

# 1 Souhrn

---

CYP3A4 je významným enzymem podílejícím se na eliminaci většiny biotransformovaných xenobiotik. Hraje zásadní úlohu v detoxifikačním systému lidského těla, čímž je také zodpovědný za vznik řady lékových interakcí. Tyto interakce představují výraznou komplikaci současné farmakoterapie, neboť v krajních případech mohou ústít až k selhání léčby či život ohrožujícímu vystupňování toxických účinků.

LI jsou důsledkem změn aktivity CYP3A4, která je mezi jednotlivci velice variabilní. Důležitým mechanismem ovlivnění aktivity CYP3A4 je regulace indukovatelné transkripce prostřednictvím xenobiotiky aktivovaných nukleárních receptorů. Jedná se zejména o receptory PXR, CAR a GR. Intenzivní studium struktury promotoru *CYP3A4* a mechanismů regulace jeho transkripce v posledních letech ještě zdaleka není u konce, vztahy mezi jednotlivými receptory a kofaktory, stejně jako schopnost léčiv zasahovat do exprese CYP3A4 je doposud odkryta jen zčásti.

Tato práce přispívá k objasnění některých otázek týkajících se účinků azolových antimykotik na aktivitu transkripce *CYP3A4* zprostředkovanou PXR, schopnosti valproátu aktivovat PXR a CAR či okolností placentární exprese CYP3A4 prostřednictvím GR. K experimentům byly využity moderní molekulárně biologické metody a probíhaly *in vitro* v kulturách primárních hepatocytů a buněčných linií.

K jednotlivým cílům dizertační práce:

1. Vliv vybraných azolových antimykotik na genovou expresi *CYP3A4* prostřednictvím PXR. Objasnění povahy sledovaných efektů na molekulární úrovni (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Otestovali jsme účinky vybraných azolových antimykotik (klotrimazolu, ketokonazolu, itrakonazolu, flukonazolu, oxikonazolu, ekonazolu a mikonazolu) na genovou expresi *CYP3A4* prostřednictvím PXR v primární kultuře lidských hepatocytů a buněčných linií HepG2, LS174T a CV-1. S využitím metod real time RT-PCR, gene reporter assay, one hybrid assay a two hybrid assay jsme sledovali schopnost azolů transaktivovat promotor *CYP3A4* nejen individuálně, ale

také v přítomnosti rifampicinu, standardního induktoru CYP3A4 přes PXR. Zaznamenali jsme významné odlišnosti mezi jednotlivými azoly, identifikovali jsme potentní induktor oxikonazol a do jisté míry objasnili povahu sledovaných efektů na úrovni interakcí azolů s LBD PXR či na úrovni jejich schopností ovlivnit tvorbu komplexu PXR/SRC-1. Na základě dose-response analýz jsme zkonstatovali, že rifampicin není schopen plné aktivace PXR a ve vztahu k oxikonazolu se chová jako parciální agonista. Naopak rifampicin v přítomnosti ekonazolu nebo mikonazolu vykazuje aditivní efekt na aktivaci PXR. Pozorované účinky vedou k závěru, že schopnost azolů ovlivnit expresi CYP3A4 je pro každou strukturu individuální a že změny, které mohou v důsledku aktivace PXR zapříčinit, se neomezují pouze na studovaný enzym.

2. Účinek kyseliny valproové na genovou expresi *CYP3A4* prostřednictvím CAR. Zavedení metody EMSA na naše pracoviště za účelem testování interakcí adekvátních responzivních elementů v přítomnosti či nepřítomnosti kyseliny valproové (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

S využitím real time RT-PCR a gene reporter assay jsme popsali indukční účinek kyseliny valproové na genovou expresi *CYP3A4* prostřednictvím CAR a PXR, a to v lidských hepatocytech a liniích HepG2 a LS174T. Po zavedení metody EMSA jsme pozorovali zesílení vazby komplexu CAR/RXR $\alpha$  na responzivní elementy DR3, DR4 a ER6 v přítomnosti valproátu. Dále jsme zaznamenali účinkem valproátu zvýšenou katalytickou aktivitu CYP3A4 v buňkách LS174T transfekovaných PXR. Kyselina valproová ovlivňuje expresi řady genů mechanismy, které zatím nejsou uspokojivě popsány. Tyto výsledky poprvé potvrzují schopnost valproátu aktivovat transkripci *CYP3A4* prostřednictvím CAR a PXR (Naznačují také na možný vliv epigenetické regulace CYP3A4 a na možnost farmakologického zásahu do tohoto typu regulace.

3. Objasnění role HNF4 $\alpha$  při aktivaci *CYP3A4* promotoru prostřednictvím GR $\alpha$ . Vysvětlení jaterní specifity této aktivace (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Metodou gene reporter assay jsme testovali schopnost buněk trofoblastu JEG3 kotransfekovaných GR $\alpha$  a HNF4 $\alpha$  exprimovat CYP3A4, a to v přítomnosti či nepřítomnosti dexametazonu. Vnesení HNF4 $\alpha$  do buněk nemělo na expresi žádný vliv, pozorovali jsme pouze mírné zvýšení exprese po inkubaci s dexametazonem. Tato pozorování jsou v souladu se způsobem regulace transkripce *CYP3A4* prostřednictvím GR $\alpha$ , která se realizuje nepřímo

zvýšením exprese *PXR*, *CAR* a *RXR $\alpha$* . Tyto receptory se v trofoblastu nevyskytují, tudíž nedošlo k aktivaci transkripce *CYP3A4*. Zajímavý je ovšem signifikantně indukční účinek dexametazonu v přítomnosti HNF4 $\alpha$ , který naznačuje důležitou úlohu tohoto jaterně specifického receptoru při indukovatelné transkripci některých genů.

Závěrem je možno konstatovat, že vytýčené cíle byly naplněny. Experimentální práce přinesly zajímavé poznatky obohacující dosavadní znalosti ohledně aspektů genové regulace *CYP3A4*. Výsledky byly publikovány formou článků v impaktovaných časopisech a jako ústní i posterové prezentace na vědeckých konferencích.

