro ovlivnění transportu a modifikaci farmakokinetiky léčiv transportovaných OATP přes biologické membrány i *in vivo*.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: MSc. Lucie Zemčíková

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Title of doctoral thesis: The effect of natural compounds on transport by OATP drug transporters

OATP membrane transporters belong to carrier proteins responsible for transporting certain drugs (e.g. hypolipidemics from the group of statins) and other xenobiotics across the biological membranes and tissue barriers within the body. These transport proteins play an important role in pharmacokinetic processes such as absorption, distribution and elimination. The potential modulation of their transport function by natural compounds commonly present in plant food or food supplements may result in the changes of the concentration of their substrate (drug) in the cells and body fluids, that may affect the effect and toxicity of these drugs.

The aim of this study was to obtain data on the interactions of selected natural compounds with human transporters OATP2B1 and OATP1A2 and their ability to affect drug transport mediated by these transporters. These two OATP transporters are involved in the drug uptake especially in organ barriers important for pharmacokinetics. For the study natural compounds from the group of flavonoids and isoflavones were selected. The common characteristics of studied flavonoids (fisetin, galangin, chrysin, myricetin, pinobanksin and pinocembrin) is their presence in the honey; studied isoflavones (daidzin, daidzein, genistin, genistein, glycitin, glycitein, biochanin A and formononetin) are mainly present in soya and soy products. The interaction of the most important isoflavone metabolites formed in gastrointestinal tract (*S*-equol, *O*-desmethylangolensin) with these transporters was also studied. The widely used hypolipidemic drug rosuvastatin served as model drug substrate of studied OATPs.

Selected cell lines transiently transfected with studied OATP transporters served as experimental models. The overexpression of studied transporters was verified. These cell models were used for the inhibitory studies to examine the effect of selected flavonoids and isoflavones towards the transport function of the studied transporters. The standard inhibitory parameters IC_{50} and K_i were used for quantitative characterization. Flavonoid quercetin served as a comparator, because its inhibitory activity towards studied OATPs has been already described. We also analyze the mechanism of inhibitory interaction of studied transporters by selected natural compounds. The potential to influence drug transport was studied by observing of the effect of selected flavonoids on uptake of radiolabeled drug rosuvastatin. The comparison of flavonoid cytotoxicity in cells overexpressing studied transporters and mock-cells was performed as indirect method of determination whether the flavonoids are also potential substrates of these transporters.

The results of *in vitro* inhibitory studies have shown that chrysin, galangin and pinocembrin are able to inhibit OATP2B1 and OATP1A2, respectively, at lower or comparable concentrations as quercetin. Galangin, chrysin and pinocembrin inhibited the rosuvastatin uptake mediated by OATP2B1 with the range of IC_{50} 1–10 μM. The inhibition of rosuvastatin uptake mediated by OATP1A2 by these flavonoids was lower. In the case of soy isoflavones, aglycones and the main biologically active metabolite *S*-equol significantly inhibited the OATP2B1-mediated transport with K_i values 1–20 μM. In contrast, glucoside forms did not exhibit statistically significant effect on OATP1A2-mediated uptake of standard substrate. The kinetic analysis not indicate the uniform type of inhibition of OATP by studied natural compounds, although predominant mechanism of inhibition seemed to be competitive especially in isoflavones. The transport of studied flavonoids by OATPs into the cells was not clearly proved by cytotoxicity assay.

The obtained data has shown the ability of range of the studied natural compounds to inhibit the transport mediated by OATP2B1 and/or OATP1A2 transporter *in vitro*. These findings may suggest the potential to affect transport and modify pharmacokinetics of drugs transported by OATP across the biological membranes even *in vivo*.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK 1

2. ÚVOD 3

3. TEORETICKÁ ČÁST 4

3.1. Lékové membránové transportéry 4

3.1.1. SLC transportéry 5

3.1.2. ABC transportéry 11

3.2. Charakteristika lidských OATP transportérů 14

3.2.1. OATP1 16

3.2.2. OATP2 17

3.2.3. OATP3 17

3.2.4. OATP4 17

3.2.5. OATP5 18

3.2.6. OATP6 18

3.3. Interakce xenobiotik s OATP transportéry 18

3.4. Charakteristika zkoumaných látek 23

3.4.1. Flavonoidy a isoflavony 23

3.4.2. Statiny 30

4. CÍLE PRÁCE 33

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 34

5.1. Materiál 34

5.1.1. Použité přístroje a vybavení 34

5.1.2. Studované látky a použité chemikálie 35

5.2. Buněčné linie 36

5.3. Použité metody 37

5.3.1. Transfekce 37

5.3.2. Western blotting 38

5.3.3. Akumulační buněčné studie 39
5.3.4. Inhibiční buněčné studie 40
5.3.5. Stanovení buněčného proteinu 41
5.3.6. Stanovení cytotoxicity 41
5.4. Data a statistická analýza 42
6. VÝSLEDKY 44
6.1. Validace buněčných modelů 44
6.1.1. Ověření exprese transportérů v buněčných modelech 44
6.1.2. Ověření funkčnosti transportérů buněčných modelů 45
6.2. Interakce flavonoidů s OATP transportéry 46
6.2.1. Inhibice transportní funkce OATP transportérů flavonoidy 46
6.2.2. Kvantitativní parametry inhibice OATP flavonoidy 47
6.2.3. Interakce flavonoidů s transportem rosuvastatinu zprostředkovaným OATP transportéry 51
6.2.4. Orientační posouzení buněčného uptake flavonoidů OATP transportéry pomocí cytotoxického testu 54
6.3. Interakce isoflavonů a jejich metabolitů s OATP transportéry 56
6.3.1. Efekt isoflavonů a jejich metabolitů na transportní funkci OATP transportérů 56
6.3.2. Inhibice OATP2B1 transportéru isoflavony 57
6.3.3. Inhibice OATP2B1 transportéru metabolity isoflavonů 59
7. DISKUZE 61
8. ZÁVĚRY 71
9. POUŽITÁ LITERATURA 72
10. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH PRACÍ 82
10.1. Odborné články vztahující se k tématu dizertační práce 82
10.2. Další impaktované odborné články 82
10.3. Výstupy na odborných konferencích 83

11. PŘÍLOHY 86

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	*ATP-binding cassette*
ACE	angiotenzin-konvertáza
ATP	adenosintrifosfát
BCA	kyselina bicinchoninová
BCRP	protein rezistence rakoviny prsu *(breast cancer resistance protein)*
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNTs	koncentrační nukleosidové transportéry *(concentrative nucleoside transporters)*
COS-7	fibroblastová buněčná linie odvozená z opičí ledvinné tkáně
CYP	cytochrom P450
DHEAS	dehydroepiandrosteron 3-sulfát
DMSO	dimethylsulfoxid
E-64	*trans*-epoxysukcinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
EC	epikatechin
ECG	epikatechin galát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGCG	epigalokatechin galát
ENTs	ekvilibrační nukleosidové transportéry *(equilibrative nucleoside transporters)*
E3S	estron 3-sulfát
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (*Food and Drug Administration*)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GIT	gastrointestinální trakt
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky 293 (*human embryonic kidney cells 293*)
HeLa	lidské epiteliální buňky z nádoru děložního hrdla (*Henrietta Lacks' immortal cells*)
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
IC_{50}	inhibiční koncentrace potřebná ke snížení akumulace substrátu na 50 %; toxikologická koncentrace vedoucí ke snížení viability buněčné populace na 50 %
K_i	inhibiční konstanta
LDL	lipoprotein o nízké hustotě

MATEs	*multidrug and toxin extrusion trasporters*
MDCKII	Madin-Darbyho psí ledvinné buňky II (*Madin-Darby canine kidney II cells*)
MPP	1-methyl-4-fenylpyridinium
MRPs	proteiny spojené s multilékovou rezistencí *(multidrug resistance-associated protein)*
OATs	transportéry pro organické anionty (*organic anion transporters)*
OATPs	organické anionty transportující polypeptidy *(organic anion-transporting polypeptides)*
OCTNs	transportéry pro organické kationty a karnitin *(organic cation/carnitine transporters)*
OCTs	transportéry pro organické kationty *(organic cation transporters)*
ODMA	*O*-desmethylangolensin
P-gp	P-glykoprotein
PBS	fosfátový pufr
pCMV6	prázdný vektor
PEPTs	peptidové transportéry (*peptide transporters)*
PG	prostaglandin
PVDF	polyvinylidenfluorid
RIPA	radioimunoprecipitační assay
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
SLC	nosiče rozpuštěných látek *(solute carrier)*
SLCO	*solute carrier organic anion*
TEA	tetraethylammonium
URAT1	urátový transportér 1 (*urate transporter 1*)

POZNÁMKA: Všechny popisované transportéry jsou lidskými proteiny a jsou značeny velkými písmeny (dle současných doporučení).

2. ÚVOD

Interakce mezi léčivy a přírodními látkami z potravy na lékových transportérech lokalizovaných v buněčných membránách může potenciálně modifikovat transport léčiv přes důležité bariéry v organismu a změnit tak jejich koncentrace v cílových tkáních. Výsledkem těchto interakcí mohou být až změny účinky a toxicity léčiv. Předkládaná dizertační práce je zaměřena na posouzení interakcí lékových transportérů ze skupiny OATP (organic anion-transporting polypeptides) exprimovaných v membránách buněk orgánů determinujících farmakokinetiku s vybranými přírodními látkami. Cílem práce bylo získat data o potenci těchto přírodních látek běžně se vyskytujících v lidské stravě ovlivňovat transport studovanými transportními systémy a zjistit, zda by mohly narušit transport lékových substrátů těchto transportérů.

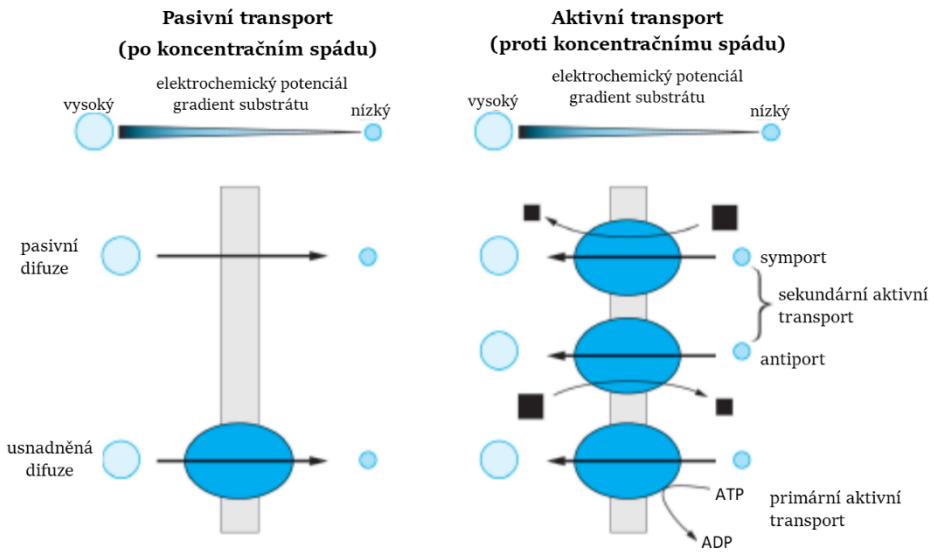
Pro studium byly vybrány přírodní látky ze skupiny flavonoidů a isoflavonů. Obě skupiny se běžně vyskytují i v poměrně vysokých koncentracích v řadě potravin rostlinného původu. Společnou charakteristikou námi zkoumaných flavonoidů je výskyt v medu a včelích produktech, isoflavony studované v rámci této práce spojuje výskyt v sóji a sójových produktech. Obě skupiny potravin jsou na základě deklarované zdravotní prospěšnosti v dnešní době konzumovány v mnoha populacích ve zvýšené míře, navíc mohou být tyto přírodní látky také součástí masově užívaných doplňků stravy.

Přestože klinických údajů je zatím poměrně málo, experimentální studie s jinými či příbuznými přírodními látkami ukázaly, že u některých přírodních látek existuje určité riziko efektivní interakce s lékovými transportéry (*Estudante et al.*, 2013; *Kovacsics et al.*, 2017; *Wu et al.*, 2012). Zatímco modulační působení přírodních látek ze zkoumaných skupin na efluxní lékové transportéry je poměrně zkoumanou problematikou, informace o jejich vlivu na významné influxní transportéry jsou mnohem omezenější (*Li et al.*, 2017; *Li a Paxton*, 2013). K těmto transportérům podílejícím se na uptake léčiv a dalších xenobiotik patří i rodina OATP transportérů. O rostoucím významu této rodiny svědčí i doporučení FDA zkoumat při vývoji nových léčiv možné interakce s hlavními reprezentanty této skupiny (*International Transporter Consortium et al.*, 2010). Pro získání základních údajů o interakcích vybraných skupin přírodních látek s OATP transportéry a jejich případný vliv na transport léčiv těmito transportéry byla v této práci provedena řada *in vitro* experimentů na buněčné úrovni studujících především jejich potenciál inhibovat transportní funkci studovaných přenašečových systémů a případně ovlivnit uptake jejich lékových substrátů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Lékové membránové transportéry

Farmakokinetika léčiv v organismu je determinována řadou faktorů, avšak jedním z nejdůležitějších parametrů, který ovlivňuje absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci látek, je transport přes biologické membrány a bariéry. Míra přestupu přes biologické membrány významně určuje pohyb endogenních a exogenních látek v těle, jejich množství v buňkách a tím i fyziologickou či farmakologickou aktivitu, je rovněž podmínkou jejich eliminace. V řadě případů je přestup látek přes lipidové membrány umožněn prostou difuzí, avšak v mnoha případech přispívají či zajišťují transmembránový přenos specializované membránové systémy – transportní proteiny (transportéry, přenašeče) (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Vedle pasivní difuze jsou tak za důležité transportní mechanismy pokládány procesy spojené s těmito transportéry – usnadněná difuze a aktivní transport. Pasivní difuze probíhá ve směru elektrochemického potenciálu bez účasti transportních proteinů. Pro usnadněnou difuzi je charakteristická účast membránového transportéru a přenos rovněž ve směru elektrochemického potenciálu, nevyžaduje tedy žádnou energii. Aktivní transport probíhá proti koncentračnímu gradientu a vyžaduje energii. Podle hnací síly ho dělíme na primární, sekundární, příp. terciární. Primární aktivní transport využívá přímo energii z hydrolýzy ATP (např. ABC transportéry). Sekundární či terciární aktivní transport přes biologické membrány je spojen s přenosem jiné látky po jejím koncentračním gradientu, což tvoří hnací sílu transportu (obr.1) (*Giacomini a Sugiyama*, 2011).



Obr. 1. Membránové transportní systémy. Světle modré kruhy charakterizují substráty, jejich velikost odpovídá koncentraci substrátu. Šipky ukazují směr toku. Černé čtverce reprezentují ionty/látky, které jsou hnací silou transportu (velikost odpovídá koncentraci iontu). Tmavě modré ovály charakterizují transportní proteiny (upraveno dle Giacomini a Sugiyama, 2011*).*

Transportéry jsou membránové proteiny přítomné v celém organismu (*Giacomini a Sugiyama*, 2011). Kontrolují uptake a eflux klíčových sloučenin jako cukrů, aminokyselin, nukleotidů, nabitých sloučenin, odpadních látek a léčiv. Jsou exprimovány v membránách enterocytů, hepatocytů, renálních buněk a dalších významných tkáňových bariérách, včetně hematoencefalické, hematotestikulární a placentární (*Estudante et al.*, 2013). Transportéry exprimované ve střevě, játrech a ledvinách jsou významné pro dispozici léčiv a lékové interakce, transportéry nacházející se na tkáňových bariérách chrání citlivé tkáně před potenciálními toxiny (*König et al.*, 2013).

Transportéry se dělí na dvě velké nadrodiny: SLC (solute carrier) a ABC (ATP-binding cassette). SLC transportéry bývají považovány za uptake transportéry, ač některé umožňují i obousměrný přenos přes membrány. Pro přenos látek využívají sekundární a terciární transport. ABC transportéry fungují jako efluxní pumpy odstraňující látky z buněk primárním aktivním transportem (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

Kromě rodiny OATP transportérů, která je podrobně pojednána v kapitole 3.2, přináší tato kapitola stručné charakteristiky nejvýznamnějších rodin transportérů, umožňující základní porovnání s uvedenou, pro práci stěžejní, skupinou OATP.

3.1.1. SLC transportéry

Jedná se o velkou skupinu transportních membránových proteinů, z nichž jsou dle dosavadních poznatků pro uptake léčiv do buněk nejdůležitější rodiny OAT, OCT, OATP, OCTN a PEPT. Zvláštní skupinou jsou transportéry MATE, které se řadí také do této skupiny, mají však efluxní funkci (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

<u>OAT (organic anion transporter)</u>

Tyto transportéry patří do rodiny SLC22A. Zprostředkovávají antiport organických aniontů výměnou za sodík a dikarboxylát, jejichž gradient vzniká kotransportem s Na^+/K^+ ATPázou (jedná se tudíž o terciární transport) (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

OAT1 se nachází v ledvinách, dále v kosterním svalstvu, mozku a placentě. V ledvinách se nachází v bazolaterální membráně proximálního tubulu (*Roth et al.*, 2012). Jeho endogenními substráty jsou středně dlouhé mastné kyseliny, α-ketoglutarát, cAMP, cGMP, prostaglandin E_2 a F_2 a urát. Z léčiv přenáší např. antibiotikum tetracyklin, antivirotika, H_2-antihistaminika cimetidin a ranitidin, furosemid, nesteroidní antiflogistika a sulfátové konjugáty flavonoidů (*Koepsell*, 2013). Tento transportér je považován za prototyp transportéru pro malé molekuly organických aniontů (*Nigam et al.*, 2015).

OAT2 je primárně exprimovaný v játrech a s nízkou expresí také v ledvinách v bazolaterální membráně proximálního tubulu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Z léčiv mezi jeho substráty najdeme erytromycin, tetracyklin, zidovudin, ranitidin, 5-fluorouracil, paklitaxel, alopurinol a metotrexát (*Koepsell*, 2013).

OAT3 se vyskytuje v ledvinách v bazolaterální membráně buněk proximálního tubulu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010), ale byl detekován rovněž v mozku a nadledvinách (*Roth et al.*, 2012). Mezi transportovaná léčiva patří např. benzylpenicilin, tetracyklin, řada antivirotik, H_2-antihistaminika, furosemid, nesteroidní antiflogistika, pravastatin a rosuvastatin, metotrexát a topotekan (*Koepsell*, 2013).

OAT4 je výrazně exprimován v ledvinách v apikální membráně buněk proximálního tubulu a v placentě v bazolaterální membráně syncytiotrofoblastu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Krom endogenních substrátů přenáší aflatoxin A a ochratoxin A (*Koepsell*, 2013).

O **OAT5–7** je toho známo mnohem méně. U lidí se vyskytuje pravděpodobně pouze **OAT7**, který se nachází v játrech v bazolaterální membráně hepatocytů (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Roth et al.*, 2012). Tento transportér vykazuje vyšší substrátovou specifitu, neinteraguje s řadou substrátů OAT (*Koepsell*, 2013).

OAT10 je exprimován v ledvinách, dále v mozku, srdci, tenkém a tlustém střevě (*Roth et al.*, 2012). Jeho lékovým substrátem je cyklosporin A (*Koepsell*, 2013).

URAT1 je také členem rodiny SLC22A. Je exprimovaný převážně v apikální membráně v ledvinách. Zprostředkovává přenos organických aniontů výměnou za urát, čímž je zodpovědný za reabsorpci urátu při výměně aniontů. Tento přenos je na sodíku nezávislý (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Koepsell*, 2013).

Ačkoliv transportéry OAT najdeme v různých tkáních, zkoumání lékových interakcí způsobených inhibicí OAT se soustřeďuje nejvíce na ledviny, tj. na transportéry OAT1 a OAT3. Jejich spektrum substrátů je široké a částečně se překrývá, společnými substráty jsou např. antibiotika, antivirotika, H_2-antihistaminika, furosemid, metotrexát. Inhibitorem obou transportérů je probenecid. Přestože je dnes v terapii využíván jen velmi zřídka, může toto léčivo sloužit jako vzorový příklad lékových interakcí na OAT transportérech. Byl používán ke snížení renální tubulární sekrece antibiotik zprostředkované OAT, zejména benzylpenicilinu, neboť její inhibicí významně prodlužuje jejich poločas a zvyšuje sérové koncentrace. Nyní se používá při léčbě cidofovirem, kde snižije nefrotoxicitu cidofoviru inhibicí OAT1 transportéru (*König et al.*, 2013).

OCT (organic cation transporter)

OCT transportéry, patřící také do rodiny SLC22A, zprostředkovávají usnadněnou difúzi řady organických kationtů ve směru jejich elektrochemického gradientu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Roth et al.*, 2012). Přenos může probíhat v obou směrech, je nezávislý na sodíku i pH a pro substráty s nábojem je vždy elektrogenní (*Roth et al.*, 2012). Substráty jsou hydrofilní organické kationty s relativně malou molekulovou hmotností, např. ranitidin, memantin, metformin, acyklovir či zalcitabin (*Estudante et al.*, 2013; *Klaassen a Aleksunes*, 2010). Přenášejí ale také slabé báze a některé elektroneutrální sloučeniny (*Koepsell*, 2013).

OCT1 byl považován za transportér specifický pro játra (podobně jako OATP1B1 a OATP1B3), ale je v menší míře exprimován i v dalších tkáních – srdci, kosterním svalstvu, ledvinách, tenkém střevě, mozku, plicích a placentě (*Müller et al.*, 2017; *Roth et al.*, 2012).

OCT2 je považován za typicky ledvinný transportér, je však exprimován také ve slezině, placentě, tenkém střevě a mozku (*Roth et al.*, 2012).

OCT3 je označován jako extraneuronální transportér monoaminů (*Roth et al.*, 2012). Přenáší neurotransmitery adrenalin, noradrenalin a histamin, ale i léčiva jako lidokain, chinidin, metformin, oxaliplatinu či antivirotikum lamivudin (*Koepsell*, 2013). Má nejširší tkáňovou distribuci ze všech OCT transportérů. Byl detekován v játrech, placentě,

ledvinách, kosterním svalstvu, plicích, srdci, mozku a v apikální membráně tenkého střeva (*Koepsell*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

Příklad lékových interakcí OCT transportérů je uveden u přenašečů MATE, neboť obě tyto skupiny transportérů jsou spolu spjaté.

OCTN (organic cation/carnitine transporter)

Hlavní fyziologickou funkcí těchto transportérů patřících také do rodiny SLC22A je přenos karnitinu, transportují ovšem i řadu dalších organických kationtů (*Estudante et al.*, 2013; *Roth et al.*, 2012). OCTN1 transportér zprostředkovává uniport organických kationtů a antiport H^+/organické kationty, který je obousměrný. OCTN2 zprostředkovává rovněž uniport organických kationtů či kotransport sodíku a karnitinu. OCTN1 i OCTN2 jsou schopny přenášet krom karnitinu také tetraethylamonium, verapamil, chinidin a ergothionein, OCTN2 navíc ještě kyselinu valproovou, antibiotikum cefaloridin a spironolakton. OCTN3 přenáší pouze karnitin, pro jiné organické kationty má jen velmi malou afinitu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

OCTN1 se nachází v ledvinách, kosterním svalstvu, placentě, prostatě, srdci, očích a plících, dále také ve slezině a kostní dřeni. Jeho výskyt byl popsán rovněž v buňkách v membráně mitochondrií, kde je zodpovědný za akumulaci karnitinu do těchto organel (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). **OCTN2** je významný v ledvinách a placentě, v nižší míře se nachází také v dalších tkáních včetně tenkého střeva (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). **OCTN3** byl kromě výskytu ve tkáních nalezen také v peroxizomech, kde má pravděpodobně význam při dodávání karnitinu pro peroxizomální metabolismus lipidů (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

O interakcích těchto transportérů s léčivy zatím není mnoho dostupných informací. Některá beta-laktamová antibiotika mohou inhibovat transport karnitinu zprostředkovaným OCTN2 (např. cefaloridin, cefepim). Tento transportér, exprimovaný rovněž v srdci, je inhibován také léčivy na kardiovaskulární systém verapamilem či spironolaktonem. OCTN1 transportér je schopen uptake mitoxantronu a doxorubicinu, čímž zvyšuje citlivost buněk vůči těmto antineoplastikům (*Pochini et al.*, 2013).

PEPT (peptide transporter)

Tyto transportéry patří do rodiny SLC15A (*Smith et al.*, 2013). Zajišťují přenos di- a tripeptidů, který je spřažen s protony, což znamená, že s rostoucím pH klesá transportní schopnost. Kromě peptidů z potravy přenášejí rovněž peptidům podobné struktury jako beta-laktamová antibiotika, ACE inhibitory, antivirotika, inhibitory reninu či inhibitory trombinu (*Estudante et al.*, 2013; *Müller et al.*, 2017; *Smith et al.*, 2013).

PEPT1 je považován za typicky střevní PEPT transportér (*Smith et al.*, 2013). Na proteinové úrovni je dokonce nejvíce exprimovaným střevním transportérem. Nejvyšší aktivita byla detekována v duodenu a proximálním jejunu (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Müller et al.*, 2017). Kromě tenkého střeva se nachází v proximálním tubulu ledvin, v menší míře ve slinivce, žlučovodech a játrech (*Smith et al.*, 2013). **PEPT2** je naopak typicky ledvinným PEPT transportérem.

CNT (concentrative nucleoside transporter)

Koncentrační nukleosidové transportéry CNT patří do rodiny SLC28A. Jsou to transportéry zajišťující přenos nukleosidů a nukleosidům podobných léčiv (antineoplastik, antivirotik). Tento transport je spřažený s přenosem kationtu sodíku (*Young et al.*, 2013). Jejich přítomnost ve střevě vedla k myšlence, že se ve spolupráci s ENT transportéry v bazolaterální membráně podílejí na absorpci nukleosidů z potravy (*Young et al.*, 2013).

CNT1 je transportér selektivní pro pyrimidinové nukleosidy, v menší míře umožňuje i přenos adenosinu. Vyskytuje se ve střevě, ledvinách a játrech (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Young et al.*, 2013). **CNT2** transportér se vyznačuje selektivitou pro purinové nukleosidy, umožňuje však i přenos uridinu. Najdeme ho ve střevě, v ledvinách, játrech, srdci, kosterním svalstvu, slinivce, placentě a mozku (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Young et al.*, 2013).

ENT (equilibrative nucleoside transporter)

Tyto transportéry patřící do rodiny SLC29A zprostředkovávají na energii nezávislý transport – usnadněnou difuzi – širokého spektra purinových a pyrimidinových

nukleosidů. Ač jsou považovány za influxní transportéry, může být tento přenos obousměrný (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Young et al.*, 2013). Jsou schopny rovněž přenosu antineoplastik s nukleosidovými strukturami, ENT2 pak i řady nukleosidových antivirotik (*Young et al.*, 2013). ENT2 přenáší krom nukleosidů i nukleové baze, ENT1 je schopný přenosu nukleových bází jen v malém rozsahu (*Young et al.*, 2013).

ENT1 je v lidském těle hojně exprimován. Najdeme jej v placentě, ledvinách, střevě, játrech, plicích, srdci, vaječnících, mozku i erytrocytech. Je rovněž exprimován v mitochondriích, kde se podílí na buněčné toxicitě nukleosidových antivirotik (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). **ENT2** se hojně vyskytuje v kosterním svalstvu a srdci, dále v ledvinách, játrech, střevě, buňkách hematoencefalické a cerebrospinální bariéry (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Young et al.*, 2013).

MATE (multidrug and toxin extrusion transporter)

Ačkoliv jde o SLC transportéry (patří do rodiny SLC47A), fungují jako transportéry efluxní (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Usnadňují exkreci organických kationtů a zwitteriontů do žluči a moči, čímž přispívají k jaterní a renální eliminaci mnoha xenobiotik. Tato exkrece se děje výměnou za proton. Transportují substráty jako endogenní kreatinin, thiamin (vitamin B1) a řadu léčiv s poměrně různorodou strukturou např. metformin, antivirotika acyklovir a ganciklovir, antibiotika cefalexin a cefaridin, antihistaminikum cimetidin (*Nies et al.*, 2016).

MATE1 je exprimován v srdci, játrech, nadledvinách, varlatech, kosterním svalstvu, ledvinách, placentě a prostatě. V ledvinách je lokalizován spolu s MATE2-K v apikální membráně buněk proximálního tubulu. Díky tomu se podílí na tubulární sekreci kationických léčiv, které se do buněk mohou dostat přes basolaterální membránu pomocí OCT2 transportéru. Toto je umožněno podobnou substrátovou specifitou těchto transportérů (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Nies et al.*, 2016). **MATE2-K** je specifický pro ledviny (*Klaassen a Aleksunes*, 2010; *Nies et al.*, 2016).

Příkladem koordinace transbuněčného transportu léčiv za účasti transportéru MATE je situace v játrech, kde OCT1 a OCT3 v bazolaterální membráně zprostředkovávají přenos substrátů z krve do hepatocytů, zatímco MATE1 v apikální membráně přenáší tato léčiva do žluči. V buňkách proximálního tubulu ledvin jsou OCT2, MATE1 a MATE2-K významné

pro ledvinou tubulární sekreci léčiv. Významným substrátem jak OCT, tak MATE je metformin, u něhož je pasivní difuze přes buněčné membrány minimální. Inhibitorem OCT transportérů je H2-antihistaminikum cimetidin, který má ovšem vysokou afinitu k MATE. Výsledkem je preferenční inhibice MATE, což při společné aplikaci obou léčiv vede ke klinicky prokázanému snížení renální clearance metforminu (*König et al.*, 2013).

Tabulka 1. Základní charakteristika influxních transportérů (převzato z www.bioparadigms.org)

Transportér	SLC označení	Typ transportu	Dominantní substrát
OATP1A2	SLCO1A2		žlučové soli, organické anionty a kationty
OAT2B1	SLCO2B1		E3S, DHEAS
OAT1	SLC22A6	E/organické anionty	organické anionty
OAT2	SLC22A7	F nebo E	organické anionty
OAT3	SLC22A8	E/dikarboxylát	organické anionty
OAT4	SLC22A11	F nebo E	organické anionty
OAT7	SLC22A9	E/krátké mastné kyseliny	organické anionty
OAT10	SLC22A13	E/anionty	urát, organické anionty
URAT1	SLC22A12	E/organické anionty	urát, organické anionty
OCT1	SLC22A1	F	organické kationty
OCT2	SLC22A2	F	organické kationty
OCT3	SLC22A3	F	organické kationty
OCTN1	SLC22A4	C/Na^+	zwitterionty, organické kationty
OCTN2	SLC22A5	C/Na^+, L-karnitin; F/organické kationty	zwitterionty (L-karnitin), organické kationty
PEPT1	SLC15A1	C/H^+	di- a tripeptidy, beta-laktamová antibiotika
PEPT2	SLC15A2	C/H^+	di- a tripeptidy, beta-laktamová antibiotika
CNT1	SLC28A1	C/Na^+	nukleosidy
CNT2	SLC28A2	C/Na^+	nukleosidy
ENT1	SLC29A1	F	nukleosidy
ENT2	SLC29A2	F	nukleosidy
MATE1	SLC47A1		TEA, MPP, cimetidin, metformin, guanidin, prokainamid, cefalexin, cefradin
MATE2-K	SLC47A2		TEA, MPP, cimetidin, metformin, guanidin, prokainamid

C – kotransport (symport), E – výměník (antiport), F – usnadněná difuze

3.1.2. ABC transportéry

Tyto transportéry patří k přenašečům, které využívají hydrolýzy ATP jako zdroje energie pro přenos substrátů proti koncentračnímu spádu. Členové transportérové rodiny ABC jsou hlavním faktorem rozhodujícím o lékové rezistenci, protože omezují biologickou

dostupnost a účinek řady léčiv ovlivněním jejich absorpce, distribuce a eliminace či omezením jejich prostupnosti přes bariéry krev-tkáň, včetně nádorů (*Bruhn a Cascorbi*, 2014). Inhibice těchto transportérů může být pak využita ke zlepšení dostupnosti jejich substrátů (*Estudante et al.*, 2013).

P-glykoprotein (P-gp, MDR1, multidrug resistance protein 1, ABCB1)

Byl prvním popsaným lékovým transportérem (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Jedním z jeho rysů je různorodá struktura jeho substrátů zahrnující řadu terapeuticky užívaných léčiv. Spolu s lokalizací v apikální membráně epiteliálních buněk lze předpokládat, že jeho fyziologickou úlohou je ochrana buněk před potenciálními toxiny (*Hoffmann a Kroemer*, 2004). Krom nádorových buněk, kde způsobuje rezistenci vůči léčbě, ho najdeme v tenkém střevě, nadledvinách, ledvinách, tlustém střevě, játrech, plicích, mozku, prostatě, pokožce, jícnu, žaludku, vaječnících, svalech, srdci a na všech bariérách krev-tkáň, včetně placenty a hematoencefalické bariéry (*Takano et al.*, 2006).

Substráty P-gp jsou obvykle hydrofobní molekuly s kationickými vlastnostmi. Tyto substráty lze z pohledu interakcí rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky, které nejsou metabolizovány a slouží jako modelový substrát pro zkoumání P-gp (digoxin, dabigatran, fexofenadin a talinolol). Druhou a větší skupinou jsou léčiva, která jsou jak substráty P-gp, tak i CYP3A4 a/nebo jiných biotransformačních enzymů. A protože i řada inhibitorů P-gp je také inhibitory CYP3A4, byly pozorovány lékové interakce způsobené současnou inhibicí obou systémů (*König et al.*, 2013).

MRP (multidrug resistance-associated protein)

Celkem již bylo identifikováno 9 členů rodiny MRP, avšak jen u MRP1-5 byla prokázána role při transportu léčiv. MRP transportují látky typu organických aniontů (*Estudante et al.*, 2013). MRP4 a MRP5 přenáší (na rozdíl od MRP1–3) také cyklické a acyklické nukleosidové monofosfáty a jejich analoga (*Choudhuri a Klaassen*, 2006).

MRP1 (ABCC1) je exprimován ve většině tkání, kde se nachází v bazolaterální membráně. Je tedy spíše než za exkreci do žluči, moči či lumen GIT odpovědný za přenos substrátů do krve. Ve vysokém množství se tento přenašeč nachází v plicích, varlatech, ledvinách, ale také v mnoha nádorech (*Choudhuri a Klaassen*, 2006). MRP1 chrání buňky před

akumulací toxických látek. Přenáší hydrofobní léčiva a sloučeniny konjugované s glutathionem, glukuronidy či sulfáty (*Estudante et al.*, 2013).

MRP2 (ABCC2) transportuje metabolické konjugáty, ale i široké spektrum nekonjugovaných léčiv, řadu toxinů a jejich konjugátů včetně těžkých kovů (*Estudante et al.*, 2013). Překrytím substrátové specificity s P-glykoproteinem spolu s jejich stejnou lokalizací vzniká souhra tvořící výraznou bariéru pro absorpci mnoha xenobiotik (*Estudante et al.*, 2013). Najdeme ho v tenkém střevě, játrech, ledvinách, mozku, placentě, slinných žlázách, jako součást hematotestikulární bariéry a v řadě nádorů, kde negativně přispívá k rezistenci vůči chemoterapeutikům (*Takano et al.*, 2006).

MRP3 (ABCC3) transportér má substrátovou specifitu shodnou s MRP1, MRP2 a BSEP (bile salt export pump), i když s výrazně nižší afinitou vůči substrátům, které jsou přenášeny také MRP1 a MRP2 (*Choudhuri a Klaassen*, 2006). Krom chemoterapeutik a žlučových kyselin je také odpovědný za transport glukuronidových a glutathionových konjugátů (*Choudhuri a Klaassen*, 2006; *Klaassen a Aleksunes*, 2010). Nachází se hlavně v játrech, ledvinách a GIT, zejména v ileu (*Choudhuri a Klaassen*, 2006).

MPR4 (ABCC4) přenáší z endogenních látek leukotrieny, prostaglandiny, foláty, žlučové kyseliny, uráty a cyklické nukleotidy (*Klaassen a Aleksunes*, 2010). Kromě střeva je exprimován v bazolaterální membráně hepatocytů a v prostatě, v ledvinách se nachází v apikální membráně buněk proximálního tubulu. Tato rozdílná lokalizace MRP4 v játrech a ledvinách je ideální pro transport substrátů z hepatocytů do krve a poté z renálních buněk do moči, což je zvláště významné pro clearance žlučových kyselin při cholestáze (*Choudhuri a Klaassen*, 2006).

MRP5 (ABCC5) transportér se nalézá v tenkém i tlustém střevě, játrech, ledvinách a kosterním svalstvu, ale jeho lokalizace v membránách těchto orgánů je zatím nejasná (*Choudhuri a Klaassen*, 2006).

Zejména transportéry MRP1–3 jsou spojovány s rezistencí řady nádorů, která je způsobena zvýšeným efluxem a sníženou akumulací chemoterapeutik. Inhibice těchto transportérů se jeví jako vhodný přístup nejen při léčbě rakoviny, ale také pro překonání antimikrobiální rezistence (*Zhou et al.*, 2008).

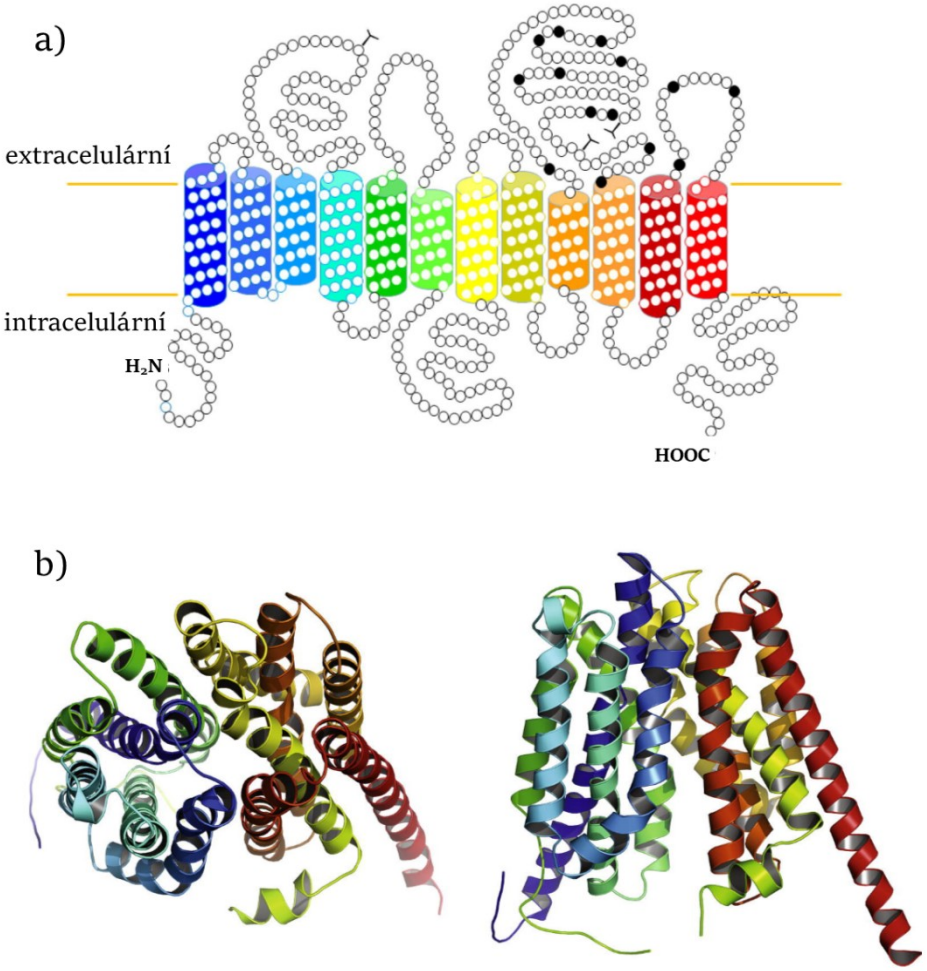
BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2)

Je stejně jako P-gp a MRP transportéry odpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci (*Estudante et al.*, 2013). Poprvé byl popsán jako hlavní faktor rezistence k adriamycinu u lidské prsní rakovinové buněčné linie, odkud je odvozen i jeho název breast cancer resistance protein (*Bruhn a Cascorbi*, 2014). V tkáních dosahuje nejvyšší exprese v placentě, dále pak v mozku, tenkém i tlustém střevě, kde brání průniku nebezpečných látek, v játrech, plicích, ledvinách, prsních a potních žlázách, kde usnadňuje sekreci těchto látek (*Li et al.*, 2017). Najdeme jej také v myeloidních a leukemických kmenových buňkách, kde způsobuje mnohočetnou lékovou rezistenci při terapii krevních malignit (*Bruhn a Cascorbi*, 2014).

BCRP se vyznačuje širokým spektrem substrátů, jejichž počet se od jeho objevu stále rozrůstá. Je odpovědný za rezistenci snížením absorpce řady chemoterapeutik, i dalších léčiv. Díky překryvu substrátové specificity s MRP2 dochází k synergickému efektu při omezování transportu léčiv přes bariéry (*Estudante et al.*, 2013).

3.2. Charakteristika lidských OATP transportérů

Transportéry OATP (organic anion-transporting polypeptides) patří do nadrodiny SLCO. U lidí byla doposud objevena exprese 11 OATP transportérů s výskytem v různých tkáních. Všechny OATP transportéry mají 12 proteinových domén s amino- a C-koncem koncem na cytoplazmatické straně membrány (obr. 2a). Pro vytvoření předpokládaného trojrozměrného modelu bylo použito teoretické modelování (obr. 2b), zde je pro ilustraci ukázáno uspořádání transportéru OATP1B1. Při tvorbě modelů se rovněž zkoumá, která oblast či které konkrétní aminokyseliny jsou důležité pro funkci OATP transportérů. Dle těchto studií se zdá, že cysteinové zbytky v páté velké extracelulární smyčce se podílejí na tvorbě disulfidových můstků a jsou nezbytné pro správnou povrchovou expresi OATP2B1 transportéru. Transmembránové domény 1, 8, 9 a 10 spolu s šestou extracelulární smyčkou jsou důležité u OATP1B1 a OATP1B3 pro přenos substrátů (*Hagenbuch a Stieger*, 2013)



Obr. 2. Model OATP1B1 transportéru. ***a)*** *Předpokládaná sekundární struktura OATP1B1 transportéru s 12 transmembránovými doménami. Extracelulární cysteinové zbytky jsou označeny černou barvou.* ***b)*** *Odpovídající 3D modely. Vlevo je uspořádání OATP1B1 transportéru znázorněno z pohledu z extracelulárního prostoru, vpravo jak prochází lipidovou dvojvrstvou membrány. Barvy transmembránových domén odpovídají barvám v modelu sekundární struktury (upraveno dle Hagenbuch a Stieger, 2013).*

V současnosti je význam těchto transportérů pro transmembránový přenos léčiv obecně akceptován, testování interakcí s OATP je regulačními lékovými autoritami vyžadováno už při vývoji léčiv (*Stieger a Hagenbuch*, 2014). Mechanismus, jakým zprostředkovávají přenos látek, zůstává stále sporný. Transport probíhá nezávisle na ATP i sodných iontech, jsou schopny i obousměrného přenosu. Několik studií naznačuje, že by mohly pracovat jako elektroneutrální antiport. Přenos některých látek je ovlivněn pH, ale zdá se, že v tomto ohledu mezi substráty existují odlišnosti (*Roth et al.*, 2012). Obecně tyto transportéry zprostředkovávají přenos pestré škály amfifilních organických sloučenin,

mnohdy s vyšší molekulovou hmotností, včetně žlučových kyselin, thyroidních hormonů, anionických peptidů, řady léčiv a jiných xenobiotik, ale některé z jejich substrátů jsou látky neutrální či pozitivně nabité (*Estudante et al.*, 2013; *Hagenbuch a Stieger*, 2013).

Lidské OATP transportéry se dělí do 6 rodin. Isoformy OATP s více než 40% shodou v sekvenci aminokyselin jsou členy stejné rodiny (OATP1, OATP2, OATP3, ...). Přiřazení k jedné podrodině (OATP1A, -1B, -1C) pak vyžaduje více než 60% shodu v uspořádání aminokyselin (*Klaassen a Aleksunes*, 2010).

3.2.1. OATP1

Tato rodina zahrnuje celkem 4 členy: **OATP1A2, 1B1, 1B3** a **1C1**.

OATP1A2 byl prvním izolovaným lidským OATP transportérem. Byl detekován v řadě tkání včetně mozku, kde je součástí hematoencefalické bariéry, ledvin, jater, plic, varlat, placenty a prostaty (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012). Dále byl detekován v enterocytech tenkého střeva (*Roth et al.*, 2012), kde se uvádí jeho výskyt ve všech úsecích střeva (*Meier et al.*, 2007). Je považován za transportér významně se podílející na absorpci léčiv ve střevě, neboť některé studie zde potvrdily jeho potenciální význam pro transport léčiv jako fexofenadin, aliskiren či betablokátory (*Müller et al.*, 2017). Novější data ovšem spíše ukazují, že jeho exprese v lidském střevě je nízká (*Li et al.*, 2017; *Müller et al.*, 2017; *Tamai*, 2012). Tyto údaje naznačují, že účast OATP1A2 na střevní absorpci léčiv může být pravděpodobně nižší, než se dosud předpokládalo.

OATP1B1 spolu s OATP1B3 transportérem jsou považovány za OATP transportéry typické pro játra, kde jsou lokalizovány v basolaterální membráně hepatocytů (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

Přítomnost **OATP1B3** byla krom jater detekována i v některých nádorech např. žaludku, tlustého střeva, slinivky, ale také plic, prsu či prostaty. Naopak při hepatocelulárním karcinomu je jeho exprese snížena (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

OATP1C1 je exprimován v mozku v gliových buňkách hypothalamu, na mozkomíšní bariéře a v plexu choroideu a ve varlatech (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

3.2.2. OATP2

Rodinu OATP2 tvoří dva členové: **OATP2A1** a **2B1**.

OATP2A1 je přítomný prakticky ve všech tkáních (mozek, tenké a tlusté střevo, srdce, ledviny, játra, plíce, vaječníky, slinivka, placenta, prostata, kosterní svalstvo, slezina, dále v oku, děloze, neuronech i astrocytech). Je označován jako prostaglandinový transportér (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

OATP2B1 je také exprimován v řadě orgánů: v játrech v basolaterální membráně, v tenkém střevě, placentě, mléčné žláze, na hematoencefalické bariéře, v srdci, destičkách a kosterním svalstvu (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012). Jeho exprese v hepatocytech je nižší než exprese OATP1B1, ale srovnatelná s OATP1B3 (*Badée et al.*, 2015; *Vildhede et al.*, 2018). Jak již bylo zmíněno výše, tyto tři transportéry se nacházejí v basolaterální membráně hepatocytů, kde jsou zodpovědné za uptake léčiv z krve do jater (*Hagenbuch a Stieger*, 2013). Exprese OATP2B1 byla prokázána ve všech částech lidského střeva (*Drozdzik et al.*, 2014; *Meier et al.*, 2007). Informace o buněčné lokalizaci v enterocytech jsou poněkud nekonzistentní. Existují jak data o jeho výskytu v apikální membráně střeva, kde se podílí na absorpci látek z lumen střeva do krve (*Kobayashi et al.*, 2003), tak údaje o jeho basolaterální lokalizaci (*Keiser et al.*, 2017).

3.2.3. OATP3

OATP3A1 se nachází v řadě orgánů: ve střevě, varlatech, mozku, srdci, plicích, slezině, na leukocytech periferní krve a ve štítné žláze (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012). Přenáší thyroidální hormony, estron 3-sulfát a prostaglandiny (*Hagenbuch a Stieger*, 2013).

3.2.4. OATP4

Do této rodiny patří transportéry **OATP4A1** a **OATP4C1**.

OATP4A1 je nejvíce exprimován v srdci a placentě, dále pak v plicích, játrech, střevě, kosterním svalstvu, ledvinách a slinivce (*Roth et al.*, 2012). Transportuje stejně jako OATP3A1 thyroidální hormony, estron 3-sulfát a prostaglandiny (*Hagenbuch a Stieger*, 2013).

U **OATP4C1** se předpokládá, že je OATP transportérem typickým pro ledviny, což zatím nebylo na proteinové úrovni potvrzeno, rovněž byla jeho přítomnost prokázána v játrech (*Hagenbuch a Stieger*, 2013).

3.2.5. OATP5

OATP5A1 byl detekován ve fetálním mozku, prostatě, kosterním svalstvu a brzlíku (*Hagenbuch a Stieger*, 2013).

3.2.6. OATP6

OATP6A1 byl detekován zejména ve varlatech, dále ve slezině, mozku a placentě (*Hagenbuch a Stieger*, 2013; *Roth et al.*, 2012).

Za fyziologických podmínek jsou OATP transportéry významné pro homeostázu žlučových kyselin (1A2, 1B, 1C1, 2B1, 4A1, 4C1), eliminaci bilirubinu (1A2, 1B), zánětlivé procesy (4C1) a regulaci úrovní hormonů (1A2, 1B, 1C1, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 4C1). Nejvíce substrátů bylo identifikováno pro transportéry: OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 a OATP2B1 (*Kovacsics et al.*, 2017) (viz kapitola 3.3). V případě transportérů OATP5A1 a OATP6A1 zatím substráty nebyly nalezeny (*Roth et al.*, 2012).

3.3. Interakce xenobiotik s OATP transportéry

Na rozdíl od interakcí léčivo-léčivo, kterým je přikládán velký význam, je identifikování interakcí potrava-léčivo pomalejší, přestože se možné riziko těchto interakcí zvyšuje spolu s narůstajícím užíváním léčiv. Zvláště u vysoce rizikových pacientů, jako jsou starší lidé užívající chronicky tři a více léků, pacienti s diabetem, hypertenzí, vysokým cholesterolem, depresemi, městnavým srdečním selháním, by interakce potrava-léčivo měly být systematicky zkoumány a monitorovány (*Ötles a Senturk*, 2014).

Léčiva mohou být buď substráty a/nebo inhibitory jednoho či více transportérů (*Estudante et al.*, 2013), což současně platí i pro látky přijímané v potravě či potravních doplňcích. Případná inhibice transportéru může mít vliv na transport látek, které jsou jeho substráty (*Ötles a Senturk*, 2014). Interakce léčivo-léčivo a potrava-léčivo může vést ke snížení systémové expozice léčivem inhibicí influxních transportérů ve střevě

a zvýšení expozice při modulaci efluxních transportérů střeva (*Nakanishi a Tamai*, 2015). Inhibice OATP transportérů v sinusoidální membráně játerních buněk, kde jsou zodpovědné za uptake léčiv, může mít za následek zvýšení tkáňové distribuce a vedlejších účinků léčiv přenášených těmito transportéry. Lékové a potravní interakce mohou tedy potenciálně vést až k selhání léčby či naopak k vystupňování nežádoucích účinků (*Nakanishi a Tamai*, 2015).

V současné době je již známa řada lékových či fytochemických substrátů a inhibitorů lidských OATP transportérů. Jedná se o léčiva z různých farmakoterapeutických skupin a rostlinné látky různých strukturních skupin (tab. 2). Obecně lze konstatovat, že dominantní skupinou mezi fytochemickými sloučeninami ovlivňujícími OATP transportéry jsou látky flavonoidní či látky jim podobné, např. flavolignany, z nichž řada je inhibitory i několika transportérů této skupiny (tab. 2). Paleta léčiv transportovaných OATP je poměrně pestrá, avšak velká pozornost je zaměřena na hypolidemické statiny, neboť u těchto léčiv je prokázáno, že významný transport prostřednictvím OATP je vlastností celé skupiny (*Gong a Kim*, 2013).

Tabulka 2. Významné substráty a inhibitory OATP transportérů (převzato z Roth et al., 2012 – *substráty; Estudante et al.*, 2013*, Kovacsics et al.*, 2017*, Li et al.*, 2017 – *inhibitory).*

	Substráty		**Inhibitory**	
	endogenní	**exogenní**	**léčiva**	**přírodní látky**
OATP1A2	bilirubin, DHEAS, estradiol-17β-glukuronid, E3S, glykocholát, cholát, PGE_2, taurocholát, taurochenodeoxycholát, tauroursodeoxycholát, trijodtyronin, tyroxin	acebutolol, atenolol, atrasentan, bromsulfoftalein, celiprolol, ciprofloxacin, darunavir, enoxacin, ECG, EGCG, erytromycin, fexofenadin, gatifloxacin, hydroxyurea, imatinib, labetalol, levofloxacin, lomefloxacin, lopinavir, metotrexát, N-methylchinidin, N-methylchinin, nadolol, norfloxacin, ouabain, pitavastatin, rokuronium, rosuvastatin, saquinavir, sotalol, talinolol, tebipenem pivoxil	budesonid, cyklosporin, everolimus, rifampicin, sirolimus	ovocné šťávy, apigenin, ECG, EGCG, hesperidin, kaempferol, naringin, quercetin
OATP1B1	bilirubin, DHEAS, estradiol-17β-glukuronid, E3S, glykocholát, glykoursodeoxycholát, cholát, leukotrien C4 a E4, PGE_2, taurocholát, tauroursodeoxycholát,	atorvastatin, atrasentan, benzylpenicilin, bosentan, bromosulfoftalein, cefazolin, cefoperazon, cerivastatin, darunair, demetylphalloin, enalapril, ezetimib glukuronid, fluorescein,	rifampicin	biochanin A, genistein, silymarin, silybin A, silybin B, silychristin

	tromboxan B2, trijodtyronin, tyroxin	fluvastatin, hydroxyurea, lopinavir, mesalazin, metotrexát, olmesartan, phalloidin, pitavastatin, pravastatin, rifampicin, rosuvastatin, saquinavir, simvastatin, temokapril, troglitazon sulfát, valsartan		
OATP1B3	bilirubin, DHEAS, estradiol-17β-glukuronid, E3S, glutathion, glykocholát, glykoursodeoxycholát, cholát, leukotrien C4, taurocholát, taurochenodeoxycholát, taurodeoxycholát, tauroursodeoxycholát, trijodtyronin, tyroxin	amanitin, benzylpenicilin, bosentan, bromosulfoftalein, cefadroxil, cefazolin, cefoperazon, cefalexin, demetylphalloin, diklofenak, digoxin, docetaxel, ECG, EGCG, enalapril, erytromycin, fexofenadin, fluorescein, fluvastatin, hydroxyurea, imatinib, mesalazin, metotrexát, olmesartan, ouabain, paklitaxel, phalloidin, pitavastatin, rifampicin, rosuvastatin, saquinavir, telmisartan, valsartan	rifampicin	silymarin, silybin A, silybin B, silychristin
OATP1C1	estradiol-17β-glukuronid, E3S, trijodtyronin, tyroxin, tyroxin sulfát	bromosulfoftalein		
OATP2A1	PGE_1, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGH_2, tromboxan B_2	kys. latanoprostová		
OATP2B1	DHEAS, E3S, pregnelon sulfát, PGE_2, taurocholát, thyroxin	aliskiren, atorvastatin, benzylpenicilin, bosentan, bromsulfoftalein, ezetinib glukuronid, fexofenadin, fluvastatin, glibenklamid, kys. latanoprostová, mesalazin, montelukast, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, talinolol, tebipenem pivoxil	budesonid, cyklosporin, everolimus, rifampicin, sirolimus	ovocné šťávy, EC, ECG, EGCG, isorhamnetin-3-glukosid, kaempferol-3-glukosid, kaempferol-3-rutosid, katechin, naringin, naringenin, quercitrin, rutin, silymarin, silybin A, silibin B, silichristin
OATP3A1	kys. arachidonová, E3S, PGE_1, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, tyroxin, vasopresin	benzylpenicilin		
OATP4A1	estradiol-17β-glukuronid, E3S, PGE_2, taurocholát, trijodtyronin, tyroxin	benzylpenicilin		
OATP4C1	cAMP, E3S, trijodtyronin, tyroxin	digoxin, metotrexát, ouabain, sitagliptin		

DHEAS – dehydroepiandrosteron 3-sulfát, EC – epikatechin, ECG – epikatechin galát, EGCG – epigalokatechin galát, E3S – estron 3-sulfát, PGE_1 – prostaglandin E_1, PGE_2 – prostaglandin E_2

Interakce OATP s léčivy

Na rozdíl od přírodních látek, u kterých je známa především inhibiční schopnost vůči OATP, léčiva patří hlavně k substrátům OATP transportérů, méně je známo o jejich inhibičních interakcích. Přehled substrátů OATP transportérů je uveden v tab. 2. K substrátům přenášeným OATP2B1 patří navíc též inhibitory tyrozinkináz crizotinib a gefitinib (*Sato et al.*, 2018). Inhibiční aktivita vůči OATP2B1 byla *in vitro* pozorována také u léčiv streptomycinu, linezolidu (*Parvez et al.*, 2016) či cefiximu (*Fujita et al.*, 2016). Vedle dat o interakcích léčiv s OATP2B1 a OATP1A2 je k dispozici mnoho údajů o interakcích s dalšími typy OATP, především s typicky jaterními transportéry OATP1B1 a OATP1B3. Z těch je patrné, že spektrum lékových substrátů i inhibitorů je poměrně široké a částečně se překrývá s transportéry OATP2B1 a OATP1A2 (*Kovacsics et al.*, 2017; *Li et al.*, 2017; *Roth et al.*, 2012).

Vzhledem k masovému používání a klinickému významu se mezi důležité a studované lékové substráty transportérů OATP řadí antidyslipidemika ze skupiny statinů. Atorvastatin je substrátem jak OATP1B1, tak OATP2B1, fluvastatin pak OATP1B1, OATP1B3 a OATP2B1, pravastatin patří k prokázaným substrátům OATP1A2, OATP1B1 i OATP2B1, pitavastatin je transportrován všemi farmakologicky zajímavým OATP. Rosuvastatin je také substrátem OATP1A2, 1B1, 1B3 i 2B1 transportéru (*Roth et al.*, 2012; *Shitara et al.*, 2013). U tohoto, v rámci skupiny významného, statinu jsou popsány lékové interakce s OATP transportéry, které potenciálně ovlivňující jeho biologickou dostupnost. Při současném užití s gemfibrozilen a cyklosporinem bylo pozorováno zvýšení biologické dostupnosti rosuvastatinu způsobené inhibicí OATP1B1 transportéru v játrech (*Bergman et al.*, 2006). Při studiu interakcí přírodních látek s rosuvastatinem byla popsána indukce uptake rosuvastatinu OATP1B1 transportérem *in vivo* flavonem baicalinem (*Fan et al.*, 2008). Silymarin inhiboval *in vitro* uptake rosuvastatinu pomocí OATP1B1, ovšem *in vivo* nebylo pozorováno žádné ovlivnění farmakokinetiky tohoto léčiva (*Deng et al.*, 2008). Z interakcí s OATP2B1 transportérem lze zmínit stimulaci uptake rosuvastatinu rutinem *in vitro* zřejmě způsobenou stimulací exprese OATP2B1 transportéru (*Ogura et al.*, 2014), ale také snížení uptake rosuvastatinu kyselinou glycyrrhetinovou, mulberinem, quercetinem a scutellarinem dané inhibicí OATP2B1 transportéru (*Wen et al.*, 2016).

Interakce OATP s přírodními látkami

Po zjištění, že ovocné šťávy z grepu, jablek či pomerančů mohou inhibovat transmembránový přenos látek prostřednictvím OATP transportérů (*Dresser et al.*, 2002), byla snaha identifikovat konkrétní látky za tuto inhibici zodpovědné. Tím začal nárůst zájmu o výzkum interakcí přírodních látek, který byl do té doby zaměřen především na potenciální ovlivnění CYP3A a P-glykoproteinu, jako možných inhibitorů influxních transportérů (*Edwards et al.*, 1999; *Lown et al.*, 1997; *Takanaga et al.*, 1998). Postupně bylo zjištěno, že hlavní látky grepové, pomerančové a jablečné šťávy odpovědné za inhibici transportéru OATP2B1 jsou flavonoidy naringin, naringenin, hesperidin, floridzin, floretin, quercetin a kaempferol (*Shirasaka et al.*, 2013), v grepové šťávě byl jako hlavní inhibitor OATP1A2 transportéru identifikován naringin (*Bailey et al.*, 2007) a pro transportéry OATP1B1 a OATP1B3 naringenin (*Mandery et al.*, 2012). Dále bylo zjištěno, že transport pomocí OATP2B1 a OATP1A2 je kompetitivně inhibován také flavonoidem apigeninem (*Mandery et al.*, 2010) a flavonoidy zeleného čaje epikatechin galátem (ECG), epigalokatechin galátem (EGCG) (*Roth et al.*, 2011). Mezi další flavonoidní látky prokazatelně inhibující OATP2B1 transportér patří flavony mulberrin, scutellarin, glykosidové formy quercetinu hyperosid, isoquercitrin a rutin, jejichž inhibiční aktivita je však kvantitativně nižší než v případě quercetinu (*Wen et al.*, 2016), či flavolignany silymarin, silybin A, silybin B a silychristin (*Köck et al.*, 2013). Jaterní OATP1B1 a OATP1B3 transportéry jsou rovněž inhibovány quercetinem (*Mandery et al.*, 2012) a silymarinem, silybinem A, silybinem B a silychristinem (*Köck et al.*, 2013). Uptake pomocí OATP1B1 transportéru je inhibován také biochaninem A (*Wang et al.*, 2005). Vedle zmíněných ovocných šťáv byla při *in vitro* experimentech nalezena významná inhibice OATP2B1 také u extraktů z borůvek, echinacey, zeleného čaje, banaby, hroznových semínek, jinanu a sójových bobů (*Fuchikami et al.*, 2006). Z dalších přírodních látek byly prokázány interakce OATP transportérů např. s alkaloidy. U alkaloidu chelerythrinu byl *in vitro* prokázán výrazný inhibiční efekt vůči OATP1A2 (*Shams et al.*, 2018). Transportér OAT1B3 byl pak prokázán jako významný pro uptake isochinolinového alkaloidu berberinu (*Chen et al.*, 2015). K inhibitorům OATP2B1 patří i kyselina glycyrrhetinová, která se řadí k triterpenoidním látkám (*Wen et al.*, 2016).

Vedle identifikace látek s inhibičním potenciálem byl u některých flavonoidů zkoumán i jejich vliv na transport léčiv zprostředkovaný transportéry OATP. Ve studii s hlavními obsahovými flavonoidy jinanu bylo prokázáno, že apigenin je silným inhibitorem uptake

jak fexofenadinu zprostředkovaného OATP1A2, tak atorvastatinu zprostředkovaného OATP1A2 i OATP2B1. Také stanovené inhibiční koncentrace quercetinu a kaemferolu vůči transportu fexofenadinu pomocí OATP1A2 a atorvastatinu pomocí OATP1A2, resp. OATP2B1, byly srovnatelné s koncentracemi těchto flavonoidů dosažitelnými v tenkém střevě z potravních zdrojů (*Mandery et al.*, 2010). Rozšíření této studie na jaterní OATP přineslo poznání, že tyto tři flavonoidy snižují uptake atorvastatinu také inhibicí transportéru OATP1B1. Apigenin byl i v této studii nejsilnějším inhibitorem (*Mandery et al.*, 2012). Rovněž u extraktu ze zeleného čaje byl prokázán inhibiční účinek na přenos glibenklamidu zprostředkovaný transportérem OATP2B1 (*Fuchikami et al.*, 2006). Při současném podání inhibitoru reninu aliskirenu a grepové šťávy bylo v klinické studii pozorováno snížení absorpce a biologické dostupnosti tohoto léčiva. To bylo vysvětleno inhibicí intestinálního uptake aliskirenu zprostředkovaného OATP2B1 (*Tapaninen et al.*, 2010). Tento vliv flavonoidů ovocných šťáv, jako jsou naringin či hesperidin, na OATP transportéry byl deklarován jako odpovědný za snížení biologické dostupnosti několika dalších léčiv transportovaných OATP1A2, např. fexofenadinu či celiprololu (*Bailey et al.*, 2007; *Dresser et al.*, 2002; *Shirasaka et al.*, 2013). Transportér OATP2B1 je odpovědný také za přenos toxického metabolitu irinotecanu označovaného jako SN-38. Snížení uptake do enterocytů inhibicí tohoto přenosu flavonoidem baicalinem či ovocnými šťávami může vést k prevenci gastrointestinální toxicity tohoto metabolitu (*Fujita et al.*, 2016).

3.4. Charakteristika zkoumaných látek

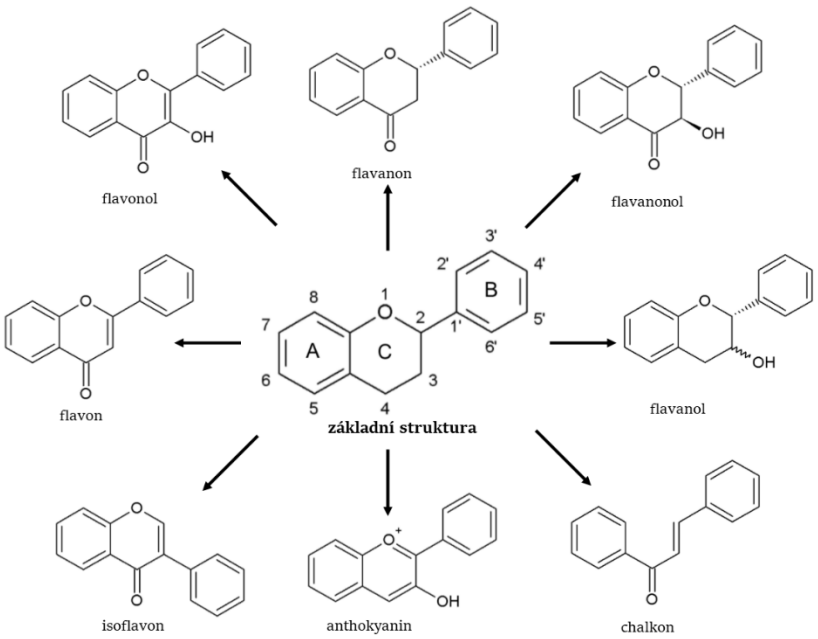
3.4.1. Flavonoidy a isoflavony

Rostliny jsou schopny syntetizovat řadu organických látek, které se dále dělí na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity najdeme v každé rostlině a mají základní funkce pro rostlinný růst a vývoj, fotosyntézu a dýchání. Sekundární metabolity nejsou pro přežití rostlin nezbytné, přesto ho značně usnadňují: působí jako atraktanty pro opylovače, chrání rostliny před býložravci, hmyzem, mikrobiálními patogeny i přemnožením jiných rostlinných druhů v těsném okolí, dále před stresory z životního prostředí, vysokými teplotami, suchem i UV zářením, působí také jako signální molekuly (*Cavalier-Smith*, 1992; *Rhodes*, 1994). Některé se vyskytují napříč rostlinnými druhy (např. flavonoidy, které se vyskytují ve většině, ne-li ve všech rostlinných druzích), jiné jsou vázány převážně na určitou taxu (např. isoflavony) (*Rhodes*, 1994). Jsou tedy

významnou součástí potravy a také doplňků stravy, jejichž spotřeba stále roste, a tak se stávají více a více možným zdrojem interakcí.

Flavonoidy jsou nejběžnější a velmi rozšířené sekundární metabolity vyskytující se prakticky ve všech částech velké řady rostlin (*Kumar a Pandey*, 2013). V rostlinách jsou zodpovědné za barvu a vůni květů, lákají opylovače, napomáhají růstu a vývoji nových rostlin. Flavonoidy chrání rostliny přes stresem, slouží jako signální molekuly, fytoalexiny, detoxikační činidla a obranné antimikrobiální látky. Hrají roli v odolnosti vůči mrazu či suchu, čímž přispívají k aklimatizaci rostlin. V neposlední řadě fungují i jako jedinečný UV filtr (*Panche et al.*, 2016).

Flavonoidy se dělí do několika tříd se stejnou základní strukturou tvořenou dvěma aromatickými jádry spojenými tříuhlíkatým řetězcem, který spolu s kyslíkem může tvořit heterocyklus (obr. 3). Flavonoidy bývají často konjugovány jako glykosidy, a to s L-rhamnózou, D-glukózou, glukorhamnózou, galaktózou či arabinózou, ale vyskytují se i ve formě aglykonů, případně jako methylované deriváty (*Kumar a Pandey*, 2013; *Landete*, 2013). Pokud tvoří glykosidy, bývá vazba s cukernou složkou v pozici 3 nebo 7 (*Kumar a Pandey*, 2013).



Obr. 3. Základní struktura flavonoidů a jednotlivých tříd (upraveno dle Kumar a Pandey, 2013; Panche et al., 2016).

Protože se jedná o fytochemické látky, nejsou flavonoidy syntetizovány živočichy, včetně člověka, ale jsou nedílnou součástí potravy jak zvířat, tak i lidí. V potravě jsou zodpovědné za barvu, chuť, prevenci oxidace tuků a rovněž chrání vitamíny a enzymy. Flavonoidy jsou lidmi konzumovány odedávna a je o nich známo, že vykazují řadu pozitivních biologických účinků na lidské zdraví (*Kumar a Pandey*, 2013). Prakticky všechny skupiny flavonoidů jsou antioxidanty, některé mají účinky hepatoprotektivní, protizánětlivé, antikancerogenní, inhibují srážení destiček, zlepšují endotelovou dysfunkci, snižují riziko infarktu myokardu, vykazují antibakteriální a protivirovou aktivitu. Používají se v léčbě diabetu i v prevenci osteoporózy. Řada vykazuje anticholinesterázovou aktivitu, modulují xantinoxidázu, příznivě působí při neurodegenerativních onemocněních (*Kumar a Pandey*, 2013; *Landete*, 2013; *Panche et al.*, 2016).

Přesný odhad průměrného příjmu flavonoidů v potravě je ztížen značnou různorodostí flavonoidů, různým obsahem v rostlinách a rovněž rozdílnou konzumací každého jednotlivce (*Kumar a Pandey*, 2013), přesto se odhaduje, že jen z potravy, hlavně ovoce a zeleniny, přijímá člověk denně množství od stovek miligramů až po 1–2 g flavonoidů (*Havsteen*, 2002; *Witkowska et al.*, 2015).

Řada flavonoidů vykazuje po perorálním podání jen nízkou biologickou dostupnost. Glykosidické formy flavonoidů jsou před absorpcí zpravidla rozštěpeny v tenkém střevě na aglykony (*Del Rio et al.*, 2013), které jsou však jen málo rozpustné ve vodě. Tato skutečnost vede k jejich omezené absorpci a většina zůstává ve střevě (*Kumar a Pandey*, 2013).

Bylo identifikováno přes 6000 chemicky unikátních flavonoidů v rostlinách, zejména v ovoci, zelenině, oříškách, semenech, dále v nápojích jako víně, čaji, džusech a rovněž v medu, propolisu a rostlinných potravních doplňcích (*Jaganathan a Mandal*, 2009; *Landete*, 2013; *Panche et al.*, 2016).

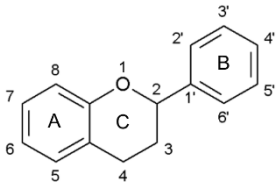
Flavonoidy obsažené ve včelích produktech

Používání medu, propolisu, vosku a mateří kašičky v léčbě je pravděpodobně staré jako lidstvo samo. Všechny tyto včelí produkty obsahují významné koncentrace flavonoidů, nejbohatším zdrojem je propolis. Prvním z používaných včelích produktů byl pravděpodobně med pro svou sladkou chuť a vysoký obsah glukózy. Dále se využíval také propolis, který měl spolu s medem uplatnění při zánětech kůže a hrdla (*Havsteen*, 2002).

Med má vysoký obsah fytochemických látek včetně flavonoidů, které jsou zodpovědné za jeho pozitivní biologické účinky. Ovšem množství obsahových látek se může podstatně lišit v závislosti na geografických a klimatických podmínkách. Některé flavonoidy jsou typické pro určitý druh medu, např. kaempferol pro rozmarýnový med, quercetin pro slunečnicový med. V evropském medu najdeme také flavonoidy typické pro propolis: chrysin, pinocembrin a pinobanksin (*Jaganathan a Mandal*, 2009). Přehled typických flavonoidů obsažených v medu a jejich chemické zařazení shrnuje tabulka 3. Kromě těchto flavonoidů najdeme v medu i další široce rozšířené látky, např. apigenin, kaempferol (*Jaganathan a Mandal*, 2009), naringin či hesperidin (*Viuda-Martos et al.*, 2008), ale u těch byl již vliv na OATP transportéry popsán a jejich významnějšími zdroji jsou ovocné šťávy (*Bailey et al.*, 2007; *Mandery et al.*, 2010; *Shirasaka et al.*, 2013).

Tabulka 3. Strukturní charakteristika zkoumaných flavonoidů typicky se vyskytujících v medu

FLAVONOID	**Třída**	**Substituce**				
		C_5	**C_7**	**$C_{3'}$**	**$C_{4'}$**	**$C_{5'}$**
quercetin	flavonol	OH	OH	OH	OH	H
fisetin	flavonol	OH	H	H	OH	OH
galangin	flavonol	OH	OH	H	H	H
chrysin	flavon	OH	OH	H	H	H
myricetin	flavonol	OH	OH	OH	OH	OH
pinobanksin	flavanonol	OH	OH	H	H	H
pinocembrin	flavanon	OH	OH	H	H	H



Kromě včelích produktů najdeme tyto flavonoidy v dalších přírodních zdrojích (tab. 4), jejichž konzumací se dále navyšuje jejich příjem. Roční konzumace medu ve státech EU je odhadována v průměru od 0,35 kg/osobu (Itálie, Francie, UK, Dánsko, Portugalsko) po 1,8 kg/osobu (Německo, Rakousko, Švýcarsko, Maďarsko, Řecko), což v přepočtu na den činí 1–5 g/osobu/den. Jednotlivá dávka u lidí konzumujících med se předpokládá až 25 g (*Bogdanov et al.*, 2008). Pro dosažení většiny pozitivních vlivů medu na zdraví je nutný příjem poměrně vysokých dávek a to až 50–80 g (*Bogdanov et al.*, 2008). V tabulce 4 je pro lepší ilustraci uvedeno množství zkoumaných flavonoidů v 1 g medu.

Tabulka 4. Zdroje zkoumaných flavonoidů a jejich obsah v medu

FLAVONOID	Zdroje	Obsah v medu [μg/g]	Reference
quercetin	med[1], propolis[2], bobulovité ovoce[3], cibule, brokolice, zelený čaj, pomeranče, jablka, jahody[4], víno[5], kakao[6]	0,01–4	(*Campone et al.*, 2014; *Kečkeš et al.*, 2013; *Wabaidur et al.*, 2015)
fisetin	jahody, jablka, hrozny, kivi, cibule[4], med, propolis[7]	0,1–2	(*Campillo et al.*, 2015)
galangin	med[1], propolis[2]	1–6	(*Campone et al.*, 2014; *Kečkeš et al.*, 2013)
chrysin	med[1], propolis[2]	1–10	(*Campone et al.*, 2014; *Kečkeš et al.*, 2013; *Wabaidur et al.*, 2015; *Yao et al.*, 2004)
myricetin	med[8], bobulovité ovoce[3], petržel, špenát, brokolice, pomeranče[4], víno[5]	0,01–36	(*Campone et al.*, 2014; *Yao et al.*, 2004)
pinobanksin	med[1]	5–14	(*Campone et al.*, 2014)
pinocembrin	med[1], propolis[2]	1–3	(*Campone et al.*, 2014; *Yao et al.*, 2004)

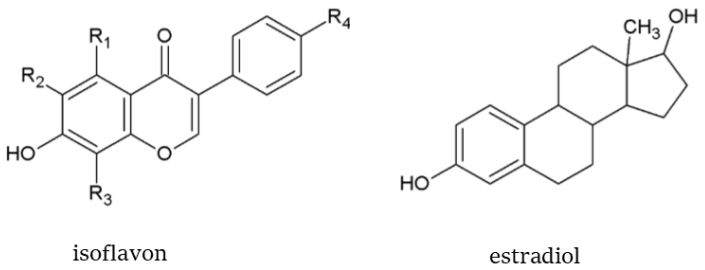
[1] Jaganathan a Mandal, 2009; [2] Havsteen, 2002; [3] Häkkinen et al., 1999; [4] Kimira et al., 1998; [5] Burns et al., 2001; [6] Sánchez-Rabaneda et al., 2003; [7] Viuda-Martos et al., 2008; [8] Escriche et al., 2014

Isoflavony sóji

Isoflavony tvoří zvláštní skupinu látek řazenou mezi flavonoidy i přes poněkud odlišnou strukturu (obr. 3). Kromě strukturního rozdílu se odlišují také svým vznikem, výskytem a některými biologickými účinky. Isoflavony jsou sekundární metabolity tvořené symbiózou mezi rhizobiálními bakteriemi a kořínky luštěnin. Po syntéze slouží rostlinám jako chemoatraktant (*Ko*, 2014; *Reynaud et al.*, 2005). V rostlinách mají také funkci fytoalexinů, tj. látek syntetizovaných rostlinami na obranu v odpovědi na napadení patogeny (*Reynaud et al.*, 2005). Poprvé se o ně vědci začali zajímat kolem roku 1940 v souvislosti s problémy plodnosti ovcí pojídajících druh jetele s vysokým obsahem isoflavonů (*Wang et al.*, 2013).

Isoflavony se nacházejí ve více než 300 druzích rostlin, a to zejména v kořenech a semenech. Jejich specifickým strukturním rysem je přesun aromatického kruhu B z polohy 2 do polohy 3 heterocyklu (obr. 3) (*Szeja et al.*, 2017). Tato změna vede k zisku nového biologického účinku, který u jiných flavonoidů nebyl pozorován. Isoflavony jsou tak fytoestrogeny – nesteroidní estrogeny s chemickou strukturou podobnou 17-β-estradiolu (obr. 4) (*Ko*, 2014). Přirozeně se isoflavony vyskytují převážně konjugované ve formě biologicky neaktivních glykosidů (*Ko*, 2014). Jsou podobně jako

jiné flavonoidní látky jen omezeně rozpustné ve vodě, což negativně ovlivňuje jejich biologickou dostupnost. Lze předpokládat, že jejich rozpustnost se bude zvyšovat se stoupajícím počtem cukerných jednotek, tím se ale zvětšuje velikost molekuly (*Szeja et al.*, 2017). V tenkém střevě jsou však štěpeny na aglykony, které pak mohou být absorbovány, pravděpodobně pasivní difuzí (*Ko*, 2014; *Larkin et al.*, 2008).

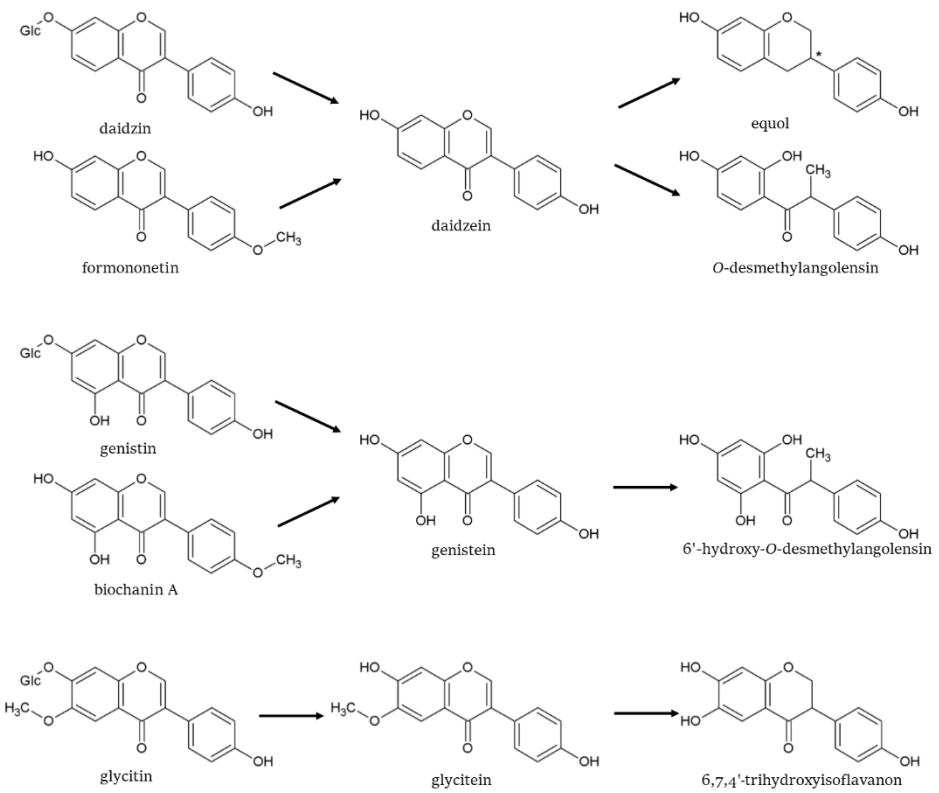


Obr. 4. Srovnání základní struktury isoflavonů a 17-β-estradiolu (upraveno dle Ko, 2014).

U lidí mají isoflavony řadu pozitivních biologických účinků na kardiovaskulární systém, využívají se při léčbě osteoporózy, pro úlevu od symptomů provázejících začátek menopauzy, jako ochrana před hormonálně dependentními nádory (*Szeja et al.*, 2017). U postmenopauzálních žen jejich příjem zlepšuje kognitivní funkce, mají ochranný efekt proti UVB záření (*Wang et al.*, 2013). Jsou antioxidanty a byl rovněž prokázán jejich vliv na zlepšení glykémie u postmenopauzálních žen (*Ko*, 2014). Navzdory značnému nadšení nad potenciálními přínosy isoflavonů se objevily také obavy nad bezpečností v souvislosti s jejich vlastnostmi podobnými estrogenu, zejména při konzumaci u pacientů s estrogen-senzitivním nádorem prsu (*Wang et al.*, 2013).

Přírodním zdrojem isoflavonů jsou především rostliny z čeledi *Fabaceae* (Bobovité), ale najdeme je například i v brokolici, květáku, ječmenu, červeném víně, ovšem nejbohatším zdrojem zůstávají sójové boby a produkty z nich (*Ko*, 2014). V konzumaci sójových produktů lze pozorovat v poslední době značný nárůst, který je způsoben jednak vírou v přínos pro zdraví, a rovněž i trendy ve výživě, kdy se omezuje příjem masa a zvířecích produktů (*Navrátilová et al.*, 2018; *Wang et al.*, 2013). Sójový protein slouží vegetariánům jako náhrada masa a sýru, používá se jako náhrada masa v masných produktech, obohacuje energetické tyčinky, pití pro sportovce, kojenecké výživy, cereálie, zmrzlinu, je přidáván do konzerv i pekařských produktů. Jeho přídavek zlepšuje vzhled jídla a rovněž umožňuje kontrolovat doporučený denní příjem, protože je bez cholesterolu, s vysokým obsahem vlákniny a bez laktózy (*Ko*, 2014).

Hlavními isoflavony obsaženými v sóji a sójových produktech jsou glykosidy daidzin, genistin a glycitinu a jejich aglykony daidzein, genistein a glycitein. Ty mohou vznikat také z prekurzorů formononetinu a biochaninu A metabolizací ve střevě (*Ko*, 2014; *Wang et al.*, 2013) (obr. 5). U glykosidů je cukernou složkou glukóza, která je připojena v pozici 7 kruhu A (*Larkin et al.*, 2008). Aglykony mohou být pak ve střevě dále metabolizovány střevní mikroflórou (obr. 5), ze všech sekundárních metabolitů je pravděpodobně nejdůležitější *S*-equol, protože jako jediný vykazuje biologickou aktivitu. Také zvířata jsou schopná při trávení isoflavonů produkovat jak *S*-equol, tak *O*-desmethylangolensin (ODMA) (*Larkin et al.*, 2008; *Mattison et al.*, 2014). Hlavní exkreční cestou těchto metabolitů bývají výkaly a moč, jsou však exkretovány také do mléka. Z tohoto důvodu mohou být mléko a produkty z něj významným zdrojem equolu v lidské stravě (*Kašparovská et al.*, 2017). V mléce se mohou vyskytovat i další isoflavony jako daizdein, genistein, formononetin a biochanin A. Do mléka se tyto látky dostávají po strávení krmiva pro přežvýkavce a dosahují koncentrací až stovek µg na litr mléka (*Bláhová et al.*, 2016).



Obr. 5. Předpokládané metabolické přeměny isoflavonů obsažených v sóji (upraveno dle Heinonen et al., 2003; *Joannou et al.*, 1995; *Larkin et al.*, 2008).

V příjmu isoflavonů potravou je velký rozdíl mezi asijskou a západní populací. V asijských státech zkonzumují kolem 35 g sóji na osobu denně, což odpovídá celkového příjmu 25-100 mg isoflavonů denně (*Ko,* 2014; *Larkin et al.*, 2008). Studie zaměřena na západní populaci prováděná v Kanadě (*Thompson et al.*, 2006) nevyčísluje denní příjem sóji, ale obsah isoflavonů v jednotlivých porcích produktů ze sóji. Tyto porce jsou po recenzích literatury a vztažení na západní populaci stanoveny následovně: 45 g sójových bobů, 30 g tofu, 250 ml mléka, 65 g sójového jogurtu, 17 g sójové omáčky. Koncentrace isoflavonů v sójových bobech a sójových produktech se liší v závislosti na zdroji sójových bobů a podmínkách při výrobě daného produktu. V různých sójových produktech byla zjištěna široká škála koncentrací, většinou od 50 µg/g do 20 000 µg/g (*Song et al.*, 1998; *Thompson et al.*, 2006). Reprezentativní údaje o obsahu isoflavonů v nejčastěji konzumovaných sójových produktech jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Obsah hlavních isoflavonů v často konzumovaných sójových produktech

ISOFLAVON	**Sójové boby** [µg/g]	**Tofu** [µg/g]	**Sójové mléko** [µg/g]	**Reference**
daidzin	474	453	410	(*Song et al.*, 1998)
daidzein	44 424–1138*	116 63–106*	18 9–126*	(*Song et al.*, 1998) (*Nakamura et al.*, 2000; *Thompson et al.*, 2006)
genistin	568	532	710	(*Song et al.*, 1998)
genistein	77 373–894*	140 80–170*	19 19–168*	(*Song et al.*, 1998) (*Nakamura et al.*, 2000; *Thompson et al.*, 2006)
glycitin	70	130	65	(*Song et al.*, 1998)
glycitein	58 28–145*	26 7–29*	10 2–16*	(*Song et al.*, 1998) (*Nakamura et al.*, 2000; *Thompson et al.*, 2006)
formononetin	0,052*	0,009*	0,012*	(*Thompson et al.*, 2006)

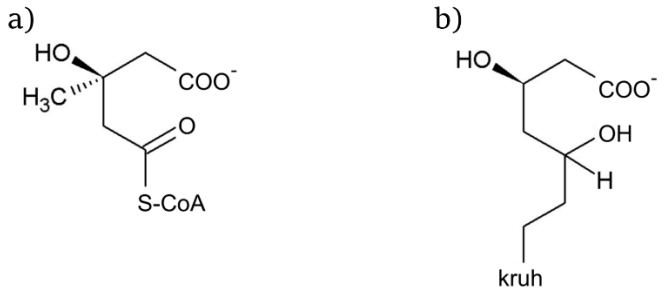
* celková koncentrace aglykonů po hydrolýze

3.4.2. Statiny

Tyto látky jsou v současné době hojně užívanými léčivy reprezentujícími první linii ve farmakoterapie hypercholesterolemie a v prevenci aterosklerózy (*Ho et al.*, 2006). Jedná se o inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, inhibují tedy klíčový krok v biosyntéze sterolů, včetně cholesterolu. Snížení dostupnosti cholesterolu vede ke zvýšené expresi LDL-receptorů v hepatocytech a zvýšenému vychytávání LDL-cholesterolu z krve (*Sirtori*, 2014). V České republice je v současné době

registrováno 6 statinů: simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, fluvastatin, lovastatin a pravastatin, z nichž nejčastěji jsou v klinické praxi užívány první tři zmíněné.

Aktivita statinů vychází z podobnosti s 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymem A (HMG-CoA) a schopnosti inhibovat HMG-CoA reduktázu, která má pro statiny afinitu až 8 000 krát vyšší než pro svůj přirozený substrát HMG-CoA. Z chemické struktury (obr. 6) je zřejmá podobnost části molekuly statinů a HMG-CoA. Tato podobnost je významná pro farmakologickou aktivitu těchto molekul. Vývoj nových struktur vedl k látkám s otevřeným laktonovým kruhem, který byl u prvních statinů uvedených do klinické praxe uzavřený. Tyto látky tak představují proléčiva, neboť pro dosažení farmakologického efektu musí dojít k rozštěpení kruhu, což je typické pro simvastatin a lovastatin (*Sirtori*, 2014).



Obr. 6. Chemická struktura HMG-CoA (a) a farmakoforu statinů (b). Lovastatin a simvastatin mají uzavřený laktonový kruh a jsou proléčivy (upraveno dle Sirtori, 2014).

Statiny jsou podávány výlučně perorálně, a proto ovlivnění jejich absorpce do systémové cirkulace z GIT může ovlivnit jejich terapeutický účinek. Do buněk se mohou dostávat buď přímo interakcí s membránou v případě lipofilních látek (simvastatin, fluvastatin, atorvastatin), nebo pomocí přenašečů v případě hydrofilnějších látek (např. pravastatinu). U rosuvastatinu se předpokládá možná kombinace obou mechanismů. Většina statinů (opět s výjimkou pravastatinu a částečně rosuvastatinu) podléhá first-pass metabolismu v játrech, čímž se snižuje jejich biologická dostupnost (*Sirtori*, 2014).

Kromě hypolipidemického efektu statiny zlepšují endoteliární funkci cévního endotelu, zvyšují odolnost aterosklerotických plátů vůči poškození, přispívají k potlačení zánětlivých procesů (*Sirtori*, 2014). Mezi nežádoucí účinky statinů patří myalgie až rhabdomyolýza, mohou neznámým mechanismem zvyšovat riziko diabetu, při vysokých dávkách mají toxický vliv na ledviny a také u nich byly pozorovány (zejména u lipofilních statinů) neurologické vedlejší účinky – narušení kognitivních funkcí. Studie zabývající se

potenciálně pozitivním vlivem statinů na mentální degenerativní onemocnění ovšem naopak ukazují snížení rizika výskytu Alzheimerovy choroby u jedinců užívajících statiny (*Sirtori*, 2014).

K hypolipidemicky nejúčinnějším a v současnosti nejčastěji používaným statinům patří rosuvastatin. Vyznačuje se výhodnými farmakologickými vlastnostmi včetně delšího eliminačního poločasu a minimálního metabolismu (tab. 6). V porovnání s ostatními statiny je relativně hydrofilní, a proto je předpoklad, že pro jeho přestup přes biologické membrány je důležitý aktivní transport (*Ho et al.*, 2006). Po perorálním podání se rosuvastatin vylučuje převážně stolicí (93 %) v nezměněné formě (77 %), zbývajících necelých 10 % je vyloučeno močí (*Bergman et al.*, 2006).

Tabulka 6. Farmakokinetické vlastnosti statinů (upraveno dle Sirtori, 2014; *poločas – McKenney,* 2003*; log P – Shitara et al.,* 2013*).*

	Absorpce po perorálním podání [%]	**Biologická dostupnost** [%]	**Metabolismus CYP450**	**Poločas** [%]	**log P**	**Vazba na proteiny** [%]
atorvastatin	30	12	**3A4** (2C8)	14	3,85	>98
fluvastatin	98	30	**2C9**	1–2	4,57	>98
lovastatin	30	5	**3A4** (2C87)	neuvedeno		>98
pravastatin	35	18	(3A4)	1–2	2,21	50
rosuvastatin	50	50	(2C9, 2C19)	20	0,89	90
simvastatin	60–85	<5	3A4 (2C8, 2D6)	1–2	4,72	>95

4. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem dizertační práce bylo experimentální studium interakcí přírodních flavonoidních látek nacházejících se v medu a sóji s vybranými lékovými OATP transportéry s využitím buněčných modelů. Tento konečný cíl zahrnoval dosažení několika dílčích cílových etap:

- V první fázi bylo cílem zavést a optimalizovat buněčné *in vitro* modely pro studium OATP2B1 a OATP1A2 transportérů, ověřit funkčnost připravených modelů pomocí vhodných standardních substrátů a potvrdit expresi transportérů metodou Western blotting.
- S využitím těchto buněčných modelů a pomocí inhibičních studií s vybranými obsahovými flavonoidními látkami medu a sóji zjistit, zda tyto látky ovlivňují transport prostřednictvím OATP2B1 a OATP1A2 transportérů, a stanovit kvantitativní parametry inhibice.
- Pokusit se charakterizovat povahu inhibiční interakce prokázaných inhibitorů ze zkoumané skupiny přírodních látek pomocí kinetické analýzy.
- Stanovit s pomocí relevantního lékového substrátu možný vliv zkoumaných flavonoidů na jeho buněčný uptake zprostředkovaný studovanými OATP.
- S využitím cytotoxické studie odhadnout, zda testované flavonoidy mohou být substráty studovaných OATP transportérů.
- Vyhodnotit experimentální výsledky, sepsat je do podoby publikovatelné na odborné úrovni a vypracovat dizertační práci.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Materiál

5.1.1. Použité přístroje a vybavení

Pro buněčnou kultivaci byly použity: kultivační lahve 25 a 75 cm^2 (TPP, Transadingen, Švýcarsko), 24- a 96-jamkové destičky (TPP, Transadingen, Švýcarsko), 24- a 96-jamkové destičky potažené poly-D-lysinem (Corning Incorporated, Kennebunk, ME, USA), jednorázové plastové pipety 2, 5, 10 a 25 ml (TPP, Transadingen, Švýcarsko), pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Varšava, Polsko), falkonky 15 a 25 ml (TPP, Transadingen, Švýcarsko) a Pasteurovy pipety skleněné (Brand GMBH, Wertheim, Německo). Buněčné linie byly pasážovány a sazeny v laminárním boxu (Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1.8, Bioair instruments, Miláno, Itálie) a následně inkubovány v inkubátoru s CO_2 atmosférou (ShelLab, Cornelius, USA). K nahřívání roztoků sloužila vodní lázeň Julabo TW 12 (Seelbych, Německo). Stav a konfluence buněk byl pozorován pomocí inverzního mikroskopu OPTIKA Microscopes, XDS – 1R (OPTICA Microscopes, Ponteranica, Itálie).

Při experimentech byly používány automatické pipety Eppendorf 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl (Hamburg, Německo), Discovery autoclavable 0,1-2 µl a multikanálová pipeta 50-300 µl (HTL, Varšava, Polsko) se špičkami Eppendorf 2-200 µl; 50-1000 µl a Brand GMBH 0,1-20 µl; dále mikrozkumavky Eppendorf 0,5; 1,5; 2 a 5 ml (Hamburg, Německo), centrifuga BOECO U – 32R (Hamburg, Německo), vyhřívané magnetické míchadlo IKA RCT basic safety control (Staufen, Německo), analytické váhy BOECO (Hamburg, Německo), předvážky Kern PLB 200-3 (Balinger, Německo), pH metr CyberScan (Eutech Instruments, Singapur) a třepací inkubátor (Major Science, Saratoga, CA, USA).

Měření aktivity β-zářičů probíhalo pomocí beta-spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) ve scintilačních lahvičkách (vnější šroubovací 4 ml; Kartell, Noviglio, Itálie). Odečty absorbancí a fluorescence na kultivačních destičkách byly prováděny pomocí destičkového analyzátoru (TECAN, Infinite M200, Männedor, Švýcarsko). Pro Western blotting byl použit Mini-PROTEAN Tetra system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Strukturní vzorce byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs, Toronto, Kanada).

5.1.2. Studované látky a použité chemikálie

Zkoumané flavonoidy fisetin (čistota ≥98%), galangin (95%), chrysin (≥97%), myricetin (≥96%), pinobanksin (≥95%), pinocembrin (95%) a quercetin (≥95%) a isoflavony daidzein (≥98%) a genistein (≥98%) byly zakoupeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); isoflavony biochanin A (≥99%), daidzin (≥99%), genistin (≥99%), glycitein (≥95%) a glycitin (≥95%) byly zakoupeny z Extrasynthese (Lyon, Francie); isoflavon formononetin (≥99%) z Phytolab (Vestenbergsgreuth, Německo); *S*-equol (97%) byl získán z Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada); *O*-desmethylangolensin (ODMA) byl syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové Mgr. Pavlem Horkým pod vedením prof. Milana Poura. Pro experimenty byly látky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Jako substráty pro OATP transportéry byly použity [^{3}H]estron 3-sulfát ([6,7-^{3}H(N)], specifická aktivita 50 Ci/mmol) (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA) a [^{3}H]rosuvastatin ([5-^{3}H], specifická aktivita 20 Ci/mmol) (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA), které byly pro dosažení žádané koncentrace smíchány se svými neradioaktivními solemi sodnou solí estron 3-sulfátu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respektive vápenatou solí rosuvastatinu (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA).

Buněčné linie byly kultivovány v médiích DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) a MEM (minimum essential medium Eagle) obohacených fetálním bovinním sérem, L-glutaminem či neesenciálními aminokyselinami (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pro kultivaci byl dále používán 0,25% roztok trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a připravovaný a sterilizovaný fosfátový pufr PBS, na jehož přípravu byly chemikálie (NaCl, KCl, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ a $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), stejně jako na přípravu transportního pufru (NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, glukóza a HEPES) a STOP roztoku (NaCl, HEPES) a NaOH na úpravy pH a přípravu lyzačního roztoku, získány od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika). Triton X na přípravu lyzačního roztoku byl získán z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Expresní plazmid pro lidský OATP2B1 (SLCO2B1), transkripční varianta 1, expresní plazmid pro lidský OATP1A2 (SLCO1A2), transkripční varianta 1 a prázdný vektor pCMV6-Entry byly získány z OriGene Technologies (Rockville, MD, USA) a amplifikovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Buňky jimi byly transfekovány pomocí

transfekčního roztoku Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a média Opti-MEM (Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Pro detekci plazmidů při Western blottingu byly použity antiOATP-B a antiOATP-A protilátky (Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, TX, USA), antiGAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) protilátka (ThermoScientific, Rockford, IL, USA) a sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (goat-anti rabbit IgG-HRP; Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, TX, USA).

Měření aktivity β-zářičů probíhalo v scintilačním roztoku Ultima Gold (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Kit pro stanovení cytotoxicit CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay byl zakoupen z firmy Promega (Madison, WI, USA).

5.2. Buněčné linie

K experimentům byly použity adherentní buněčné linie: Madin-Darbyho psí ledvinné buňky II (Madin-Darby canine kidney II cell line, MDCKII) a lidské embryonální ledvinné buňky 293 (human embryonic kidney 293 cell line, HEK293). Tyto buněčné linie byly získány z European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). Buněčné linie byly pasážovány každé 3 až 4 dny a kultivovány v inkubátoru se zvlhčenou atmosférou obsahující 5 % CO_2 při 37 °C.

MDCKII buňky byly kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's médiu (DMEM) s 10 % fetálního bovinního séra. Při pasážování bylo nejprve odstraněno stávající buněčné médium, buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrem (PBS) o pH 7,4 obsahujícím 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ a 10 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ a následně byl přidán 0,25% roztok trypsin/EDTA. Po rozvolnění buněk bylo přidáno čerstvé médium a buňky byly rozsuspendovány. Část takto připravené buněčné suspenze byla použita k experimentům a část byla přenesena do nové kultivační lahve s čerstvým médiem a dále kultivována.

HEK293 buňky byly kultivovány v minimum essential medium Eagle (MEM) obohaceném o 10 % fetálního bovinního séra, 2 mM L-glutamin a 1 % neesenciálních aminokyselin. HEK293 buněčná linie byla pasážována bez oplachu PBS a bez trypsinizace, pouze bylo odsáto stávající buněčné médium a buňky byly spláchnuty a rozsuspendovány v médiu novém. Část této buněčné suspenze byla opět použita k experimentům a část byla přenesena do nové kultivační lahve pro další kultivaci.

Do kultivačních médií nebyla přidávána žádná antibiotika.

5.3. Použité metody

5.3.1. Transfekce

Pro přechodné transfekce příslušnými plazmidy byly vybrány buněčné linie, které mají dle literárních údajů velmi nízkou vlastní transportérovou expresi. Toto bylo potvrzeno rovněž velmi nízkou akumulací standardního substrátu transportéru v parentních buňkách. Při optimalizaci buněčného modelu byly krom několika buněčných linií použity také různé poměry DNA a Lipofectaminu v rozmezích dle doporučení výrobce. Tyto přechodně transfekované linie byly funkčně testovány a byla vybrána ta, u které byl pozorován nejvyšší nárůst akumulace standardního substrátu daného transportéru vůči kontrole – parentním buňkám transfekovaným prázdným vektorem. Pro přechodnou transfekci plazmidem hOATP2B1 byla zvolena buněčná linie MDCKII, pro transfekci plazmidem hOATP1A2 pak buněčná linie HEK293.

Buňky byly sazeny na 24-jamkovou destičku (MDCKII v počtu 1×10^5 buněk na jamku, HEK293 $2{,}5 \times 10^5$ buněk na jamku), destičky pro sazení buněk HEK293 byly komerčně potaženy poly-D-lysinem, a následující den přechodně transfekovány příslušným plazmidem kódujícím studovaný transportér nebo prázdným vektorem pCMV6-Entry s použitím transfekčního roztoku Lipofectamine 2000 a média Opti-MEM dle protokolu výrobce. Po sérii optimalizačních experimentů byly pro transportér OATP2B1 zvoleny tyto podmínky: 0,5 µg DNA/jamka, poměr DNA : Lipofectamine 1:2 a experimenty 24 hodin po transfekci; pro transportér OATP1A2: opakovaná transfekce po 24 hodinách, 0,8 µg DNA/jamka, poměr DNA : Lipofectamine 1:2,5 a experimenty 48 hodin po první (resp. 24 hodin po druhé) transfekci. Kontrolní buňky pro každou buněčnou linii byly transfekovány prázdným vektorem za stejných podmínek.

V případě testování cytotoxicit (viz kapitola 5.3.6.) byly buňky sazeny na 96-jamkovou destičku, HEK293 buňky opět na komerčně potaženou a všechny objemy byly zmenšeny v poměru 1:5.

Zvýšená exprese studovaných transportérů v buňkách byla ověřena metodou Western blotting (viz kapitola 5.3.2.) a správná funkčnost buněčného modelu byla ověřována

akumulační studií s radioaktivně značeným standardním substrátem daného transportéru (viz kapitola 5.3.3.) při každém experimentu.

5.3.2. Western blotting

Součástí přípravy buněčných modelů bylo ověření zvýšené exprese studovaných transportérů v přechodně transfekovaných buňkách, jako kontrola sloužily parentní buňky transfekované prázdným vektorem.

Pro přípravu vzorků proteinů membránových frakcí byly přechodně transfekované buňky MDCKII 24 hodin a HEK293 48 hodin po transfekci na 24-jamkové destičce opláchnuty PBS pufrem a lyzovány směsí RIPA pufru (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se směsí inhibitorů proteáz (4-(2-aminoethyl)benzensulfonyl fluorid 104 mM, aprotinin 80 µM, bestatin 4 mM, E-64 1,4 mM, leupeptin 2 mM a pepstatin A 1,5 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tento lyzát byl dále homogenizován resuspendací jehlou inzulínové stříkačky a v ultrazvukové lázni a centrifugován při 4 °C 10 min při 9 500 g. V proteinovém extraktu v supernatantu buněčného lyzátu bylo stanoveno množství proteinu metodou BCA.

SDS-PAGE elektroforéza probíhala na 1,0mm Tris-glycinových gelech (7,5% separační gel a 5% zaostřovací gel). Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem (125 mM Tris-HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-merkaptoetanol, 0,01% (w/v) bromfenolová modř) v poměru 1:1 a naneseny na gel v množství 10 µg proteinu/jamka. Proteiny byly rozděleny při 15 mA/gel a 200 V po dobu 75 min. Následně byly tyto rozdělené proteiny přeneseny tankovou metodou z gelu na PVDF membránu (ThermoScientific, Rockford, IL, USA) působením konstantního proudu 300 mA při 100 V po dobu 90 min. Membrána s přenesenými proteiny byla blokována v roztoku TBS-T pufru (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,5) s 5 % (w/v) sušeného nízkotučného mléka 90 minut. Blokovací pufr byl poté odstraněn a membrána byla inkubována s roztokem primární protilátky (antiOATP-A – ředění 1:400, antiOATP-B – ředění 1:800, antiGAPDH – ředění 1:2 000) rozpuštěným v blokovacím pufru 16 hodin při teplotě 4–8 °C. Po inkubaci byla membrána promyta TBS-T pufrem a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (goat-anti rabbit Ig-G-HRP – ředění 1:5 000) rozpuštěnou v blokovacím pufru po dobu 90 minut při 25 °C. Po inkubaci byla membrána opět promyta TBS-T pufrem.

K následné chemiluminiscenční detekci byl použit roztok SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vyvíjení probíhalo v temné komoře, obrazy byly zachyceny na X-ray film (CP-BU New medical x-ray film blue; Agfa Healthcare, Mortsel, Belgie) s pomocí vývojky a ustalovače (FOMA Bohemia, Hradec Králové, Česká republika). Vzniklé proužky (bandy) byly skenovány na kameře ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

5.3.3. Akumulační buněčné studie

Pro ověření správné funkčnosti buněčného modelu a při optimalizačních transfekčních studiích byla testována akumulace standardního substrátu transportérů OATP2B1 a OATP1A2 radioaktivně značeného [^{3}H]estron 3-sulfátu ([^{3}H]E3S). Experimenty byly prováděny v triplikátech na 24-jamkových destičkách s přechodně transfekovanými buňkami (při ověřování správné funkčnosti modelu při stanovení cytotoxicit na 96-jamkových destičkách byly všechny objemy zmenšeny v poměru 1:5). Buňky byly opláchnuty transportním médiem o pH 7,4 obsahujícím 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5mM glukózy a 10 mM HEPES a následně byly s tímto médiem 10 min preinkubovány při 37 °C. Po preinkubaci a odstranění transportního média byl k buňkám přidán 1μM roztok radioaktivního substrátu [^{3}H]E3S vzniklý smícháním transportního média, 20 nM radioaktivního E3S a 10 mM neznačeného E3S rozpuštěného v DMSO o výsledné aktivitě 1 μCi/ml a byl inkubován s MDCKII buňkami nesoucími OATP2B1 transportér/prázdný vektor po dobu 2 minut, s HEK293 buňkami transfekovanými plazmidem kódující OATP1A2 transportér/prázdný vektor 5 minut, vždy při 37 °C. Po uplynutí inkubačního intervalu byl radioaktivní substrát odstraněn a buňky byly třikrát opláchnuty ledově vychlazeným STOP roztokem (137 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4). Následně byly buňky zlyzovány lyzačním roztokem 0,5% Triton X v 100 mM NaOH po dobu 20 min při 37 °C. Z každé jamky byl odebrán vzorek pro stanovení proteinu (viz kapitola 5.3.5.) a zbylý obsah byl kvantitativně přenesen do scintilační lahvičky s 1 ml scintilačního roztoku. Radioaktivita byla změřena na beta-spektrometru v jednotkách DPM (dezintegrace za minutu) a výsledky byly vyjádřeny jako pmol akumulovaného substrátu na mg buněčného proteinu. Efektivita transfekce byla potvrzena díky několikanásobnému zvýšení akumulace standardního radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných transportérem ve srovnání s buňkami transfekovanými prázdným vektorem.

5.3.4. Inhibiční buněčné studie

Studie interakcí flavonoidů fisetinu, galanginu, chrysinu, myricetinu, pinobanksinu, pinocembrinu, quercetinu a isoflavonů biochaninu A, daidzinu, daidzeinu, formononetinu, genistinu, genisteinu, glycitinu, glyciteinu a jejich metabolitů *S*-equolu a ODMA s transportéry OATP2B1 a OATP1A2 byly prováděny ve dvou fázích. V prvotní fázi byly buňky inkubovány s jednou relativně vysokou koncentrací těchto přírodních látek pro zjištění, zda tyto látky vykazují inhibiční potenciál vůči danému transportéru. V druhé fázi následovaly u zjištěných potenciálních inhibitorů inkubace při jejich zvyšujících se koncentracích pro určení kvantitativních parametrů inhibičního efektu. Dvě nejběžnější hodnoty pro kvantifikaci inhibičního efektu jsou IC_{50} a K_i. U flavonoidů byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro oba transportéry, a to jak pro interakce se standardním substrátem E3S, tak pro interakce s léčivem rosuvastatinem. U isoflavonů a jejich metabolitů byly stanoveny hodnoty K_i pro interakci s transportérem OATP2B1 s využitím standardního substrátu E3S.

Design inhibičních studií byl podobný studiím akumulačním. Experimenty byly rovněž prováděny na 24-jamkových destičkách v triplikátech s buňkami transfekovanými prázdným vektorem sloužícími jako kontrola. Buňky byly opláchnuty transportním médiem a následně s tímto médiem 10 min preinkubovány při 37 °C. Po jeho odstranění byl přidán roztok radioaktivního substrátu [^{3}H]E3S (1μM), nebo [^{3}H]rosuvastatinu (0,5μM) obsahující buď jednu 500 μM, respektive 100 μM koncentraci flavonoidů, isoflavonů či jejich metabolitů, nebo zvyšující se koncentrace testovaného flavonoidu, respektive isoflavonu/metabolitu v rozmezí 0–1000 μM. Roztok radioaktivního rosuvastatinu pro inkubace byl připraven podobně jako roztok [^{3}H]E3S smícháním transportního média s 50 nM radioaktivně značeným rosuvastatinem a 10 mM neznačeným rosuvastatinem rozpuštěným v DMSO o výsledné aktivitě 1 μCi/ml. Zásobní roztoky flavonoidů/isoflavonů byly rozpuštěny v DMSO, finální koncentrace DMSO v inkubačním roztoku byla 1 % pro roztoky s flavonoidy a 0,5 % pro isoflavony. Směs substrátů s přírodními látkami byla inkubována s MDCKII buňkami s OATP2B1 transportérem/prázdným vektorem 2 min při 37 °C a s HEK293 buňkami s OATP1A2 transportérem/prázdným vektorem 5 min při 37 °C. Poté byla inkubační směs odstraněna, buňky byly třikrát opláchnuty ledově vychlazeným STOP roztokem. Lyzace buněk, zpracování vzorků, měření a výpočet akumulovaného množství substrátu byly stejné jako u akumulačních studií (kapitola 5.3.3.).

Pro grafické vyjádření byla hodnota akumulace v kontrolních buňkách transfekovaných prázdným vektorem odečtena od hodnoty akumulace buněk exprimujících studovaný transportér. Při inhibičních studiích byla akumulace radioaktivního substrátu snižována postupně se zvyšujícími koncentracemi testovaných přírodních látek, čímž byla vyjádřena afinita testované látky k příslušnému transportéru. U flavonoidů byla vyjádřena jako inhibiční koncentrace IC_{50}, tj. koncentrace potřebné ke snížení akumulace substrátu na 50 %, pro isoflavony a jejich metabolity jako inhibiční konstanta K_i.

Experimenty byly prováděny minimálně ve dvou nezávislých opakováních.

5.3.5. Stanovení buněčného proteinu

Pro standardizaci výsledků akumulačních a inhibičních studií bylo provedeno stanovení množství proteinu buněk komerční metodou BCA Protein Assay pomocí Pierce™ BCA Protein Assay kitu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tato metoda je založena na redukci Cu^{2+} iontů na Cu^{1+} ionty proteiny v alkalickém prostředí. Následně kyselina bicinchoninová (BCA) reaguje s redukovanými Cu^{1+} ionty za tvorby ve vodě rozpustného fialového komplexu, který je kolorimetricky detekován.

20µl vzorek zlyzovaných buněk odebraný z každé jamky při transportních studiích byl pipetován do 96-jamkové destičky, bylo připipetováno 200 µl BCA činidla připraveného dle pokynů výrobce a celá destička byla inkubována 30 min při 37 °C. Absorbance vzniklých barevných komplexů ve vzorcích byla změřena při 562 nm na destičkovém analyzátoru TECAN. Jako standard pro kalibrační křivku byl použit bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v koncentračním rozmezí 0–2000 µg/ml ředěný v lyzačním roztoku. Pomocí této kalibrační křivky byla stanovena koncentrace vzorků a následně vypočteno množství proteinu v každé jednotlivé jamce.

5.3.6. Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxického působení flavonoidů byly buňky sazeny na 96-jamkovou destičku (MDCKII v počtu $1{,}7 \times 10^4$ buněk na jamku, HEK293 5×10^4 buněk na jamku), destičky pro sazení buněk HEK293 byly komerčně potaženy poly-D-lysinem. Následující den byly přechodně transfekovány příslušným plazmidem kódujícím studovaný transportér nebo prázdným vektorem pCMV6-Entry s použitím transfekčního roztoku Lipofectamine 2000 a média Opti-MEM. Stanovení cytotoxicit u MDCKII transfekovaných buněk bylo provedeno 24 hod po transfekci, HEK293 buňky byly transfekovány opakovaně 2 dny za sebou a stanovení cytotoxicit bylo provedeno 24 hod po druhé

transfekci. Stanovení bylo provedeno vždy v triplikátech. Zároveň byla vždy ověřena účinnost transfekce buněčných modelů akumulační studií.

CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay

Cytotoxické působení flavonoidů bylo zkoumáno kolorimetrickou metodou, při které je sledována proliferace a metabolický stav živých buněk. Přidané činidlo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS) je živými buňkami redukováno na barevný rozpustný formazan, jehož množství je následně kolorimetricky stanoveno.

K transfekovaným buňkám byly přidány zkoumané flavonoidy quercetin, fisetin, galangin, chrysin, myricetin, pinobanksin a pinocembrin v koncentracích 0–1500 µM rozpuštěné v DMSO (maximální koncentrace DMSO ve vzorcích byla 1 %). Současně byly připraveny kontroly 100% viability (buňky s přidaným 1 % DMSO), 0% viability (buňky, ke kterým bylo přidáno 10 % DMSO) a buňky jen s buněčným médiem. Zároveň byla napipetována kontrola pozadí bez buněk. Po 8 hod inkubaci v inkubátoru se zvlhčenou atmosférou obsahující 5 % CO_2 při 37 °C bylo přidáno 20 µl činidla CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent na jamku a destička byla dále inkubována 1,5 hod za stejných podmínek. Následně byla změřena absorbance vzorků při 490 nm na destičkovém analyzátoru TECAN.

Od naměřených hodnot v testovaných jamkách (buňky s kultivačním médiem + zkoumané flavonoidy) byly odečteny kontroly pozadí bez buněk (kultivační médium + zkoumané flavonoidy) a vyjádřena životnost v % viability v závislosti na koncentraci flavonoidu pro transfekované i kontrolní buňky, kde 100 % představovala hodnota změřená u buněk s přidaným 1 % DMSO. Dále byly stanoveny hodnoty standardního toxikologického parametru IC_{50}, koncentrace vedoucí ke snížení viability buněčné populace na 50 %.

5.4. Data a statistická analýza

Inhibiční parametr IC_{50} byl stanoven pomocí nelineární regresní analýzy sigmoidní křivky závislosti dávky a odpovědi v programu GraphPad Prism (verze 6 a 7). Inhibiční parametr K_i byl vypočítán z Dixonova zobrazení (převrácená hodnota uptake proti koncentraci inhibitoru) pomocí GraphPad Prism (verze 6 a 7). Typ inhibice byl u flavonoidů určen

pomocí Lineweaver-Burkova grafu, u isoflavonů ze závislosti s/v na koncentraci inhibitoru.

Toxikologický parametr IC_{50} byl vypočítán nelineární regresní analýzou z inhibiční křivky pomocí programu GraphPad Prism (verze 6 a 7).

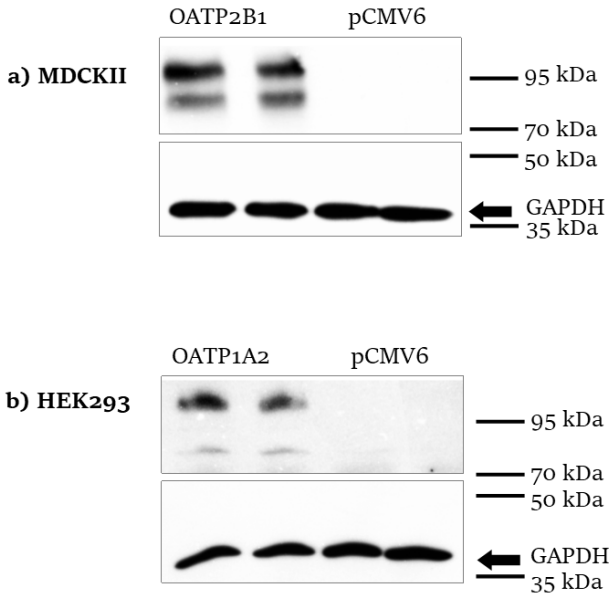
Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot byla hodnocena pomocí nepárového t-testu a one-way ANOVA testu s následným Dunnettovým srovnávacím testem či Tukeyho testem. * značí statistickou významnost $p<0,05$, ** $p<0,01$ a *** $p<0,001$.

6. VÝSLEDKY

6.1. Validace buněčných modelů

6.1.1. Ověření exprese transportérů v buněčných modelech

Byly vytvořeny buněčné modely, které vykazují výrazně zvýšenou expresi studovaných OATP transportérů po přechodné transfekci příslušným plazmidem. Tato nadměrná exprese byla potvrzena metodou Western blotting, kde jako negativní kontrola sloužily buňky transfekované prázdným vektorem (pCMV6). Horní proužek představuje vždy glykosylovanou formu proteinu daného transportéru, tento jev byl popsán i v dřívějších studiích (*Lee et al.*, 2005).



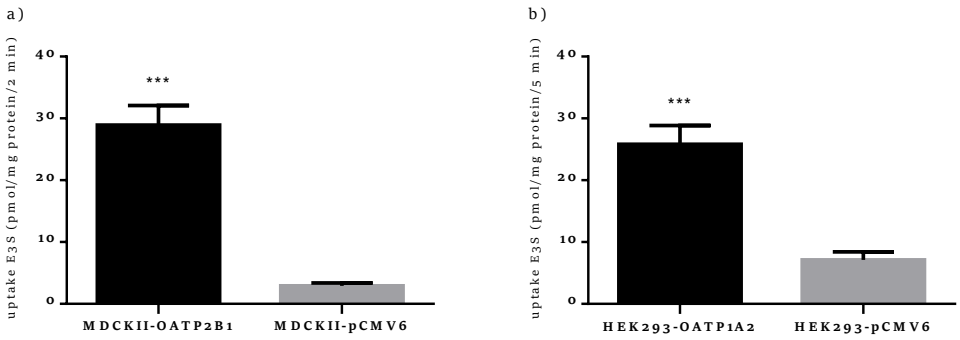
Obr. 7. Demonstrace zvýšené exprese OATP2B1 a OATP1A2 transportérů v transfekovaných buňkách za použití metody Western blotting. GAPDH sloužila jako pozitivní kontrola, neboť je přítomná ve všech buňkách. Imunoblot pro OATP2B1 vidíme na obrázku a), kde byl detekován signál v MDCKII-OATP2B1 buňkách zhruba na úrovni 85 kDa (předpokládaná molekulová hmotnost OATP2B1 byla 85 kDa), nikoliv však v buňkách MDCKII-pCMV6. Imunoblot pro transportér OATP1A2 je na obrázku b), kde byl detekován signál zhruba na úrovni 80 kDa (předpokládaná molekulová hmotnost OATP1A2 byla 80 kDa) v HEK293-OATP1A2 buňkách, nikoliv však v buňkách HEK293-pCMV6.

6.1.2. Ověření funkčnosti transportérů buněčných modelů

Účinnost transfekce byla ověřována v každé sadě experimentů funkčním testem založeným na porovnání akumulace standardního substrátu transportéru v buňkách transfekovaných plazmidem kódující daný transportér s buňkami transfekovanými prázdným vektorem.

Nejvhodnější linií pro transfekci transportérem OATP2B1 se v optimalizačních studiích ukázala linie MDCKII buněk, u které došlo 24 hod po transfekci k 10násobnímu zvýšení akumulace standardního substrátu E3S ve srovnání s MDCKII buňkami transfekovanými prázdným vektorem (obr. 8a).

V optimalizačních studiích přechodné transfekce transportérem OATP1A2 se nepodařilo tímto transportérem linii MDCKII transfekovat, a to ani za použití jiných transfekčních činidel. Po řadě neúspěšných transfekcí různých buněčných linií byl první úspěch zaznamenán až při transfekci buněčné linie HEK293. Při transfekci a akumulační studii následující 48 hod po této transfekci bylo pozorováno dvojnásobné zvýšení akumulace standardního substrátu E3S, opakovanou transfekcí se podařilo rozdíl akumulace navýšit čtyřnásobně (obr. 8b). Proto byl pro další experimenty používán model HEK293 s opakovanou transfekcí plazmidem nesoucí OATP1A2 transportér, stejný postup byl uplatněn pro transfekci prázdným vektorem.



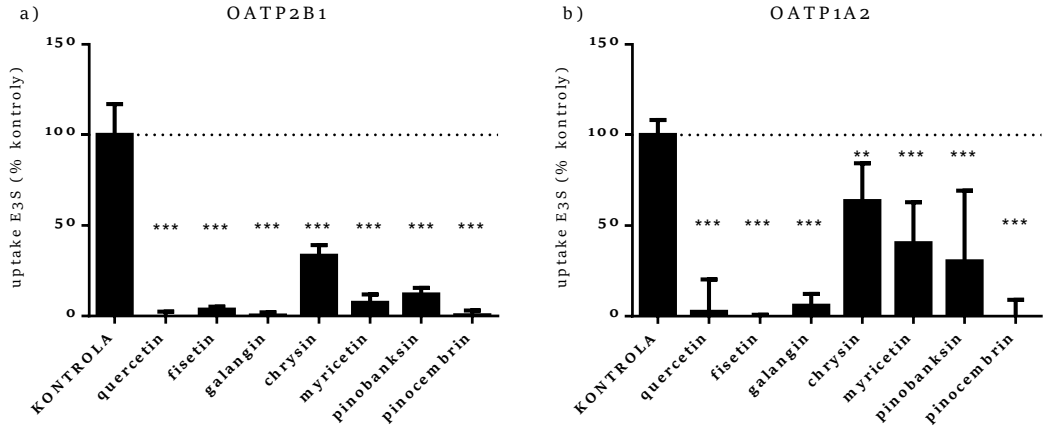
*Obr. 8. Reprezentativní příklad uptake E3S (1 μM) v buňkách MDCKII-OATP2B1 a v MDCKII buňkách transfekovaných prázdným vektorem po 2min inkubaci při 37 °C (a) a v buňkách HEK293-OATP1A2 a HEK293 transfekovaných prázdným vektorem po 5min inkubaci při 37 °C (b). Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=8-9). ***p<0,001*

6.2. Interakce flavonoidů s OATP transportéry

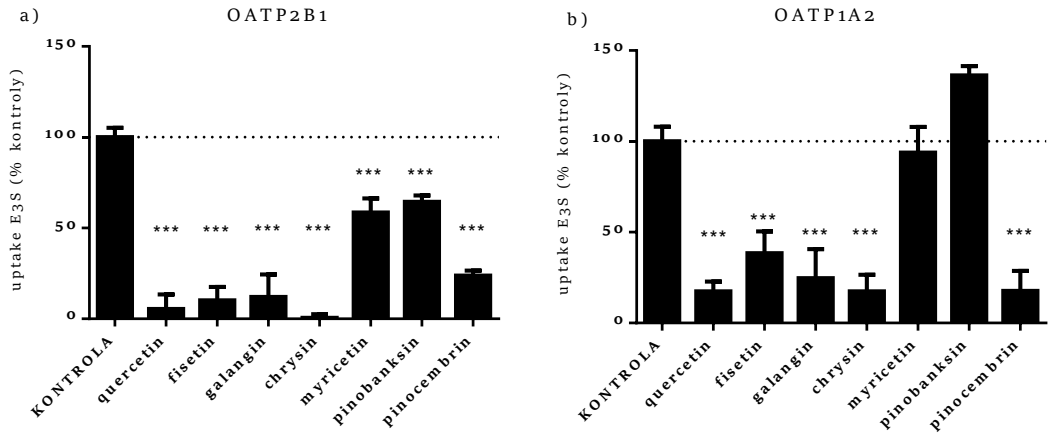
6.2.1. Inhibice transportní funkce OATP transportérů flavonoidy

Inhibiční potenciál vybraných flavonoidů vůči transportní funkci OATP2B1 a OATP1A2 byl ověřen snížením množství akumulovaného standardního substrátu E3S v transfekovaných buňkách v přítomnosti zkoumaných flavonoidů. Tento prvotní test byl nejprve proveden při záměrně vysoké inkubační koncentraci 500 µM. Při této koncentraci prokázaly všechny testované flavonoidy schopnost inhibovat jak OATP2B1, tak OATP1A2 transportér (obr. 9), ale u chrysinu jsme narazili na problém snížené rozpustnosti, který vedl k jeho vysrážení po přidání k buňkám. Abychom předešli zkreslení výsledků v porovnání schopnosti inhibice jednotlivých flavonoidů vůči transportérům, byla jejich inhibiční aktivita hodnocena i při nižší 100µM koncentraci (obr. 10). Toto srovnání již velmi dobře koreluje i se stanovenými kvantitativními parametry inhibicí.

Všechny zkoumané flavonoidy vykázaly určitou schopnost inhibovat a byly proto podrobeny bližšímu stanovení inhibičních parametrů vůči testovaným OATP transportérům



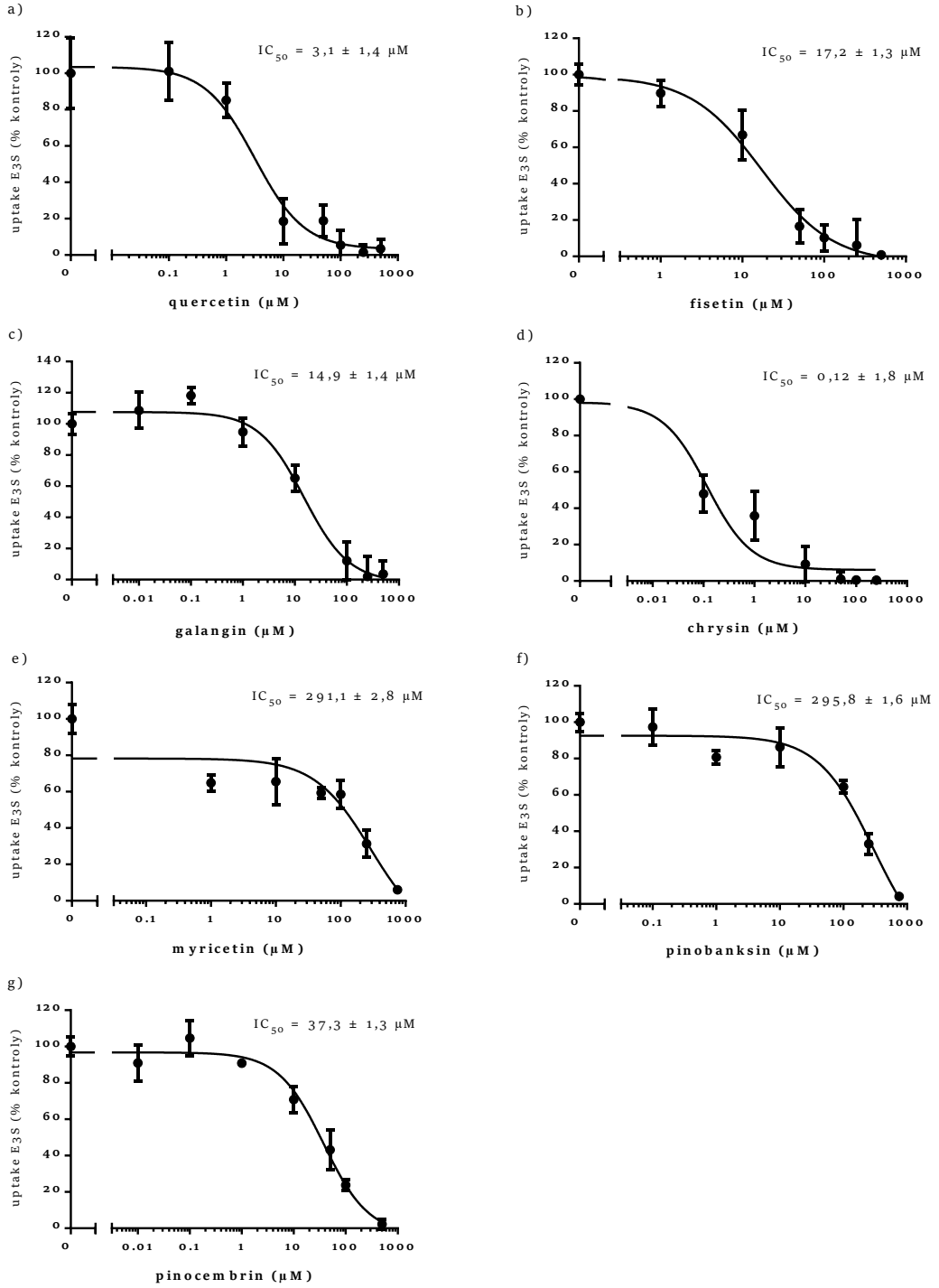
*Obr. 9. Srovnání inhibičního potenciálu jednotlivých flavonoidů (500 µM) na uptake E3S (1 µM) zprostředkovaný transportérem OATP2B1 (a) a OATP1A2 (b). Uptake E3S byl měřen za nepřítomnosti (kontrola) a v přítomnosti quercetinu, fisetinu, galanginu, chrysinu, myricetinu, pinobanksinu a pinocembrinu pro OATP2B1 po 2min akumulaci při 37 °C, pro OATP1A2 po 5min akumulaci při 37 °C. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD (n=5-6). ***p<0,001, **p<0,01*



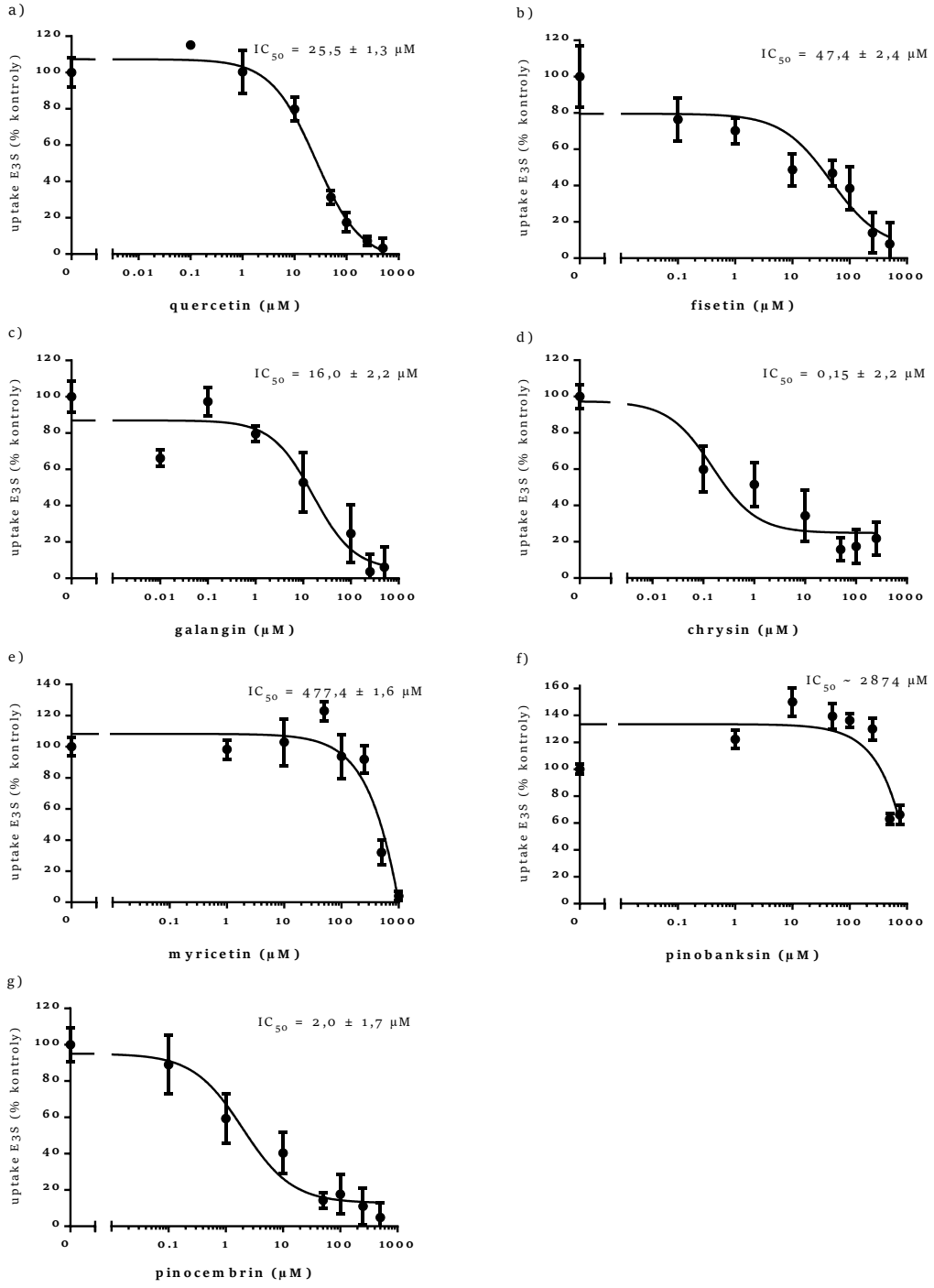
*Obr. 10. Srovnání inhibičního potenciálu jednotlivých flavonoidů (100 μM) na uptake E3S (1 μM) zprostředkovaný transportérem OATP2B1 (a) a OATP1A2 (b). Uptake E3S byl měřen za nepřítomnosti (kontrola) a v přítomnosti zkoumaných flavonoidů pro OATP2B1 po 2min akumulaci při 37 °C, pro OATP1A2 po 5min akumulaci při 37 °C. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD (n=5-6). ***p<0,001*

6.2.2. Kvantitativní parametry inhibice OATP flavonoidy

Pro stanovení kvantitativních parametrů inhibice byly provedeny inhibiční studie, ve kterých byly sledovány změny buněčného uptake E3S jednotlivými transportéry v závislosti na koncentraci flavonoidů. Jako kvantitativní parametr inhibičního účinku byly u flavonoidů stanoveny hodnoty IC_{50}. Nejsilnějším inhibitorem OATP2B1 se ukázal být chrysin, následovaný quercetinem, galanginem a fisetinem s hodnotami IC_{50} do 20 μM (obr. 11). Vliv flavonoidů na uptake E3S pomocí OATP1A2 byl velmi podobný. Chrysin byl opět nejsilnějším inhibitorem, následovaný pinocembrinem a galanginem (obr. 12). Nejslabší inhibiční potenciál vůči oběma transportérům byl pozorován u myricetinu a pinobanksinu.

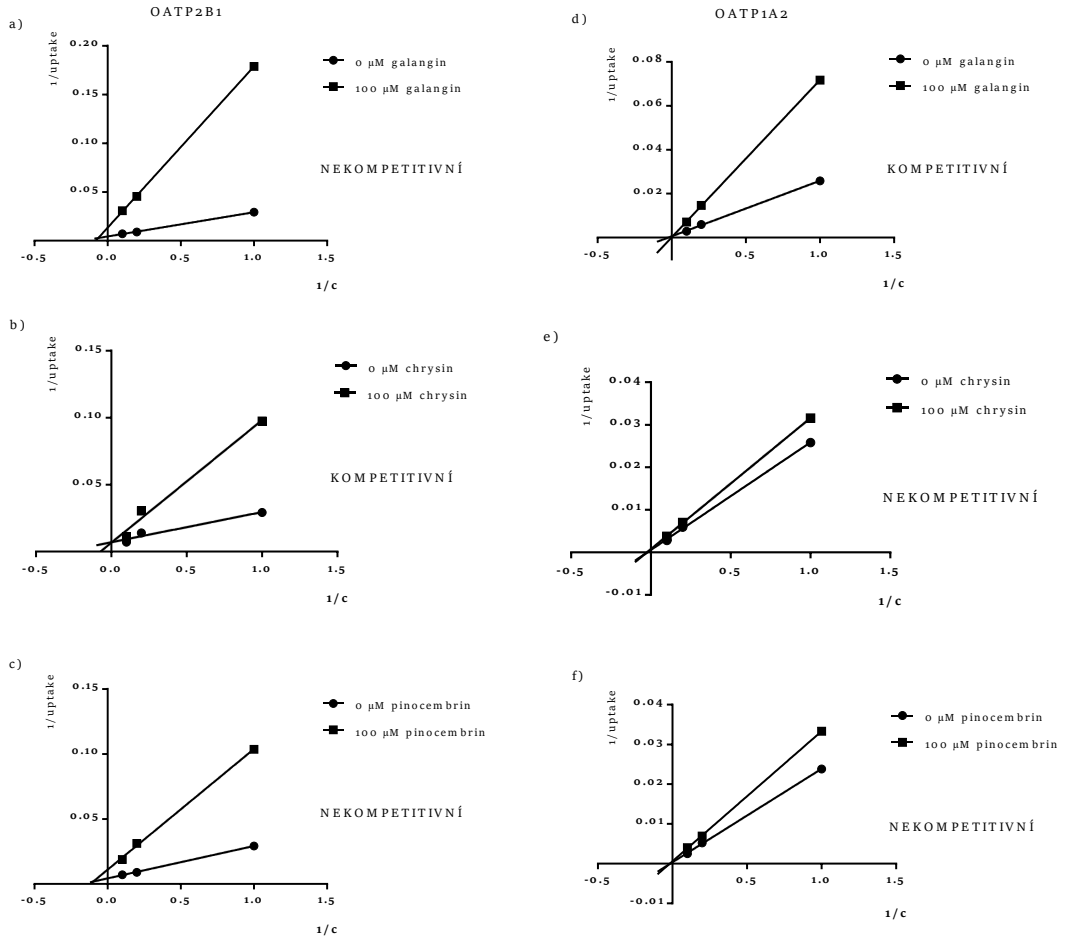


Obr. 11. Vliv flavonoidů na akumulaci E3S zprostředkovanou OATP2B1. Akumulace E3S (1 µM) v MDCKII buňkách přechodně transfekovaných OATP2B1 byla inhibována quercetinem (a), fisetinem (b), galanginem (c), chrysinem (d), myricetinem (e), pinobanksinem (f), pinocembrinem (g) po dobu 2 min při 37 °C. Použité rozmezí koncentrací flavonoidů bylo 0–1000 µM. Data jsou vyjádřená jako procenta kontroly (akumulace E3S bez přítomnosti flavonoidů). Každý bod představuje průměr ± SD (n=5-6).



Obr. 12. Vliv flavonoidů na akumulaci E3S zprostředkovanou OATP1A2. Akumulace E3S (1 µM) v HEK293 buňkách přechodně transfekovaných OATP1A2 byla inhibována quercetinem (a), fisetinem (b), galanginem (c), chrysinem (d), myricetinem (e), pinobanksinem (f), pinocembrinem (g) po dobu 5 min při 37 °C. Použité rozmezí koncentrací flavonoidů bylo 0–1000 µM. Data jsou vyjádřená jako procenta kontroly (akumulace E3S bez přítomnosti flavonoidů). Každý bod představuje průměr ± SD (n=5-6).

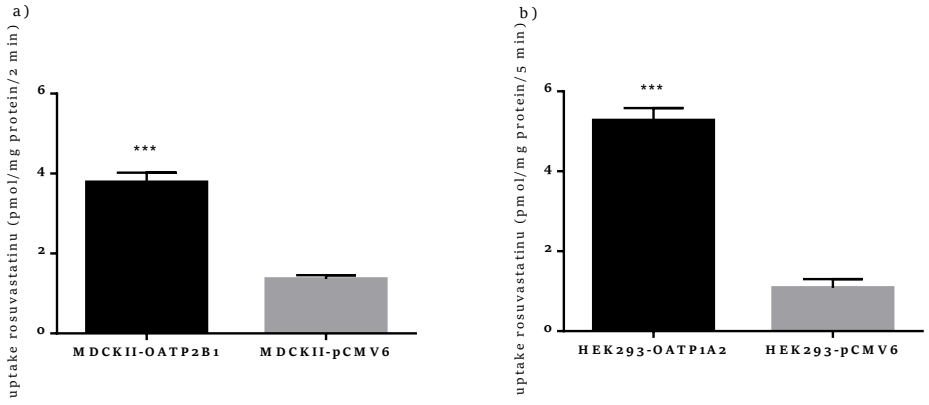
U tří nejsilnějších inhibitorů chrysinu, galanginu a pinocembrinu jsme zjišťovali také typ inhibice. Experimenty prokázaly různý charakter inhibice u jednotlivých flavonoidů, který se lišil mezi nimi navzájem, ale i ve vztahu k OATP transportérům. Z grafů je patrné, že jasnější určení typu bylo pro OATP2B1 transportér (obr. 13 a-c). Zatímco galangin se zdá, že inhibuje OATP2B1 nekompetitivně, inhibice OATP1A2 tímto flavonoidem je pravděpodobně kompetitivní. Přesně opačné výsledky byly zjištěny u chrysinu, jenž inhiboval OATP2B1 kompetitivně, avšak OATP1A2 nekompetitivně. Pinocembrin pak inhiboval oba transportéry nekompetitivně.



Obr. 13. Lineweaver-Burkův graf pro stanovení typu inhibice. Na ose x je vynesena převrácená hodnota koncentrace substrátu E3S a na ose y pak převrácená hodnota uptake tohoto substrátu stanovená v nepřítomnosti a za inkubace se zkoumaným flavonoidem v koncentraci 100 µM. Levý sloupec je pro transportér OATP2B1 (a-c), pravý pro OATP1A2 (d-f). Inkubace byla prováděna s různými koncentracemi E3S (0,1–10 µM), u OATP2B1 2 min, u OATP1A2 5 min při 37 °C. Každý bod představuje průměrnou hodnotu (n=5-6).

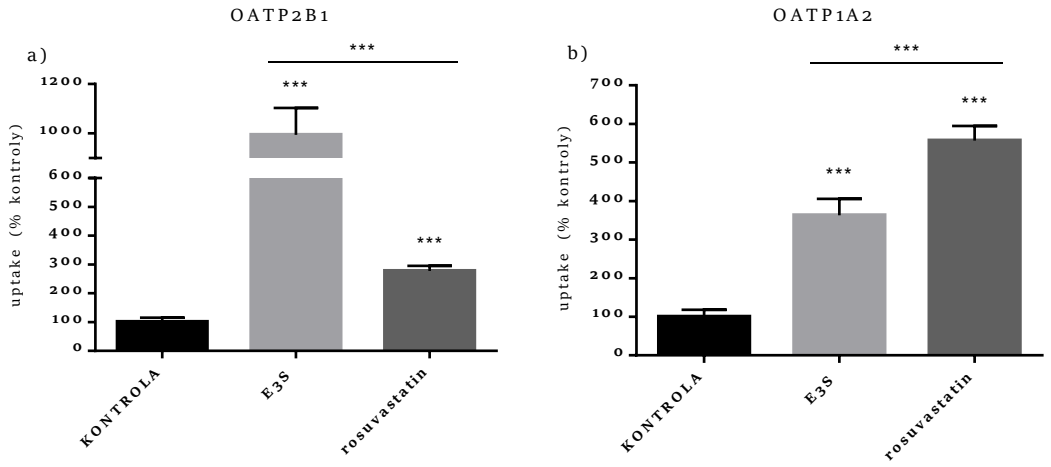
6.2.3. Interakce flavonoidů s transportem rosuvastatinu zprostředkovaným OATP transportéry

Pro potvrzení předpokladu, že je rosuvastatin substrátem OATP2B1 i OATP1A2 transportéru a je jimi aktivně transportován do buněk, byly provedeny akumulační studie s buňkami transfekovanými plazmidem kódujícím daný transportér a s buňkami transfekovanými prázdným vektorem. U MDCKII-OATP2B1 buněk došlo k 2,8násobnému nárůstu akumulace ve srovnání s buňkami s prázdným vektorem (obr. 14a), u HEK293-OATP1A2 k 5,2násobnému nárůstu akumulace rosuvastatinu ve srovnání s buňkami nesoucími jen prázdný vektor (obr. 14b).



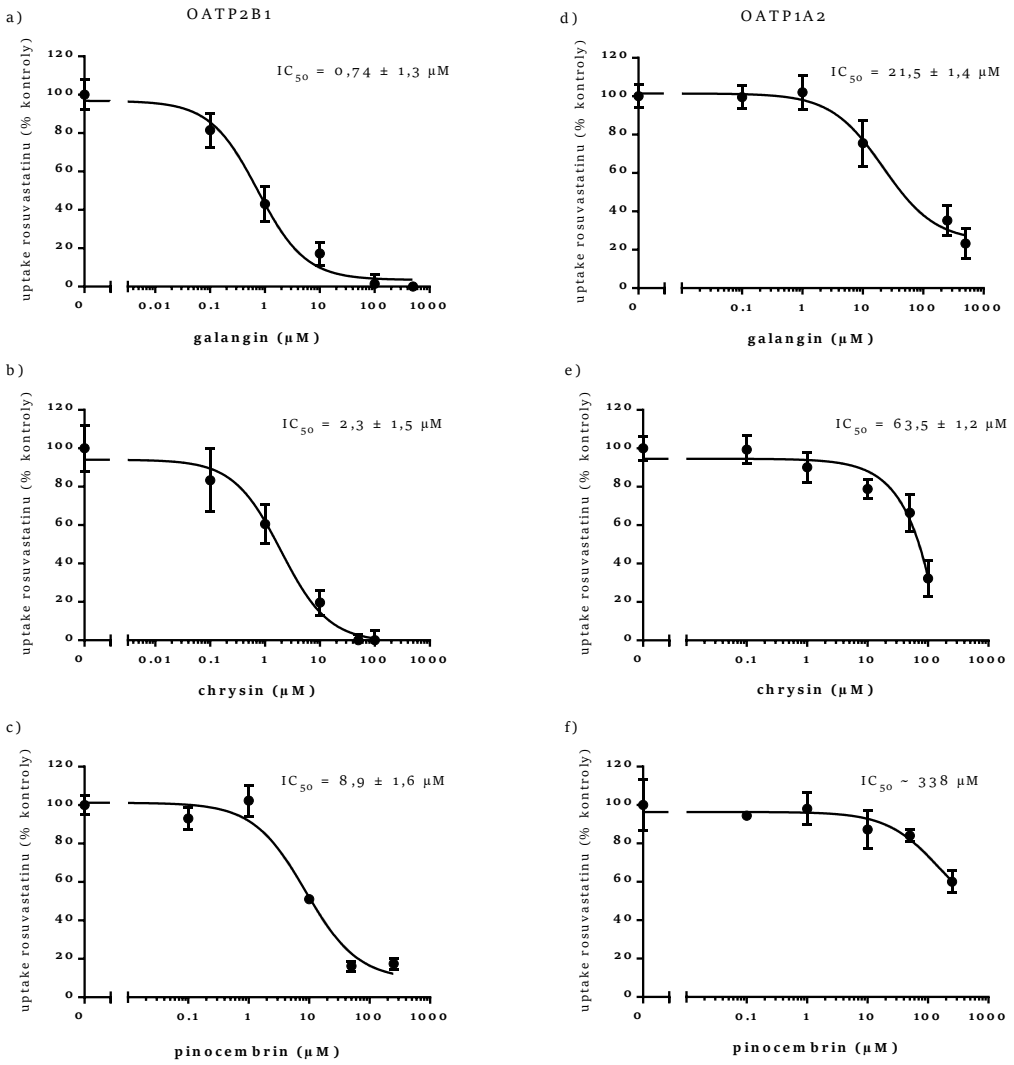
*Obr. 14. Uptake rosuvastatinu pomocí OATP v buněčných modelech. Stanovovali jsme uptake rosuvastatinu (0,5 μM) v buňkách MDCKII-OATP2B1 a MDCKII buňkách transfekovaných prázdným vektorem po 2min inkubaci (a) a v buňkách HEK293-OATP1A2 a HEK293-pCMV6 po 5min inkubaci (b) při 37 °C. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=6-9). ***p<0,001*

Relativní srovnání E3S a rosuvastatinu jako substrátů OATP2B1 a OATP1A2 je na obr. 15. Jako kontrola sloužily buňky dané linie transfekované prázdným vektorem. Oba substráty byly ve významně vyšší míře akumulovány v buňkách nesoucích transportér. U buněk nesoucích OATP1A2 transportér byl rosuvastatin akumulován dokonce více než standardní substrát E3S.



*Obr. 15. Srovnání uptake E3S a rosuvastatinu v buněčných modelech exprimujících OATP transportéry. Uptake E3S (1 μM) a rosuvastatinu (0,5 μM) do transfekovaných MDCKII-OATP2B1 a MDCKII-pCMV6 buněk (a) byl měřen po 2 min inkubace při 37 °C; uptake těchto dvou substrátu do HEK293-OATP1A2 a HEK293-pCMV6 buněk (b) byl měřen po 5min inkubaci při 37 °C. Data jsou vyjádřená jako % kontroly, tj. akumulace v buňkách transfekovaných prázdným vektorem a jsou vyjádřena jako průměr ± SD (n=6-9). ***p<0,001*

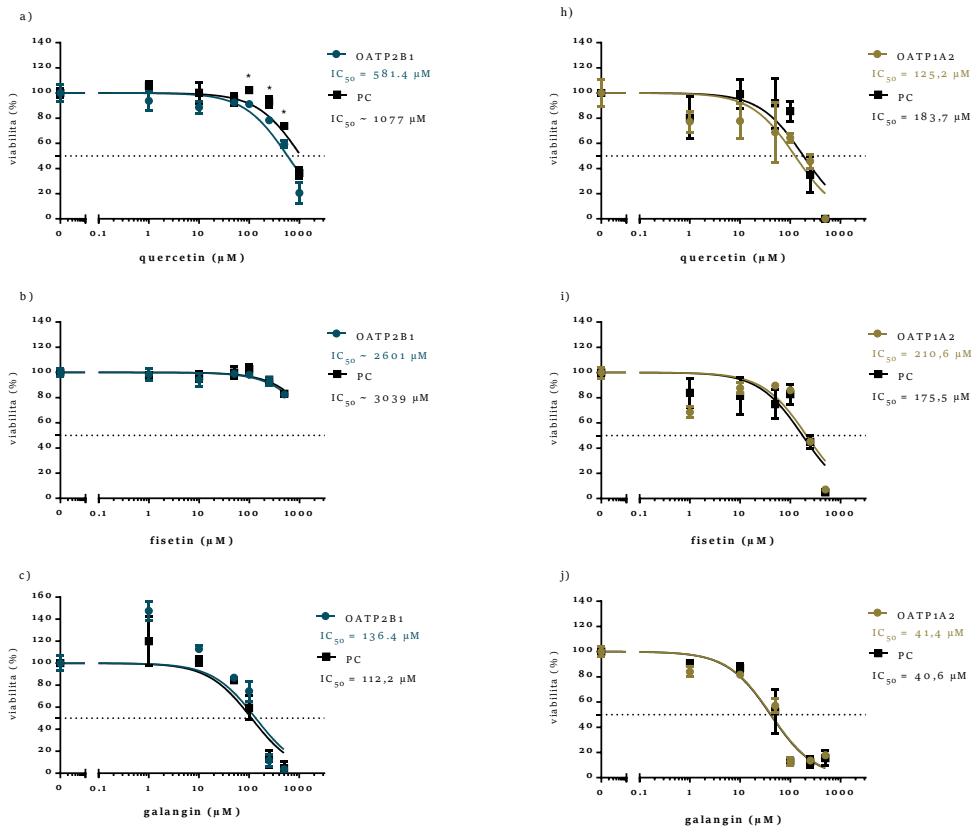
Při zjišťování potenciální inhibice transportu rosuvastatinu pomocí OATP transportérů flavonoidy byla schopnost inhibovat tento transport zkoumána u tří nejsilnějších inhibitorů prokázaných v předchozích studiích se standardním substrátem E3S, tj. galanginu, chrysinu a pinocembrinu (obr. 16). Nejsilnějším inhibitorem uptake rosuvastatinu u obou transportérů byl galangin s hodnotami IC_{50} 0,74 ± 1,3 μM pro OATP2B1 a 21,5 ± 1,4 μM pro OATP1A2 transportér, následovaný chrysinem a pinocembrinem. Inhibiční účinek pinocembrinu na uptake rosuvastatinu OATP1A2 transportérem byl poměrně malý, hodnota IC_{50} byla odhadnuta výpočtem z průběhu inhibiční křivky.

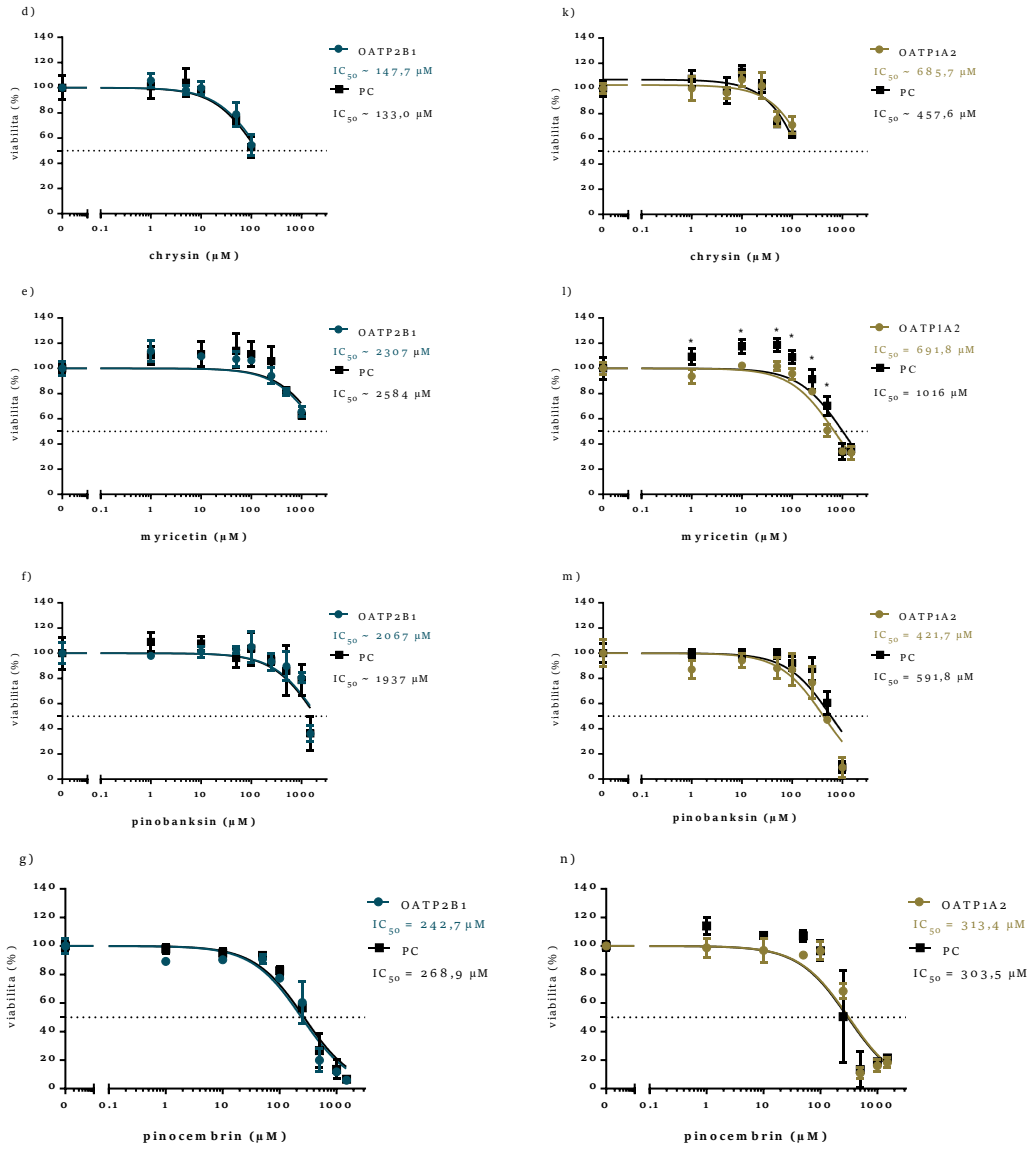


Obr. 16. Vliv vybraných flavonoidů na uptake rosuvastatinu zprostředkovaný OATP transportéry. Inhibiční efekt zvyšujících se koncentrací galanginu, chrysinu a pinocembrinu na akumulaci rosuvastatinu (0,5 µM) pomocí OATP2B1 transportéru (a-c) byl měřen po 2min inkubaci při 37 °C. Inhibiční efekt zvyšujících se koncentrací těchto flavonoidů na akumulaci rosuvastatinu (0,5 µM) pomocí OATP1A2 transportéru (d-f) byl měřen po 5min inkubaci při 37 °C. Použité rozmezí koncentrací testovaných flavonoidů bylo 0–500 µM. Data jsou vyjádřena jako % kontroly (akumulace rosuvastatinu v buňkách bez přítomnosti flavonoidů). Každý bod představuje průměr ± SD (n=5-6).

6.2.4. Orientační posouzení buněčného uptake flavonoidů OATP transportéry pomocí cytotoxického testu

Pro hodnocení, zda jsou testované flavonoidy i substráty studovaných OATP transportérů, byla použita nepřímá metoda založená na stanovení závislosti cytotoxicity na přítomnosti transportérů. Rozdílný cytotoxický efekt u buněk bez a s transportérem může indikovat významný transport zkoumané látky daným transportérem. Za tímto účelem byl použit delší inkubační interval 8 h a standardní cytotoxický test metabolické aktivity buněk CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay. Tato domněnka se nám na hladině statistické významnosti potvrdila pouze u quercetinu, který vykazoval toxický efekt mírně závislý na OATP2B1 (obr. 17a), a u myricetinu v souvislosti s OATP1A2 zprostředkovaným transportem (obr. 17l). U ostatních flavonoidů nebyl ve srovnání s buňkami s prázdným vektorem pozorován zvýšený toxický účinek na buňky nesoucí OATP2B1 nebo OATP1A2 transportér. Současně jsou hodnoty IC_{50} i po 8hod inkubaci buněk s flavonoidy prakticky řádově vyšší ve srovnání se zjištěnými inhibičními koncentracemi IC_{50}, s výjimkou myricetinu a pinobanksinu u transportéru OATP1A2, kde ovšem jejich zjištěné inhibiční koncentrace IC_{50} byly značně vysoké, tudíž lze rovněž vyloučit případné toxické působení během transportních studií.



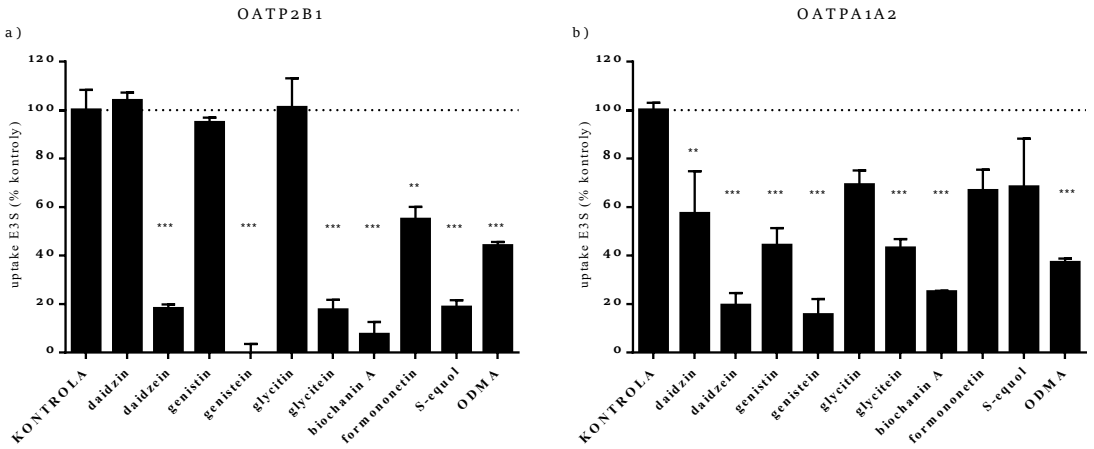


*Obr. 17. Cytotoxické působení zkoumaných flavonoidů ovlivněné přítomností transportéru OATP2B1 a OATP1A2. MDCKII-OATP2B1/MDCKII-pCMV6 buňky (levý sloupeček) a HEK293-OATP1A2/HEK293-pCMV6 buňky (pravý sloupeček) byly inkubovány se zvyšujícími se koncentracemi flavonoidů po dobu 8 hod v inkubátoru se zvlhčenou atmosférou s 5 % CO_2 při 37 °C. Použité rozmezí koncentrací flavonoidů bylo 0–1500 µM. Současně bylo vždy provedeno funkční ověření úspěšnosti transfekce pomocí standardního radioaktivního substrátu OATP2B1 a OATP1A2 estron 3-sulfátu. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD (n=5-6). *p< 0,05*

6.3. Interakce isoflavonů a jejich metabolitů s OATP transportéry

6.3.1. Efekt isoflavonů a jejich metabolitů na transportní funkci OATP transportérů

I u isoflavonů a jejich metabolitů jsme nejprve zjišťovali, zda jsou schopny inhibovat uptake standardního substrátu E3S OATP2B1 a OATP1A2 transportérem. Zvolená koncentrace byla po zkušenostech s flavonoidy 100 µM. Při zkoumání interakcí s OATP2B1 transportérem nebyl pozorován inhibiční efekt u glukosidů (daidzinu, genistinu a glycitinu), pouze aglykony a metabolity byly schopny inhibovat uptake zprostředkovaný OATP2B1 transportérem (obr. 18a). Situace u OATP1A2 transportéru byla odlišná. Statisticky významná inhibice byla prokázána i pro některé glukosidy jako daidzin a genistin. Formononetin a metabolit *S*-equol naopak nevykazovaly významný inhibiční vliv na uptake pomocí OATP1A2 (obr 18b).

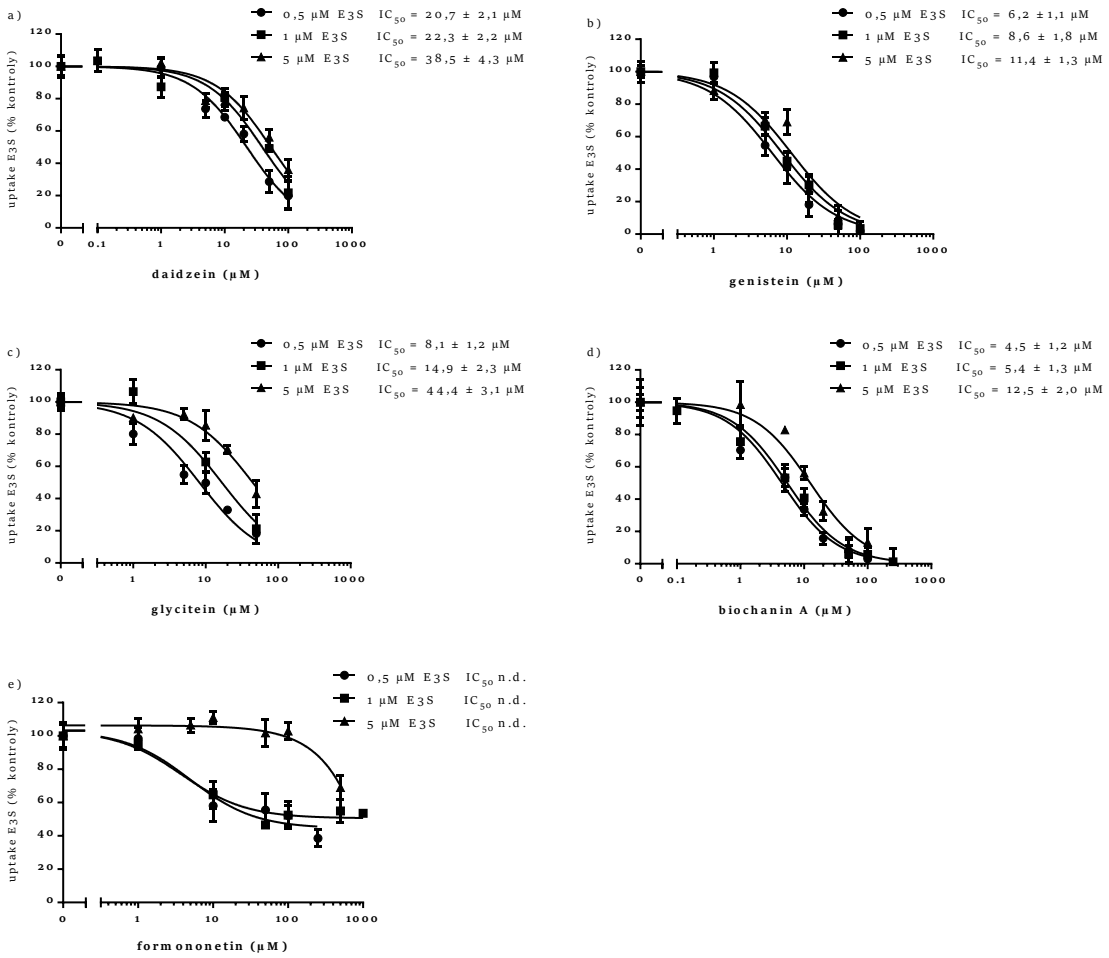


*Obr. 18. Porovnání inhibičního potenciálu isoflavonů a jejich metabolitů (100 µM) na uptake E3S (1 µM) zprostředkovaný transportérem OATP2B1 (a) a OATP1A2 (b). Uptake E3S byl měřen za nepřítomnosti (kontrola) a v přítomnosti jednotlivých isoflavonů s MDCKII-OATP2B1/MDCKII-pCMV6 buňkami po 2min inkubaci při 37 °C, s HEK293-OATP1A2/HEK293-pCMV6 buňkami po 5 min inkubace při 37 °C. Jako pozitivní kontrola inhibice sloužil quercetin. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD (n = 6-9). **p< 0,01, ***p< 0,001*

Další studie byly pro uváděný vyšší význam OATP2B1 pro transport xenobiotik na bariérách zaměřeny na interakci isoflavonů pouze s tímto transportérem.

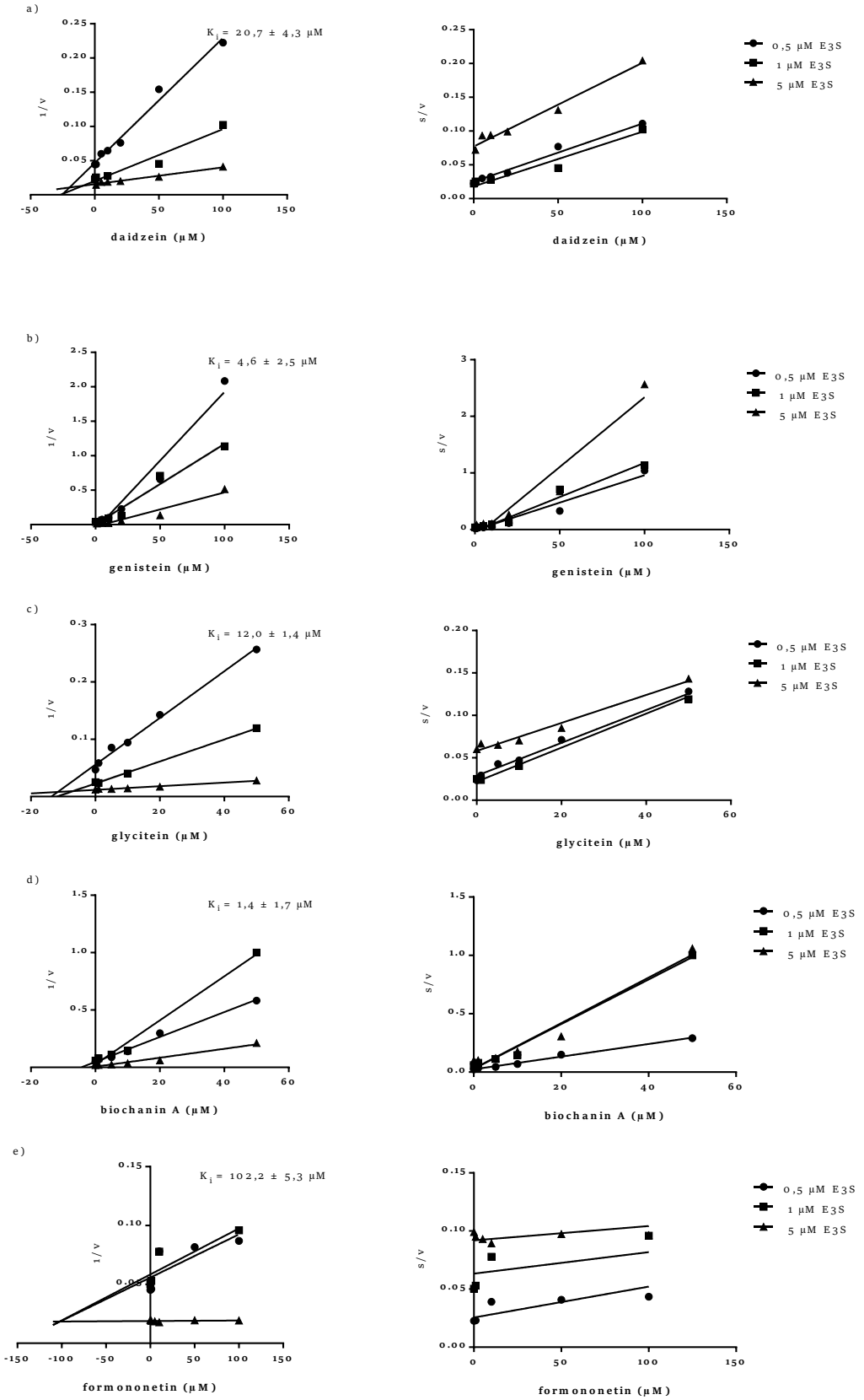
6.3.2. Inhibice OATP2B1 transportéru isoflavony

Sledovali jsme změny uptake E3S v závislosti na koncentraci isoflavonů, které prokázaly statisticky významný inhibiční efekt vůči OATP2B1 v předchozí studii. Pro všechny tyto látky jsme stanovili inhibiční parametry IC_{50} (obr. 19) a K_i (obr. 20) a také byl určen předpokládaný typ inhibice (obr. 20). Inhibiční efekt v závislosti na zvyšující se koncentraci isoflavonů byl pozorován u všech zkoumaných látek při všech použitých koncentracích substrátu. Kromě formononetinu, byl u všech isoflavonů sóji prokázán poměrně silný inhibiční potenciál vůči OATP2B1 s hodnotami K_i do 20 μM (obr. 20). Nejsilnější inhibiční účinek byl zjištěn u biochaninu A s K_i 1,4 ± 1,7 μM a genisteinu s K_i 4,6 ± 2,5 μM. Většina zkoumaných isoflavonů inhibuje OATP2B1 transport kompetitivně, pouze genistein a biochanin A nekompetitivním způsobem (obr. 20).



Obr. 19. Inhibiční křivky vlivu zvyšujících se koncentrací isoflavonů na akumulaci E3S pomocí OATP2B1. Inhibiční efekt daidzeinu (a), genisteinu (b), glyciteinu (c), biochaninu A (d) a formononetinu (e) na akumulaci tří různých koncentrací substrátu E3S (●0,5 μM, ■1 μM a ▲5 μM) v MDCKII buňkách přechodně transfekovaných OATP2B1/pCMV6 byl měřen po 2min inkubaci při

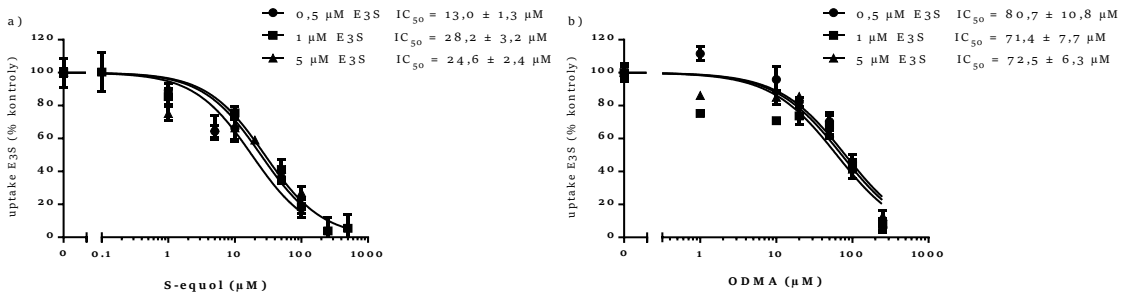
37 °C. Použité rozmezí koncentrací isoflavonů bylo 0–1000 μM. Data jsou vyjádřená jako procenta kontroly (akumulace E3S bez přítomnosti isoflavonů). Každý bod představuje průměr ± SD (n=6-8) (n.d. nebylo stanoveno). Tato data byla následně použita pro stanovení K_i.



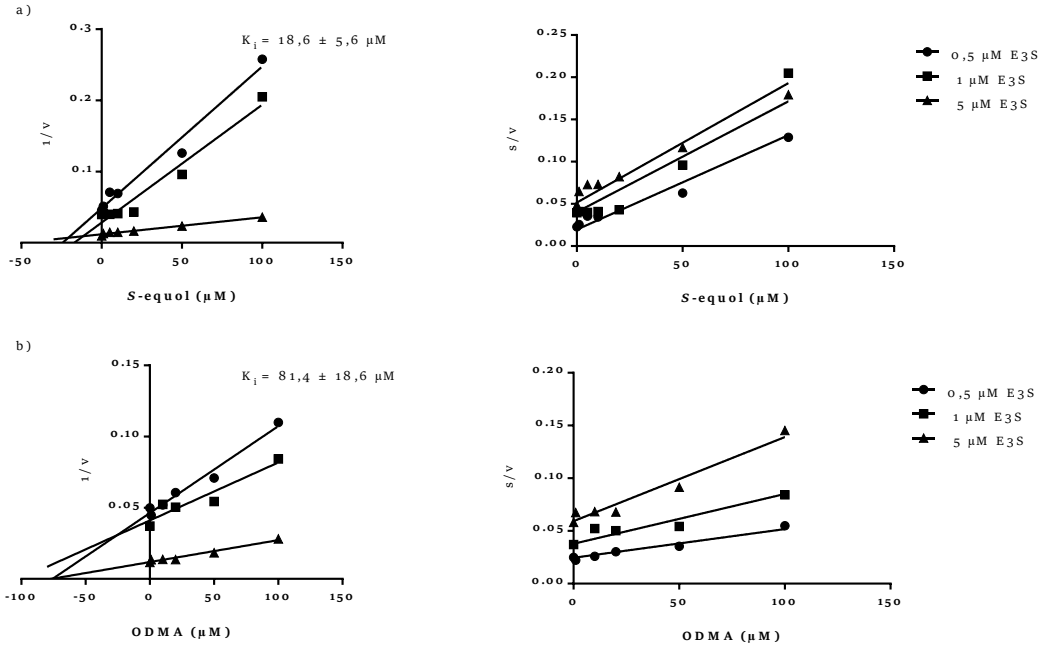
Obr. 20. Inhibice OATP2B1 uptake E3S aglykony isoflavonů. Akumulace E3S ve třech různých koncentracích (●0,5 μM, ■1 μM a ▲5 μM) byla inhibována zvyšujícími se koncentracemi daidzeinu (a), genisteinu (b), glyciteinu (c), biochaninu A (d) a formononetinu (e) po dobu 2 min při 37 °C. Testované rozmezí koncentrací isoflavonů bylo 0–500 μM. V levém slouci je Dixonovo zobrazení (závislost převrácené hodnoty uptake E3S na koncentraci inhibitoru), v pravém závislost s/v, kde s je koncentrace substrátu, na koncentraci inhibitoru, které ilustruje typ inhibice. Znázorněné hodnoty jsou převrácenými hodnotami aritmetických průměrů (n = 6-8).

6.3.3. Inhibice OATP2B1 transportéru metabolity isoflavonů

Testované metabolity *S*-equol a ODMA prokázaly v pilotních studiích schopnost inhibice OATP2B1, proto jsme také pro ně určovali kvantitativní parametry IC_{50} (obr. 21), K_i a typ inhibice (obr. 22). *S*-equol inhiboval uptake zprostředkovaný OATP2B1 poměrně výrazně s hodnotou K_i 18,6 ± 5,6 μM (obr. 22a). Inhibiční potenciál metabolitu ODMA byl výrazně nižší s hodnotou K_i několikanásobně vyšší (obr. 22b). Oba metabolity *S*-equol i ODMA inhibují transport pomocí OATP2B1 kompetitivním mechanismem.



Obr. 21. Inhibiční křivky vlivu zvyšujících se koncentrací metabolitů isoflavonů na akumulaci E3S pomocí OATP2B1. Inhibiční efekt S-equolu (a) a O-desmethylangolensinu (b) na akumulaci tří různých koncentrací substrátu E3S (●0,5 μM, ■1 μM a ▲5 μM) v MDCKII buňkách přechodně transfekovaných OATP2B1/pCMV6 byl měřen po 2min inkubaci při 37 °C. Použité rozmezí koncentrací metabolitů isoflavonů bylo 0–500 μM. Data jsou vyjádřená jako procenta kontroly (akumulace E3S bez přítomnosti isoflavonů). Každý bod představuje průměr ± SD (n=6-8). Tato data byla následně použita pro stanovení K_i.



Obr. 22. Inhibice OATP2B1 uptake E3S metabolity isoflavonů. Akumulace E3S ve třech různých koncentracích (●0,5 µM, ■1 µM a ▲5 µM) byla inhibována zvyšujícími se koncentracemi S-equolu (a) a O-desmethylangolensinu (b) po dobu 2 min při 37 °C. Testované rozmezí koncentrací metabolitů isoflavonů bylo 0–250 µM. V levém slouci je Dixonovo zobrazení (závislost převrácené hodnoty uptake E3S na koncentraci inhibitoru), v pravém závislost s/v, kde s je koncentrace substrátu, na koncentraci inhibitoru, které ilustruje typ inhibice. Znázorněné hodnoty jsou převrácenými hodnotami aritmetických průměrů (n = 6-8).

7. DISKUZE

Pro zkoumání interakcí xenobiotik s membránovými transportéry jsou v současné době standardním prostředkem buněčné modely, které jsou založeny na transfekovaných liniích exprimujících příslušný transportér v relativně vysokém stupni ve srovnání s parentními buňkami, od kterých byly odvozeny. Pro provádění *in vitro* experimentů bylo nejprve nutné zavést takové buněčné modely. Na základě zkušeností výzkumného týmu a dostupnosti byly po rozsáhlé optimalizaci zavedeny modely s tranzientní transfekcí studovanými OATP transportéry. Pro transfekci plazmidem kódujícím lidský OATP2B1 transportér se nejvhodnější linií ukázala MDCKII, která patří k běžným buněčným liniím používaným pro indukci exprese influxních i efluxních transportérů pro transportní studie. V optimalizačních studiích přechodné transfekce lidským OATP1A2 transportérem se ovšem nepodařilo tímto transportérem linii MDCKII efektivně transfekovat, a to ani za použití různých transfekčních činidel: Lipofectamin 2000, TransFectin Lipid Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) či K2 Tranfection System (Biontex, Mnichov, Německo). Ani experimenty s dalšími potenciálně vhodnými liniemi, např. HeLa a COS-7, nevedly k dostatečně efektivní míře transfekce, opět ani při použití různých transfekčních činidel. Jako vhodný typ buněk pro transfekci OATP1A2 se ukázala až linie HEK293, pro kterou byla transfekce úspěšně zoptimalizována a která poté sloužila jako *in vitro* model pro zkoumání interakcí OATP1A2 transportéru se studovanými látkami. V případě obou buněčných modelů byla standardně násobně zvýšena exprese a transportní funkce OATP2B1 a OATP1A2 v transfekovaných buňkách ve srovnání s odpovídajícími parentními buňkami (obr. 7 a 8), což umožnilo jejich úspěšnou aplikaci při studiích prováděných v rámci práce.

V první části práce jsme se zabývali vlivem sedmi flavonoidů, pro něž je společnou charakteristikou výskyt v medu, na transportní funkci OATP2B1 a OATP1A2 transportérů. Experimenty se zkoumanými flavonoidy s využitím *in vitro* buněčných modelů prokázaly schopnost všech testovaných látek inhibovat transportní funkci OATP2B1 i OATP1A2 transportéru (obr. 9 a 10). Potenciál zkoumaných flavonoidů inhibovat uptake zprostředkovaný OATP2B1 a OATP1A2 nebyl ovšem jednotný. Mezilátkové porovnání vlivu na jednotlivé transportéry ukázalo, že inhibiční aktivita zkoumaných flavonoidů vůči transportérům vyjádřená parametrem IC_{50} se lišila i o několik řádů. Nejsilnějším inhibitorem obou transportérů byl chrysin s IC_{50} kolem 0,1 μM, u OATP2B následován quercetinem, galanginem a fisetinem s hodnotami IC_{50} do 20 μM. U OATP1A2 byly vedle

chrysinu dalšími relativně silnými inhibitory pinocembrin a galangin, následovány quercetinem. Značný rozdíl ve schopnosti inhibice byl zjištěn u některých flavonoidů i v účinku na jednotlivé transportéry, kde byly pozorovány až řádové odlišnosti v hodnotách IC_{50}. Quercetin a pinobanksin inhibovaly OATP2B1 transportér výrazně silněji než transportér OATP1A2, pinocembrin byl naopak mnohem silnějším inhibitorem OATP1A2.

Pozorovaná schopnost studovaných flavonoidů inhibovat OATP2B1 a/nebo OATP1A2 je v souladu s dalšími údaji o účinku přírodních látek ze skupiny flavonoidů zjištěnými v předcházejících studiích. Quercetin byl již dříve identifikován jako poměrně silný inhibitor transportu zprostředkovaného OATP2B1 i OATP1A2 (*Mandery et al.*, 2010), což bylo motivem pro jeho zařazení do studie jako pozitivní kontroly a kvantitativního komparátoru míry inhibice. Ve stejné *in vitro* studii byla také popsána schopnost flavonoidů apigeninu a kaempferolu inhibovat OATP2B1 i OATP1A2, v porovnání s quercetinem však byla míra jejich efektu nižší (*Mandery et al.*, 2010). Porovnání inhibičního účinku v naší studii ukázalo, že chrysin je silnějším inhibitorem OATP2B1 transportéru než quercetin. Pro OATP1A2 transportér pak krom chrysinu byly silnějšími inhibitory také pinocembrin a galangin.

K dalším přírodním látkám schopným inhibovat uptake zprostředkovaný OATP2B1 patří např. flavonoidy z ovocných šťáv naringin, naringenin, hesperidin, floridzin a floretin (*Shirasaka et al.*, 2013). U naringinu a hesperidinu byly zkoumána schopnost inhibice i vůči OATP1A2 (substrátem byl fexofenadin) se závěrem, že se jedná o relativně silné inhibitory s hodnotami IC_{50} 3,6 μM pro naringin a 2,7 μM pro hesperidin (*Bailey et al.*, 2007). OATP2B1 transportér je inhibován také glykosidovými formami quercetinu hyperosidem, isoquercitrinem a rutinem, dále pak flavony mulberrinem a scutellarinem, avšak inhibiční aktivita všech těchto látek byla ve srovnání s quercetinem nižší (*Wen et al.*, 2016). Vedle vlivu na OATP2B1 a OATP1A2 je možné, že studované látky by mohly, analogicky jako jiné flavonoidy, mít potenci ovlivňovat i jiné isoformy OATP přítomné na bariérách organismu determinujících farmakokinetiku léčiv. Toto bylo pozorováno u již zmíněných flavonoidů apigeninu, kaempferolu a quercetinu, u nichž byla prokázána vedle interakce s OATP2B1 a OATP1A2 rovněž schopnost inhibovat i významné jaterní isoformy OATP transportérů – OATP1B1 a OATP1B3 (*Mandery et al.*, 2012). K dalším flavonoidům inhibujícím vedle OATP2B1 a OATP1A2 také OATP1B1 transportér patří katechiny ze zeleného čaje epikatechin galát (ECG) a epigalokatechin galát (EGCG) (*Roth et al.*,

2011). OATP transportéry mohou být ovlivněny i jinými přírodními látkami. Např. flavolignany silymarin, silybin A či B a silychristin významně inhibují OATP2B1, OATP1B1 i OATP1B3 transportéry (*Köck et al.*, 2013), triterpenoidy z lékořice kys. glycyrrhetinová a kys. glycyrrhizová vykazují inhibiční aktivitu vůči transportu pomocí OATP2B1, které je ovšem nižší než inhibiční aktivita quercetinu (u kys. glycyrrhizové řádově) (*Wen et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že v řadě uvedených studií byl součástí testování quercetin a jeho inhibiční účinek byl zpravidla silnější než u dalších studovaných látek, lze z hlediska kvantitativního mezilátkového srovnání charakterizovat inhibiční potenci nejsilnějších inhibitorů z naší skupiny (např. chrysinu) jako velmi vysokou.

Další skupinou látek, u kterých jsme zkoumali vliv na transport zprostředkovaný OATP s využitím buněčných modelů, byly isoflavony, které jsou základními obsahovými a farmakologicky účinnými látkami sóji. Přestože jejich struktura neodpovídá přesně strukturní definici flavonoidů, bývají k těmto látkám běžně přiřazovány. Úvodní inhibiční studie *in vitro* prokázaly u zkoumaných isoflavonů významný inhibiční účinek vůči OATP2B1 i OATP1A2. Ten byl však obecně silnější vůči transportéru OATP2B1 (obr. 18), což bylo mimo jiné také důvodem pro detailnější studium interakcí právě na tomto transportéru. Vůči OATP1A2 prokázaly inhibiční schopnost kromě aglykonů také glykosidy daidzin a genistin, ovšem při testované koncentraci byla schopnost glykosidů inhibovat transport zprostředkovaný OATP1A2 výrazně nižší v porovnání s jejich aglykony (obr. 18b). Vůči OATP2B1 transportéru byla však diference inhibičního účinku konjugovaných forem isoflavonů a jejich příslušných aglykonů téměř úplná (obr. 18a). Kromě jedné výjimky (formononetinu) inhibovaly aglykony tento transportér s hodnotami K_i v rozmezí od 1 do 20 μM (obr. 20), naopak testované glykosidy daidzin, genistin a glycitin nevykazovaly při použitých koncentracích statisticky významný inhibiční účinek na transport zprostředkovaný OATP2B1 transportérem (obr. 18a). Získané výsledky pro pár genistin/genistein, které ukázaly, že pouze aglykon má inhibiční efekt vůči OATP2B1, jsou v souladu s pozorováním pro příbuzný transportér OATP1B1. I v tomto případě byl transportér inhibován pouze aglykonem genisteinem, ne však glykosidem genistinem (*Wang et al.*, 2005). Tentýž rozdíl inhibiční aktivity vůči OATP1B1 byl pozorován i pro pár diosmin/diosmetin. Naopak údaj o neschopnosti ani jedné látky z páru daidzin/daidzein inhibovat transport zprostředkovaný OATP1B1 (*Wang et al.*, 2005) neodpovídá našemu nálezu pro transportér OATP2B1, který ukazuje poměrně silnou potenci daidzeinu inhibovat uptake E3S pomocí OATP2B1 (K_i = 20,7 μM). Transport

prostřednistvím OATP1A2 byl schopen inhibovat jak aglykon daidzein, tak i glykosid daidzin. Vysvětlením rozdílného nálezu ve vlivu daidzeinu na OATP transportéry může být nejen v odlišné afinitě daidzeinu k OATP2B1 a OATP1B1, ale roli může hrát i použití rozdílných standardních substrátů v naší a diskutované práci. Na druhou stranu, i glykosidy flavonoidů prokázaly schopnost inhibovat OATP transportéry podobně jako jejich aglykony. Toto bylo pozorováno pro OATP1B1 u dvojic hesperidin/hesperitin, naringin/naringenin či floridzin/floretin (*Wang et al.*, 2005). Za zmínku stojí, že u glukosidu rutinu byla pozorována dokonce stimulace uptake prostřednictvím OATP1B1 (*Wang et al.*, 2005) i OATP2B1 (*Ogura et al.*, 2014). I přes poměrně málo experimentálních údajů se zdá, že některé z námi testovaných sójových isoflavonů jsou také inhibitory OAP1B1 transportéru (*Wang et al.*, 2005). Při srovnání hodnoty K_i z této studie s námi zjištěnými parametry se biochanin A jeví jako silnější inhibitor OATP2B1 (K_i = 1,4 μM) než OATP1B1 (K_i = 10,4 μM).

Srovnáme-li inhibiční schopnosti sójových isoflavonů a jejich metabolitů s flavonoidem quercetinem zjistíme, že pouze biochanin A vykazuje hodnoty IC_{50} srovnatelné. Všechny ostatní zkoumané isoflavony jsou vůči OATP2B1 transportéru inhibitory slabšími. Podle hodnot Ki je pořadí inhibičního potenciálu isoflavonů následující: biochanin A > genistein > glycitein > *S*-equol ~ daidzein >> ODMA > formononetin. Jinak je inhibiční potenciál isoflavonů vůči OATP2B1 (krom formononetinu) podobný jako u zkoumaných flavonoidů s hodnotami IC_{50} do 20 μM, chrysin zůstává se submikromolární inhibiční koncentrací nejsilnějším inhibitorem OATP2B1, následovaný quercetinem. Celkově získaná data o inhibiční aktivitě vůči zkoumaným OATP transportérům neukazují na to, že by některý ze základních strukturních rysů flavonoidních látek představoval zásadní předpoklad pro inhibiční aktivitu.

Na rozdíl od inhibičního působení na transportní funkci zkoumaných OATP transportérů se nepodařilo prokázat, zda jsou studované flavonoidy substráty těchto transportérů. V provedené studii, při které bylo využito nepřímé indikace uptake a akumulace flavonoidů v buňkách provázené zvýšeným cytotoxickým účinkem u buněk transfekovaných OATP2B1 nebo OATP1A2, bylo zjištěno, že cytotoxické koncentrace reprezentované IC_{50} jsou ve většině případů shodné u buněk kontrolních i exprimujících OATP transportér (obr. 17). Výjimkou byl pouze myricetin, kde se mírné zvýšení cytotoxicity u buněk nesoucích transportér OATP1A2 objevilo. Avšak definitivní potvrzení, zda jsou studované flavonoidy substráty či nikoliv, bude vyžadovat další studia

s využitím jiných metodických přístupů. Pro velmi omezené množství experimentálních údajů nelze ani z obecného pohledu zvažovat, zda flavonoidy spíše patří mezi substráty OATP transportérů nebo jsou jen jejich inhibitory. Existují izolované údaje o transportu ECG, EGCG (*Li et al.*, 2017) a quercetinu (*Glaeser et al.*, 2014) do buněk OATP transportéry, avšak další údaje i u významných zástupců ze skupiny flavonoidů dosud chybějí.

Obecně je většina flavonoidů v rostlinách přítomna ve formě glykosidů, nejčastěji konjugátů s glukózou – glukosidů. Ke štěpení glykosidů flavonoidů dochází bakteriemi tlustého střeva. Z tohoto pohledu by se mohlo jevit zkoumání interakcí se střevními transportéry zajišťujícími absorpci léčiv v proximálních částech střeva za nedůležité, protože volné formy by se zde neměly ve významné míře vyskytovat. Avšak studie potvrzují, že již v horních částech GIT jsou přítomny glykosidázy podílející se na hydrolýze některých glykosidů flavonoidů (*Day et al.*, 1998; *Lu et al.*, 2010). To znamená, že i flavonoidy přijaté ve formě glykosidů, mohou jako aglykony interagovat s transportéry již na úrovni duodena. Takto je tomu i v případě sójových isoflavonů, neboť ve stravě a potravních doplňcích se nachází převážně jako glukosidy, aglykony představují jen malou část z jejich celkového množství (*Nakamura et al.*, 2000; *Song et al.*, 1998). Tyto glukosidy jsou však v tenkém střevě štěpeny glykosidázami nacházejícími se v horních částech GIT včetně duodena (*Franke et al.*, 2014; *Larkin et al.*, 2008; *Mattison et al.*, 2014; *Walsh et al.*, 2007). To znamená, že ve střevním obsahu už se i isoflavony vyskytují převážně nekonjugované ve formě aglykonů. Vzniklé aglykony mohou být také absorbovány do portální žíly (*Mattison et al.*, 2014; *Yuan et al.*, 2007) a dostávají se tak do jater, kde mohou ovlivnit hepatální transportní systémy, vč. OATP. V případě flavonoidů obsažených v medu je situace poněkud odlišná, neboť analytická data ukazují, že se ve včelích produktech námi zkoumané flavonoidy vyskytují převážně v nekonjugované formě jako volné aglykony (*Campillo et al.*, 2015; *Campone et al.*, 2014; *Kečkeš et al.*, 2013; *Wabaidur et al.*, 2015; *Yao et al.*, 2004). Lze tedy předpokládat, že po požití potravy obsahující flavonoidy se vedle konjugovaných forem bude v GIT nacházet i významný nebo převažující podíl volných aglykonů. Vedle zkoumání interakční aktivity glykosidů vůči lékovým transportérům exprimovaným v trávicím traktu je tedy i studium aktivity jejich volných aglykonů nedílnou součástí těchto studií.

Isoflavony sóji jsou v lidském střevě kromě příslušných aglykonů přeměňovány také na další metabolity (obr. 5), které mohou potenciálně působit na střevní či, po absorpci, i na jaterní transportéry. K významným a zkoumaným patří metabolity jedné z hlavních obsahových látek sóji daidzeinu: equol a O-desmethylangolensin (ODMA) (*Ko*, 2014; *Wang et al.*, 2013). Equol se díky chirálnímu centru může vyskytovat ve dvou stereoizomerech. Jeho syntéza bakteriemi tlustého střeva je ovšem enantiospecifická za vzniku *S*-equolu. Tento enantiomer je klinicky a farmakologicky zajímavý kvůli svým biologickým vlastnostem, neboť se jedná, stejně jako v případě isoflavonů, o fytoestrogen schopný vázat se na estrogenní receptory a působit příznivě u řady hormonálně závislých poruch (*Mattison et al.*, 2014). Inhibiční aktivita *S*-equolu vůči OATP2B1 transportéru byla podobná jako u aglykonů isoflavonů s hodnotou K_i do 20 μM (obr. 22). Schopnost inhibovat transportní funkci OATP1A2 v prvotním testování ale u *S*-equolu nebyla prokázána (obr. 18b). Druhý zkoumaný metabolit ODMA inhiboval jak transport pomocí OATP2B1, tak pomocí OATP1A2, ale s menší intenzitou. Jeho hodnota K_i vůči OATP2B1 byla několikanásobně vyšší ve srovnání s hodnotou K_i *S*-equolu. Protože je *S*-equol v gastrointestinálním traktu dobře absorbován (*Mattison et al.*, 2014) a vykazuje významnou inhibiční aktivitu vůči OATP2B1 *in vitro*, lze zvažovat možnou inhibici OATP v játrech, zvláště pokud by byl podán ve vysokých dávkách. Příslušná farmakokinetická data o jeho plazmatických koncentracích nejsou však zatím dostupná. Metabolit ODMA se zdá být farmakologicky méně zajímavý, neboť u něj nebyla popsána žádná významná biologická aktivita (*Setchell a Clerici*, 2010). Jeho farmakokinetika není doposud známa, avšak pro jeho nízkou potenci inhibovat OATP2B1 *in vitro* jsou jeho systémové interakce s léčivy na tomto transportéru nepravděpodobné, a to i v případě, kdyby se prokázala jeho vysoká biologická dostupnost. Inhibiční účinek na transportér OATP2B1 je v literatuře popsán i pro některé další metabolity daidzeinu – konjugáty vznikající během 2. fáze metabolismu. Uptake E3S pomocí OATP2B1 inhibovaly *in vitro* krom daidzeinu také daidzein-7,4′-disulfát, daidzein-7-sulfát, daidzein-4′-sulfát, daidzein-7-β-D-glukuronid, daidzein-4′-β-D-glukuronid (*Grosser et al.*, 2015).

Pravděpodobnost interakcí přírodních látek s lékovými transportéry je největší ve střevě a v játrech. Obecně, flavonoidy z potravy se do střevního kompartmentu dostávají v relativně vysokých koncentracích ve srovnání s jejich množstvím v krvi, protože jejich absorpce je limitovaná. Kvůli nedostatečným informacím, které jsou, respektive nejsou, v současné době k dispozici, je obtížné odhadovat potenciál zkoumaných flavonoidů

inhibovat OATP transportéry v GIT *in vivo*. Nalezené hodnoty IC_{50} zkoumaných flavonoidů kolísají v rozmezí od 0,1 μM do několika stovek μM u látek s nejslabšími inhibičními schopnostmi. Z analytických dat obsahu flavonoidů v medu (tab. 4) zjistíme, že množství nejsilnějšího inhibitoru chrysinu se odhaduje na 1–10 μg/g, což odpovídá 0,004–0,04 μmol/g (*Campone et al.*, 2014; *Kečkeš et al.*, 2013; *Wabaidur et al.*, 2015; *Yao et al.*, 2004). Pro hodnocení gastrointestinální koncentrace po perorálním podání je doporučováno odhadovat koncentraci látek jako dávku přijatou v objemu 250 ml (*International Transporter Consortium et al.*, 2010). Konzumace 10 g medu by teoreticky vedla k intestinální koncentraci chrysinu 0,16–1,6 μM. Po obdobných výpočtech pro galangin (1–6 μg/g medu, tj. 0,004–0,022 μmol/g) a pinocembrin (1–3 μg/g medu, tj. 0,004–0,012 μmol/g) se dostáváme ke střevním koncentracím po konzumaci 10 g medu 0,15–0,9 μM pro galangin a 0,16–0,5 μM pro pinocembrin. Nicméně jednotlivá dávka při konzumaci medu u lidí se udává až 25 g (*Bogdanov et al.*, 2008), a ta vede k výsledným koncentracím 2,5krát vyšším. To znamená, že už příjem jediné dávky medu by mohl vést ke střevním koncentracím flavonoidů přesahujícím efektivní koncentrace inhibující OATP transportéry. Tyto výpočty zohledňují pouze příjem jednotlivých flavonoidů v medu, ač se hojně vyskytují i v potravě a doplňcích stravy. Navíc je nutné zvážit, že současný příjem několika flavonoidů může vést ke kombinovanému synergickému účinku vůči transportérům a potenciálně silnější inhibici. Tento synergický inhibiční efekt byl vůči OATP2B1 transportéru pozorován již pro směs flavonoidů obsažených v jablečné šťávě (*Shirasaka et al.*, 2013).

Také u isoflavonů můžeme potenciál inhibovat OATP transportéry v GIT *in vivo* pouze odhadovat, neboť data o jejich střevních koncentracích po perorálním podání nejsou dostupná. Vyjdeme-li z údajů o obsahu isoflavonů v potravě dostupných v literatuře, tak v jedné porci sójových bobů může být až 24 913 μg daidzeinu, 19 454 μg genisteinu a 1 236 μg glyciteinu (*Thompson et al.*, 2006). Při přepočtu na objem 250 ml dostáváme intestinální koncentrace daidzeinu 392 μM, genistein 288 μM a glyciteinu 17 μM. Tyto koncentrace přesahují stanovené hodnoty K_i, pro daidzein a genistein dokonce řádově. Lze tedy předpokládat značný potenciál pro *in vivo* interakce s OATP2B1 transportérem, který by mohl být ještě umocněn možným synergickým působením.

Výsledky zkoumání mechanismu inhibičního efektu ukázaly, že způsob inhibice zkoumaných přírodních látek vůči OATP transportérům není jednotný. Byl pozorován jak kompetitivní, tak nekompetitivní způsob inhibice. Většina z testovaných isoflavonů a oba

metabolity inhibují OATP2B1 transportér kompetitivně, pouze u genisteinu a biochaninu A byl pozorován nekompetitivní typ (obr. 20 a 22). U biochaninu A byl nekompetitivní způsob inhibice popsán také vůči příbuznému transportéru OATP1B1 (*Wang et al.*, 2005). Velmi nehomogenní výsledky jsme získaly u zkoumaných flavonoidů z medu. Galangin inhiboval transport prostřednictvím OATP2B1 nekompetitivně, kdežto jeho inhibice OATP1A2 byla kompetitivní. Přesně opačné výsledky jsme zaznamenali u chrysinu, jenž inhiboval OATP2B1 transportér kompetitivně, ale OATP1A2 nekompetitivním způsobem. Pinocembrin pak inhiboval oba transportéry nekompetitivně. Pokud porovnáme tyto výsledky s literálními údaji o inhibici OATP transportérů, nalezneme rovněž nejednotné údaje. Spíše u přírodních látek převládá kompetitivní inhibice OATP, která byla prokázána např. u flavonoidů apigeninu, kaempferolu i quercetinu při jejich působení na OATP2B1 i OATP1A2 (*Mandery et al.*, 2010). Inhibice jaterních OATP1B1 a OATP1B3 transportérů těmito flavonoidy byla také kompetitivní (*Mandery et al.*, 2012). U naringinu byla inhibice OATP1A2 rovněž kompetitivní (*Bailey et al.*, 2007), stejně jako inhibice OATP2B1 transportéru prostřednictvím theaflavinu (*Kondo et al.*, 2017). U katechinů ECG a EGCG byl naopak pozorován nekompetitivní způsob inhibice OATP1B3 (*Roth et al.*, 2011). U řady látek však není typ inhibice zatím popsán.

Pro potvrzení schopnosti působit inhibičně na uptake léčiv OATP transportéry byl u vybraných zkoumaných flavonoidů studován vedle působení na transport modelového substrátu rovněž i vliv na uptake vybraného léčiva, které je prokázaným substrátem studovaných OATP transportérů. Jako modelový lékový substrát byl zvolen jeden z nejčastěji podávaných statinů – rosuvastatin. V porovnání s ostatními statiny patří k relativně hydrofilním látkám. Jeho průnik přes buněčné membrány pasivní difuzí je omezený, k jeho uptake přispívají ve značné míře aktivní transportní mechanismy (*McTaggart et al.*, 2001). Význam studia interakcí rosuvastinu s OATP transportéry potvrzuje i *in vitro* studie, která prokázala, že na rozdíl od jiných statinů, u kterých převažuje pasivní transport, je pro uptake rosuvastatinu stěžejní aktivní transport (*Varma et al.*, 2011). Akumulační experimenty pro potvrzení, že rosuvastatin v námi použitém buněčném modelu vykazuje deklarovaný uptake pomocí OATP2B1 a OATP1A2, ukázaly, že rosuvastatin je substrátem obou transportéru a je v transfekovaných buňkách nesoucích OATP2B1 nebo OATP1A2 transportér statisticky významně akumulován (obr. 14), v případě OATP1A2 dokonce ve vyšší míře než standardní substrát E3S (obr. 15b). Aktivní akumulace rosuvastatinu prostřednictvím OATP2B1 i OATP1A2 je v souladu

s předcházejícími *in vitro* studiemi (*Ho et al.*, 2006; *Varma et al.*, 2011). Transport prostřednictvím OATP transportérů je obecným rysem skupiny statinů, byl popsán v několika jiných studiích i pro další statiny a to pro lidské i potkaní OATP transportéry. Kromě rosuvastatinu byly jako substráty obou OATP2B1 i OATP1A2 identifikovány také pravastatin a pitavastatin, atorvastatin a fluvastatin pak byly prokázány jako substráty OATP2B1 (*Shitara et al.*, 2013; *Varma et al.*, 2011).

Provedená *in vitro* inhibiční studie, která hodnotila potenciální efekt tří nejsilnějších inhibitorů transportu standardního substrátu E3S ze skupiny flavonoidů na uptake léčiva rosuvastatinu zprostředkovaný OATP2B1 a OATP1A1, prokázala silnou potenci galanginu, chrysinu a pinocembrinu inhibovat transport rosuvastatinu pomocí transportéru OATP2B1 do buněk. Galangin byl schopen inhibovat OATP2B1 zprostředkovaný transport rosuvastatinu do buněk už v submikromolárních koncentracích, chrysin a pinocembrin v koncentracích mikromolárních (obr. 16a-c). Schopnost těchto tří flavonoidů inhibovat transport rosuvastatinu zprostředkovaný OATP1A2 byla výrazně slabší (obr. 16d-f), ale i v tomto případě byl galangin nejsilnějším inhibitorem. Z výsledků je patrná také rozdílná schopnost flavonoidů inhibovat uptake standardního modelového substrátu E3S a rosuvastatinu. Zatímco nejsilnější inhibitor OATP2B1 a OATP1A2 transportéry zprostředkovaného uptake E3S byl chrysin, nejúčinnějším inhibitorem uptake rosuvastatinu prostřednictvím OATP2B1 i OATP1A2 byl galangin. Značná diference byla zjištěna u pinocembrinu, jehož koncentrace účinně inhibující OATP1A2 zprostředkovaný uptake rosuvastatinu byla o 2 řády vyšší než pro inhibici standardního substrátu E3S. Při porovnání koncentrací *in vitro* inhibujících transport rosuvastatinu s koncentracemi potenciálně *in vivo* dosaženými po požití 10 g medu získáme hodnoty koncentrací porovnatelné se zjištěnými hodnotami IC_{50} u galanginu (IC_{50} 0,7 μM vs. 0,9 μM) i chrysinu (IC_{50} 2,3 μM vs. 1,6 μM). Tyto srovnatelné inhibiční a intestinální koncentrace naznačují potenciální možnost interakcí.

Odhadnout potenciální význam *in vitro* inhibičního působení zkoumaných přírodních látek na farmakokinetiku *in vivo* je vzhledem k možným dalším faktorům uplatňujícím se *in vivo* bez dalších experimentálních dat obtížné. Přestože je počet dostupných klinických studií omezený, existují některé doklady o ovlivnění farmakokinetiky léčiv přírodními látkami, v nichž mohou hrát roli OATP transportéry. Ve studiích s dobrovolníky bylo pozorováno snížení biologické dostupnosti fexofenadinu, které bylo vysvětleno inhibicí střevních OATP transportérů flavonoidy ovocných šťáv (*Dresser et al.*, 2002). Byl též

pozorován pokles plazmatické koncentrace nandololu inhibicí OATP látkami obsaženými v zeleném čaji, který byl na základě následných *in vitro* studií přisouzen inhibici OATP1A2 transportéru ve střevě (*Misaka et al.*, 2014). Klinické studie zaměřené na vliv přírodních látek na OATP zprostředkovanou farmakokinetiku statinů se doposud soustřeďovaly převážně na transportér OATP1B1. Wu et al. (2012) prokázal inhibiční účinek quercetinu na farmakokinetiku pravastatinu *in vitro* i u lidských dobrovolníků. Flavolignan silymarin, přestože účinně inhiboval transport rosuvastatinu zprostředkovaný OATP1B1 *in vitro*, tak u lidských dobrovolníku významný vliv na farmakokinetiku tohoto léčiva neměl (*Deng et al.*, 2008). Po perorálním příjmu flavonu baicalinu bylo pozorováno v klinické studii snížení plazmatické koncentrace rosuvastatinu v závislosti na haplotypu OATP1B1 indukcí jaterního uptake rosuvastatinu (*Fan et al.*, 2008). Z těchto příkladů plyne, že existuje potenciální riziko interakce některých přírodních látek s léčivy, která jsou transportována OATP transportéry, které může vést až k ovlivnění systémové expozice léčivem.

8. ZÁVĚRY

Metodickým přínosem této práce bylo úspěšné zavedení buněčných modelů pro studium OATP2B1 a OATP1A2 transportérů na pracovišti, jejich optimalizace a charakterizace.

S využitím těchto modelů byla následně nově prokázána schopnost šesti studovaných flavonoidů inhibovat transport prostřednictvím jak OATP2B1, tak OATP1A2 transportéru, přičemž inhibiční aktivita některých látek byla srovnatelná nebo vyšší než u použitého komparátoru quercetinu, který byl pro srovnání vybrán kvůli popsaným *in vitro* i *in vivo* inhibicím OATP transportérů. U sójových isoflavonů byl zjištěn zásadní rozdíl v inhibiční aktivitě na transport zprostředkovaný OATP2B1 transportérem u glykosidických forem na jedné straně a odpovídajících aglykonů a metabolitu *S*-equolu na straně druhé. Zatímco studované glukosidy nevykazovaly významnou schopnost inhibovat tento transportér, u aglykonů (s výjimkou formononetinu) a *S*-equolu byla inhibiční aktivita významná. I v případě OATP1A2 transportéru byl inhibiční potenciál glukosidů nevýznamný či výrazně nižší v porovnání s aglykony.

Inhibiční studie jasně prokázala významný vliv několika vybraných flavonoidů efektivně inhibujících transport modelového substrátu i na uptake lékového substrátu OATP transportérů rosuvastatinu, jenž byl patrný zejména vůči transportéru OATP2B1. Míra inhibice transportu rosuvastatinu byla u některých flavonoidů srovnatelná s inhibičním účinkem na uptake standardního substrátu estron 3-sulfátu.

Zkoumané přírodní látky byly schopny inhibovat OATP transportéry jak kompetitivním, tak nekompetitivním mechanismem. U sójových isoflavonů a jejich metabolitů převažovala kompetitivní inhibice OATP2B1 (s výjimkou genisteinu a biochaninu A), u zkoumaných flavonoidů byl typ inhibice vůči OATP různorodý. Transport zkoumaných flavonoidů studovanými transportéry se nepodařilo jednoznačně prokázat.

Získaná experimentální *in vitro* data o interakci studovaných přírodních látek běžně se vyskytujících v lidské stravě či potravních doplňcích svědčí o významné inhibiční potenci většiny zástupců vůči farmakologicky významným OATP transportérům. Kromě základního rozšíření informací o interakcích přírodních látek s lékovými OATP transportéry, mohou být získané údaje podkladem pro další zkoumání interakcí potrava-léčivo.

9. POUŽITÁ LITERATURA

Badée, J., Achour, B., Rostami-Hodjegan, A., Galetin, A., 2015. Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. Drug Metab. Dispos. 43, 424–32.

Bailey, D.G., Dresser, G.K., Leake, B.F., Kim, R.B., 2007. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. Clin. Pharmacol. Ther. 81, 495–502.

Bergman, E., Forsell, P., Tevell, A., Persson, E.M., Hedeland, M., Bondesson, U., Knutson, L., Lennernäs, H., 2006. Biliary secretion of rosuvastatin and bile acids in humans during the absorption phase. Eur. J. Pharm. Sci. 29, 205–14.

Bláhová, L., Kohoutek, J., Procházková, T., Prudíková, M., Bláha, L., 2016. Phytoestrogens in milk: Overestimations caused by contamination of the hydrolytic enzyme used during sample extraction. J. Dairy Sci. 99, 6973–6982.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P., 2008. Honey for nutrition and health: a review. J. Am. Coll. Nutr. 27, 677–89.

Bruhn, O., Cascorbi, I., 2014. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 10, 1337–54.

Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E., Crozier, A., 2001. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. J. Agric. Food Chem. 49, 5797–808.

Campillo, N., Viñas, P., Férez-Melgarejo, G., Hernández-Córdoba, M., 2015. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. Talanta 131, 185–91.

Campone, L., Piccinelli, A.L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Russo, M., Rastrelli, L., 2014. Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. J. Chromatogr. A 1334, 9–15.

Cavalier-Smith, T., 1992. Origins of secondary metabolism. Ciba Found. Symp. 171, 64-80–7.

Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J., Morgan, M.R., Williamson, G., 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett. 436, 71–5.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013.

Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid. Redox Signal. 18, 1818–92.

Deng, J.W., Shon, J.-H., Shin, H.-J., Park, S.-J., Yeo, C.-W., Zhou, H.-H., Song, I.-S., Shin, J.-G., 2008. Effect of silymarin supplement on the pharmacokinetics of rosuvastatin. Pharm. Res. 25, 1807–14.

Dresser, G.K., Bailey, D.G., Leake, B.F., Schwarz, U.I., Dawson, P.A., Freeman, D.J., Kim, R.B., 2002. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. Clin. Pharmacol. Ther. 71, 11–20.

Drozdzik, M., Gröer, C., Penski, J., Lapczuk, J., Ostrowski, M., Lai, Y., Prasad, B., Unadkat, J.D., Siegmund, W., Oswald, S., 2014. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. Mol. Pharm. 11, 3547–55.

Edwards, D.J., Fitzsimmons, M.E., Schuetz, E.G., Yasuda, K., Ducharme, M.P., Warbasse, L.H., Woster, P.M., Schuetz, J.D., Watkins, P., 1999. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. Clin. Pharmacol. Ther. 65, 237–44.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., Domenech, E., 2014. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. Food Chem. 142, 135–43.

Estudante, M., Morais, J.G., Soveral, G., Benet, L.Z., 2013. Intestinal drug transporters: an overview. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1340–56.

Fan, L., Zhang, W., Guo, D., Tan, Z.-R., Xu, P., Li, Q., Liu, Y.-Z., Zhang, L., He, T.-Y., Hu, D.-L., Wang, D., Zhou, H.-H., 2008. The effect of herbal medicine baicalin on pharmacokinetics of rosuvastatin, substrate of organic anion-transporting polypeptide 1B1. Clin. Pharmacol. Ther. 83, 471–6.

Franke, A.A., Lai, J.F., Halm, B.M., 2014. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake. Arch. Biochem. Biophys. 559, 24–8.

Fuchikami, H., Satoh, H., Tsujimoto, M., Ohdo, S., Ohtani, H., Sawada, Y., 2006. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. Drug Metab. Dispos. 34, 577–82.

Fujita, D., Saito, Y., Nakanishi, T., Tamai, I., 2016. Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)2B1 Contributes to Gastrointestinal Toxicity of Anticancer Drug SN-38, Active Metabolite of Irinotecan Hydrochloride. Drug Metab. Dispos. 44, 1–7.

Giacomini, K.M., Sugiyama, Y., 2011. Membrane transporters and drug response. In: Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (Ed.), Goodman and Gilman's Pharmacological basis of

therapeutics. 12th edition. McGraw Hill Companies, New York, s. 89-121. ISBN 978-0-07-162442-8

Glaeser, H., Bujok, K., Schmidt, I., Fromm, M.F., Mandery, K., 2014. Organic anion transporting polypeptides and organic cation transporter 1 contribute to the cellular uptake of the flavonoid quercetin. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 387, 883–91.

Gong, I.Y., Kim, R.B., 2013. Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response. Drug Metab. Pharmacokinet. 28, 4–18.

Grosser, G., Döring, B., Ugele, B., Geyer, J., Kulling, S.E., Soukup, S.T., 2015. Transport of the soy isoflavone daidzein and its conjugative metabolites by the carriers SOAT, NTCP, OAT4, and OATP2B1. Arch. Toxicol. 89, 2253–63.

Hagenbuch, B., Stieger, B., 2013. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. Mol. Aspects Med. 34, 396–412.

Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R., 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. J. Agric. Food Chem. 47, 2274–9.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther. 96, 67–202.

Heinonen, S.M., Hoikkala, A., Wähälä, K., Adlercreutz, H., 2003. Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 87, 285–99.

Ho, R.H., Tirona, R.G., Leake, B.F., Glaeser, H., Lee, W., Lemke, C.J., Wang, Y., Kim, R.B., 2006. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. Gastroenterology 130, 1793–806.

Hoffmann, U., Kroemer, H.K., 2004. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. Drug Metab. Rev. 36, 669–701.

Chen, C., Wu, Z.-T., Ma, L.-L., Ni, X., Lin, Y.-F., Wang, L., Chen, K.-P., Huang, C., Pan, G., 2015. Organic anion-transporting polypeptides contribute to the hepatic uptake of berberine. Xenobiotica. 45, 1138–46.

Choudhuri, S., Klaassen, C.D., 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, 231–59.

International Transporter Consortium, Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z.,

Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, L., 2010. Membrane transporters in drug development. Nat. Rev. Drug Discov. 9, 215–36.

Jaganathan, S.K., Mandal, M., 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. J. Biomed. Biotechnol. 2009, 830616.

Joannou, G.E., Kelly, G.E., Reeder, A.Y., Waring, M., Nelson, C., 1995. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 54, 167–84.

Kašparovská, J., Dadáková, K., Lochman, J., Hadrová, S., Křížová, L., Kašparovský, T., 2017. Changes in equol and major soybean isoflavone contents during processing and storage of yogurts made from control or isoflavone-enriched bovine milk determined using LC-MS (TOF) analysis. Food Chem. 222, 67–73.

Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T.Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž., 2013. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. Food Chem. 138, 32–40.

Keiser, M., Kaltheuner, L., Wildberg, C., Müller, J., Grube, M., Partecke, L.I., Heidecke, C.-D., Oswald, S., 2017. The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers. J. Pharm. Sci. 106, 2657–2663.

Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K., Watanabe, S., 1998. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. J. Epidemiol. 8, 168–75.

Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. Pharmacol. Rev. 62, 1–96.

Ko, K.-P., 2014. Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. Asian Pac. J. Cancer Prev. 15, 7001–10.

Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., Tamai, I., 2003. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. J. Pharmacol. Exp. Ther. 306, 703–8.

Köck, K., Xie, Y., Hawke, R.L., Oberlies, N.H., Brouwer, K.L.R., 2013. Interaction of silymarin flavonolignans with organic anion-transporting polypeptides. Drug Metab. Dispos. 41, 958–65.

Koepsell, H., 2013. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and

zwitterions. Mol. Aspects Med. 34, 413–35.

Kondo, A., Narumi, K., Ogura, J., Sasaki, A., Yabe, K., Kobayashi, T., Furugen, A., Kobayashi, M., Iseki, K., 2017. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) 2B1 contributes to the cellular uptake of theaflavin. Drug Metab. Pharmacokinet. 32, 145–150.

König, J., Müller, F., Fromm, M.F., 2013. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. Pharmacol. Rev. 65, 944–66.

Kovacsics, D., Patik, I., Özvegy-Laczka, C., 2017. The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 13, 409–424.

Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. 2013, 162750.

Landete, J.M., 2013. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 53, 706–21.

Larkin, T., Price, W.E., Astheimer, L., 2008. The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48, 538–52.

Lee, W., Glaeser, H., Smith, L.H., Roberts, R.L., Moeckel, G.W., Gervasini, G., Leake, B.F., Kim, R.B., 2005. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. J. Biol. Chem. 280, 9610–7.

Li, Y., Paxton, J.W., 2013. The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 9, 267–85.

Li, Y., Revalde, J., Paxton, J.W., 2017. The effects of dietary and herbal phytochemicals on drug transporters. Adv. Drug Deliv. Rev. 116, 45–62.

Lown, K.S., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Janardan, S.K., Adair, C.H., Fortlage, L.A., Brown, M.B., Guo, W., Watkins, P.B., 1997. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. J. Clin. Invest. 99, 2545–53.

Lu, X.-Y., Sun, D.-L., Chen, Z.-J., Chen, T., Li, L.-P., Xu, Z.-H., Jiang, H.-D., Zeng, S., 2010. Relative contribution of small and large intestine to deglycosylation and absorption of flavonoids from Chrysanthemun morifolium extract. J. Agric. Food Chem. 58, 10661–7.

Mandery, K., Balk, B., Bujok, K., Schmidt, I., Fromm, M.F., Glaeser, H., 2012. Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. Eur. J. Pharm. Sci. 46, 79–85.

Mandery, K., Bujok, K., Schmidt, I., Keiser, M., Siegmund, W., Balk, B., König, J., Fromm, M.F., Glaeser, H., 2010. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the

function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. Biochem. Pharmacol. 80, 1746–53.

Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmaco- and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps. Crit. Rev. Toxicol. 44, 696–724.

McKenney, J.M., 2003. Pharmacologic Characteristics of Statins. Clin. Cardiol. 26, 32–38.

McTaggart, F., Buckett, L., Davidson, R., Holdgate, G., McCormick, A., Schneck, D., Smith, G., Warwick, M., 2001. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. Am. J. Cardiol. 87, 28B–32B.

Meier, Y., Eloranta, J.J., Darimont, J., Ismair, M.G., Hiller, C., Fried, M., Kullak-Ublick, G.A., Vavricka, S.R., 2007. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. Drug Metab. Dispos. 35, 590–4.

Misaka, S., Yatabe, J., Müller, F., Takano, K., Kawabe, K., Glaeser, H., Yatabe, M.S., Onoue, S., Werba, J.P., Watanabe, H., Yamada, S., Fromm, M.F., Kimura, J., 2014. Green tea ingestion greatly reduces plasma concentrations of nadolol in healthy subjects. Clin. Pharmacol. Ther. 95, 432–8.

Müller, J., Keiser, M., Drozdzik, M., Oswald, S., 2017. Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update. Biol. Chem. 398, 175–192.

Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y., 2000. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. J. AOAC Int. 83, 635–50.

Nakanishi, T., Tamai, I., 2015. Interaction of Drug or Food with Drug Transporters in Intestine and Liver. Curr. Drug Metab. 16, 753–64.

Navrátilová, L., Applová, L., Horký, P., Mladěnka, P., Pávek, P., Trejtnar, F., 2018. Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter. Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.

Nies, A.T., Damme, K., Kruck, S., Schaeffeler, E., Schwab, M., 2016. Structure and function of multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) and their relevance to drug therapy and personalized medicine. Arch. Toxicol. 90, 1555–84.

Nigam, S.K., Bush, K.T., Martovetsky, G., Ahn, S.-Y., Liu, H.C., Richard, E., Bhatnagar, V., Wu, W., 2015. The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. Physiol. Rev. 95, 83–123.

Ogura, J., Koizumi, T., Segawa, M., Yabe, K., Kuwayama, K., Sasaki, S., Kaneko, C., Tsujimoto, T.,

Kobayashi, M., Yamaguchi, H., Iseki, K., 2014. Quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) stimulates transport of organic anion compounds mediated by organic anion transporting polypeptide 2B1. Biopharm. Drug Dispos. 35, 173–82.

Ötles, S., Senturk, A., 2014. Food and drug interactions: a general review. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 13, 89–102.

Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. J. Nutr. Sci. 5, e47.

Parvez, M.M., Jung, J.A., Shin, H.J., Kim, D.H., Shin, J.-G., 2016. Characterization of 22 Antituberculosis Drugs for Inhibitory Interaction Potential on Organic Anionic Transporter Polypeptide (OATP)-Mediated Uptake. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 3096–105.

Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., Indiveri, C., 2013. OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development. J. Biomol. Screen. 18, 851–67.

Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M., Walchshofer, N., 2005. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. Nat. Prod. Rep. 22, 504–15.

Rhodes, M.J.C., 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. Plant Mol. Biol. 24, 1–20.

Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B., 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. Br. J. Pharmacol. 165, 1260–87.

Roth, M., Timmermann, B.N., Hagenbuch, B., 2011. Interactions of green tea catechins with organic anion-transporting polypeptides. Drug Metab. Dispos. 39, 920–6.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R.M., 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (Theobroma cacao). J. Mass Spectrom. 38, 35–42.

Sato, T., Ito, H., Hirata, A., Abe, T., Mano, N., Yamaguchi, H., 2018. Interactions of crizotinib and gefitinib with organic anion-transporting polypeptides (OATP)1B1, OATP1B3 and OATP2B1: gefitinib shows contradictory interaction with OATP1B3. Xenobiotica. 48, 73–78.

Setchell, K.D.R., Clerici, C., 2010. Equol: history, chemistry, and formation. J. Nutr. 140, 1355S–62S.

Shams, T., Lu, X., Zhu, L., Zhou, F., 2018. The inhibitory effects of five alkaloids on the substrate transport mediated through human organic anion and cation transporters. Xenobiotica. 48, 197–205.

Shirasaka, Y., Shichiri, M., Mori, T., Nakanishi, T., Tamai, I., 2013. Major active components in grapefruit, orange, and apple juices responsible for OATP2B1-mediated drug interactions. J.

Pharm. Sci. 102, 3418–26.

Shitara, Y., Maeda, K., Ikejiri, K., Yoshida, K., Horie, T., Sugiyama, Y., 2013. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. Biopharm. Drug Dispos. 34, 45–78.

Sirtori, C.R., 2014. The pharmacology of statins. Pharmacol. Res. 88, 3–11.

Smith, D.E., Clémençon, B., Hediger, M.A., 2013. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. Mol. Aspects Med. 34, 323–36.

Song, T., Barua, K., Buseman, G., Murphy, P.A., 1998. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. Am. J. Clin. Nutr. 68, 1474S–1479S.

Stieger, B., Hagenbuch, B., 2014. Organic anion-transporting polypeptides. Curr. Top. Membr. 73, 205–32.

Szeja, W., Grynkiewicz, G., Rusin, A., 2017. Isoflavones, their Glycosides and Glycoconjugates. Synthesis and Biological Activity. Curr. Org. Chem. 21, 218–235.

Takanaga, H., Ohnishi, A., Matsuo, H., Sawada, Y., 1998. Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. Biol. Pharm. Bull. 21, 1062–6.

Takano, M., Yumoto, R., Murakami, T., 2006. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. Pharmacol. Ther. 109, 137–61.

Tamai, I., 2012. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 508–14.

Tapaninen, T., Neuvonen, P.J., Niemi, M., 2010. Grapefruit juice greatly reduces the plasma concentrations of the OATP2B1 and CYP3A4 substrate aliskiren. Clin. Pharmacol. Ther. 88, 339–42.

Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M., Kreiger, N., 2006. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. Nutr. Cancer 54, 184–201.

Varma, M. V, Rotter, C.J., Chupka, J., Whalen, K.M., Duignan, D.B., Feng, B., Litchfield, J., Goosen, T.C., El-Kattan, A.F., 2011. pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. Mol. Pharm. 8, 1303–13.

Vildhede, A., Nguyen, C., Erickson, B.K., Kunz, R.C., Jones, R., Kimoto, E., Bourbonais, F., Rodrigues, A.D., Varma, M.V.S., 2018. Comparison of Proteomic Quantification Approaches

for Hepatic Drug Transporters: Multiplexed Global Quantitation Correlates with Targeted Proteomic Quantitation. Drug Metab. Dispos. 46, 692–696.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Alvarez, J.A., 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J. Food Sci. 73, R117-24.

Wabaidur, S.M., Ahmed, Y.B.H., Alothman, Z.A., Obbed, M.S., AL-Harbi, N.M., AL-Turki, T.M., 2015. Ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry method for the simultaneous determination of phenolic constituents in honey from various floral sources using multiwalled carbon nanotubes as extraction sorbents. J. Sep. Sci. 38, 2597–606.

Walsh, K.R., Haak, S.J., Bohn, T., Tian, Q., Schwartz, S.J., Failla, M.L., 2007. Isoflavonoid glucosides are deconjugated and absorbed in the small intestine of human subjects with ileostomies. Am. J. Clin. Nutr. 85, 1050–6.

Wang, Q., Ge, X., Tian, X., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, P., 2013. Soy isoflavone: The multipurpose phytochemical (Review). Biomed. reports 1, 697–701.

Wang, X., Wolkoff, A.W., Morris, M.E., 2005. Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators. Drug Metab. Dispos. 33, 1666–72.

Wen, F., Shi, M., Bian, J., Zhang, H., Gui, C., 2016. Identification of natural products as modulators of OATP2B1 using LC-MS/MS to quantify OATP-mediated uptake. Pharm. Biol. 54, 293–302.

Witkowska, A.M., Zujko, M.E., Waśkiewicz, A., Terlikowska, K.M., Piotrowski, W., 2015. Comparison of Various Databases for Estimation of Dietary Polyphenol Intake in the Population of Polish Adults. Nutrients 7, 9299–308.

Wu, L.-X., Guo, C.-X., Chen, W.-Q., Yu, J., Qu, Q., Chen, Y., Tan, Z.-R., Wang, G., Fan, L., Li, Q., Zhang, W., Zhou, H.-H., 2012. Inhibition of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 by quercetin: an in vitro and in vivo assessment. Br. J. Clin. Pharmacol. 73, 750–7.

www.bioparadigms.org, dostupné na: http://slc.bioparadigms.org/ [citováno 4. 3. 2018]

Yao, L., Jiang, Y., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K., 2004. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys. J. Agric. Food Chem. 52, 210–4.

Young, J.D., Yao, S.Y.M., Baldwin, J.M., Cass, C.E., Baldwin, S.A., 2013. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. Mol. Aspects Med. 34, 529–47.

Yuan, J.-P., Wang, J.-H., Liu, X., 2007. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora--implications for health. Mol. Nutr. Food Res. 51, 765–81.

Zhou, S.-F., Wang, L.-L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W., Li, C.G., Li, Y., 2008. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. Curr. Med. Chem. 15, 1981–2039.

10. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH PRACÍ

10.1. Odborné články vztahující se k tématu dizertační práce

Navrátilová L., Applová L., Horký P., Mladěnka P., Pávek P., Trejtnar F. **Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2018;391(10):1063-1071 (IF = 2,24)

Navrátilová L., Ramos Mandíková J., Pávek P., Mladěnka P., Trejtnar F. **Honey flavonoids inhibit hOATP2B1 and hOATP1A2 transporters and hOATP-mediated rosuvastatin cell uptake *in vitro*.** Xenobiotica 2018;48(7):745-755 (IF = 1,93)

10.2. Další impaktované odborné články

Zitko J., Janďourek O., Paterová P., Navrátilová L., Kuneš J., Vinšová J., Doležal M. **Design, synthesis and antimycobacterial activity of hybrid molecules combining pyrazinamide with 4-phenylthiazol-2-amine scaffold.** MedChemComm. 2018;9(4):685-696 (IF = 2,61)

Semelková L., Janošcová P., Fernandes C., Bouz G., Janďourek O., Konečná K., Paterová P., Navrátilová L., Kuneš J., Doležal M., Zitko J. **Design, synthesis, antimycobacterial evaluation, and in silico studies of 3-(phenylcarbamoyl)-pyrazine-2-carboxylic acids.** Molecules 2017;22(9) (IF = 2,86)

Semelková L., Janďourek O., Konečná K., Paterová P., Navrátilová L., Trejtnar F., Kubíček V., Kuneš J., Doležal M., Zitko J. **3-Substituted N-benzylpyrazine-2-carboxamide derivatives: Synthesis, antimycobacterial and antibacterial evaluation.** Molecules 2017;22(3) (IF = 2,86)

Krátký M., Štěpánková Š., Vorčáková K., Navrátilová L., Trejtnar F., Stolaříková J., Vinšová J. **Synthesis of readily available fluorophenylalanine derivatives and investigation of their biological aktivity.** Bioorg Chem. 2017;71:244–256 (IF = 3,23)

Janďourek O., Tauchmann M., Paterová P., Konečná K., Navrátilová L., Kubíček V., Holas O., Zitko J., Doležal M. **Synthesis of novel pyrazinamide derivatives based on 3-chloropyrazine-2-carboxamide and their antimicrobial evaluation.** Molecules 2017;22(2) (IF = 2,86)

Paraskevopoulos G., Monteiro S., Vosátka R., Krátký M., Navrátilová L., Trejtnar F., Stolaříková J., Vinšová J. **Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity.** Bioorg Med Chem. 2017;25(4):1524–1532 (IF = 2,93)

Zitko J., Servusová-Vaňásková B., Paterová P., Navrátilová L., Trejtnar F., Kuneš J., Doležal M. **Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides.** Chem Pap. 2016;70(5):649–657 (IF = 1,33)

Mandíková J., Volková M., Pávek P., Navrátilová L., Hyršová L., Janeba Z., Pavlík J., Bárta P., Trejtnar F. **Entecavir interacts with influx transporters hOAT1, hCNT2, hCNT3, but not with hOCT2: The potential for renal transporter-mediated cytotoxicity and drug-drug interactions.** Front Pharmacol. 2016;6:304 (IF = 4,42)

Volková M., Mandíková J., Bárta P., Navrátilová L., Lázníčková A., Trejtnar F. **The *in vivo* disposition and *in vitro* transmembrane transport of two model radiometabolites of DOTA-conjugated receptor-specific peptides labelled with (177) Lu.** J Labelled Comp Radiopharm. 2015;58(13-14):483–489 (IF = 1,27)

10.3. Výstupy na odborných konferencích

Janoušek J., Bárta P., Navrátilová L., Trejtnar F. **The influence of 99mTc-labeling on the binding affinity of anti-VEGFR2 human monoclonal antibody ramucirumab.** 67. Česko-slovenské farmakologické dni, 2.10. – 4.10. 2017, Stará Lesná, Slovensko (poster)

Navrátilová L., Applová L., Mladěnka P., Pávek P., Trejtnar F. **Interactions of isoflavonoids daidzin, genistin and their metabolites with hOATP2B1 and hOATP1A2 *in vitro*.** BioMedical Transporters 2017, 6. 8. 2017 – 10. 8. 2017, Lausanne, Švýcarsko (poster)

Navrátilová L., Ramos Mandíková J., Lněničková K., Trejtnar F. **Flavonoids as inhibitors of OATP-mediated rosuvastatin intestinal transport.** XVII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, 30. 5. 2017 – 1. 6. 2017, Milovy, ČR (poster)

Navrátilová L., Lněničková K., Ramos Mandíková J., Janoušek J., Trejtnar F. **Comparison of rosuvastatin uptake via intestinal OATP transporters.** 66. Česko-slovenské farmakologické dny, 13. 9. – 16. 9. 2016, Brno, ČR (poster)

Janoušek J., Bárta P., Navrátilová L., Trejtnar F. **Comparison of selected methods for radiolabeling of monoclonal antibody ramucirumab.** 66. Česko-slovenské farmakologické dny, 13. 9. – 16. 9. 2016, Brno, ČR (poster)

Navrátilová L., Ramos Mandíková J., Janoušek J., Trejtnar F. **Cytotoxicity of selected flavonoids mediated by intestinal OATP transporters.** TOXCON 2016, 21st Interdisciplinary Toxicological Conference, 22. 6. – 24. 6. 2016, Stará Lesná, Slovensko (poster)

Navrátilová L., Ramos Mandíková J., Trejtnar F. **Interactions of the transporters hOATP2B1 and hOATP1A2 with selected flavonoids.** Meet the Experts: Transporter Conference – Budapest 2016, 11. 5. – 13. 5. 2016, Budapešť, Maďarsko (poster)

Navrátilová L., Ramos Mandíková J., Trejtnar F. **Interactions of intestinal influx transporter hOATP1A2 with selected flavonoids.** 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, 9. 2. – 10. 2. 2016, Hradec Králové, ČR (přednáška)

Navrátilová L., Mandíková J., Trejtnar F. **Interactions of selected flavonoids with the transporters hOATP2B1 and hOATP1A2.** 65. Farmakologické dny, 16. 9. – 18. 9. 2015, Praha, ČR (poster)
- čestné uznání v soutěži o nejlepší poster (EPHAR Poster Award) od ČSEKFT

Navrátilová L., Mandíková J., Trejtnar F. **Interactions of selected flavonoids with the transporter hOATP2B1.** 13th European ISSX Meeting, 22. 6. – 25. 6. 2015, Glasgow, Skotsko, UK (poster)

Carazo A., Navrátilová L., Smutný T., Berka K., Pávek P. **New methodological approaches for distinguishing direct and indirect constitutive androstane receptor (CAR) activators.** 13th European ISSX Meeting, 22. 6. – 25. 6. 2015, Glasgow, Skotsko, UK (poster)

Navrátilová L., Mandíková J., Trejtnar F. **Interaction of the intestinal transporter hOATP2B1 with selected natural compounds.** 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference FAF UK, 3. 2. – 4. 2. 2015, Hradec Králové, ČR (přednáška)

Navrátilová L., Mandíková J., Trejtnar F. **Interakce steviolu a steviosidu s vybranými transportéry pro organické anionty exprimovanými v ledvinách a střevě.** 64. Farmakologické dny, 25. 6. – 27. 6. 2014, Martin, Slovensko (poster + přednáška)

11. PŘÍLOHY

Recenzované odborné články publikované v časopisech s impakt faktorem vztahující se k tématu dizertační práce