

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**Role lékových transportérů v aktivaci pregnanového X
receptoru**

Diplomová práce

PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Kateřina Kejvalová

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

V Hradci Králové

Kateřina Kejvalová

Poděkování

Tímto bych chtěla velice poděkovat mé vedoucí diplomové práce PharmDr. Lucii Smutné, Ph.D. za její odborné vedení, ochotu a milé vystupování při zpracovávání diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Kateřina Kejvalová

Školitel: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Název diplomové práce: Role lékových transportérů v aktivaci pregnanového X receptoru

Nukleární pregnanový X receptor (PXR) se podílí na udržování homeostázy endogenních látek, ale také na regulaci exkrece látek exogenních. Aktivací PXR dochází k regulaci exprese transportních proteinů a biotransformačních enzymů I. a II. fáze. Vzhledem k vysoké flexibilitě ligand vázající domény PXR, může být aktivovaný širokou škálou různých xenobiotik. Mezi takové látky spadá např. rifampicin, který jakožto modelový agonista PXR způsobuje klinicky významné lékové interakce. Rifampicin však není za fyziologických podmínek stabilní a dochází ke vzniku degradačních produktů (rifampicin chinon, 25-desacetylriřampicin, 3-formylrifamycin SV a rifampicin N-oxid).

Cílem našich experimentů bylo porovnat mezidruhovou aktivaci PXR rifampicinu a jeho derivátů u člověka, opice, myši a potkana. K tomuto účelu byly provedené gene reporter experimenty s využitím HepG2 buněčné linie. Statisticky významné výsledky v aktivaci PXR byly pozorovány u lidského hPXR a opičího oPXR u všech derivátů rifampicinu s výjimkou 25-desacetylriřampicinu. Podobnost v aktivaci hPXR a oPXR vykazovali všechny deriváty rifampicinu, avšak v případě oPXR docházelo k několikanásobně nižší aktivaci reportérového konstruktů. Potenciál rifampicinu a jeho derivátů transportovat se pomocí MDR1 byl stanovován nepřímě, opět s využitím metody gene reporter assay provedené na buněčné linii HepG2 transfekované MDR1 nebo prázdným vektorem. Afinitu k MDR1 transportéru jsme pozorovali u rifampicinu, rifampicin chinonu, rifampicin N-oxidu, 3-formylrifamycinu SV a 25-desacetylriřampicinu.

Námi studované interakce rifampicinu a jeho derivátů s PXR a MDR1 transportérem hrají významnou roli v lékových interakcích, dosud však nebyly podrobněji zkoumány.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Kateřina Kejvalová

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Title of diploma thesis: The role of drug transporters in activation of pregnane X receptor

The nuclear pregnane X receptor (PXR) is involved in maintaining the homeostasis of endogenous substances as well as in regulation of excretion of exogenous substances. PXR activation regulates the expression of transport and biotransformation enzymes I. and II. phase. Due to the high flexibility of PXR ligand binding domain, it can be activated by a wide range of xenobiotics. Including e.g., rifampicin, well-known PXR agonist causes clinically significant drug-drug interactions. However, rifampicin is not stable under physiological conditions and degradation occurs (into rifampicin quinone, 25-desacetylrifampicin, 3-formylrifamycin SV and rifampicin N-oxide).

The aim of our experiments was to compare the interspecies activation of PXR (human, monkey, mouse and rat) by rifampicin and its derivatives. Hence, gene reporter experiments were performed using the HepG2 cell line. Statistically significant results in PXR activation were observed for human hPXR and monkey oPXR for all rifampicin derivatives except 25-desacetylrifampicin. Similarity in the activation of hPXR and oPXR was shown by all rifampicin derivatives, but in the case of oPXR there was several times lower activation of the reporter construct. The potential of rifampicin and its derivatives to be transported by MDR1 was determined indirectly using the gene reporter assay method performed on the HepG2 cell line transfected with MDR1 or an empty vector. The affinity to the MDR1 transporter was observed in the case of rifampicin, rifampicin quinone, rifampicin N-oxide, 3-formylrifamycin SV and 25-desacetylrifampicin.

The studied interactions of rifampicin and its derivatives with PXR and MDR1 transporter play an important role in the drug-drug interactions but have not been investigated in more details so far.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK.....	1
2	ÚVOD.....	5
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1	FARMAKOKINETICKÉ DĚJE	7
3.1.1	<i>Metabolizmus.....</i>	7
3.1.2	<i>Exkrece</i>	9
3.1.3	<i>Cytochrom P450.....</i>	9
3.1.4	<i>CYP3A4</i>	12
3.1.5	<i>Jaterní exkrece.....</i>	15
3.1.6	<i>Jaterní transportní proteiny.....</i>	16
3.1.7	<i>ABC transportéry.....</i>	17
3.1.8	<i>P-glykoprotein (MDR1/ABCB1).....</i>	18
3.2	NUKLEÁRNÍ RECEPTORY	23
3.2.1	<i>Pregnanový X receptor (PXR).....</i>	24
3.3	RIFAMPICIN.....	27
3.3.1	<i>Deriváty rifampicinu.....</i>	29
4	CÍL PRÁCE.....	30
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	31
5.2	EXPERIMENTÁLNÍ METODY	34
5.2.1	<i>Kultivace a pasážování HepG2 buněk.....</i>	34
5.2.2	<i>Metoda gene reporter assay.....</i>	35
5.2.3	<i>Dual-luciferase reporter assay.....</i>	36
5.2.4	<i>Statistické zpracování dat.....</i>	40
6	VÝSLEDKY	41
7	DISKUSE.....	46
8	ZÁVĚR	50
9	LITERATURA.....	51

1 Seznam zkratek

AADAC	lidská arylacetamid deacetylasa
ABC	ATP-binding cassette
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
ADP	adenosindifosfát
AF-1	activator function-1
AP-1	activator protein 1
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	breast cancer resistance protein
BSEP	bile salt export pump
C/EBP	CAAT enhancer binding proteins
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CCRP	CAR cytoplasmatic retention protein
CYP	cytochrom
DBD	DNA-vázající doména
DMEM	dulbeccos modified eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DR4	direct repeats
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	kyselina edetová
ER	estrogenní receptor

ER6	everted repeats
FXR	farnesoidní X receptor
GR	glukokortikoidní receptor
GST	glutathion S-transferasa
HEB	hematoencefalická bariéra
HMC-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
hPXR	lidský pregnanový X receptor
HSE	heat shock element
Hsp90	heat shock protein 90
Inr	initiator element
IR6	inverted repeats
LBD	ligand-binding domain
LBP	ligand binding pocket
LXR	játerní X receptor
MDR1	transportér mnohočetné lékové rezistence 1
MEF1	MDR1 promoter-enhancing faktor 1
mPXR	myšší pregnanový X receptor
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	messenger ribonucleotide acid
MRP	multidrug resistance-associated protein
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAT2	N-acetyltransferasa 2
NBD NBF	hydrofilní nukleotid vázající doménu

NCoR2	nukleární receptorový co-represor 2
NF-Y	nukleární transkripční faktor Y
NK	nukleová kyselina
NR1I2	nukleární receptor podskupiny 1, skupiny I a člen 2
NTCP transportér	Na ⁺ taurocholate cotransporter polypeptide
NTD	N-terminalní doména
OAT	organický aniontový transportér
OATP	organický aniontový transportní polypeptid
OCT	organický kationtový transportér
PBS	fosfátový pufr
PCN	pregnenolone 16 α -carbonitrile
P-gp	P-glykoprotein
p53	protein 53
P _i ,	fosfát
PPAR	receptory aktivované proliferátory peroxizomů
PXR	pregnanový X receptor
PXRE	responsibilní element pregnanového X receptoru
RAR	receptor retinoidní kyseliny
RIF	rifampicin
RXR	retinoidní X receptor
RXR α	retinoidní receptor α
SLC	solute carrier family
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors

SRC-1	steroidní receptorový co-aktivátor 1
SULT	sulfotransferasa
TMD	hydrofobní transmembránová doména
TR	tyroidní receptor
UDP	uridinfosfát kyseliny glukuronové
UGT	glukuronosultransferasa
XREM	xenobiotic responsive enhancer module

2 Úvod

Enzymy cytochromu P450 (CYP450) mají hlavní roli při biotransformaci léčiv a endogenních látek v organismu. Účastní se až 75 % veškerých metabolických dějů a podílejí se na biosyntéze steroidních hormonů, cholesterolu, prostacyklinů a tromboxanu A₂. V lidském organismu je enzym CYP3A4 nejdůležitější izoformou cytochromu P450 zodpovědný za biotransformaci více než 30 % klinicky využívaných léčiv, někteří autoři uvádí podíl na metabolismu až z 50 %. Biotransformace ovlivňuje biodostupnost perorálně podávaných léčiv, a tím upravuje jejich koncentrace v krvi. Studie potvrdily přes 1000 různých sloučenin, zahrnujících i inhibitory a induktory enzymu, interagujících s izoformou CYP3A4 (Švihovec *et al.* 2018, Baylon *et al.* 2013, Chen *et al.* 2006).

Transportér MDR1 (multidrug resistance protein 1), označován též jako P-glykoprotein (P-gp, kde P znamená permeabilitu), patří do podrodiny ABCB efluxních transportérů podílejících se na farmakokinetických dějích uvnitř organismu. Jeho hlavní fyziologická funkce spočívá v ochraně orgánů a plodu před exogenně podanými látkami a zajišťuje exkreci xenobiotik a endogenních látek. Zvýšená exprese MDR1 transportéru je důvodem vzniku mnohočetné lékové rezistence a může značně zkomplikovat terapii (Dostálek *et al.* 2006, Choudhuri *et al.* 2006, Staudinger *et al.* 2013, Fung *et al.* 2009, Yano *et al.* 2018).

K interakci na P-gp transportéru dochází mezi mnoha strukturně odlišnými molekulami. Inhibitory MDR1 transportéru ovlivňují jeho funkci kompetitivní/ nekompetitivní/ alosterickou vazbou na vazebné místa přenašeče. V důsledku různě silné inhibice MDR1 transportéru dochází k řadě lékových interakcím, které mohou být potenciálně závažné v důsledku zvýšení koncentrace léčiv v organismu. Nadměrná indukce exprese MDR1 přenašeče způsobená induktory má za následek zvýšenou exkreci a snížení plazmatické koncentrace léčiv v krvi (Fung *et al.* 2009, Hoosain *et al.* 2015, Ganesan *et al.* 2021).

Rifampicin je považován za silný induktor biotransformačních enzymů léčiva a membránových transportérů podílejících se na transportu léčiv. Významně ovlivňuje výsledný terapeutický efekt léčiv a způsobuje lékové interakce. Mechanismus indukce CYP enzymů spočívá v aktivaci pregnanového X receptoru (PXR) a zvýšené expresi CYP enzymů, zejména CYP3A4, které jsou významnými cílovými geny PXR. Dalším

z významných cílových genů PXR je *ABCB1*, gen kódující MDR1 transportér, který je mimo jiné významně exprimovaný ve střevě. Aktivací PXR tedy dochází ke zvýšení exprese MDR1 a tím se snižuje biologická dostupnost léčiv (Chen *et al.* 2006, Bulutoglu *et al.* 2020).

3 Teoretická část

3.1 Farmakokinetické děje

Pohyb léčiv v organismu od podání do jeho vyloučení významně ovlivňuje účinek léčiv. Akronym ADME popisuje jednotlivé farmakokinetické procesy probíhající v organismu. Vznikla spojením počátečních písmen jednotlivých farmakokinetických fází: **A**bsorpce, **D**istribuce, **M**etabolismus, **E**xkrece. Cílem farmakokinetiky léčiv je znázornit, jak koncentrace léčiv a jejich metabolitů ovlivňuje reakce organismu na podané léčivo. Absorpcí se rozumí proces, během kterého dochází k pronikání léčiva z místa podání do systémového krevního oběhu. Biologická dostupnost léčiv podávaných enterální cestou podléhá efektu prvního průchodu játry (first-pass effect), kdy dochází v různé míře k metabolismu na neúčinné nebo méně účinné metabolity. Distribuce léčiva krevní cestou do tkání je obousměrný transport probíhající zejména v krevních kapilárách. Transport do CNS regulují i speciální transportéry. Transportní protein MDR1 (též označován jako *ABCB1* nebo P-glykoprotein) fungující jako obranný mechanismus, transportuje opačným směrem léčiva a cizorodé látky, které pronikly přes HEB (Švihovec *et al.* 2018, Lüllmann *et al.* 2007).

3.1.1 Metabolismus

Metabolismus společně s exkrečními mechanismy tvoří zásadní eliminační procesy v organismu. Většina léčiv (xenobiotik) podstupuje po vstupu do organismu chemickou přeměnu neboli biotransformaci. K biotransformaci může dojít již na úrovni ústní dutiny, nebo po distribuci léčiva krevní cestou do orgánů a tkání, jako jsou játra, gastrointestinální trakt, plíce, ledviny, mozek a placenta. Detoxikační cestou biotransformace se z léčiv stávají polárnější (hydrofilní) molekuly a mohou tak být snadno vyloučeny žlučí nebo močí. Z farmakologického hlediska může při chemické přeměně docházet k biodeaktivaci, kdy změnou struktury léčiva se sníží až vymizí původní terapeutický účinek. Naopak bioaktivací se u vzniklého metabolitu zvýší terapeutický účinek, který může být pro organismus až toxický. Proléčiva (*prodrugs*) je označení pro léčiva podávané ve farmakologicky neúčinné formě, které se biotransformací v místě účinku stávají účinnými. (Zhao *et al.* 2021, Dostálek *et al.* 2006, Lincová *et al.* 2007).

Metabolickou přeměnu léčiv lze rozdělit na dvě fáze. Biotransformační reakce I. fáze vedou k zavedení nové funkční skupiny nebo změně původní za účelem zvýšit polaritu molekuly. Nejčastěji enzymy katalyzují reakce, při kterých dochází zejména k oxidaci a redukci nebo k hydrolýze esterové vazby. Během reakcí I. fáze biotransformace tak vzniká molekula léčiva obsahující ve své struktuře hydrofilní funkční skupiny jako např. -OH, -SH, -COOH nebo -NH₂. Hlavní a nejdůležitější enzymy, podílející se na I. fázi biotransformace xenobiotik, patří do nadrodiny cytochromu P450 (CYP450), která je spojována až se třemi čtvrtinami biotransformačních dějů v organismu (Choudhuri *et al.* 2006, Lüllmann *et al.* 2007, Švihovec *et al.* 2018, Lincová *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2021).

Vzniklé metabolity z I. fáze pokračují do konjugační II. fáze biotransformace, která dává vzniku ještě polárnější molekuly. Enzymy katalyzují konjugační reakce metabolitu s malou endogenní sloučeninou. Během reakce dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi funkční skupinou metabolitu léčiva s konjugačním činidlem, kterým může být např. kyselina glukuronová, sulfát, acetát, glutathion, methionin a aminokyseliny. Enzymy konjugační fáze se označují za transferasy. Přenosem uridinfosfátu kyseliny glukuronové pomocí UDP glukuronosultransferasy (zkráceně UGT) vznikají glukuronidy. Konjugační fáze dále zahrnuje N-acetyltransferasu 2 (NAT2), sulfotransferasy (SULT), glutathion S-transferasy (GST). Minoritními reakcemi jsou konjugace metabolitů s aminokyselinami glycinem nebo glutaminem pomocí acyltransferas. Vzniklé metabolity z obou fází mohou přestoupit z hepatocytu zpátky do krve, nebo se pomocí jednoho z ABC-transportérů (ATP-binding-cassette transporter) vylučovat do žluči (Choudhuri *et al.* 2006, Lüllmann *et al.* 2007, Švihovec *et al.* 2018, Lincová *et al.* 2007).

Biotrasformační enzymy jsou strukturálně nespecifické a mohou se tak vyskytovat v různých formách lišící se strukturálními odchylkami, které vznikly na genetickém podkladě nebo postranskripční a postranlační modifikací. V obou fázích biotransformace nacházíme více či méně specifické substráty a inhibitory ovlivňující metabolismus. Xenobiotika se mohou při interakci s enzymy projevit jako substráty nebo inhibicí a indukci enzymů ovlivňovat biotransformaci (Ledvina *et al.* 2009, Lincová *et al.* 2007).

3.1.2 Exkrece

Poslední fází farmakokinetických dějů je exkrece neboli vyloučení léčiv z organismu v nezměněné formě nebo v podobě vzniklých metabolitů. Tento proces zcela neukončuje účinek vyloučeného léčiva, doba odeznění účinku závisí na mechanismu působení a souvisí se změnami vzniklými během přítomnosti léčiva v organismu. Eliminace léčiv se účastní mnoho orgánů, avšak mezi hlavní eliminační orgány patří ledviny a játra. Na ledvinné exkreci se podílí systém tří různých mechanismů. Glomerulární filtrací se sekretují molekuly s hmotností do 5000 Da, u molekul s vyšší molekulovou hmotností hraje roli jejich prostorové uspořádání a náboj. Kromě velikosti molekuly léčiv hraje roli i míra vazby látek na plazmatické bílkoviny. Tubulární sekrece probíhá proti koncentračnímu spádu pomocí membránových přenašečů eliminujících léčiva s vysokou vazbou na krevní bílkoviny. Proximální část tubulu zajišťuje aktivní transport exogenních a endogenních látek prostřednictvím specializovaných membránových transportérů. Tubulární reabsorpcí se snižuje exkrece, která probíhá hlavně pasivní difuzí lipofilních sloučenin. Významný vliv na reabsorpci ionizovaných látek má pH moči (Švihovec *et al.* 2018, Lincová *et al.* 2007).

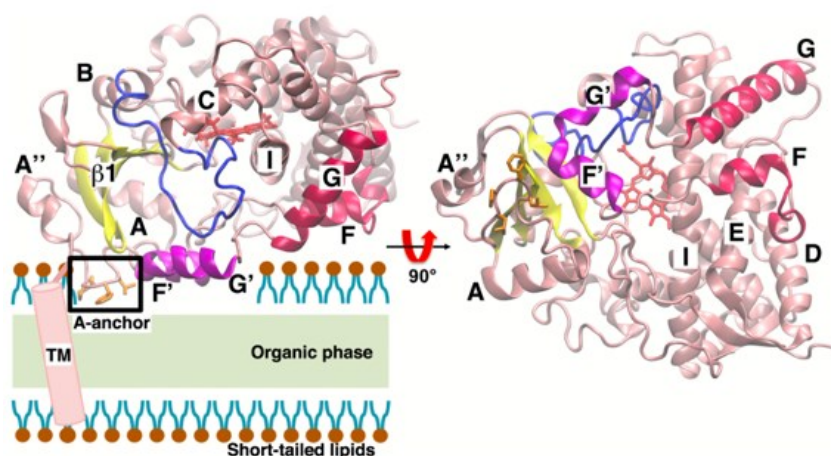
3.1.3 Cytochrom P450

Enzymy cytochromu P450 (CYP450) mají hlavní roli při metabolismu léčiv a endogenních látek v organismu. Účastní se až 75 % veškerých metabolických dějů a podílejí se na biosyntéze steroidních hormonů, cholesterolu, prostacyklinů a tromboxanu A₂. Enzymy cytochromu jsou přítomny prakticky v každé lidské tkáni. Nejvíce je metabolická aktivita soustředěna v játrech, ledvinách, plicích, gastrointestinálním traktu a v kůži. Na buněčné úrovni jsou enzymy CYP lokalizovány na membránách endoplazmatického retikula, mikrosomů popř. mitochondrií. Mikrozomy vznikají rozbitím endoplazmatického retikula (ER) a spojením zlomů do váčku o průměru 0,3 μm. Tyto váčky obsahují kromě CYP450 i další enzymy účastnící se metabolismu (Švihovec *et al.* 2018, Zhao *et al.* 2021, Lynch *et al.* 2007, Baylon *et al.* 2013).

Význam označení cytochromu P450 souvisí se strukturou enzymů. Struktura odpovídá hemoproteinům složených z okolo 400-500 aminokyselin dlouhé sekvence s atomem železa (hem) v aktivním místě enzymu (planární útvar). Absorpční maximum hemu je při vlnové délce 450 nm. CYP450 společně s monooxidásovým systémem tvoří

kovalentní vazbou s NADPH-cytochromem P450 reduktásou komplex v poměru (10:1), který je zdrojem elektronů. (Lincová *et al.* 2007, Lynch *et al.* 2007, Baylon *et al.* 2013).

V Protein Data Bank bylo dosud popsáno a uloženo okolo 104 jednotlivých struktur enzymů CYP450. Sekvence enzymů z rodiny CYP je z 40 % homologní a z 55 % sdílí identickou strukturu mezi enzymy jednotlivých podrodin. V každé molekule enzymu je v aktivním místě přítomný atom železa (hem), který je přístupný substrátům z okolí. Terciální struktura proteinových řetězců aminokyselin je stočena do 12 α helikálních řetězců a 4 β struktur skládaných listů. Lidský CYP450 je ukotven k membráně N-terminálním koncem transmembránového helikálního řetězce. Globulární proteinová část molekuly interaguje s lipofilním povrchem membrány a její orientace a směr je klíčová pro účinek se substráty (obr. 1). Substráty vstupují do aktivního místa enzymu v blízkosti F a G helikálních řetězců a změnou struktury této části molekuly může docházet ke změně substrátové specifity. Aktivní místo izoenzymu CYP3A4 je v porovnání s ostatními izoenzymy rozsáhlé a molekula obsahuje více vazebných míst, a tím umožňuje interagovat s větším množstvím substrátů (Zhao *et al.* 2021, Baylon *et al.* 2013, Chen *et al.* 2006).



Obr. 1 Prostorová struktura CYP3A4 (Baylon *et al.* 2013).

Xenobiotikum se v monooxygenásovém cyklu P450 naváže na železitý ion CYP450 a přijme elektron z NADPH-cytochrom reduktázy, tím dojde k redukcí železitého ionu na ion železnatý. Reakcí xenobiotika s molekulárním kyslíkem, protonem a elektronem vzniká peroxidový komplex, ze kterého se za odštěpení molekuly vody vytvoří komplex obsahující ve své molekule atom vodíku. Odštěpením vodíku z molekuly vznikne volný radikál molekuly xenobiotika, který reaguje s vázaným

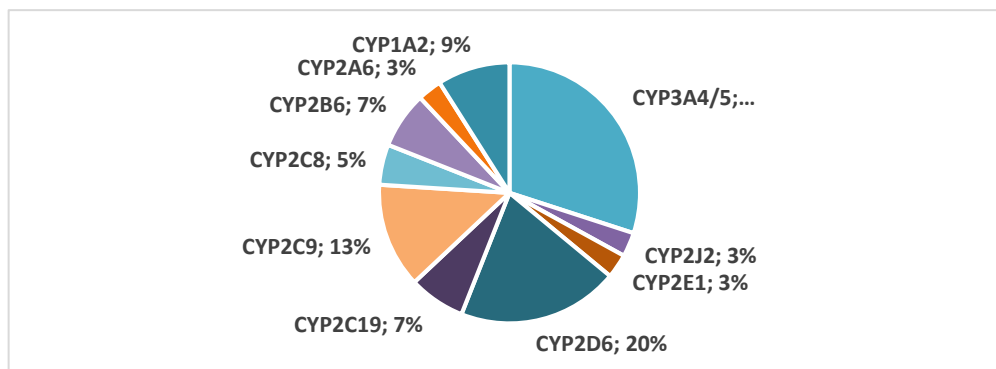
radikálem za vzniku hydroxylované molekuly léčiva (Lincová *et al.* 2007, Guengerich *et al.* 2016).

Lidský genom kóduje přes 57 enzymů CYP450, geny jsou rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin. Genom vyskytující se u myši obsahuje až 102 genů pro enzymy CYP450. Gen 7q21.1 na lidském chromozomu reguluje syntézu izoenzymu CYP3A4 a CYP3A5. Názvy cytochromů P450 se řídí systematickou nomenklaturou vycházející na základě molekulové struktury a funkce enzymů. Jednotlivé enzymy se označují zkratkou CYP a řadí do rodin pomocí číslovky (např. CYP3). Dále získávají písmeno odpovídající konkrétní podrodině (např. CYP3A). Konečná číslovka určuje konkrétní enzym (např. CYP3A4). Zatím je známo cca 20 forem CYP450 enzymů metabolizujících xenobiotika u lidské populace (Mckinnon *et al.* 2008, Chen *et al.* 2006, Švihovec *et al.* 2018, Patel *et al.* 2020).

Enzymy CYP450 byly detekovány v nádorových buňkách, kde jejich metabolická aktivita ovlivňuje účinnost cytostatik. Nízká aktivita enzymů CYP450 v nádorových buňkách může snížit biotransformaci a aktivaci protinádorových léčiv. Naopak zvýšená exprese CYP450 může být spojována s lékovou rezistencí a špatnou prognózou nemoci v důsledku nadměrného metabolismu substrátů. CYP450 má vliv i na prokarcinogeny, které je metabolismem schopen aktivovat nebo inaktivovat. V důsledku přítomnosti enzymů v nádorových buňkách je i zde riziko lékových interakcí (Zhao *et al.* 2021, Stavropoulou *et al.* 2018).

Enzymy CYP450

Existuje přes 57 různých druhů enzymů CYP450 účastnících se metabolismu v organismu. Rodiny enzymů CYP1, CYP2 a CYP3 metabolizují až 80 % klinicky podávaných léčiv. Významná metabolická aktivita byla popsána u 6 dominantních enzymů, a to konkrétně u CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4. Ostatní enzymy CYP450 se podílí na metabolismu v menší míře např. CYP1B1, CYP2A6, CYP2A7, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A5, CYP3A7. Celkový procentuální podíl enzymů a vliv na biotransformaci v játrech popisuje obr.2 (Zhao *et al.* 2021, Mckinnon *et al.* 2008).



Obr. 2 Procentuální rozložení jaterních cytochromů P450 a jejich vliv na metabolismus léčiv (Zhao *et al.* 2021).

Rodina enzymů CYP1 reguluje metabolismus převážně v játrech a plicích. Substráty jsou molekuly xenobiotik obsahující aromatické jádro. U enzymů této rodiny byla popsána jejich role v bioaktivaci karcinogenů (Švihovec *et al.* 2018, Zhao *et al.* 2021).

CYP2 je nejrozšířenější rodinou, avšak s rozdílnými vlastnostmi jednotlivých enzymů. Enzym CYP2D6 váže bazické sloučeniny a hraje zásadní roli ve farmakogenetice. Tento enzym není indukovatelný a v důsledku variantních alel v lidské populaci nastávají problémy s farmakoterapií. Podrodina CYP2C patří mezi hlavní metabolizující enzymy u hlodavců. V lidském organismu se enzymy účastní biotransformace řady léčiv. Důležitost enzymu CYP2C9 spočívá v jeho podílu na metabolismu warfarinu. Zásadní roli hraje jeho podobnost s enzymem vitamin K-reduktasou podílejícího se na chemické přeměně warfarinu. Výskyt variantních alel a různých forem obou enzymů může komplikovat farmakoterapii. S genovým polymorfismem se setkáváme i u druhého enzymu této podrodiny CYP2C19, který metabolizuje např. klopidogrel a inhibitory protonové pumpy (IPP). Enzym CYP2E1 ovlivňuje metabolismus úzkého spektra léčiv, mezi které patří hlavně anestetika, paracetamol a ethanol (Zhao *et al.* 2021, Švihovec *et al.* 2018).

3.1.4 CYP3A4

V lidském organismu je enzym CYP3A4 nejdůležitější formou cytochromu P450 zodpovědný za metabolismus více než 30 % klinicky využívaných léčiv, někteří autoři uvádí podíl na metabolismu až z 50 %. Jedná se o nejvíce zastoupený enzym v játrech a tenkém střevě. Metabolizací ovlivňuje biodostupnost perorálně podávaných léčiv, a tím upravuje jejich koncentrace v krvi. Studie potvrdily přes 1000 různých sloučenin,

zahrnujících i inhibitory a induktory enzymu, interagujících s enzymem CYP3A4 (Švihovec *et al.* 2018, Baylon *et al.* 2013, Chen *et al.* 2006).

Metabolická aktivita enzymu může být ovlivněna působením induktorů a inhibitorů CYP450. Tyto procesy jsou regulovány odlišným mechanismem. Enzymové indukce lze docílit navýšením hladiny enzymu. Exprese CYP3A4 je stimulována řadou faktorů jako např. hormony, jaderné receptory odpovídající na xenobiotika apod. V regulační oblasti genu pro CYP3A4 se nachází dvě vazebná místa pro jaderné receptory PXR, FXR a CAR. Jaderný receptor vytváří komplex s retinoidním X jaderným receptorem (RXR) a váže se na responzivní oblasti lokalizované v promotoru cílových genů. Následuje transkripce a translace genetické informace do struktury proteinu. Transkripce probíhá jak konstitutivně, tak i indukovatelným způsobem. Konstitutivní transkripce je řízena podle potřeb buňky. Řada chemických sloučenin způsobuje up-regulaci CYP3A4 a vyvolává indukovatelnou transkripci. Typickými léčivými, u kterých je potřeba pamatovat na možnou enzymovou indukci, jsou antiepileptika (karbamazepin, fenytoin, fenobarbital), antituberkulotikum rifampicin, antivirotika (efavirenz, nevirapin) a hyperforin (sekundární rostlinný metabolit nacházející se v extraktu třezalky tečkované – *Hypericum perforatum*). K enzymové inhibici dochází častěji a probíhá mechanismem odlišným než u indukce. Při inhibici probíhá interakce, během které substrát kompetuje o vazebné místo na CYP450 s jiným léčivem. Inhibicí metabolismu léčiv dochází k zvýšení plazmatické koncentrace léčiva, a tím větší pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků léčiv. Enzymová inhibice má formu reverzibilní nebo ireverzibilní. Reverzibilní inhibice zahrnuje kompetitivní, vratnou kompetitivní inhibici a nevratnou nekompetitivní inhibici enzymu. Rozdíl mezi kompetitivní a nekompetitivní inhibicí spočívá v mechanismu inhibice enzymu CYP450. Kompetitivní inhibitor obsadí vazebné místo enzymu a zabrání navázání substrátu. U vratné nekompetitivní inhibice spolu substrát a inhibitor nesoutěží, ale inhibitor se váže na alosterické místo enzymu, a tím inhibuje účinek komplexu substrátu a enzymu. Ireverzibilní inhibitor se váže kovalentní vazbou k vazebnému místu enzymu a nevratně inhibuje účinek enzymu. Častými inhibitory CYP3A4 jsou azolová antimykotika (ketokonazol, itraconazol), klaritromycin nebo grapefruitová šťáva, která inaktivuje střevní CYP3A4 (Chen *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2021, Švihovec *et al.* 2018).

Ligandy a lékové interakce

Přehled substrátů, inhibitorů a induktorů nejdůležitějších izoform CYP450 je shrnut v následující tabulce 1.

Tabulka 1 Seznam nejvýznamnějších enzymů CYP450 a jejich substrátů, induktorů a inhibitorů (Lynch *et al.* 2007).

Enzym	Substrát	Induktor	Inhibitor
CYP1A2	theofylin, klozapin, kofein	karbamazepin, fenobarbital, rifampicin, tabák	amiodaron, ciprofloxacín, fluvoxamin
	karvediol, losartan, celecoxib, ibuprofen	karbamazepin, fenytoin, rifampicin	amiodaron, flukonazol, fluoxetin, metronidazol, ritonavir,
CYP2C9			
CYP2C19	omeprazol, fenytoin, fenobarbital	karbamazepin, fenytoin, rifampicin	fluvoxamin, ritonavir, isoniazid
CYP2D6	karvediol, amitriptylin, kodein, donepezil, haloperidol, metoprolol, paroxetin, risperidon, tramadol	-	amiodaron, fluoxetin, paroxetin, ritonavir, terbinafin
CYP3A4	alprazolam, amlopidin, atorvastatin, cyklosporin, diazepam, estradiol, simvastatin, sildenafil, verapamil, zolpidem	karbamazepin, třezalka tečkovaná, fenobarbital, fenytoin, rifampicin	klaritromycin, diltiazem, erytromycin, grapefruitová šťava, itraconazol, ketokonazol, ritonavir, verapamil

Enzymy se vyznačují širokou substrátovou specifikou. Léčiva interagují s enzymy CYP450 v různých podobách. Xenobiotikum může vystupovat jako substrát, induktor nebo inhibitor enzymu. Biotransformací více léčiv jedním enzymem dochází k vzájemným interakcím, kdy interagující léčivo může působit jako substrát a v přítomnosti jiného inhibitoru/induktoru způsobovat lékové interakce. Enzym CYP450

může metabolizovat léčivo, které zároveň působí jako jeho induktor/inhibitor (karbamazepin/erytromycin). Enzymovou indukcí se zvyšuje exprese a aktivita metabolizujícího enzymu CYP450, a tím se urychluje exkrece léčiva. Plazmatická koncentrace léčiva klesá až několik dní po enzymové indukci. Exkrece léčiva urychluje současná indukce exprese MDR1 transportéru fungujícího jako efluxní pumpa. Časté lékové interakce klinicky podávaných léčiv probíhají v důsledku enzymové inhibice. Vazbou inhibitoru v aktivním místě enzymu se snižuje biotransformace léčiva metabolizujícího se daným enzymem. Výsledným efektem je nárůst koncentrace léčiva v krvi, která může dosáhnout toxických hodnot. U enzymové inhibice je interakce a výsledný efekt okamžitý (Lynch *et al.* 2007, Švihovec *et al.* 2018, Lüllmann *et al.* 2007, Patel *et al.* 2020).

3.1.5 Jaterní exkrece

Játra jsou hlavním eliminačním orgánem podílejícím se na metabolismu a exkrece endogenních a exogenních látek. Absorbované léčivo se dostává krví do jater, do kterých přiteče *vena portae* a *arteria hepatica* cca 1,5 l krve za minutu. Na bazolaterální (sinusoidální) membráně přechází léčivo po koncentračním gradientu z krve do hepatocytu. Způsob přestupu přes membránu závisí na struktuře molekuly léčiva a aktivitě přenašečového systému. Lipofilní malé molekuly využívají pro prostup prostou difuzi, u větších polárních nebo ionizovaných molekul je potřeba k transportu využít přítomný transportér. Léčivo přítomné v hepatocytu může podstoupit biotransformaci pomocí enzymů CYP450 a konjugací s konjugačním činidlem vytvořit hydrofilní metabolit. Původní léčivo nebo jeho metabolit jsou transportovány zpátky do krve nebo eliminovány do žluči. Vzniklé metabolity přechází prostou difuzí nebo za účasti ABC membránových transportérů přes bazolaterální membránu do krevního oběhu a následně jsou vyloučeny ledvinami (Van Montfoort *et al.* 2003, Chandra *et al.* 2004).

Exkrece do žlučového kanálku přes kanalikulární membránu probíhá proti koncentračnímu gradientu pomocí ABC membránových přenašečů, k jejich aktivaci je potřeba energie ve formě ATP. Léčivo nebo endogenní látka přítomné ve žluči jsou buď vyloučeny stolicí, nebo jsou v prostředí duodena a tenkého střeva zpětně reabsorbovány. Enzymatickou hydrolýzou metabolitů II. fáze biotransformace dochází ke vzniku původní molekuly léčiva a k prodloužení jeho účinku. Tento proces je označován za

enterohepatální cirkulaci (Van Montfoort *et al.* 2003, Chandra *et al.* 2004, Švihovec *et al.* 2018).

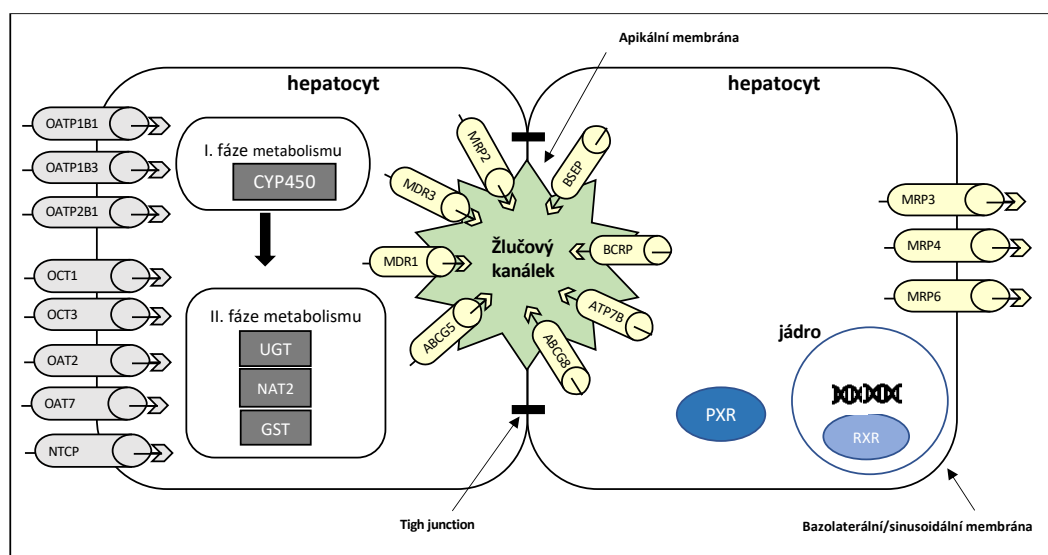
3.1.6 Jaterní transportní proteiny

Membránové proteinové přenašečové systémy hrají klíčovou roli v hepatální absorpci a exkreci endogenních a exogenních látek. Podle mechanismu transportu se dělí na efluxní a influxní (up-take) transportéry (Choudhuri *et al.* 2006).

Influxní transportéry lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytu přenášejí molekuly z krevního systému do prostředí hepatocytu (viz obr. 3). Nadrodina SLC transportérů (solute carrier family) představuje hlavní transportní systém regulující transport látek skrze hepatocyty a jaterní tkáň. Tato skupina proteinových přenašečů se skládá z mnoha druhů transportérů. NTCP transportér (Na^+ taurocholate cotransporter polypeptide) je zodpovědný za uptake sodíkového ionu a soli žlučové kyseliny. Skupina transportérů OCT (organic cation transporter) přenášejí malé kladně nabitě organické molekuly. Další skupinou přenašečů jsou OAT (organic anion transporter) a OATP transportéry (organic anion transporting polypeptide). Tyto influxní přenašeče jsou schopné přenášet celou řadu organických aniontů. Typickými substráty těchto přenašečů jsou např. inhibitory HMC-CoA reductázy, valsartan a žlučové kyseliny (Choudhuri *et al.* 2006, Chandra *et al.* 2004, Corsini *et al.* 2013, Yasuhisa *et al.* 2007, Van Montfoort *et al.* 2003).

Druhým typem jaterních transportních proteinů podílejících se na exkreci jsou efluxní transportéry, které přenášejí exogenní a endogenní látky z buněk (viz obr.č.3). V hepatocytech hrají klíčovou roli přenašeče nadrodiny ABC transportérů (ATP-binding cassette). Dosud bylo identifikováno mnoho podobných transportérů patřících do této nadrodiny. Efluxní membránové přenašeče (MRP3, 4, 6) přítomné na bazolaterální membráně hepatocytu transportují organické anionty z hepatocytu do jaterních sinusoid. Jejich exprese je indukována zejména při deficitu MRP2 a cholestáze, kdy dochází ke kumulaci žlučových kyselin a bilirubinu uvnitř hepatocytu. Transportní proteiny lokalizované na apikální membráně hepatocytu v blízkosti žlučového kanálku slouží k exkreci látek do žluči. Efluxní pumpa BSEP (*ABCB11*) (bile salt export pump) eliminuje soli žlučové kyseliny v konjugované i nekonjugované formě. Mezi substráty BCRP (*ABCG2*) (breast cancer resistance protein) transportéru patří jednak některá

chemoterapeutika jako např. mitoxantron, ale i endogenní a další exogenní látky, zejména sulfátové konjugované metabolity steroidních látek a xenobiotik. Na žlučovém pólu jaterních buněk se na biliárním efluxu podílí přenašeč MRP2 (*ABCC2*) (multidrug resistance-associated protein 2), který zodpovídá za přenos organických aniontů včetně vzniklých konjugátů s glutathionem, kyselinou glukuronovou a sulfátové konjugáty. Specifickým jaterním efluxním přenašečem je MDR3 (*ABCB4*) (multidrug resistance protein 3) účastníci se exkrece fosfolipidů do žluči. MDR1 (*ABCB1*) též známý jako P-glykoprotein se vyznačuje širokou substrátovou specifikou a je spojován s lékovou rezistencí. V následující kapitole bude detailně probrána nadrodina ABC transportérů a MDR1 transportér (Corsini *et al.* 2013, Chandra *et al.* 2004, Mao *et al.* 2015, Staudinger *et al.* 2013).



Obr. 3 Grafické znázornění jaterních eliminačních dějů včetně klíčových transportních membránových přenašečů. Žlutou barvou jsou znázorněny efluxní transportéry a šedou barvou skupina influxních přenašečů. Nukleární receptory jsou označeny modrou barvou (Choudhuri *et al.* 2006, Hyršová 2018, Corsini *et al.* 2013).

3.1.7 ABC transportéry

Transmembránové proteinové přenašeče, které využívají energii v podobě ATP na transport látek z intracelulárního prostředí do extracelulárního, se označují jako transportní proteiny z rodiny ABC (ATP binding cassette). ABC transportéry jsou lokalizovány v játrech na apikální i bazolaterální membráně hepatocytů. Tyto přenašeče mohou transportovat širokou škálu látek, které spadají jak do skupiny endogenních, tak i exogenních látek. Z řad endogenních látek se jedná o lipidy, steroidy, hormony a

bilirubin. Široká substrátová afinita léčiv hraje důležitou roli při lékových interakcích, kdy nevhodně zvolené látky mohou vzájemně kompetovat o stejný transportér (Dostálek *et al.* 2006, Chandra *et al.* 2004, Corsini *et al.* 2013).

Dosud bylo identifikováno 49 genů kódujících jednotlivé transportní proteiny a došlo k rozdělení transportérů do 7 podrodin- ABCA (12), ABCB (11), ABCC (13), ABCD (4), ABCE (1), ABCF (3) a ABCG (5). Skupina ABCB podrodiny je označována jako MDR-ABC transportéry a podrodina ABCC transportérů nese označení MRP-ABC. ABCB podrodina je přítomna v lidském organismu v podobě 11 druhů proteinových přenašečů. Klíčovou roli v exkreci látek hrají zejména *ABCB1* (MDR1), *ABCB4* (MDR2/3) a *ABCB11* (BSEP). Tyto transportéry se skládají z 1280 až 1320 aminokyselin uspořádaných do 12 transmembránových α helixů (Dostálek *et al.* 2006, Chandra *et al.* 2004, Corsini *et al.* 2013, Choudhuri *et al.* 2006, Staudinger *et al.* 2013).

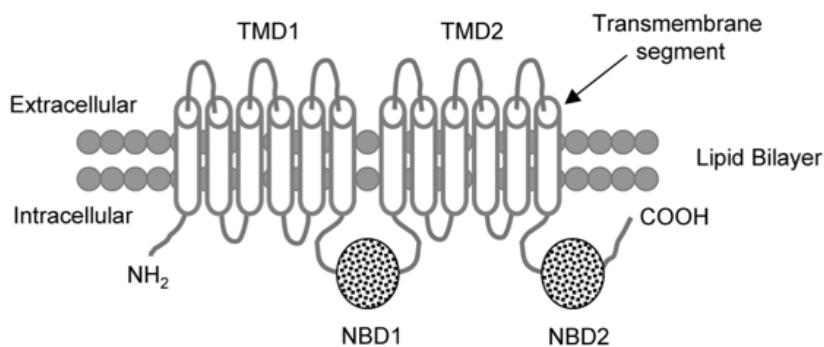
MDR1 (*ABCB1*), známý jako P-glykoprotein, je exprimován v lidském organismu v mnoha tkáních jako např. ledviny, játra, tenké střevo, placenta, plíce a hematoencefalické bariéry. Specifickými jaterními transportéry jsou *ABCB11* (BSEP) a *ABCB4* (MDR2/3) (Dostálek *et al.* 2006, Chandra *et al.* 2004, Corsini *et al.* 2013, Choudhuri *et al.* 2006, Staudinger *et al.* 2013).

3.1.8 P-glykoprotein (MDR1/*ABCB1*)

Transportér MDR1 (multidrug resistance protein 1), označován též jako P-glykoprotein (P-gp, kde P znamená permeabilitu), patří do podrodiny ABCB efluxních transportérů podílejících se na farmakokinetických dějích uvnitř organismu. Jeho role závisí na přítomnosti přenašeče v dané tkáni. MDR1 transportér je exprimován na apikální membráně mnoha buněk jako např. hepatocytech, buněk hematoencefalické bariéry, placenty, ledvin, tenkého střeva. MDR1, přítomný na apikální membráně kapilárního endotelu HEB, kde transportuje látky zpátky do krve a brání vstupu xenobiotik do mozkové tkáně. Jeho hlavní fyziologická funkce spočívá v ochraně orgánů a plodu před exogenně podanými látkami a zajišťuje exkreci xenobiotik a endogenních látek. MDR1 přenašeč je ve velké míře exprimován v nádorových buňkách a spojován s lékovou rezistencí. Poprvé byl tento transportér detekován v kolchicin rezistentních nádorových ovariálních buňkách křečka čínského. P-gp byl prvním studovaným transportním proteinem odpovědným za rozvoj rezistence u podávané cytostatické léčby

u onkologických pacientů. Zvýšená exprese MDR1 transportéru je důvodem vzniku mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance) u nádorových buněk (Dostálek *et al.* 2006, Choudhuri *et al.* 2006, Staudinger *et al.* 2013, Fung *et al.* 2009, Yano *et al.* 2018).

Gen kódující expresi MDR1 transportéru, *ABCB1*, je lokalizován na chromozomu 7, konkrétně se jedná o lokus p21-21.1. Překladem genetické informace do struktury proteinu vzniká transmembránový přenašeč skládající se z 1280 aminokyselin s celkovou molekulovou hmotností 170 kDa. Prostorové uspořádání proteinových řetězců procházejících skrze membránu vytváří dva symetrické homologní segmenty složené z 610 aminokyselin. Obě tyto části spolu fungují jako celek spojený linkerem z přibližně 75 aminokyselin. Každá polovina obsahuje 1 hydrofobní transmembránovou doménu (TMD) a 1 hydrofilní nukleotid vázající doménu (NBD, někdy označována jako NBF) lokalizovanou na intracelulární straně membrány. Jednotlivé TMD se skládají ze 6 vzájemně propojených transmembránových helikálních řetězců. Proteinový přenašeč je celkově tvořen z 12 transmembránových α -helixů, kdy každé TMD odpovídá 1 NBD vázající a hydrolyzující ATP (viz obr.č. 4) (Fung *et al.* 2009, Seigneuret *et al.* 2003, Mora Lagares *et al.* 2021, Choudhuri *et al.* 2006).

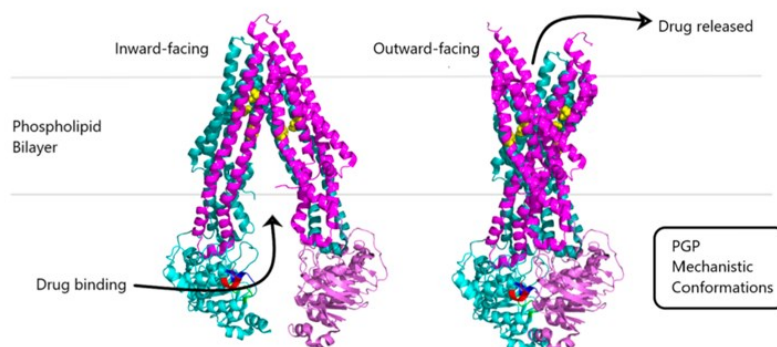


Obr. 4 Grafické znázornění prostorového uspořádání transportéru MDR1 (Choudhuri *et al.* 2006).

Mechanismus transportu

Efluxní transport P-glykoproteinem probíhá různými mechanismy. Jedním z možných způsobů transportu substrátů skrze transportér je prostřednictvím porů vzniklých z TMD. Model flipasy popisuje interakci substrátu přítomného na vnitřní vrstvě fosfolipidové membrány s MDR1 receptorem, který obrátí substrát na vnější vrstvu membrány proti koncentračnímu gradientu. Tento model vychází z principu, kdy transportované látky získávají přístup do prostoru TMD z vnitřní části membrány. Hydrofóbní vakuová pumpa je model charakterizující přímou interakci MDR1 přenašeče a substrátu v intracelulárním prostředí nebo lokalizovaného uvnitř membrány. Výsledkem je transport látek do extracelulárního prostředí za současné hydrolýzy ATP na ADP (adenosindifosfát) (Choudhuri *et al.* 2006, Fung *et al.* 2009, Kodan *et al.* 2021, Urbatsch *et al.* 2003, Li-Blatter *et al.* 2012, Hoosain *et al.* 2015).

Přenos látek přes membránu pomocí transportéru začíná interakcí substrátu s TMD na intracelulární straně fosfolipidové membrány. V dalším kroku se naváže ATP na NBD, která podstoupí dimerizaci a změnu konformace. Převrácením vazebného místa na extracelulární stranu dojde k uvolnění navázaného substrátu (viz obr. 5). Energií k provedení transportu zajišťuje hydrolýza ATP na vzniklý ADP a P_i , zároveň umožňuje obnovení původní konformace transportéru (Li-Blatter *et al.* 2012).



Obr. 5 Konformační změna P-gp při efluxním transportu vyobrazená ve 3D (Ahmed Juvale *et al.* 2022).

Regulace exprese MDR1

Expresi MDR1 iniciuje aktivace nukleárních receptorů PXR (pregnanový X receptor) a CAR (konstitutivní androstanový receptor) mnoha strukturálně odlišnými substráty. Aktivované nukleární receptory nasedají na vazebná místa, tzv. DR4 motiv (Direct repeats, které jsou oddělené 4 nukleotidy) lokalizovaný v promotorové oblasti

genu pro MDR1 a následně dochází k zahájení transkripce MDR1. *ABCB1* gen lidského MDR1 transportéru obsahuje responzivní elementy pro pregnanový X receptor (PXRE), který zahrnuje několik výše zmiňovaných DR4 motivů. V lidském promotoru MDR1 genu se nenachází TATA box. Transkripci zde zahajují iniciátorové jednotky Inr (initiator element). V promotoru je přítomna celá řada transkripčních regulačních jednotek, jako je GC-box a Y-box, které interagují s transkripčními faktory jako např: NF-Y, p53, AP-1, CAAT, C/EBP, HSE (heat shock element), MEF1 (MDR1 promoter-enhancing factor 1) a mnoho dalších. Studie nedávno prokázaly účast protein kinasy C na regulaci exprese *ABCB1* transportéru. Po transkripci je vzniklá mRNA transkribována do struktury proteinu MDR1. V poslední fázi vniklý protein podstupuje posttranslační modifikace zahrnující glykosylaci a fosforylaci struktury proteinu. Geny kódující MDR1 transportér a enzym CYP3A4 jsou lokalizovány v těsné blízkosti na stejném chromozomu v polohách 7q22.1 (CYP3A4) a 7q21.1 (MDR1) (Al-Dosari *et al.* 2018, Sakaeda *et al.* 2002, Yano *et al.* 2018, Choudhuri *et al.* 2006, Ganesan *et al.* 2021).

K interakci na P-gp transportéru dochází mezi mnoha strukturně odlišnými molekulami. Podle výsledné reakce, kterou navodí interagující látka, lze tyto látky rozdělit na substráty, inhibitory a induktory MDR1 přenašeče. Substráty s afinitou k P-gp jsou látky hydrofobní povahy s neutrálním nebo kladným nábojem molekuly. K nejvýznamnějším substrátům patří léčiva z farmakologických skupin jako např: protinádorová léčiva, antihypertenziva, hypolipidemika, antibiotika, antiarytmika, antidepresiva a mnoho dalších. Řada substrátů P-gp je současně substráty CYP450 a dochází ke koordinované regulaci (Fung *et al.* 2009, Mora Lagares *et al.* 2021).

Inhibitory MDR1 transportéru ovlivňují jeho funkci kompetitivní/ nekompetitivní/ alosterickou vazbou na vazebné místa přenašeče. Výsledkem inhibice MDR1 transportéru je intracelulární akumulace substrátu, kdy je léčivo přítomné v organismu ve vyšších až toxických koncentracích potencujících nežádoucí účinky. V důsledku různě silné inhibice MDR1 transportéru dochází k řadě lékových interakcím, které mohou být potenciálně závažné (Hoosain *et al.* 2015, Ganesan *et al.* 2021).

Nadměrná indukce exprese MDR1 přenašeče způsobená induktory má za následek zvýšenou exkreci a snížení plazmatické koncentrace léčiv v krvi. Léková rezistence nádorových buněk je často příčinou nadměrné exprese genu pro P-gp.

Tabulka 2 obsahuje přehled nejvýznamnějších substrátů, inhibitorů a induktorů MDR1 transportéru (Hoosain *et al.* 2015, Choudhuri *et al.* 2006).

Tabulka 2 Nejvýznamnější interagující léčiva s P-gp (Dostálek *et al.* 2006).

Substráty	Inhibitory	Induktory
aldosteron	amiodaron	dexametazon
amitriptylin	amitriptylin	doxorubicin
amoxicilin	atorvastatin	fenobarbital
ciprofloxacín	bromokriptin	rifampicin
cyklosporin	cyklosporin	ritonavir
digoxin	diltiazem	hyperforin
diltiazem	erytromycin	trazodon
estradiol	fentanyl	
fenytoin	grapefruitová šťáva	
karbamazepin	itrakonazol	
kortikosteroidy	klaritromycin	
losartan	simvastatin	
takrolimus	verapamil	
vinblastin	zelený čaj	
vinkristin		

Léková rezistence (multidrug resistance)

Nádorové buňky se stávají rezistentními vůči chemoterapii vlivem pozměněné genové exprese nebo rezistence může být vyvolána v průběhu léčby následkem adaptačního mechanismu nádorových buněk na podávané chemoterapeutikum. Rezistence může vznikat v důsledku např. změny vazebného místa léčiva, mutace DNA nebo zvýšenou enzymatickou biotransformací léčiv. Nejvyšší zásluhu na vzniku rezistence má nadměrná exprese ABC transportérů. Změna genetické informace pro MDR1 přenašeč umožňuje vznik isoformy se zvýšenou funkcí. Nadměrná indukce exprese P-gp přispívá ke vzniku rezistence nádorových buněk. Nádorové nediferencované kmenové buňky bývají bohaté na ABC přenašeče se zvýšenou schopností exkrece léčiv (Prochazkova *et al.* 2012).

3.2 Nukleární receptory

Nukleární receptory jsou cílovým místem účinku řady ligandem a hormonem aktivovaných transkripčními faktorů. Účastní se mnoho fyziologických procesů uvnitř organismu, jako např. hormonální regulace, ovlivňují homeostázu iontů a endogenních látek, regulují metabolismus xenobiotik a buněčné dělení. Důležitou roli hrají i při patologických dějích a onemocnění, které jsou spojovány s poruchou funkce procesů regulovaných prostřednictvím nukleárních receptorů. Nejčastěji se jedná o kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, zánětlivé reakce a nádorové onemocnění. Mnoho klinicky významných onemocnění (jako např. diabetes mellitus 2. typu, obezita, ateroskleróza, hyperlipidémie) je asociováno s dysfunkcí procesů regulovaných pomocí nukleárních receptorů (Tebbens *et al.* 2018).

Dosud bylo objeveno 48 jednotlivých druhů nukleárních receptorů, z toho 25 tvoří sirotčí (orphan) receptory, u kterých stále nebyly identifikovány ligandy. Nukleární receptory jsou nejčastěji regulovány malými lipofilními ligandy z řad endogenních látek, jako jsou steroidní sloučeniny, retinoidy a fosfolipidy, tak i prostřednictvím exogenních látek (např. glitazony, rifampicin, syntetická analoga hormonů). Xenosenzory je označení pro jaderné receptory aktivované cizorodými látkami z vnějšího prostředí (xenobiotiky). Po navázání ligandů na jaderný receptor dochází k aktivaci transkripce, a tím dochází k ovlivnění exprese cílových genů (Tebbens *et al.* 2018, Huang *et al.* 2010, Weikum *et al.* 2018).

Nadrodina jaderných receptorů se skládá z více než 70 členů a je rozdělena do 2 podskupin podle vázacího ligandu. První podskupinu tvoří receptory pro steroidní hormony (GR, MR, AR, ER), receptor pro vitamín D₃, retinoidní receptor (RAR) a tyroidní receptor (TR). Tyto receptory mohou být regulovány různorodou skupinou endogenních a exogenních látek. Druhou podskupinou, která tvoří až 60 % veškerých nukleárních receptorů, jsou sirotčí (orphan) receptory. Klíčovou roli hrají především aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR), pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní andostanový receptor (CAR), jaterní X receptor (liver X receptor; LXR) a farnesoidní X receptor (FXR). V novějších studiích se setkáváme se třetí skupinou jaderných receptorů označovanou jako adaptované sirotčí receptory, mezi které patří např. PXR, u kterého byl teprve nedávno definován endogenní ligand (Chen *et al.* 2012, Safe *et al.* 2014).

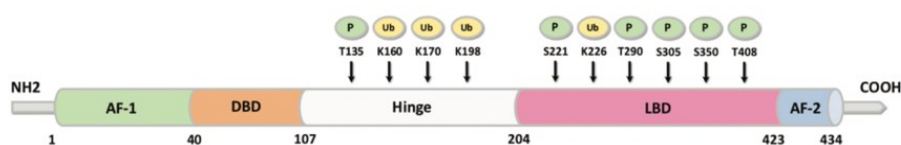
3.2.1 Pregnanový X receptor (PXR)

Pregnanový X receptor (PXR) je jedním z ligandem aktivovaných transkripčních faktorů nadrodiny nukleárních receptorů. Poprvé byla jeho funkce PXR objasněna v roce 1998. Název souvisí s endogenní steroidní sloučeninou pregnanem, který je spojovaný s aktivací PXR. PXR vystupuje jako obranný adaptivní mechanismus organismu, který pomáhá při metabolismu a exkreci exogenních a toxických látek. Klíčovou roli hraje v regulaci genové exprese biotransformačních enzymů a transportních proteinů ovlivňujících farmakokinetické děje v organismu. PXR jaderný receptor je spojován s indukcí exprese jak ABC přenašečů (MDR1), tak i biotransformačních enzymů I. (zejména CYP450) a II. fáze (např. UGT) metabolismu. Účastní se řady fyziologických procesů podílejících se na metabolismu glukosy, lipidů, cirkulaci žlučové kyseliny a homeostáze endokrinního systému. Existuje mnoho isoform lidského PXR s odlišnou transkripční aktivitou. Transkripční varianta 1 (PXR1) a 2 (PXR2), na rozdíl od PXR3 a PXR4, indukují expresi cílových genů. Nedávné studie PXR zabývajících se jeho schopností regulace genové exprese v lidských hepatocytech potvrdili up-regulaci 164 genů a down-regulaci u 334 genů (Lv *et al.* 2022, Svecova *et al.* 2008, Pavek *et al.* 2016, Robbins *et al.* 2014, Chai *et al.* 2016, Orans *et al.* 2005).

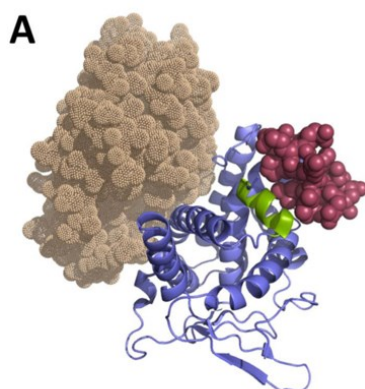
PXR je ve velké míře exprimován v játrech, tenkém a tlustém střevě a ledvinách. V minoritním množství je hPXR (lidský) a mPXR (myši) přítomný i v ostatních tkáních, jako např. plíce, děloha, vaječníky, prsní tkáň, žaludek a mozek. Jaterní hPXR a mPXR jsou lokalizovány v cytosolu a po navázání agonisty translokovány do buněčného jádra (Orans *et al.* 2005, Pavek *et al.* 2016).

NR1I2 (nukleární receptor podskupiny 1, skupiny I a člen 2) je označení pro gen kódující expresi hPXR. Tento gen je lokalizován na chromozomu 3, konkrétně na lokusu 3q11-q13.3. *NR1I2* gen se skládá z 10 exonů, mezi kterými se nachází 9 nekódujících oblastí genu (introny). Oblast exonu 2 až 9 obsahuje okolo 434 párů bází kódujících PXR protein. Struktura PXR je rozdělena na několik důležitých domén (viz obr.6). DNA-vázací doména DBD (DNA-binding domain) má 2 podoblasti tvořené 4 cysteinovými zbytky, které společně se zinkem vytváří komplex (zinc finger) vázající se na specifické sekvence v DNA označované jako pregnanové X responzivní jednotky (PXRE). Každá DBD se skládá ze 2 komplexů následovaných amfifilním helixem a peptidovou smyčkou. N-terminální doména NTD (N-terminal domain) obsahuje region AF-1 (activator

function-1), který hraje roli při interakci s co-regulačními proteiny. Postranlačními úpravami (např. acetylací, fosforylace) NTD se aktivuje transkripční aktivita. Ligand-vázající doména LBD (ligand-binding domain), ležící v C-terminální oblasti genu, umožňuje specifický a selektivní mechanismus interakce agonisty s PXR. Strukturu LBD tvoří celkem 11 α helixů a 4 β skládané listy, které společně vytváří hydrofobní uspořádání LBP (ligand binding pocket). Obr. 7 znázorňuje prostorové uspořádání LBD struktury PXR. Ligand vázající doména je schopná interagovat s transkripčními co-regulačními proteiny prostřednictvím aktivačního funkčního regionu AF-2 (activation function region). Oblasti DBD a LBD navzájem spojuje flexibilní linker označovaný jako hinge region (Cheng *et al.* 2011, Pavěk *et al.* 2016, Mangelsdorf *et al.* 1995, Weikum *et al.* 2018, Orans *et al.* 2005, Lv *et al.* 2022, Huang *et al.* 2010).



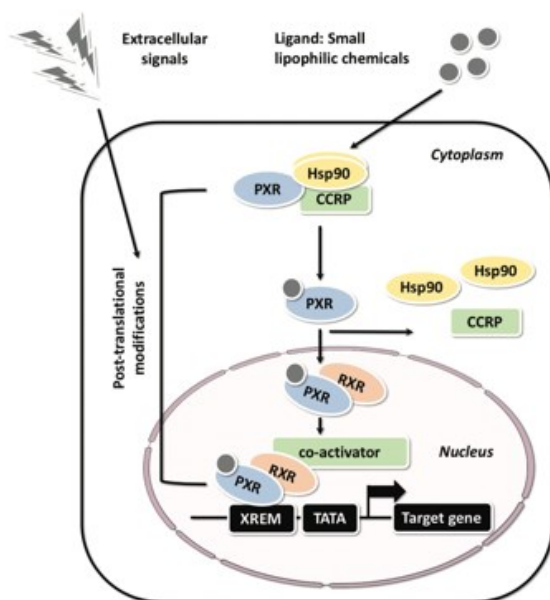
Obr. 6 Základní struktura PXR (Lv *et al.* 2022).



Obr. 7 Krystalická struktura LBD PXR. Zeleně je znázorněn region AF-2, na který je navázán co-aktivátor SRC-1 (steroidní receptorový co-aktivátor) vyobrazený červeně. Světle hnědá barva odpovídá heterodimerizačnímu partneru PXR, RXR α (Chai *et al.* 2016).

PXR je v neaktivovaném stavu přítomný převážně v cytoplasmě, a to v podobě komplexu s chaperony, jako jsou Hsp90 (heat shock protein 90) a CCRP (CAR cytoplasmatic retention protein). Navázáním ligandu na LBD PXR dochází k aktivaci receptoru, která je provázená konformační změnou AF-2. V důsledku konformační změny se rozpadá chaperonový komplex s PXR a receptor je translokován pomocí

energeticky závislých reakcích do buněčného jádra, kde vytváří heterodimer s retinoidním receptorem α (RXR α). Vzniklý heterodimer PXR/RXR α interaguje s transkripčními co-aktivátory (např. SRC receptorový co-aktivátor) a váže se prostřednictvím pregnanové X responzibilní jednotky receptoru (PXRE) na specifická vazebná místa promoteru DNA (viz obr. 8). Vazebná místa promoteru obsahují přímo se opakující sekvence (direct repeats) TGAACT oddělené 3 nebo 4 nukleotidy (DR3, DR4). Mezi další cílové vazebné sekvence PXR/RXR α v promotoru patří obrácené opakující se sekvence (IR6 nebo ER6 inverted resp. everted repeats) tvořené nukleotidovým hexamerem AGGTTCA. Po interakci s DR3, DR4, IR6 a ER6 se zahajuje transkripce cílových genů do struktury proteinů. PXR reguluje expresi genů pro biotransformační enzymy CYP450 a řady transportních přenašečů (např. MDR1, MRP2) (Lv *et al.* 2022, Robbins *et al.* 2014, Pavěk *et al.* 2016, Tebbens *et al.* 2018).



Obr. 8 Molekulární mechanismus aktivace PXR a regulace exprese genů (Lv *et al.* 2022).

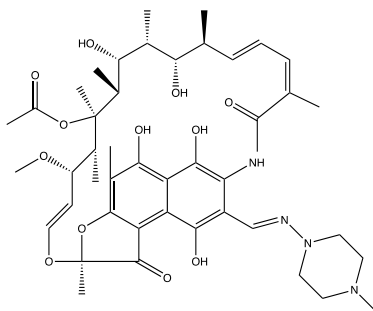
Klíčovou roli v regulaci transkripce genů hrají ko-aktivátory a ko-represory souhrnně označované jako co-regulátory. Co-aktivátory interagují s LBD, kde se váží na AF-2 prostřednictvím Leu-X-X-Leu-Leu (X označuje aminokyselinu) opakující se sekvence a stabilizují vzniklý komplex PXR a ligandu. SRC-1 (co-aktivátor steroidních receptorů), člen rodiny SRC, patří mezi první objevené co-aktivátory PXR. V neaktivovaném stavu se na PXR váže nukleární receptorový co-represor 2 (NCoR2), označován také jako SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors). Vazba co-aktivátoru ovlivňuje remodelaci chromatinu a schopnost aktivace

receptoru. Účinkem co-represoru dochází k deacetylaci histonů a neschopnosti regulace exprese genu (Pavek *et al.* 2016, Orans *et al.* 2005, Rigalli *et al.* 2021).

V důsledku velké flexibility ligand vázající domény je PXR schopný interagovat s velkým množstvím strukturně odlišných ligandů. Mezi ligandy PXR patří endogenní žlučové kyseliny a steroidní sloučeniny jako např. 5 β -pregnan-3,20-dion a estradiol. PXR je cílovým místem řady xenobiotik, které kompetují o vazebné místo na PXR s ostatními sloučeninami a vlivem vazby ovlivňují expresi cílových genů a účastní se tak lékových interakcí. U řady exogenních ligandů byla zjištěna vysoká afinita k PXR, jedná se hlavně o antibiotikum rifampicin, antihypertenzivum nifedipin, cytostatikum tamoxifen, antimykotikum clotrimazol a přírodní sloučeninu hyperforin z třezalky tečkované. Aktivace ligandy PXR je ovlivněna mezidruhovými rozdíly, např. rifampicin je schopen silné aktivace genové exprese u hPXR, ale zanedbatelné aktivace genové exprese u mPXR. Hlavními antagonisty PXR jsou zástupci azolových antimykotik, konkrétně ketokonazol a jeho deriváty. Ketokonazol je schopen inhibovat ligandem aktivovanou indukci PXR a zabraňuje interakci co-regulátorů s LBD (Pavek *et al.* 2016, Lv *et al.* 2022, Cheng *et al.* 2011, Chai *et al.* 2016, Orans *et al.* 2005).

3.3 Rifampicin

Rifampicin, též označován jako rifampin, patří do skupiny semisyntetických ansamycinových antibiotik. Skupina rifamycinů byla v roce 1959 poprvé izolována z *Nocardia mediteranei*. Chemická struktura rifampicinu obsahuje makrocyclický laktam s ansa uspořádáním aromatické části molekuly (viz obr.9). Rifampicin je derivátem rifamycinu B získaného fermentací gram-pozitivní bakterie *Streptomyces mediterranei*. Baktericidní účinek rifampicinu souvisí s mechanismem účinku, který spočívá v inhibici bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy (Hartl *et al.* 2019, Ola *et al.* 2019.).



Obr. 9 Chemická struktura rifampicinu (nakresleno v ChemDraw).

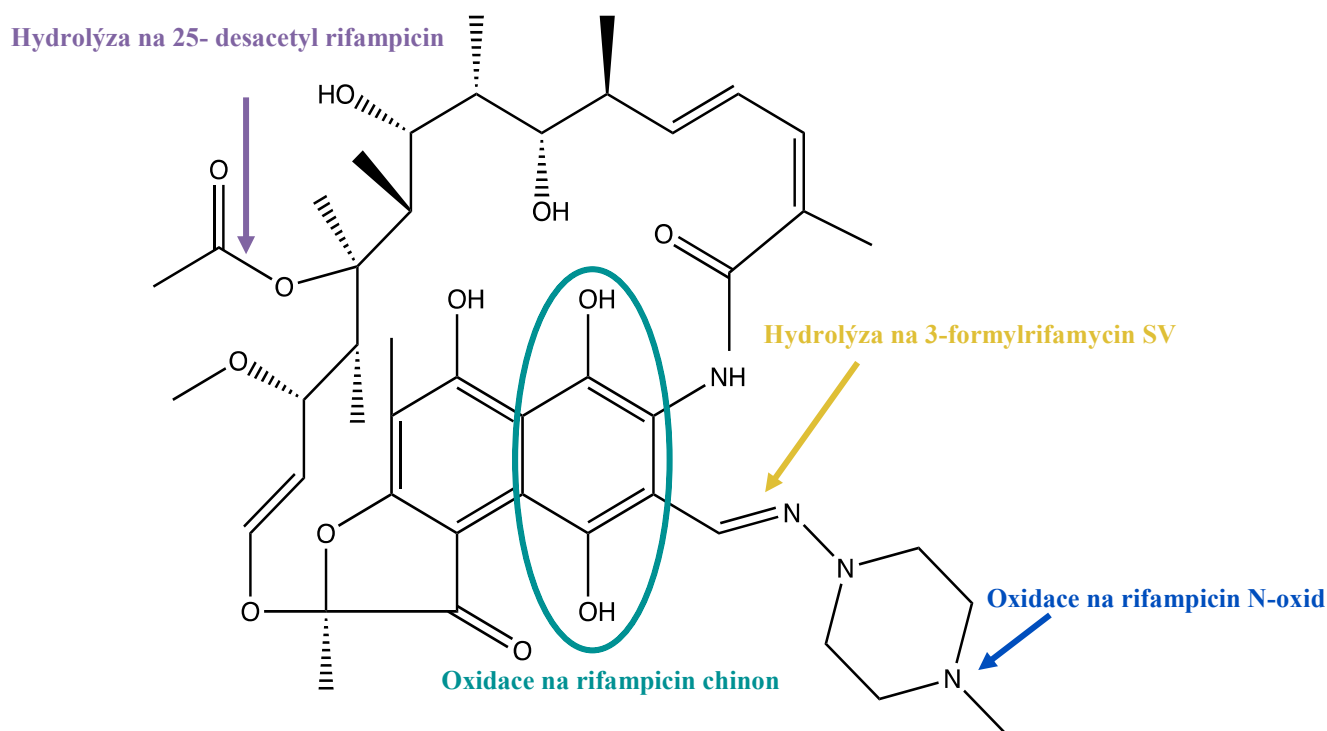
Široké spektrum účinku rifampicinu zahrnuje jak gram-pozitivní a gram-negativní bakterie, tak i chlamydie, rickettsie a anaerobní bakterie. Hlavní terapeutickou indikací rifampicinu je léčba tuberkulózy, kterou způsobuje *Mycobacterium tuberculosis*. Mezi minoritní indikace spadá např. léčba lepry, osteomyelitidy a endokarditidy. Rifampicin vykazuje i protizánětlivé účinky v léčbě neurodegenerativních onemocnění. V důsledku výskytu rezistentních kmenů se rifampicin nepodává v monoterapii, ale vždy v kombinaci s jiným antituberkulotikem (např. isoniazid, streptomycin, pirazinamid a etambutol) K selhání terapie může také dojít následkem řady interakcí s ostatními léčivy a potravinami (Ola *et al* 2019, Švihovec *et al.* 2018, Nakajima *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006, Acuña *et al.* 2019).

Biologická dostupnost rifampicinu záleží na způsobu podání léčiva. U perorálního podání záleží na přítomnosti potravy v gastrointestinálním systému, kdy dochází k nižší absorpci. Terapeutických hladin rifampicinu je dosaženo v mnoha lidských tkáních a tělních tekutinách (např. mozkomíšní mok, moč, sliny, kosti, lymfatické uzliny). Rifampicin je schopen procházet placentou a vylučovat se do mateřského mléka. Ve velké míře se metabolizuje v tenkém střevě a játrech, kdy vznikají deacetylované metabolity vylučující se převážně žlučí a stolicí. Lidská arylacetamid deacetylase (AADAC) je zodpovědná za biotransformaci rifampicinu na 25-desacetylrifampicin, u kterého studie potvrdily nižší schopnost indukce enzymů a nižší hepatotoxicitu (Kobayashi *et al.* 2012, Ola *et al* 2019, Nakajima *et al.* 2011).

Rifampicin je považován za silný induktor enzymů metabolizujících léčiva a membránových transportérů podílejících se na transportu léčiv. Významně ovlivňuje výsledný terapeutický efekt léčiv a způsobuje lékové interakce. V roce 1972 byla popsána první léková interakce rifampicinu s perorálními kontraceptivy, kdy při současném užívání obou léčiv došlo k selhání účinku kontraceptiv. Mechanismus indukce CYP enzymů spočívá v aktivaci PXR a zvýšené expresi CYP enzymů, které jsou významnými cílovými geny PXR. K lékovým interakcím dochází nejčastěji indukcí CYP3A4 v hepatocytech a enterocytech. Rifampicin ve většině případů indukuje expresi jaterních i intestinálních enzymů CYP. Aktivací PXR ve střevě dochází mj. k indukci exprese MDR1 transportéru, který je v této tkáni významně exprimovaný a tím snižuje biologickou dostupnost léčiv. (Chen *et al.* 2006, Nishimura *et al.* 2006, Bulutoglu *et al.* 2020).

3.3.1 Deriváty rifampicinu

Rifampicin ve vodném prostředí podléhá samovolným rozkladným a oxidačním reakcím za tvorby mnoha derivátů. Mezi hlavní rozkladné metabolity rifampicinu patří rifampicin chinon, 25-desacetylrifampicin, 3-formylrifamycin SV a rifampicin N-oxid. Oxidací naftylové části molekuly rifampicinu vzniká derivát rifampicin chinon s naftochinonem ve své struktuře. Studie u tohoto derivátu prokázali vyšší účinnost v prevenci protizánětlivém procesu u Parkinsonovy choroby. Deacetylaci rifampicinu zajišťují arylacetamid deacetylasa (AADAC), mikrosomální cholinesterasa a β -esterasa. V kyselém prostředí dochází k hydrolýze rifampicinu a tvorbě 3-formylrifamycinu SV. Obrázek 10 znázorňuje strukturální změny ve struktuře rifampicinu za vzniku zmiňovaných derivátů (Burman *et al.* 2001, Sorokoumova *et al.* 2008, Acuña *et al.* 2019).



Obr. 10 Vznik derivátů rifampicinu (ChemDraw).

4 Cíl práce

- 1) Stanovení potenciálů derivátů rifampicinu aktivovat pregnanový X receptor ve srovnání s modelovým agonistou rifampicinem.
- 2) Nepřímo určit podíl MDR1 transportéru na efluxu rifampicinu a jeho derivátů.
- 3) Mezidruhové porovnání aktivace PXR studovanými látkami u člověka, opice, myši a potkana.

5 Experimentální část

5.1 Použité materiály a přístroje

Přístroje a pomůcky

Automatické pipety se špičkami (Eppendorf, Německo)

Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Plynový kahan

Kónické zkumavky 50 ml (TPP, Švýcarsko)

Kultivační lahve 75 cm² (TPP, Švýcarsko)

Kultivační plato 48jamkové (Thermo Fisher Scientific)

Kultivační plato 96 jamkové bílé (Thermo Fisher Scientific)

Laminární box (Bioair Instruments, Itálie)

Lednice

Mikrozkumavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)

Nitrilové rukavice

Sérologické pipety o objemu 5ml, 10ml, 25ml (TPP, Švýcarsko)

Spektrofotometr Synergy 2 (BioTek, USA)

Světelný mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)

Vakuová odsávačka

Vodní lázeň (Julabo, Německo)

Třepačka Lab Dancer (IKA, Německo)

Chemikálie a reagensie

25- desacetyl rifampicin D288726 (TRC, Kanada)

3- formylo rifampicin SV BP627 (Merck, Německo)

DMEM high-glucose (Thermo Fisher Scientific, USA)

DMSO (dimethylsulfoxid, Merck, Německo)

Dual-Glo Luciferase Assay Systém (Promega, USA)

Fetální bovinní sérum (Merck, Německo)

Fosfátový pufr PBS (Phosphate Buffered Saline) viz tabulka 3

L-glutamin 200 mM (Merck, Německo)

Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Neesenciální aminokyseliny (Merck, Německo)

OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, USA)

Rifampicin chinon katalogové číslo R0800000 (Merck, Německo)

Rifampicin N-oxid katalogové číslo BP400 (Merck, Německo)

Rifampicin katalogové číslo R7382 (Merck, Německo)

Trypanová modř (Merck, Německo)

Plazmidy pro transfekci

Reportérový plazmid p3A4-luc obsahující PXR responzivní jednotku (ER6) a XREM (xenobiotic responsive enhancer module) genu CYP3A4 klonované do pGL3 luciferázového vektoru (Promega, USA).

Expresní konstrukt pSG5-PXR B jedná se o vektor pro wild type variantu lidského PXR, který byl poskytnutý Dr. S. Kliewerem (University of Texas, USA).

Expresní konstrukt pro lidský PXR (hPXR) transkripční varianta 2, jde o gen kódující nejdelší izoformu lidského PXR (GenScript, USA).

Expresní konstrukty pro myši PXR (mPXR), opičí PXR (oPXR) kódující PXR makaka rhesus a potkaní PXR (rPXR) byly zakoupeny od společnosti GenScript (USA).

Expresní plazmid pMDR1 kódující lidský efluxní transportér MDR1 s delecí úseku -7031-1803 promotoru lidského genu *ABCB1*.

pDNA3 vektor (Thermo Fisher Scientific, USA)

Expresní vektor pRL-TK kódující *renilla* luciferasu (Promega, USA)

Buněčná linie HepG2

HepG2 buňky jsou lidské jaterní nádorové buňky, které byly poprvé izolovány z lidského diferenciovaného hepatocelulárního karcinomu přítomného u 15letého bělošského muže. Tyto buňky jsou schopné rychlé proliferace a sekrece mnoha plazmatických proteinů jako např. transferin, fibrinogen, plasminogen a albumin. HepG2 buňky mají v porovnání s jaterními hepatocyty nižší metabolickou aktivitu v důsledku absence exprese enzymů nadrodiny CYP450 a jaderných receptorů PXR a CAR. Z tohoto důvodu je nutná jejich transfekce do HepG2 buněk za účelem provedení studií. Buněčná linie HepG2 buněk byla pro tento experiment dodána prostřednictvím European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (web 1, web 3, Arzumian *et al.* 2021).

HepG2 buňky byly uchovávány hluboce zmrazené v -80 °C v kryoprezervačním médiu sestávajícím se z fetálního bovinního séra (FBS) s přidavkem 10% DMSO (dimethylsulfoxid), který v těchto podmínkách brání krystalizaci a tím pádem i mechanickému poškození zmrazených buněk vlivem krystalizace. Rozmrazení kryozkumavky s HepG2 buňkami se provádělo v předehřáté vodní lázni, následně byl celý objem přenesen do kultivační lahvičky s 10 ml standardního kultivačního média DMEM čímž došlo ke snížení koncentrace DMSO na 1 %, což pro HepG2 buňky nepředstavuje cytotoxickou koncentraci.

Příprava fosfátového pufru

Pro potřebu oplachu buněk byl připravený fosfátový pufr (PBS) o fyziologickém pH, který se v dalším kroku sterilizoval v autoklávu. Podrobné složení pufru je popsáno v tabulce 3.

Tabulka 3 Složení PBS pufru.

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

5.2 Experimentální metody

5.2.1 Kultivace a pasážování HepG2 buněk

Buněčná kultivace byla prováděna v médiu DMEM obohaceném o 2 mM L-glutamin, 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % fetálního bovinního séra. HepG2 buňky byly umístěny do inkubátoru a inkubovány ve vlhčené atmosféře při 37 °C a 5 % CO₂.

Buňky byly pasážovány vždy po dosažení přibližně 80 % konfluency. Nejprve se pomocí vakuové odsávačky odstranilo staré médium a buňky byly opláchnuty pomocí PBS. Poté se vakuovou odsávačkou odstranil fosfátový pufr a buňky se nechaly asi 2 minuty inkubovat s 0,25 % trypsinem-EDTA (kys. edetová), který uvolnil buňky ode dna kultivační lahve. Následně se přidávkem stejného množství média zastavila proteolytická aktivita trypsinu. Sérologickou pipetou se shluky buněk pečlivě rozsuspendovaly až do vzniku homogenní suspenze, se kterou jsme dále pracovali. Část byla využita pro přípravu nové lahve, aby zůstala zachována buněčná linie a zbylá část se po spočítání využila na experimenty.

V mikroskopu jsme se připravili buněčnou suspenzi sestávající se z 5 μ l připravené buněčné suspenze, 30 μ l kultivačního média a 15 μ l trypanové modři 0,4 %, celý objem se pečlivě promíchal. Takto naředěná suspenze (10 μ l) se nanesla na Bürkerovu komůrku určenou k počítání množství buněk. Trypanová modř se použila k odlišení živých a mrtvých buněk, které obarví na modro. Následně jsme spočítali množství buněk přítomné v 1 ml a připravili buněčnou suspenzi v požadované koncentraci 440 000 buněk/ml pomocí kultivačního média a suspenze HepG2 buněk. Připravenou suspenzi jsme nasadili na 48 jamková kultivační plata, která jsme inkubovali při 37 °C a 5 % CO₂ v inkubátoru.

5.2.2 Metoda gene reporter assay

Prokaryotické a eukaryotické buňky se využívají k popisu mnoha buněčných procesů a signálních kaskád. Princip je založen na transfekci plazmidové cirkulární nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) do buňky. Buněčná membrána buněk má negativní náboj a neumožňuje snadný intracelulární přestup negativně nabitých molekul. K transfekci genetické informace se využívají různé technologické postupy např. chemická, fyzikální a biologická metoda. Biologická metoda vnáší neviróvé geny do buněk pomocí virových vektorů (transdukce). Fyzikálními metodami, jako je mikroinjekce, elektroporace a fototransfekce, je genetická informace vložena přímo do cytoplazmy hostitelských buněk. Během chemické transfekce dochází k vytvoření kladně nabitého nebo neutrálního komplexu NK (nukleové kyseliny) s transfekčním činidlem. K nejvýznamnějším z chemických metod patří lipomosa zprostředkovaná transfekce, označována jako lipofekce, kterou jsme využili i pro naše experimenty. Konkrétně bylo k lipofekci DNA konstruktů použito transfekční činidlo Lipofectaminu 3000, které vykazuje vysokou účinnost u HepG2 buněk (web 2, web 4).

Metoda genového reportérového systému je založena na transfekci reportérového plazmidu kódující expresi určitého proteinu, který lze snadno detekovat, typicky se jedná o luciferázu. Reportérový konstrukt mj. obsahuje promotorovou sekvenci námi studovaného genu, za níž následuje DNA sekvenci kódující onen snadno detekovatelný gen, nikoliv gen studovaný. Míra exprese reportérového genu je detekována v závislosti na charakteru použitého reportérového genu pomocí chemiluminiscence nebo enzymatické reakce. V našich experimentech byl použit reportérový gen pro světluškovou luciferasu (*luc+*), který kóduje expresi enzymu luciferasa. Gen *luc+* byl

umístěn za promotorovou oblast genu CYP3A4, kdy následnou indukcí exprese genu CYP3A4 dochází ke stimulaci exprese genu pro světluškovou luciferasu (web 2, web 4).

Dual-luciferase reporter assay

Princip duálního reportérového systému je založen na souběžné expresi dvou nezávislých reportérových enzymů v transfekovaných buňkách a jejich následná detekce pomocí změření luminiscence. Aktivita exprese zkoumaného reportéru je závislá na nastavených experimentálních podmínkách. Druhý reportér, tzv. kontrolní reportér, slouží jako vnitřní kontrola minimalizující experimentální variabilitu. Aktivita experimentálního reportéru je normalizována k aktivitě kontrolního reportéru a případná variabilita jednotlivých vzorků a experimentálních postupů je tak eliminována. Do HepG2 buněk byl transfekován reportérový konstrukt obsahující gen *luc+* pro světluškovou luciferasu vložený za promotorovou oblast genu CYP3A4. Transfekce vektoru pRL-TK pro gen *renilla* luciferasu (nacházející se v *Renilla reniformis* z řádu pérovníků) slouží jako kontrolní reportér minimalizující transfekční variabilitu (web 2).

Oba reportérové enzymy, světlušková a *renilla* luciferáza, je možno detekovat v jedné reakční směsi z důvodu rozdílné chemické struktury a substrátové afinity. Přidáním Luciferase Assay Reagentu II do vzorku se detekuje aktivita světluškové luciferázy, která poskytuje stabilní luminiscenční signál. Po změření luminiscence se do stejného vzorku přidá Stop&Glo Reagent, který zastavuje luminiscenci světluškové luciferázy a iniciuje luminiscenční reakci *renilla* luciferázy (web 2).

Pracovní postup:

1. HepG2 buňky byly nasazeny na 48jamková plata (110 000 buněk/jamka) a nechala se 24 h inkubovat. Následně se provedla transfekce.
2. Vakuovou odsávačkou byly buňky zbaveny starého média. V dalším kroku se k HepG2 buňkám pipetovalo čerstvé DMEM (150 μ l/jamka).
3. Do dvou mikrozkušavek bylo pipetováno Opti-MEM (15 μ l/jamka), kdy jedna mikrozkušavka sloužila pro přípravu roztoku Lipofectaminu a druhá pro přípravu roztoků použitých DNA konstruktů.
4. V první mikrozkušavce se k připravenému mediu Opti-MEM pipetoval Lipofectamin 3000 (0,45 μ l/ jamka) a následně byl celý roztok rovnoměrně rozdělen na dvě poloviny.

5. Do druhé mikrozkušavky (z kroku 3) byl přidán reagent P3000 (0,6 μ l/ jamka). V dalším kroku se do stejné mikrozkušavky pipetovali jednotlivé rozmražené plazmidy:
 - a. reportérový plazmid p3A4-luc (150 ng/ jamka),
 - b. expresní plazmid pSG5-PXR B (100 ng /jamka),
 - c. pRL-TK (30 ng/ jamka).
6. Celý roztok DNA vektorů z předchozího kroku (5) se rozdělil na dvě stejně velké části. K jedné části směsi plazmidů se přidal plazmid pMDR1 (200 ng/ jamka) a do druhé části byl pipetován prázdný plazmid pDNA3 (200 ng/ jamka).
7. Vzniklý roztok plazmidů s pMDR1 byl pomalu promíchán s obsahem zkumavky s Lipofectaminem 3000 (připraveném v kroku 4). Stejným způsobem byl smíchán i roztok plazmidů obsahující prázdný plazmid pDNA3 s druhou zkumavkou roztoku s Lipofectaminem 3000. Obě směsi byly následně inkubovány 10 min při pokojové teplotě.
8. K HepG2 buňkám na dvou 48jamkových kultivačních platech bylo pipetováno 30 μ l dané transfekční směsi.
9. Po 48 h kultivaci se HepG2 opláchly 500 μ l PBS a nechaly kultivovat s připravenými roztoky (příprava roztoků viz tabulka 4)
 - a. rifampicin (0,5-10 μ M),
 - b. rifampicin chinon (0,5-10 μ M),
 - c. rifampicin N-oxid (1-40 μ M),
 - d. 3-formylrifamycin SV (1-5 μ M),
 - e. 25-desacetylriřampicin (10-80 μ M),
 - f. DMSO (1%) použit jako kontrolní vzorek.
10. Přesně po 12 h inkubaci se vakuovou odsávačkou odsálo od buněk kultivační médium s testovanými látkami a buňky byly opláchnuty 500 μ l PBS. Po odsátí PBS byl k buňkám přidán pasivní lyzovací puřr (100 μ l/ jamka), který je součástí Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System. Kultivační plata se nechala zmrazit při -20 $^{\circ}$ C, kdy dojde k mechanickému poškození buněk vlivem vzniku krystalků a vyplavení luciferázy z buněk.
11. Po rozmražení se lyzát z obou 48jamkových plat přepipetoval do bílého 96jamkového kultivačního plata. K buněčnému lyzátu byl následně přidán Luciferase Assay Reagent II připravený podle pokynů výrobce, jehož

prostřednictvím byla detekována aktivita světluškové luciferázy v podobě luminiscence. Po změření luminiscence ve spektrofotometru Synergy 2 biotek byl do stejného vzorku pipetován Stop&Glo Reagent (oba reagenty jsou součástí kitu Dual-Luciferase® Reporter Assay System). Aktivita *renilla* luciferázy byla detekována stejným způsobem.

Tabulka 4 Příprava roztoků testovaných látek. V záhlaví tabulky jsou uvedené koncentrace použitých zásobních roztoků a jejich cílové koncentrace.

μM	20 mM [μl]	OM [μl]	10 mM [μl]	OM [μl]	1 mM [μl]	OM [μl]	DMSO [μl]
80	6,6	1650					
40	3,3	1650	6,6	1650			
10			1,65	1650			
5			0,825	1650			0,825
1					1,65	1650	
0,5					0,825	1650	0,825
DMSO 1%						3500	3,5

Pracovní postup experimentu se zvířecími konstrukty:

V tomto experimentu se postupovalo stejným způsobem jako u předešlého experimentu s výjimkou použitých expresních vektorů během transfekce a následnou 24 h inkubací HepG2 buněk s připravenými roztoky. Kroky 1. a 2. jsou shodné s předchozím postupem, dovolím si je tudíž v tomto pracovním postupu vynechat.

1. K transfekci se připravilo celkem 8 mikrokumavek, do kterých se přidal Opti-MEM. Do čtyř mikrokumavek byl přidán reagent P3000, reportérový konstrukt p3A4-luc (150 ng/jamka) a pRL-TK (30 ng/jamka); do zbylých čtyř se pipetoval Lipofectamin 3000. Pro přehlednější manipulaci s mikrokumavkami jsme si jednotlivé mikrokumavky popsali podle příslušného transfekovaného plasmidu.
2. V dalším kroku se do jednotlivých čtyř mikrokumavek, obsahujících reagent P3000 a reportérové konstrukty, pipetovali jednotlivé rozmražené plazmidy:

- a. lidský hPXR (100 ng/jamka),
 - b. myšší mPXR (100 ng/jamka),
 - c. opičí oPXR (100 ng/jamka),
 - d. potkaní rPXR (100 ng/jamka).
3. K HepG2 buňkám na dvou 48jamkových kultivačních platech bylo pipetováno 30 μ l dané transfekční směsi.
 4. Po 24 h inkubaci se HepG2 opláchly 500 μ l PBS a nechaly inkubovat s připravenými roztoky (příprava roztoků viz tabulka 5).
 - e. rifampicin (10 μ M),
 - f. rifampicin chinon (10 μ M),
 - g. rifampicin N-oxid (10 μ M),
 - h. 3-formylrifamycin SV (10 μ M),
 - i. 25-desacetylriřampicin (10 μ M),
 - j. PCN (50 μ M),
 - k. DMSO (1‰) použit jako kontrolní vzorek.
 5. Přesně po 24 h inkubaci se vakuovou odsávačkou odsálo od buněk kultivační médium s testovanými látkami a buňky byly opláchnuty 500 μ l PBS.
 6. Experiment byl zakončen přidáním 100 μ l pasivního lyzovacího pufru a celé plato bylo následně zmraženo při -20 °C.
 7. Analýza experimentu probíhala totožně s krokem 11. popsáním u předchozího experimentu.

Tabulka 5 Příprava roztoků pro genové reportérové experimenty. V záhlaví tabulky jsou uvedené koncentrace použitých zásobních roztoků, cílové koncentrace.

μ M	50 mM [μ l]	OM [μ l]	10 mM [μ l]	OM [μ l]	DMSO [μ l]
50	3,2	3200			
10			3,2	3200	
DMSO 1‰				3200	3,2

5.2.3 Statistické zpracování dat

Zpracování dat získaných ze spektrofotometru bylo provedeno s využitím softwaru MS Excel. K následnému grafickému a statistickému zpracování dat byl využit GraphPad Prism verze 9.5.0 (GraphPad Software Inc., USA). Statistická významnost byla určena pomocí jednocestné ANOVA analýzy s Dunnettovým post-hoc testem (porovnávání více hodnot vůči kontrole), nebo pomocí nepárového Studentova t-testu (porovnávání rozdílu středních hodnot dvou nezávislých měření). Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Veškeré experimenty byly prováděny v technických triplikátech, ve dvou resp. třech na sobě nezávislých biologických opakováních.

6 Výsledky

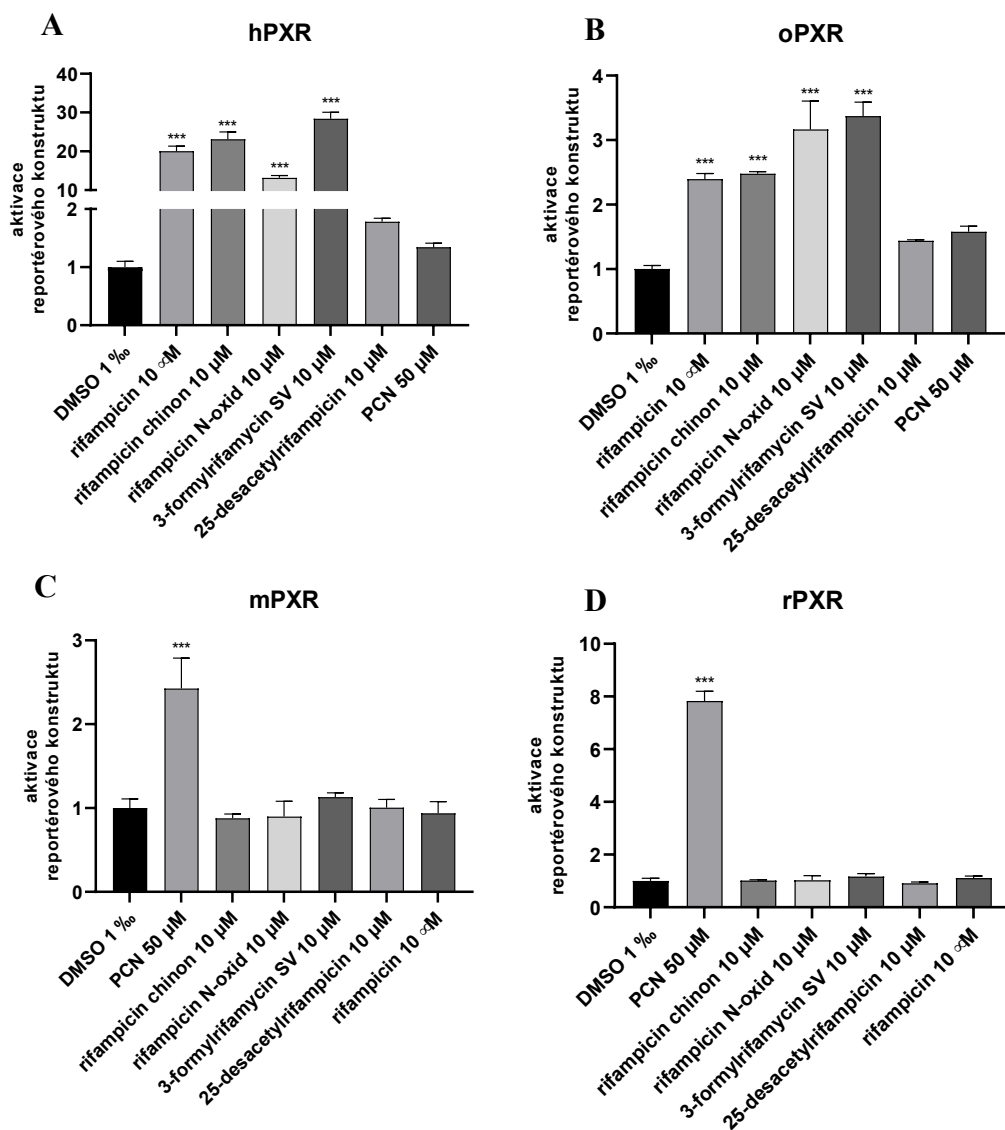
6.1 Stanovení aktivace PXR rifampicinem a jeho deriváty u zvířecích konstruktů metodou gene report assay

V našich prvních experimentech jsme se zabývali možnostmi aktivace PXR deriváty rifampicinu včetně mezidruhového srovnání se zvířecími orthology PXR. Konkrétně jsme použili konstrukty pro lidský hPXR, opičí oPXR, myší mPXR a potkaní rPXR. Rifampicin i všechny jeho deriváty byly testovány v koncentraci 10 μM , PCN (modelový ligand myšího a potkaního PXR) v koncentraci 50 μM .

Výsledky experimentu u lidského PXR (obr. 11 A) ukazují na statisticky významnou aktivaci hPXR u rifampicin chinonu a 3-formylrifamycinu SV, která je srovnatelná s aktivací vyvolanou rifampicinem. Rifampicin N-oxid aktivuje hPXR v porovnání s rifampicinem v menší míře, avšak i tato aktivace vykazuje statistickou významnost. Naopak 25-desacetylriřampicin ani PCN neaktivují v testované koncentraci lidský hPXR konstrukt.

Podobně jako u hPXR rovněž i u opičího konstruktů oPXR (obr. 11 B) došlo ke statisticky významné aktivaci reportérového konstruktů značící aktivaci oPXR vlivem vystavení rifampicinu, rifampicin chinonu a 3-formylrifamycinu SV. Všechny 3 tyto látky aktivovaly oPXR přibližně ve stejném rozsahu, avšak přibližně 8,5 krát méně. Rovněž rifampicin N-oxid vykazuje významnou aktivaci oPXR. Další podobnost s lidským hPXR vykazuje oPXR také v případě 25-desacetylriřampicinu a PCN, kdy opět nedošlo k žádnému významnému ovlivnění reportérového konstruktů.

Schopnost aktivovat potkaní rPXR (obr. 11 C) a myší mPXR (obr. 11 D) není u rifampicinu ani jeho derivátů statisticky významná. Pouze modelový ligand PCN vykazuje statisticky významnou aktivaci obou těchto hlodavčích receptorů.

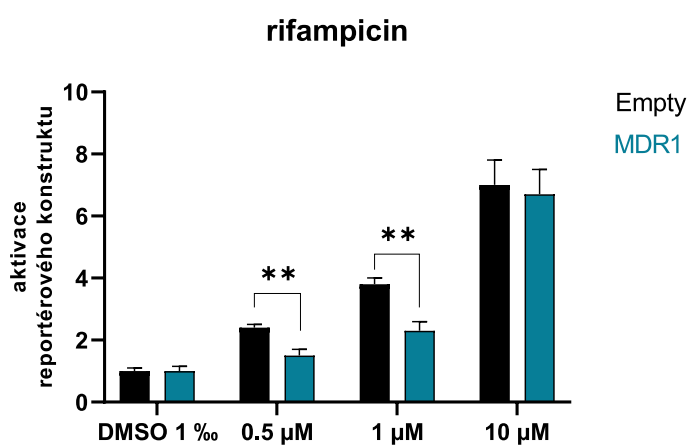


Obr. 11 A-D Aktivace PXR u zvířecích konstruktů po 24 h inkubaci HepG2 buněk s rifampicinem a jeho deriváty. Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnávána vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly provedeny ve dvou na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit jednosměrný test ANOVA s využitím Dunnettova post-hoc testu *** $P < 0,001$.

6.2 Určení potenciálu derivátů rifampicinu transportovat se pomocí lidského efluxního transportéru MDR1

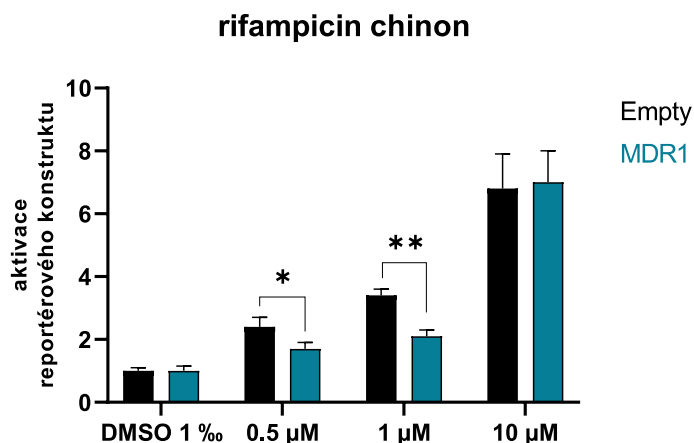
V druhé sérii našich experimentů jsme se zabývali potenciálem derivátů rifampicinu se z HepG2 buněk transportovat pomocí efluxního transportéru MDR1. Určení jsme prováděli nepřímo, a to pomocí metody gene reporter assay, kdy jsme vzájemně porovnávali aktivaci reportérového konstruktů v buňkách transfekovaných MDR1 s aktivací v buňkách transfekovaných pouze prázdným vektorem.

Z grafů na Obr. 12-16 je patrný významný rozdíl v aktivaci reportérového konstruktů mezi buňkami transfekovanými prázdným vektorem. Konkrétně byl statisticky významný rozdíl v aktivaci reportérového konstruktů pozorován u rifampicinu (0,5 μ M a 1 μ M), rifampicin chinonu (0,5 μ M, 1 μ M), rifampicin N-oxidu (10 μ M, 40 μ M), 3-formylrifamycinu SV 1 μ M a 25-desacetylrifampicinu 40 μ M. V důsledku afinity těchto derivátů k MDR1 došlo k jejich vyšší exkreci z buňky a tím pádem i ke snížení jejich potenciálu aktivovat PXR. Z těchto výsledků tedy nepřímo vyplývá, že MDR1 se podílí na efluxu rifampicinu i všech jeho derivátů z buňky.

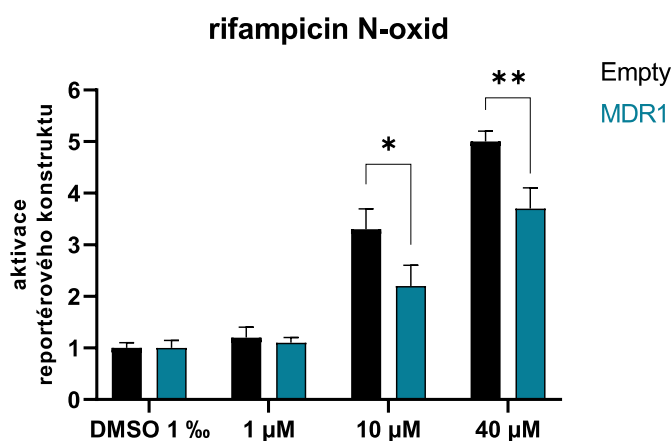


Obr. 12 Schopnost rifampicinu aktivovat reportérový konstrukt u HepG2 buněk transfekovaných expresním MDR1 plazmidem a prázdným pDNA3 plazmidem (empty). Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnáována vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly

provedeny ve třech na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit nepárový Studentův t-test, $**P < 0,01$.



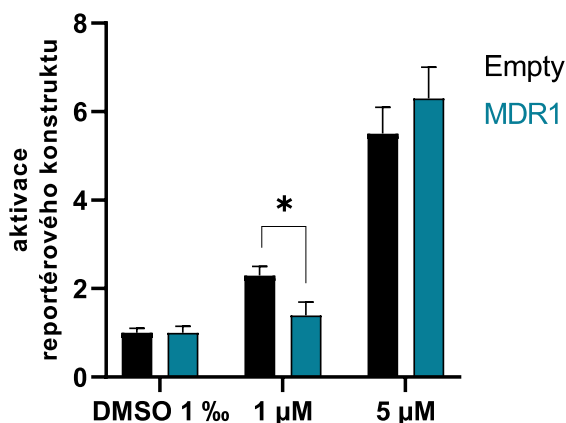
Obr. 13 Schopnost rifampicin chinonu aktivovat reportérový konstrukt u HepG2 buněk transfekovaných expresním MDR1 plazmidem a prázdným pDNA3 plazmidem (empty). Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnávána vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly provedeny ve třech na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit nepárový Studentův t-test, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$.



Obr. 14 Schopnost rifampicin N-oxidu aktivovat reportérový konstrukt u HepG2 buněk transfekovaných expresním MDR1 plazmidem a prázdným pDNA3 plazmidem (empty). Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnávána vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly

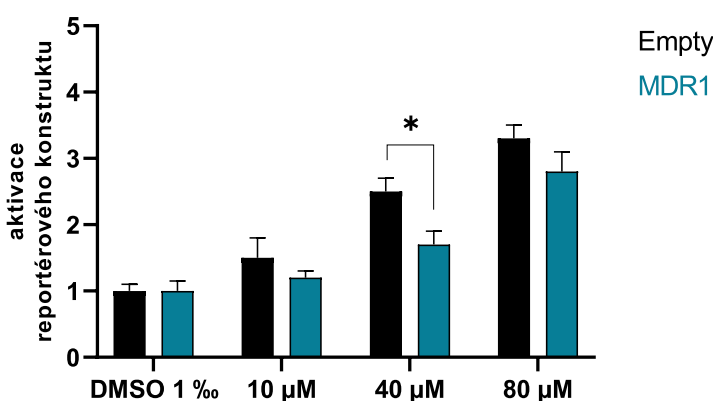
provedeny ve třech na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit nepárový Studentův t-test, *P < 0,05, **P < 0,01.

3-formylrifamycin SV



Obr. 15 Schopnost 3-formylrifamycinu SV aktivovat reportérový konstrukt u HepG2 buněk transfekovaných expresním MDR1 plazmidem a prázdným pDNA3 plazmidem (empty). Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnávána vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly provedeny ve třech na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit nepárový Studentův t-test, *P < 0,05.

25-desacetyl rifampicin



Obr. 16 Schopnost 25-desacetyl rifampicinu aktivovat reportérový konstrukt u HepG2 buněk transfekovaných expresním MDR1 plazmidem a prázdným pDNA3 plazmidem (empty). Experimenty byly provedeny metodou gene report assay. Data byla porovnávána vůči kontrole (DMSO 1 ‰), která odpovídá hodnotě 1. Jednotlivé experimenty byly provedeny ve třech na sobě nezávislých měřeních. Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit nepárový Studentův t-test, *P < 0,05.

7 Diskuse

Pregnanový X receptor, ligandem aktivovaný transkripční faktor, hraje významnou roli v biotransformačních procesech. V důsledku aktivace PXR dochází k regulaci exprese transportních proteinů z rodiny ABC (např. MDR1) i SLC (včetně OATP2), tak i biotransformačních enzymů I. (zejména CYP450) a II. fáze (např. UGT) metabolismu. V důsledku velké flexibility ligand vázající domény je PXR schopný interagovat s velkým množstvím strukturně odlišných ligandů. Vlivem vazby agonistů PXR dochází k jeho aktivaci a indukci transkripce cílových genů, což ve svém důsledku vede ke vzniku lékových interakcí, které mohou ovlivnit všechny farmakokinetické fáze. Nutno také podotknout, že ligand vázající doména jednotlivých orthologů PXR vykazuje značné mezidruhové rozdíly. Hepatální distribuci a exkreci exogenních a endogenních látek ovlivňují ABC transportéry, jedny z důležitých cílových genů PXR, které jsou lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytů. Mezi významné efluxní transportéry podílející se na farmakokinetických dějích patří MDR1 (P-gp) (Pavek *et al.* 2016, Lv *et al.* 2022, Cheng *et al.* 2011, Chai *et al.* 2016, Orans *et al.* 2005, Moscovitz *et al.* 2018).

Semisyntetické ansamycinové antibiotikum rifampicin patří mezi klinicky významné ligandy PXR. Aktivací zmíněného nukleárního receptoru PXR a následnou expresí cílových genů se podílí na vzniku lékových interakcí a může vést až k selhání farmakoterapie řady klinicky užívaných léčiv. K selhání terapeutického účinku léčiv může také dojít následkem řady interakcí s ostatními léčivy a přírodními látkami např. třezalkovým čajem (Moore *et al.*, 2000). Rifampicin je ve vodném fyziologickém prostředí nestabilní a dochází k rozkladným mechanismům, kde hlavním degradačním enzymem je AADAC, jehož účinkem vzniká biologicky neaktivní 25-desacetylrifampin, který má nižší potenciál indukce a toxicitu v porovnání s ostatními deriváty (Nakajima *et al.* 2011). Mechanismem rozkladných a oxidačních reakcí vznikají ve vodném prostředí další deriváty rifampicinu jako např. rifampicin chinon, 3-formylrifamycin SV a rifampicin N-oxid (Nakajima *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006, Kobayashi *et al.* 2012).

Metodou gene report assay u HepG2 buněčné linie jsme zkoumali schopnost aktivace PXR po inkubaci s rifampicinem a jeho deriváty (rifampicin chinon, 25-desacetylrifampicin, 3-formylrifamycin SV a rifampicin N-oxid) a následně porovnávali mezidruhovou závislost, kde doposud chybí dostatek informací. V rámci

jednotlivých zvířecích orthologů jsme posuzovali aktivaci reportérového konstruktů u lidského hPXR, opičího oPXR, myšího mPXR a potkaního rPXR. Pro tyto experimenty byla zvolena jednotná koncentrace 10 μM , což představuje standardní experimentálně používanou koncentraci rifampicinu. Rifampicin, který patří mezi modelové ligandy lidského PXR, a jeho jednotlivé deriváty, s výjimkou u 25-desacetylriřampicinu, vyvolávaly významnou aktivaci hPXR a lze je tedy na základě našich výsledků označit za ligandy lidského PXR. 25-desacetylriřampicin v koncentraci 10 μM nevyvolal významnou aktivaci, což je v souladu s prací publikovanou kolektivem autorů Nakajima *et al.* (2011), kteří prováděli gene reporter experimenty rovněž u HepG2. V jejich případě však testovali nejvyšší koncentraci 25-desacetylriřampicinu 20 μM po dobu 48 h. Nicméně v našich dalších experimentech zabývajících se možností efluxu prostřednictvím MDR1 transportéru jsme používali výrazně vyšší koncentrace (až 80 μM), které už významnou aktivaci PXR vyvolaly už po 24 h inkubaci. Tyto hodnoty však výrazně převyšují maximální plazmatické koncentrace rifampicinu samotného ($6,5 \pm 3,5$ $\mu\text{g/ml}$ resp. $7,9 \pm 4,3$ μM). V případě jeho hlavního metabolitu, 25-desacetylriřampicinu, budou maximální plazmatické koncentrace dosahovat ještě nižších hodnot, nejedná se tedy o klinicky významný ligand hPXR (Goodman *et al.* 2006). V nedávno publikované práci zabývajících se vztahem mezi strukturou a afinitou k ligand vazebné doméně PXR testovali mimo jiné i afinitu 3-formylriřampicinu SV. V souladu s našimi výsledky byla prokázána vyšší afinita 3-formylriřampicinu SV k LBD PXR než je tomu v případě rifampicinu (Lin *et al.*, 2023).

Opičí oPXR vykazoval značnou podobnost ve výsledcích v porovnání s lidským PXR. K významné aktivaci reportérového konstruktů došlo opět v případě rifampicinu, rifampicin chinonu, rifampicin N-oxidu a také 3-formylriřampicinu SV. Aktivace však nedosahovala tak vysokých hodnot v porovnání s lidskými, které byly o necelý řád vyšší. Stejně jako v případě lidského hPXR ani oPXR není 25-desacetylriřampicin za námi stanovených experimentálních podmínek ligandem. Data z naší studie potvrzují mezidruhovou podobnost v afinitě rifampicinu a jeho derivátů u hPXR a oPXR, což i odpovídá poměrně blízké genetické příbuznosti zmiňovaných druhů na rozdíl od hlodavců.

Rifampicin, ani žádný jeho testovaný derivát neaktivovali myší mPXR ani potkaní rPXR, k aktivaci došlo pouze v případě modelového ligandu PCN. Tato naše zjištění tedy doplňují známý fakt, že rifampicin patří mezi silné aktivátory hPXR, ale u hlodavců

vykazuje slabou afinitu k PXR. Lidský hPXR a mPXR se z 80 % shodují v aminokyselinové sekvenci LBD domény a DBD doména je z 96% identická, což koresponduje s cílovými geny zmiňovaných živočišných druhů. Jedním z faktorů způsobujících mezidruhové odlišnosti v aktivaci PXR může být nehomologní sekvence aminokyselin a struktura ligand-vázající domény (LBD) mezi jednotlivými druhy (Cheng *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006, Zong *et al.* 2003).

MDR1 je přirozeně ve vysoké míře exprimován ve zdravé jaterní tkáni, avšak poprvé byla jeho přítomnost detekována v kolchicin rezistentních nádorových ovariálních buňkách křečka čínského. Aktivací PXR se zvyšuje exprese genů biotransformačních enzymů a transportních proteinů (včetně MDR1) a výsledkem je zvýšená exkrece léčiv s následným snížením jejich plazmatické koncentrace v krvi. Nadměrná indukce exprese genu pro MDR1 je spojována s lékovou rezistencí u nádorových buněk. Mnoho substrátů s afinitou k MDR1 jsou současně substráty CYP450 a dochází tak ke koordinované regulaci jejich eliminace z organismu (Fung *et al.* 2009, Mora Lagares *et al.* 2021, Hoosain *et al.* 2015, Choudhuri *et al.* 2006, Staudinger *et al.* 2013).

Potenciál rifampicinu a jeho derivátů transportovat se pomocí MDR1 byl stanovován nepřímo využitím metody gene reporter assay u buněčné linie HepG2. Metoda poskytla vzájemné porovnání aktivace reportérového konstruktů v buňkách transfekovaných MDR1 s aktivací v buňkách transfekovaných pouze prázdným vektorem (pDNA3 plazmidem), který nemá vliv na aktivitu reportérového konstruktů a využívá se pro stanovení rozdílů mezi transfekcemi. Míra schopnosti transportu rifampicinu a jeho derivátů pomocí efluxního transportéru je ovlivněna substrátovou afinitou. Výsledky experimentu nepřímo ukazují na míru afinity rifampicinu a jeho zkoumaných derivátů k MDR1. Koncentrační rozmezí bylo zvoleno na základě našich předběžných experimentů pro každou z testovaných látek zvlášť. Konkrétně jsme zvolili následující koncentrační rozmezí pro rifampicin (0,5 – 10 μM), rifampicin chinon (0,5 – 10 μM), rifampicin N-oxid (1 – 40 μM), 3-formylrifamycin SV (1 – 5 μM) a 25-desacetylrifampicin (10 – 80 μM). Zvýšená exkrece testovaných látek pomocí MDR1 snižuje intracelulární koncentraci studovaných látek v HepG2 buňkách, a tím zeslabuje schopnost aktivace PXR a tedy ani aktivace reportérového konstruktů nedosáhne tak vysokých hodnot ve srovnání s kontrolními buňkami transfekovanými pouze prázdným vektorem.

Rifampicin je známým substrátem pro MDR1 efluxní transportér (Hartkoorn et al., 2006) což bylo potvrzeno i v naší studii a naší nepřímou metodu určení lze tedy považovat za validní. Pozorovali jsme významně nižší aktivaci u buněk exprimujících MDR1 ve srovnání s buňkami transfekovanými pouze prázdným vektorem při koncentraci rifampicinu 0,5 μM a 1 μM . Naopak v důsledku saturace MDR1 jsme při vyšší koncentraci (10 μM) nepozorovali prakticky žádný rozdíl v aktivaci reportérového konstruktů. Téměř totožných výsledků jsme dosáhli při inkubaci buněk s rifampicin chinonem a lze ho tedy také pokládat za substrát MDR1. Další z testovaných derivátů byl 3-formylrifamycin SV, který rovněž vykazoval významný rozdíl v aktivaci reportérového konstruktů v nízké koncentraci (1 μM), při vyšší (5 μM) se opět projevil efekt saturace transportéru. I tento derivát rifampicinu tedy můžeme považovat za substrát MDR1.

Poslední dva testované deriváty rifampicin N-oxid a 25-desacetylrifampicin nevykazovaly signifikantní rozdíly v nejnižších testovaných koncentracích (1 μM resp. 10 μM). Důvodem bude zanedbatelný vliv derivátů na aktivaci reportérového konstruktů ve zmiňovaných koncentracích, která se pohybuje přibližně v rozsahu kontroly (1 % DMSO). Významné rozdíly v aktivaci jsme u rifampicin N-oxidu pozorovali při testování vyšších koncentrací 10 μM a 40 μM . V případě 25-desacetylrifampicinu byl výrazný pokles v aktivaci u MDR1 transfekovaných buněk pouze v případě koncentrace 40 μM , při inkubaci s 80 μM 25-desacetylrifampicinem došlo k vyrovnání účinků na reportérový konstrukt zřejmě v důsledku saturace transportéru. I v tomto případě lze jak rifampicin N-oxid, tak i 25-desacetylrifampicin považovat za substráty MDR1 efluxního transportéru.

Pregnanový X receptor, jehož modelovým ligandem je rifampicin, se podílí na regulaci všech farmakokinetických dějů, a to prostřednictvím regulace transkripce lékových transportérů a biotransformačních enzymů I. i II. fáze. Detailní poznání vlivu rifampicinu a jeho derivátů na jak aktivaci PXR, tak i možnosti transportovat se pomocí MDR1, je tedy nezbytné pro stanovení účinnosti a bezpečnosti farmakoterapie. Četné lékové interakce vznikají na podkladě enzymové indukce nebo kompeticí o lékové transportéry včetně MDR1, který vyazuje širokou substrátovou specifitu. Studium aktivace vybraných zvířecích konstruktů PXR rifampicinem a jeho deriváty přispívá k porovnání mezidruhové odlišnosti a stanovení možného potenciálního experimentálního modelu pro studium farmakokinetiky léčiv.

8 Závěr

Studium aktivace PXR rifampicinem a jeho deriváty přináší nové poznatky v oblasti lékových interakcí. Výsledky experimentu se zvířecími konstrukty přináší nové poznatky v oblasti mezidruhové závislosti v aktivaci PXR.

Ke stanovení potenciálu derivátů rifampicinu transportovat se pomocí lidského efluxního transportéru MDR1 a k určení aktivace PXR rifampicinem a jeho deriváty u zvířecích konstruktů jsme využili stejnou metodu jako v předchozím případě, gene reporter assay, provedenou na HepG2 buňkách.

Výsledky u zvířecích konstruktů ukazují na mezidruhovou podobnost v aktivaci PXR mezi hPXR a oPXR, u kterých došlo ke statisticky významné aktivaci reportérového konstruktu vlivem rifampicinu, rifampicin chinonu, rifampicin N-oxidu a 3-formylrifamycinu SV. Rovněž PXR u obou zvolených hlodavčích druhů (mPXR a rPXR) byla pozorována mezidruhová podobnost, žádný ze zvolených derivátů ani rifampicin neaktivoval reportérový konstrukt.

Z námi dosažených výsledků dále vyplývá, že efluxní transportér MDR1 se účastní transportu rifampicinu i všech jeho zkoumaných derivátů.

9 Literatura

1. ACUÑA, Kimura, Morita HAMADAT, Matsuo CORBALÁN, et al. Rifampicin and Its Derivative Rifampicin Quinone Reduce Microglial Inflammatory Responses and Neurodegeneration Induced In Vitro by α -Synuclein Fibrillary Aggregates: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. *Cells*. 2019, **8**(8), 1303-1310. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8080776
2. AHMED JUVALE, Iman Imtiyaz, Azzmer Azzar ABDUL HAMID, Khairul Bariyyah ABD HALIM, et al. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 2022, **8**(6), 1747-1756. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09777
3. AL-DOSARI, Mohammed S., Mohammad K. PARVEZ, Charles PELOQUIN, et al. Novel plant inducers of PXR-dependent cytochrome P450 3A4 expression in HepG2 cells: Multiplicity and Function. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018, **26**(8), 1069-1072. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2018.05.016
4. ARZUMANIAN, Viktoriia A., Olga I. KISELEVA, Ekaterina V. POVERENNAYA, et al. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(23), 181-188. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222313135
5. BAYLON, Javier L., Ivan L. LENOV, Stephen G. SLIGAR, et al. Characterizing the Membrane-Bound State of Cytochrome P450 3A4: Structure, Depth of Insertion, and Orientation. *Journal of the American Chemical Society*. 2013, **135**(23), 8542-8551. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja4003525
6. BULUTOGLU, Beyza, Camilo REY-BEDÓN, Safak MERT, et al. A comparison of hepato-cellular in vitro platforms to study CYP3A4 induction: implications for a safer and more effective drug therapy. *PLOS ONE*. 2020, **15**(2), 1563-1570. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0229106
7. BURMAN, William J., Keith GALLICANO, Charles PELOQUIN, et al. Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Rifamycin Antibacterials: Multiplicity and Function. *Clinical Pharmacokinetics*.

- 2001, **40**(5), 327-341. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200140050-00002
8. CORSINI, Alberto, Michele BORTOLINI, Akinori NAKAJIMA, et al. Drug-Induced Liver Injury: The Role of Drug Metabolism and Transport. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2013, **53**(5), 463-474. ISSN 00912700. Dostupné z: doi:10.1002/jcph.23
 9. DOSTÁLEK, Miroslav, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Farmakokinetika*. Vyd. 3., české. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.
 10. FUNG, King Leung, Michael M. GOTTESMAN, Anna SEELIG, et al. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function: The Molecular Mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2009, **1794**(5), 860-871. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2009.02.014
 11. GANESAN, M., G. KANIMOZHI, B. PRADHAPSINGH, et al. Phytochemicals reverse P-glycoprotein mediated multidrug resistance via signal transduction pathways: 40 Years of Expertise. *International Journal of Toxicology*. 2021, **139**(4), 231-259. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111632
 12. GOODMAN, L., Gilman, A., Brunton, L., Lazo, J. and Parker, K., 2006. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill.
 13. GUENGERICH, F. Peter, Michael R. WATERMAN, Martin EGLI, et al. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function: The Molecular Mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2016, **37**(8), 625-640. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2016.05.006
 14. HARTKOORN, Ruben C., Becky CHANDLER, Andrew OWEN, Stephen A. WARD, S. BERTEL SQUIRE, David J. BACK, Saye H. KHOO a Steven A. KLIEWER. Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis*. 2007, **87**(3), 248-255. ISSN 14729792. Dostupné z: doi:10.1016/j.tube.2006.12.001
 15. HARTL, Jiří, Doležal Martin, Miletín Miroslav, Opletalová Veronika, Zimčík Petr. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2019. ISBN 978-80-246-4264-2.

16. HOOSAIN, Famida G., Yahya E. CHOONARA, Lomas K. TOMAR, et al. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmaco-resistant Schizophrenia Therapy. *BioMed Research International*. 2015, **2015**(1), 1-21. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2015/484963
17. HUANG, Pengxiang, Vikas CHANDRA, Fraydoon RASTINEJAD, Martin LANZENDÖRFER, Petr PÁVEK a Zhi-Lin LUAN. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual Review of Physiology*. 2010, **72**(1), 247-272. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135917
18. CHAI, Sergio C., Milu T. CHERIAN, Yue-Ming WANG, Taosheng CHEN, Petr PÁVEK a Zhi-Lin LUAN. Small-molecule modulators of PXR and CAR: Insights into Physiology and Therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016, **1859**(9), 1141-1154. ISSN 18749399. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagrm.2016.02.013
19. CHANDRA P, Brouwer KL. The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res*. 2004;**21**(5):719-735. doi:10.1023/b:pham.0000026420.79421.8f
20. CHEN, Jiezhong, Kenneth RAYMOND, M V RELLING, et al. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006, **5**(1), 4001-4005. ISSN 1476-0711. Dostupné z: doi:10.1186/1476-0711-5-3
21. CHEN, Yakun, Yong TANG, Changxiong GUO, et al. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: A structural perspective. *Biochemical Pharmacology*. 2012, **83**(8), 1112-1126. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2012.01.030
22. CHENG, Jie, Xiaochao MA a Frank J GONZALEZ. Pregnane X receptor- and CYP3A4 -humanized mouse models and their applications. *British Journal of Pharmacology*. 2011, **163**(3), 461-468. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01129.x
23. CHOUDHURI S, Klaassen CD. *Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1)*,

- ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters. International Journal of Toxicology.* 2006;25(4):231-259. doi:10.1080/10915810600746023
24. KOBAYASHI, Yuki, Tatsuki FUKAMI, Akinori NAKAJIMA, et al. Species Differences in Tissue Distribution and Enzyme Activities of Arylacetamide Deacetylase in Human, Rat, and Mouse: Multiplicity and Function. *Drug Metabolism and Disposition.* 2012, **40**(4), 671-679. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.111.043067
25. KODAN, Atsushi, Ryota FUTAMATA, Yasuhisa KIMURA, et al. ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs: a review of animal and human studies. *FEBS Letters.* 2021, **595**(6), 707-716. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1002/1873-3468.14018
26. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny.* Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1416-8.
27. LI-BLATTER, Xiaochun, Andreas BECK, Anna SEELIG, et al. P-Glycoprotein-ATPase Modulation: The Molecular Mechanisms. *Biophysical Journal.* 2012, **102**(6), 1383-1393. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2012.02.018
28. LIN, Wenwei, Andrew D. HUBER, Shyaron POUDEL, Yongtao LI, Jayaraman SEETHARAMAN, Darcie J. MILLER, Taosheng CHEN a Steven A. KLIEWER. Structure-guided approach to modulate small molecule binding to a promiscuous ligand-activated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2023, **120**(10), 248-255. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2217804120
29. LINCOVÁ, Dagmar, Hassan FARGHALI a Lutz HEIN. *Základní a aplikovaná farmakologie.* 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-807-2623-730.
30. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie.* Vyd. 3., české. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
31. LV, Ye, Yi-Yang LUO, Hui-Wen REN, Cheng-Jie LI, Zhi-Xin XIANG a Zhi-Lin LUAN. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. *Frontiers in Endocrinology.* 2022, **13**(3), 461-468. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2022.959902

32. LYNCH, Tom, and Amy Price. "The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects." *American family physician* vol. 76,3 (2007): 391-6.
33. MANGELSDORF, David J., Carl THUMMEL, Miguel BEATO, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 1995, **83**(6), 835-839. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90199-X
34. MAO, Q., Unadkat, J.D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J* **17**, 65–82 (2015). <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>
35. MCKINNON, Ross A, Michael J SORICH, Michael B WARD, et al. Cytochrome P450 Part 1: Multiplicity and Function. *Journal of Pharmacy Practice and Research*. 2008, **38**(1), 55-57. ISSN 1445937X. Dostupné z: doi:10.1002/j.2055-2335.2008.tb00798.x
36. Mgr. Hyršová Lucie. Nové aspekty funkce a regulace pregnanového X receptoru. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2018: 129 s.
37. Monika Ola et al., Rifampicin: Anti Tubercular Drug: An Overview., *Indo Am. J. P. Sci*, 2019; 06(05)
38. MOORE, Linda B., Bryan GOODWIN, Stacey A. JONES, G. Bruce WISELY, Cosette J. SERABJIT-SINGH, Timothy M. WILLSON, Jon L. COLLINS a Steven A. KLIEWER. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, **97**(13), 7500-7502. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.130155097
39. MORA LAGARES, Liadys, Nikola MINOVSKI, Ana Yisel CABALLERO ALFONSO, et al. Homology Modeling of the Human P-glycoprotein (ABCB1) and Insights into Ligand Binding through Molecular Docking Studies: Current Knowledge and Emerging Concepts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(11), 719-735. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21114058
40. MOSCOVITZ, Jamie E., Amit S. KALGUTKAR, Kelly NULICK, Nathaniel JOHNSON, Zhiwu LIN, Theunis C. GOOSEN a Yan WENG. Establishing Transcriptional Signatures to Differentiate PXR-, CAR-, and AhR-Mediated Regulation of Drug Metabolism and Transport Genes in Cryopreserved Human

- Hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2018, **365**(2), 262-271. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.117.247296
41. NAKAJIMA, Akinori, Tatsuki FUKAMI, Yuki KOBAYASHI, et al. Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: Rifampicin, rifabutin, and rifapentine. *Biochemical Pharmacology*. 2011, **82**(11), 1747-1756. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2011.08.003
 42. NISHIMURA, Masuhiro, Akiko KOEDA, Emako SUZUKI, et al. Regulation of mRNA Expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Primary Cultures of Human and Rat Hepatocytes: 40 Years of Expertise. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2006, **21**(4), 297-307. ISSN 13474367. Dostupné z: doi:10.2133/dmpk.21.297
 43. NISHIMURA, Masuhiro, Akiko KOEDA, Hiroshi MORIKAWA, et al. Comparison of Inducibility of Multidrug Resistance (MDR)1, Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP)1, and MRP2 mRNAs by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Primary Cultures of Human and Cynomolgus Monkey Hepatocytes: The Role of Drug Metabolism and Transport. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008, **31**(11), 2068-2072. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.31.2068
 44. ORANS, Jillian, Denise G. TEOTICO, Matthew R. REDINBO, Timothy M. WILLSON, Jon L. COLLINS a Matthew R. REDINBO. The Nuclear Xenobiotic Receptor Pregnane X Receptor: Recent Insights and New Challenges. *Molecular Endocrinology*. 2005, **19**(12), 2891-2900. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi:10.1210/me.2005-0156
 45. PATEL, Rahul, James BARKER, Amr ELSHAER, et al. Pharmaceutical Excipients and Drug Metabolism: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(21), 719-735. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21218224
 46. PAVEK, Petr, Malek AZAR, Elfriede FRIEDMANN, Martin LANZENDÖRFER, Petr PÁVEK a Zhi-Lin LUAN. Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2016, **7**(6), 461-468. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2016.00456

47. PROCHAZKOVA, Jirina, Martina LANOVA, Jiri PACHERNIK, et al. Multidrug resistance-associated ABC transporters – too much of one thing, good for nothing: 40 Years of Expertise. *BioMolecular Concepts*. 2012, **3**(4), 319-331. ISSN 1868-503X. Dostupné z: doi:10.1515/bmc-2012-0006
48. RIGALLI JP, Theile D, Nilles J, Weiss J. Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning. *Cells*. 2021; 10(11):3137. <https://doi.org/10.3390/cells10113137>
49. ROBBINS, Delira, Taosheng CHEN, Fraydoon RASTINEJAD, Martin LANZENDÖRFER, Petr PÁVEK a Zhi-Lin LUAN. Tissue-specific regulation of pregnane X receptor in cancer development and therapy: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual Review of Physiology*. 2014, **4**(1), 247-272. ISSN 2045-3701. Dostupné z: doi:10.1186/2045-3701-4-17
50. SAFE, Stephen, Un-Ho JIN, Erik HEDRICK, et al. Minireview: Role Of Orphan Nuclear Receptors in Cancer and Potential as Drug Targets. *Molecular Endocrinology*. 2014, **28**(2), 157-172. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi:10.1210/me.2013-1291
51. SAKAEDA, Toshiyuki, Tsutomu NAKAMURA a Katsuhiko OKUMURA. MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002, **25**(11), 1391-1400. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.25.1391
52. SEIGNEURET, Michel, Arlette GARNIER-SUILLEROT, Michael B WARD, et al. A Structural Model for the Open Conformation of the mdr1 P-glycoprotein Based on the MsbA Crystal Structure: Multiplicity and Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **278**(32), 30115-30124. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M302443200
53. SOROKOUMOVA, G. M., V. V. VOSTRIKOV, A. A. SELISHCHEVA, et al. Bacteriostatic activity and decomposition products of rifampicin in aqueous solution and liposomal composition: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008, **42**(8), 475-478. ISSN 0091-150X. Dostupné z: doi:10.1007/s11094-008-0153-3
54. STAUDINGER, Jeff L., Sarah WOODY, Mengxi SUN, et al. Nuclear-receptor-mediated regulation of drug- and bile-acid-transporter proteins in gut and liver: A structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, **45**(1), 48-59. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2012.748793

55. STAVROPOULOU, Elisavet, Gratiela G. PIRCALABIORU, Eugenia BEZIRTZOGLU, et al. The Role of Cytochromes P450 in Infection: a review of animal and human studies. *Frontiers in Immunology*. 2018, **9**(6), 707-716. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.00089
56. SVECOVA, Lucie, Radim VRZAL, Ladislav BURYSEK, et al. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, **36**(2). ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.107.018341
57. ŠVIHOVEC, Jan, ed., BULTAS, Jan, ed., ANZENBACHER, Pavel, ed., CHLÁDEK, Jaroslav, ed., et al. *Farmakologie*. Ilustrace Miroslav BARTÁK. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. xix, 962 stran.
58. TAKEUCHI, Toshiyuki, Sumie YOSHITOMI, Tomoaki HIGUCHI, et al. Establishment and Characterization of the Transformants Stably-Expressing MDR1 Derived from Various Animal Species in LLC-PK1. *Pharmaceutical Research*[online]. 2006, **23**(7), 1460-1472 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-006-0285-7
59. TEBBENS, Jurjen Duintjer, Malek AZAR, Elfriede FRIEDMANN, Martin LANZENDÖRFER, Petr PÁVEK a Zhi-Lin LUAN. Mathematical Models in the Description of Pregnane X Receptor (PXR)-Regulated Cytochrome P450 Enzyme Induction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(6), 461-468. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19061785
60. URBATSCH, Ina L., Grace A. TYNDALL, Gregory TOMBLINE, et al. P-glycoprotein Catalytic Mechanism: Multiplicity and Function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **278**(25), 23171-23179. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M301957200
61. VAN MONTFOORT, J. E., Hagenbuch, B., Groothuis, G. M., Koepsell, H., Meier, P. J., & Meijer, D. K. (2003). Drug uptake systems in liver and kidney. *Current drug metabolism*, **4**(3), 185–211. <https://doi.org/10.2174/1389200033489460>
62. WEIKUM, Emily R., Xu LIU, Eric A. ORTLUND, et al. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*. 2018, **27**(11), 1876-1892. ISSN 09618368. Dostupné z: doi:10.1002/pro.3496
63. YANO, Kentaro, Takumi TOMONO a Takuo OGIHARA. Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators. *Biological and Pharmaceutical*

Bulletin. 2018, **41**(1), 11-19. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.b17-00725

64. YASUHISA, Kimura, Morita SHIN-YA, Matsuo MICHINORI, et al. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1: Possible Applications in Pharmaco-resistant Schizophrenia Therapy. *Cancer Science*. 2007, **98**(9), 1303-1310. ISSN 13479032. Dostupné z: doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00538.x
65. ZHAO, Mingzhe, Jingsong MA, Mo LI, et al. Pharmaceutical Excipients and Drug Metabolism: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(23), 719-735. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312808
66. ZONG, Jian, Gary M. POLLACK, Tomoaki HIGUCHI, et al. Modulation of P-glycoprotein Transport Activity in the Mouse Blood-Brain Barrier by Rifampin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2003, **306**(2), 556-562 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.103.049452

Internetové zdroje

web 1

Culture Collections: ECACC General Cell Collection: Hep G2 [online]. *Health Security Agency, UK* [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

web 2

Dual-Luciferase Reporter Assay System: Technical manual [online] *Promega: Global USA*, 2015 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

web 3

Gibco Cell culture basics handbook: Master basic cell culture techniques and achieve consistent results [online]. *Thermo Fisher Scientific*, 2020 [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>

web 4

Introduction Reporter Gene Assay [online]. *Promega* [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>