

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM INTERAKCÍ LÉČIV S TRANSPORTÉRY Z
RODINY OATP ZA VYUŽITÍ STŘEVNÍCH TKÁŇOVÝCH
ŘEZŮ**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Patricia Čečková

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu“.

V Hradci Králové

Podpis:

.....

Podakovanie

Veľmi rada by som sa poďakovala PharmDr. Ivanovi Vokřálovi, Ph.D., za to, že ma odborne viedol, venoval mi svoj čas a mal so mnou trpezlivosť. Taktiež by som sa chcela poďakovať aj Mgr. Ondřejovi Martincovi a Mgr. Martinovi Huličiakovi za pomoc s experimentálnou časťou diplomovej práce, ich ochotu a čas. Ďakujem aj Katedre farmakológie a toxikológie a Katedre biochémie a xenobiochémie za príjemnú atmosféru.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Patřicia Čečková

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of drug interactions with OATP family transporters using intestinal tissue slices

An essential role in the action of orally administered drugs is their absorption through the intestinal barrier. It expresses a variety of transporters, including the OATP2B1 and OATP1A2 influx transporters, belonging to the SLC family. They are located on the apical membrane of enterocytes and allow the flow of endogenous and exogenous substances from the lumen of the intestines to the enterocyte. They affect not only the pharmacokinetics of drugs, but also their safety and efficacy. They represent sites of drug interactions with other drugs/food components that may altered drug efficacy or toxicity. Since FDA (The Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency) do not have intestinal OATP transporters included in their guidelines for pre-clinical studies, there is no single model of interaction study. The limitations of cell models and genetically modified organisms lead to the development of new methods such as the *ex vivo* method of precision cut intestinal slices (PCIS), which represents a tissue model reflecting the true 3D structure of the intestinal barrier.

The aim of this diploma thesis was to optimize the PCIS method to study drug interactions of intestinal OATP transporters (OATP1A2 and OATP2B1). We chose estrone-3-sulfate as a model substrate. Using rat intestinal slices, we analyzed the accumulation of estrone-3-sulfate in the individual intestinal segments and also attempted to create its saturation curve. We studied the interactions of selected OATP1A2, OATP2B1 inhibitors (cyclosporine A, verapamil, chrysin, rosuvastatin, quercetin, naringin) and ABC inhibitors (Ko, Ly, CP) in rat jejunum. Moreover, we analyzed the interactions of some inhibitors (cyclosporin A, naringin) in human jejunum.

We were unable to optimize the PCIS method for intestinal OATP transporters. However, if we want to understand more about the complex functioning of the intestinal barrier and the role of the OATP transporters, its optimization should continue.

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK.....	8
2	ÚVOD	10
3	TEORETICKÁ ČASŤ	11
3.1	Črevná bariéra	11
3.2	Transportéry v črevnej bariére	12
3.2.1	ABC nadrodina	12
3.2.1.1	P-gp	13
3.2.1.2	MRP2	13
3.2.1.3	BCRP	13
3.2.2	SLC nadrodina	14
3.2.2.1	OATP transportéry v črevnej bariére	14
3.3	Klinický význam interakcií OATP transportérov	18
3.3.1	OATP1A2	18
3.3.2	OATP2B1.....	19
3.3.3	OATP1B1 a OATP1B3	20
3.4	Modely štúdia črevnej absorpcie.....	21
3.4.1	<i>In vitro</i> modely.....	21
3.4.1.1	Transfekované línie buniek.....	21
3.4.1.2	Oocyty <i>Xenopus laevis</i>	22
3.4.2	<i>Ex vivo</i> model ultratenkých tkanivových rezov	22
4	HYPOTÉZA A CIELE.....	24
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	25
5.1	Chemikálie a reagenty.....	25
5.2	Prístrojové vybavenie	26
5.3	<i>Ex vivo</i> metóda ultratenkých intestinálnych rezov	27
5.3.1	Príprava intestinálnych rezov	27
5.3.1.1	Potkanie rezy	27
5.3.1.2	Ľudské rezy	28
5.3.2	Aplikácia metódy PCIS na akumulčné štúdie	29
5.3.3	Stanovenie obsahu proteínu	30
5.4	Štatistická analýza dát	31
6	VÝSLEDKY	32

6.1	Potkan	32
6.1.1	Akumulácia estron-3-sulfátu v intestinálnych segmentoch	32
6.1.2	Saturačná krivka estron-3-sulfátu.....	35
6.1.3	Vybrané inhibítory transportérov OATP1A2 a OATP2B1	36
6.1.3.1	Naringín (NRG).....	36
6.1.3.2	Chrysín (CHR).....	36
6.1.3.3	Kvercetín (QER).....	36
6.1.3.4	Cyklosporín A (CsA).....	37
6.1.3.5	Verapamil (VER).....	37
6.1.3.6	Rosuvastatín (ROS)	37
6.1.3.7	Výsledky experimentov s vybranými inhibítormi OATP1A2 a OATP2B1 transportérov	38
6.1.4	Inhibícia efluxných ABC transportérov	41
6.1.4.1	Ly-335979/Zosuquidar.....	41
6.1.4.2	Ko-143	41
6.1.4.3	CP-100356	41
6.1.4.4	Výsledky experimentov s inhibítormi efluxných ABC transportérov.....	41
6.2	Človek.....	43
6.2.1	Inhibičný účinok naringínu a cyklosporínu A na OATP1A2 a OATP2B1 transportéry	43
7	DISKUSIA	45
8	ZÁVER.....	49
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	50

1 ZOZNAM SKRATIEK

ABC - ATP-binding cassette

ADME - absorpcia, distribúcia, metabolizmus a exkrécia

ATP - adenzíntrifosfát

AUC - area under the curve (obsah plochy pod krivkou)

BCRP/ABCG2 - breast cancer resistance protein

c_{max} - maximálna koncentrácia v plazme po jednorazovom podaní liečiva

cRNA - complementary RNA (komplementárna RNA)

CYP - cytochróm

E3S - estron-3-sulfát

EMA – European Medicines Agency (Európska lieková agentúra)

FDA - The Food and Drug Administration (Úrad pro kontrolu potravín a liečiv)

HEK 293 - Human embryonic kidney 293 (bunková línia)

HMG-Co-A - 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzým A

CHO - Chinese hamster ovary (bunková línia)

KHP - Krebs-Henseleit pufrovací roztok

K_m - Michaelisova konštanta (parameter rovnice Michaelisa a Mentenovej)

LLC-PK1 - Lewis Lung Carcinoma-Porcine Kidney 1 (bunková línia)

MATE - multidrug and toxin extrusion

MCT - monocarboxylate transporter

MDCK - Madine-Darby canine kidney (bunková línia)

mRNA - messenger RNA (mediátorová RNA)

MRP 2/ABCC2 - multidrug resistance associated protein 2

NTCP - sodium/taurocholate cotransporting peptides

OATP - organic anion transporter polypeptide

OCT - organic cation transporter

OCTN - organic cation / carnitine transporter

PCIS - precision-cut intestinal slices

PCR - polymerase chain reaction

PEPT - oligopeptide transporter

PGE2 - prostaglandín E2

P-gp/MDR1/ABCB1 - P-glykoproteín

PMAT - plasma membrane monoamine transporter

SLC - solute carrier

V_{\max} - maximálna rýchlosť transportu substrátu

WME - Williams E medium (inkubačné médium)

2 ÚVOD

Väčšina liečiv dostupných na dnešnom farmaceutickom trhu je podávaných perorálne. Ide o spôsob podania, ktorý je veľmi jednoduchý a pohodlný pre pacienta, čím prispieva k zlepšeniu pacientovej compliance (Bardal *et al.*, 2011). Aby takto podané farmakum mohlo v cieľovom orgáne pôsobiť, musí prejsť intestinálnou bariérou, následne vedie portálnym obehom cez pečeň a dosahuje systémovú cirkuláciu (Kalliokoski and Niemi, 2009).

Dôležitým faktorom podmieňujúcim biodostupnosť, je absorpcia z čreva, odkiaľ sa väčšina perorálne podaných liečiv vstrebáva. Črevná bariéra exprimuje veľké množstvo transportných proteínov, medzi ktoré patria aj OATP transportéry (Organic anion transporting polypeptides). Radíme ich do rodiny influxných SLC transportérov (Solute carrier transporters) a ich úlohou je zabezpečiť prenos látok do buniek (El-Kattan and Varm, 2012). Niektoré endogénne látky a xenobiotiká sú substrátmi uvedených transportérov a teda za ich pomoci prechádzajú z lúmen čriev do enterocytov.

Problém predstavujú interakcie týchto transportérov s inými liečivami, či potravou, ktoré majú za následok ovplyvnenie tohto prenosu a vedú k zmene účinnosti liečiv pôsobiacich ako substráty (Tamai and Nakanishi, 2013). Pokiaľ sú tieto zmeny významné, výsledkom je neúčinná farmakoterapia, ktorá môže u niektorých liečiv ohroziť zdravie pacienta. Pre klinickú prax je teda dobré vedieť, ktoré látky vykazujú na danom transportnom proteíne inhibičnú/indukčnú aktivitu a ktoré sú substrátom. Tým je možno interakciám predchádzať a zvoliť pre pacienta bezpečnú a účinnú farmakoterapiu.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Črevná bariéra

Ludské črevo meria približne 7,5 m a anatomicky sa člení na tenké (tvoria ho segmenty- duodenum, jejunum, ileum) a hrubé (kolon). Povrch tenkého čreva je zväčšený vďaka prítomnosti výbežkov - klkov a mikroklkov. V tejto časti prebieha väčšina absorpcie, zatiaľ čo hrubé črevo je zodpovedné za transport niektorých elektrolytov a vody (Kiela and Ghishan, 2016). Epitel čriev pozostáva z monovrstvy polarizovaných buniek, enterocytov, ktoré sú spolu pevne prepojené a vytvárajú dôležitú bariéru chrániacu organizmus pred vonkajším prostredím. Je selektívne priepustná a má dve hlavné funkcie. Umožňuje absorpciu živín, elektrolytov a vody z lumen čriev do systémovej cirkulácie a naopak, poskytuje telu účinnú ochranu pred toxínmi či protilátkami (Groschwitz and Hogan, 2009). Črevná bariéra teda predstavuje fyziologickú ochranu pre transport endogénnych a exogénnych látok, kam patria aj liečivá.

Na to, aby perorálne podávané liečivo mohlo pôsobiť v cieľovom mieste, musí prejsť apikálnou membránou do enterocytu a následne bazolaterálnou membránou do portálneho krvného obehu. Absorpcia z čreva je dôležitým faktorom, ktorý podmieňuje biodostupnosť perorálne podaných liečiv. Prechod látok membránou črevných buniek zahŕňa procesy pasívnej difúzie a transportu pomocou prenášačov. Pasívna difúzia má dve zložky a to paracelulárny transport, kedy liečivo difunduje vodnými pórmi medzi tesnými spojmi enterocytov, a transcelulárny transport lipidovou vrstvou buniek. Transport liečiva cez črevnú bariéru môže byť taktiež sprostredkovaný za pomoci špecifických transportných proteínov zo skupiny influxných a efluxných transportérov. Expresia týchto transportérov sa v rámci jednotlivých intestinálnych segmentov spravidla líši (El-Kattan and Varm, 2012).

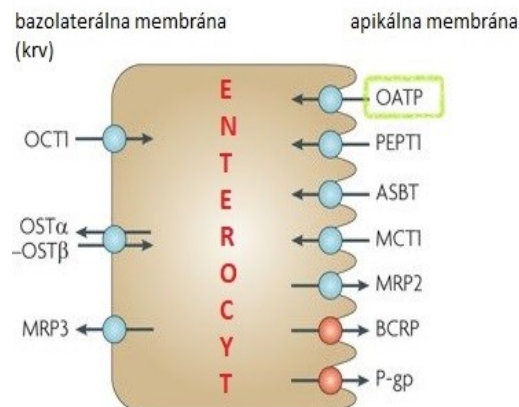
Tok látok črevnou bariérou môže byť obojsmerný, to znamená, že látky prechádzajú z lumen čriev do centrálného obehu a následne na miesto svojho pôsobenia a naopak. Navyše niektoré látky podliehajú v črevnej stene metabolizácii za pomoci enzýmov.

To, či látka bude prechádzať enterocytmi do krvného obehu, prípadne opačným smerom, závisí na fyzikálnochemických vlastnostiach danej látky. Dôležitú úlohu zohráva veľkosť molekuly, acidobázické vlastnosti substancie i prostredia, rozpustnosť v lipidoch a vo vode a taktiež afinita k transportérom (Bardal *et al.*, 2011).

3.2 Transportéry v črevnej bariére

Membránové transportéry ovplyvňujú farmakokinetiku liečiv, ich účinnosť a bezpečnosť. V tele majú na starosti dynamický prechod látok, napr. cukrov, aminokyselín, nukleotidov, anorganických iónov a liečiv. Sú exprimované napríklad na luminálnej a/alebo bazolaterálnej membráne enterocytov (prehľad na Obr.1 (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010)), hepatocytov, ľadvinových bunkách a taktiež placentárnej či hematoencefalickej bariére a prispievajú k udržaniu homeostázy organizmu. Delia sa do dvoch nadradených rodín, a to ABC (ATP-binding cassette) a SLC (solute carrier) transportéry (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010; Estudante *et al.*, 2013).

Keďže telo funguje komplexne, je dobré vedieť, ktoré tkanivá a orgány exprimujú dané transportéry, v akom množstve, kde sa transportér nachádza a v akom smere transport prebieha.



Obrázok 1: Prehľad transportérov črevnej bariéry lokalizovaných na apikálnej/bazolaterálnej membráne enterocytov. Prevzaté a upravené (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010).

3.2.1 ABC nadrodina

Tieto transportéry používajú ako zdroj energie ATP (adenozíntrifosfát), ktorý im umožňuje pumpovať substráty proti koncentračnému gradientu a zabraňuje tak absorpcii niektorých látok (Locher, 2004). Členovia ABC nadrodiny umožňujú transport substrátov do bunky (influxné) aj z bunky (effluxné). Okrem expresie v čreve sú prítomné aj v placentе, semenníkoch, hematoencefalickej a hemoretinálnej bariére, kde majú ochrannú funkciu. V tubulárnych bunkách ľadvín a žlčových kanálikoch zvyšujú vylučovanie liečiv.

V črevnej bariére je najviac zastúpený P-glykoprotein (P-gp), multidrug resistance - associated protein 2 (MRP 2) a breast cancer resistance protein (BCRP). Jedná sa o efluxné transportéry, ktoré sú umiestnené na apikálnej (luminálnej) membráne enterocyту. Ich inhibíciou či indukciou dochádza k ovplyvneniu absorpcie rady klinicky významných a často predpisovaných liečiv, preto sú predmetom skúmania liekových interakcií (Estudante *et al.*, 2013).

3.2.1.1 P-gp

V literatúre známy aj ako MDR1 (Multidrug resistance protein1), ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1). Jedná sa o efluxný transportér obmedzujúci distribúciu látok do mozgu, semenníkov, placenty, či gastrointestinálneho traktu (luminálna membrána). Zároveň napomáha eliminácii látok z pečene a ľadvín (apikálna membrána). V gastrointestinálnom trakte je najviac exprimovaný na enterocytoch tenkého čreva. Medzi jeho substráty patrí široké spektrum liečiv, napríklad digoxín, proteázové inhibítory, dabigatran, etopozid, cyklosporín, a endogénnych molekúl (steroidy, bilirubín). Jeho inhibícia a indukcia mnohokrát vedú k závažným interakciám (Finch and Pillans, 2014). Jeho expresia je u človeka najvyššia v ileu a kolone a smerom k jejunu a duodenu sa znižuje (Ho, Moodie and Satsangi, 2003).

3.2.1.2 MRP2

Synonymum ABCC2 (ATP binding cassette subfamily C member 2). Tento efluxný transportér je lokalizovaný na apikálnej membráne polarizovaných buniek (hlavne hepatocyty, epiteliálne bunky proximálneho kanálu ľadvín, enterocyty a placenta) (Nies and Keppler, 2007). Podieľa sa na transporte liečiv, eliminácii a detoxikácii látok z organizmu vo forme konjugátov s glutathionom, sulfátom alebo glukuronátom, ale aj samostatne. Medzi jeho substráty patr cisplatina, metotrexát, sachinavir, či azitromycín (Jedlitschky, Hoffmann and Kroemer, 2006). Expresia MRP2 je u človeka najvyššia v duodene a jejune a smerom k distálnym častiam čriev klesá (Takano, Yumoto and Murakami, 2006).

3.2.1.3 BCRP

Jedná sa o transportér, ktorý má pomerne široké zastúpenie v tkanivách. Nazýva sa tiež ABCG2 (ATP binding cassette subfamily G member 2). Môžeme ho nájsť na apikálnej membráne placentárnych buniek, enterocytoch tenkého a hrubého čreva, pečeni, pľúcach, v prsnom tkanive, či hematoencefalickej bariére (Leslie, Deeley and Cole,

2005). Vykazuje zvýšenú mieru expresie v prsníkoch v období laktácie a taktiež pri niektorých typoch nádorov. Substráty tvorí široké spektrum endogénnych, aj exogénnych látok, napríklad nitrofurantoin, rosuvastatín, metotrexát, topotekan a.i. (Ni *et al.*, 2010). U ľudí je exprimovaný vo všetkých segmentoch čriev, najviac však v jejunu (Englund *et al.*, 2006).

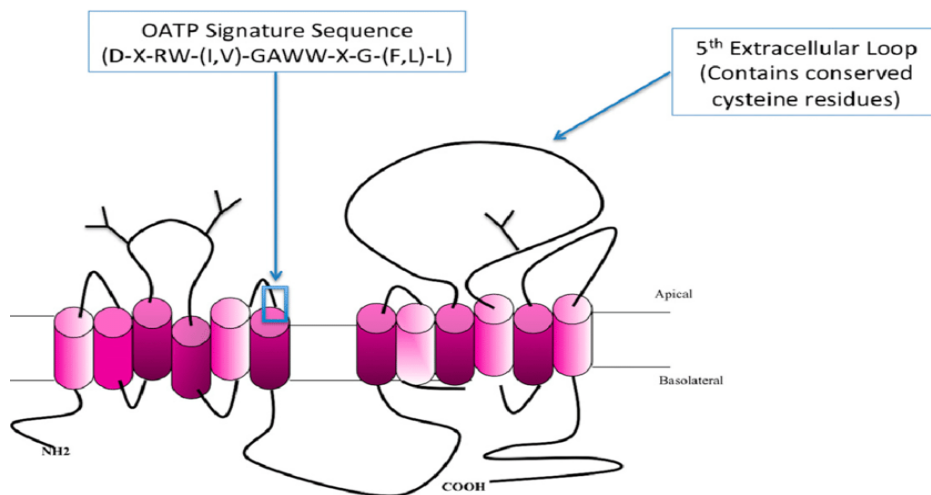
3.2.2 SLC nadrodina

SLC transportéry nevyžadujú k svojej činnosti ATP. Ich mechanizmus spočíva vo facilitovanej difúzií, kedy je substrát prenášaný po koncentračnom gradiente, alebo v sekundárne aktívnom transporte využívajúcom symport/antiport, ktorý im umožňuje prechod membránou proti koncentračnému gradientu. Patrí tu viac ako 400 členov organizovaných do 65 rodín, založených na transportnej funkcii a sekvenčnej homológii (Bai, Moraes and Reithmeier, 2017). Tak isto sú umiestnené na dôležitých biologických bariérach a sprostredkujú prenos širokej škály substrátov, do ktorej patria aminokyseliny, cukry, peptidy, vitamíny, žľčové kyseliny a xenobiotiká. Najvýznamnejšie z hľadiska črevnej absorpcie a farmakokinetiky liečiv sú influxné transportéry patriace do rodín PEPT (oligopeptide transporter), OCT (organic cation transporter), OCTN (organic cation/carnitine transporter), OATP (organic anion transporter polypeptide), PMAT (plasma membrane monoamine transporter) a MCT (monocarboxylate transporter) (Estudante *et al.*, 2013). Spomedzi uvedených SLC transportérov, najvyššiu prevalenciu v tenkom čreve ľudí vykazuje PEPT1 transportér, ktorý má zvýšenú expresiu v duodene a ileu. Transportéry OCTN1 a OATP2B1 sa nelíšia expresiou v jednotlivých intestinálnych segmentoch. MCT1 transportér je najviac exprimovaný v kolone a duodene, OCTN2 transportér v kolone. Otázka expresie OATP1A2 transportéru v črevnej bariére je nejasná a je bližšie popísaná v príslušnej podkapitole (Englund *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2007).

3.2.2.1 OATP transportéry v črevnej bariére

Ako už bolo spomínané, OATP transportéry patria do nadrodiny SLC. Doteraz bolo identifikovaných 11 OATP zástupcov, ktoré radíme do 6 rodín a 10 podrodín na základe aminokyselinovej sekvencie. Jedná sa o influxné transportéry nezávislé na prenose Na⁺. Zabezpečujú prechod mnohých endogénnych a exogénnych látok naprieč bunkami a tkanivami tela (Kalliokoski and Niemi, 2009). Ich popis a štruktúra je znázornená na Obr.2 (Hagenbuch and Meier, 2004; Ronaldson and Davis, 2013).

V porovnaní so zástupcami ABC nadrodiny sa o nich vie podstatne menej. Transportéry OATP1B1 a OATP1B3 sa nachádzajú výhradne v pečeni. Čo sa týka expresie v čreve, najviac je z tejto skupiny zastúpený OATP2B1 transportér, ďalej nasleduje OATP4A1, OATP3A1 a OATP4C1. mRNA OATP1A2, OATP1B1 a OATP1B3 sú tu len v stopových množstvách (Drozdik *et al.*, 2014). Keďže predmetom záujmu výskumných skupín sú hlavne OATP1A2 a OATP2B1, o ostatných transportéroch z tejto rodiny sa toho vie veľmi málo (Oswald, 2018).



Obrázok 2: Schematické znázornenie všeobecnej štruktúry OATP transportéru. Proteín tvorí 12 transmembránových domén, pričom medzi 9. a 10. doménou sa v extracelulárnom priestore nachádza veľká slučka. Na 2. a 5. extracelulárnej slučke sú viditeľné miesta N-glykozylácie vyskytujúce sa naprieč celou OATP skupinou. Prevzaté a upravené (Hagenbuch and Meier, 2004; Ronaldson and Davis, 2013).

OATP1A2

Jedná sa o prvý ľudský OATP transportér, ktorý bol naklonovaný z pečene a podrobne popísaný. Dominantným miestom výskytu je hematoencefalická bariéra mozgu, kde sa podieľa na transporte niektorých látok do mozgu, napríklad opioidných peptidov - deltorfin II (Zhou *et al.*, 2015). Jeho prítomnosť bola opísaná aj v ďalších tkanivách, napríklad v distálnom tubule ľadvín, pečeni, retine, pľúcach, semenníkoch, cholangiocytoch, ale aj v nádorových bunkách (Franke, Scherkenbach and Sparreboom, 2009).

Otázkou ostáva expresia v črevách, kde sa názory odborníkov rozchádzajú. Imunohistochemické farbenie tohto transportéru vyšlo pozitívne a pomohlo ho lokalizovať na apikálnej membráne enterocytov duodena spolu s ABCB1 (Glaeser *et al.*, 2007). Iným výskumným skupinám sa ho na úrovni génov ani proteínu nepodarilo detekovať v dostatočnom množstve, pričom bola použitá kvantitatívna PCR (polymerase chain reaction)

a kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou (Hilgendorf *et al.*, 2007; Meier *et al.*, 2007; Miyauchi *et al.*, 2016). Je teda možné, že expresia OATP1A2 mRNA neodráža množstvo tohto transportéru alebo jeho aktivitu.

Medzi endogénne substráty OATP1A2 patrí PGE2 (prostaglandín E2), kyselina all-trans-retinová, bilirubín, žľčové kyseliny, hormóny štítnej žľazy a steroidné konjugáty. Z liečiv sa podieľa na prenose antihistaminika fexofenadínu, D-penicilamínu, metotrexátu, brómsulfaleínu, imatinibu, statínov (rosuvastatín, pravastatín), či betablokátorov (talinolol). Hrá významnú úlohu v uptaku fluorochinolónov, protinádorových liečiv a niektorých antiretrovirotík (sachinavir) cez telesné membrány (Franke, Scherkenbach and Sparreboom, 2009; Hagenbuch, 2019).

Podľa *in vitro* štúdií s metotrexátom (Badagnani, 2006) a imatinibom (Eechoute *et al.*, 2011) na oocytoch *Xenopus laevis* je transport týchto látok ovplyvniteľný hodnotou pH a pri nižšom pH, prítomnom aj v duodene, je zvýšený. Navyše v populácii sa vyskytujú jednonukleotidové polymorfizmy tohto transportéru (Franke, Scherkenbach and Sparreboom, 2009), ktoré môžu tak isto ovplyvniť vstrebávanie liečiv pomocou OATP1A2, preto je potrebné ich viac skúmať.

Zatiaľ čo funkčný transportér OATP1A2 u človeka je 1 a líši sa v expresii, lokalizácii, množstve a smere transportu, u potkana je tento systém ešte komplikovanejší, pretože tvorí 5 ortológov nesúcich určitú zhodnosť s ľudským OATP1A2 proteínom, nie však úplnú totožnosť (Hagenbuch and Meier, 2004). V čreve potkana je na apikálnej membráne enterocytov lokalizovaný jeho OATP1a5 ortológ, ktorý sa podieľa na transporte fexofenadínu či steroidných konjugátov (MacLean *et al.*, 2010).

OATP2B1

OATP2B1 bol pôvodne izolovaný z ľudského mozgu. Spolu s OATP1B1 a OATP1B3 je vo veľkej miere zastúpený na sinusoidálnej membráne hepatocytov (krv) a podieľa sa na uptaku látok z krvi do pečene. Ďalej sa nachádza napríklad v placentе, luminálnej membráne endoteliálnych buniek mozgu, srdci, pľúcnych cievach, ale aj ľadvinách, slezine, ováriách a bunkách adenokarcinómu (Hagenbuch and Meier, 2004).

Je exprimovaný vo všetkých segmentoch čriev, v zvýšenej miere však v tenkom čreve, pričom zastúpenie naprieč ním je približne rovnaké (Meier *et al.*, 2007; Gröer *et al.*, 2013). Nejasná je ale jeho lokalizácia. Doteraz sa myslelo, že je prítomný na luminálnej/apikálnej membráne a má na starosti influx endogénnych aj exogénnych látok z lumen čriev do enterocytu (Kobayashi, 2003). Niektoré výskumné skupiny prišli s celkom

novou informáciou, a to, že jeho lokalizácia by mohla byť na bazolaterálnej membráne (Mooij *et al.*, 2016; Keiser *et al.*, 2017). Avšak aj tu sa názory líšia, Keiser *et al.* (2017) udáva smer transportu látok z krvi do enterocytu a Mooij *et al.* (2016) opačným smerom. Tieto nejasné závery vo funkcii a lokalizácii len potvrdzujú, že je potrebné OATP2B1 transportér bližšie skúmať.

Rovnako ako ostatné OATP, sprostredkúva transport organických amfifilných molekúl nezávisle na Na^+ . Fyziologická úloha v tele spočíva v distribúcii a eliminácii endogénnych látok, akými sú napríklad žľčovú kyseliny a steroidné hormóny (podobnosť s OATP1A2). K liečivám tvoriacim substráty patrí telmisartan, glibenklamid, amiodaron, bosentan, brómsulfalein, talinolol, aliskiren, fexofenadín a statíny (Hagenbuch, 2019).

Spoločne s OATP1A2 a OATP1B3 je aktivita tohto transportéru závislá na hodnote pH. Táto skutočnosť bola pozorovaná na transporte estron-3-sulfátu (E3S), kedy pri pH 5.0 došlo oproti pH 7.4 k niekoľkonásobnému nárastu V_{\max} aj K_m (Kobayashi, 2003). Ďalej bolo zistené, že zmenou pH môžeme rozšíriť spektrum substrátov, ako napríklad pravastatín, cerivastatín a pitavastatín, ktoré pri pH 7.4 nie sú substrátmi tohto transportéru, no pri pH 5.5-6.0 vykazovali afinitu (Kobayashi, 2003; Varma *et al.*, 2011). Avšak sú látky, ako je napríklad rosuvastatín, ktoré sú substrátmi OATP2B1 a ich transport nie je ovplyvniteľný zmenou pH (Varma *et al.*, 2011; McFeely *et al.*, 2019). K uvedeným experimentom boli použité transfekované HEK-293 bunky (Human embryonic kidney) Caco-2 bunky.

Navyše sa zistilo, že OATP2B1 obsahuje 2 miesta viažuce substráty. Má stranu s vyššou a nižšou afinitou. Transport substrátov stranou s nižšou afinitou môže byť zvýšený pri nižšej hodnote pH. K interakciám potom dochádza, keď majú 2 látky rovnaké miesto, kam sa viažu. Preto by bolo dobré skúmať nielen to, či je látka substrát a inhibítor OATP2B1, ale aj to, kam sa viaže (Shirasaka *et al.*, 2012; Tamai and Nakanishi, 2013).

U potkana sa stretávame len s jedným ortológom, a to OATP2b1, ktorý má 77% zhodnosť. Vykazuje funkčnú podobnosť, avšak širšiu substrátovú špecifickosť v porovnaní s ľudským OATP2B1 (Hagenbuch and Meier, 2004).

3.3 Klinický význam interakcií OATP transportérov

Transportéry hrajú významnú úlohu v absorpcii, distribúcii, metabolizme a exkrécii liečiv (ADME) (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010). Interakcie na úrovni transportérov môžu byť spôsobené iným liečivom, zložkou potravy, či doplnkom stravy. Môže sa jednať o indukciu/inhibíciu transportéru, a tá sa potom odzrkadlí vo zvýšenej/zníženej plazmatickej a tkanivovej koncentrácii liečiv. Výsledkom je ovplyvnenie účinnosti a bezpečnosti farmakoterapie. Toto je dôležité uvedomiť si hlavne pri liečivách s úzkym terapeutickým indexom, kde môže ľahko dôjsť k prehlbeniu nežiadúcich účinkov liečiv (hrozí toxicita) alebo k strate účinnosti terapie (Han, 2011).

Klinický dopad interakcií sa skúma ťažšie. Nasledujúce body udávajú niekoľko dôvodov, prečo je tomu tak.

- *In vivo* testovaniu na mladých, zdravých jedincoch predchádzajú *in vitro* experimenty. Dôležitý je fakt, že nie vždy interakcie vychádzajúce signifikantne v prostredí *in vitro* fungujú *in vivo*.
- Liekové interakcie sa vyskytujú prevažne u pacientov liečených polyfarmakoterapiou. Jedná sa hlavne o starších pacientov, prípadne pacientov trpiacich chronickým ochorením. Títo pacienti majú zníženú funkciu vylučovacích orgánov, čo vie znovu ovplyvniť farmakokinetiku liečiv.
- Ďalším dôležitým faktorom je genetická variabilita vyskytujúca sa v populácii a s ňou súvisiace zmeny v expresii prenášačov.
- Substráty transportérov a látky s nimi interagujúce väčšinou nie sú špecifické len pre jeden daný typ transportéru a niekedy ovplyvňujú aj metabolické enzýmy (Han, 2011; Gessner, König and Fromm, 2019).

Najviac klinicky relevantných interakcií spomedzi OATP je popísaných u OATP1B1 a OATP1B3 v pečeni.

3.3.1 OATP1A2

Väčšina popísaných interakcií OATP1A2 prebieha medzi liečivami a jedlom/doplnkami stravy. Príkladom sú ovocné šťavy znižujúce biodostupnosť antihistaminika fexofenadínu. Je tiež substrátom ďalších transportérov (napríklad **OATP2B1**, P-gp) a len minimálne metabolizovaný. Dresser *et al.* (2002) a Dresser, Kim a Bailey (2005) zistili, že príjem ovocných štiav (grepovej, pomarančovej, jablkovej (ovplyvňuje aj **OATP2B1**))

dokáže znížiť u človeka systémovú expozíciu fexofenadínu o 40-70%. Navyše vodný roztok naringínu, nachádzajúci sa v grepovej šťave v rovnakej koncentrácii (~1,2 mM), znižuje absorpciu perorálne podaného fexofenadínu o 25% (Bailey *et al.*, 2007). Toto zníženie je pripisované hlavne OATP1A2 a OATP2B1 transportérom v čreve a vedie k neúčinnnej farmakoterapii.

Rovnako zelený čaj v kombinácii s nadololom (neselektívny β -blokátor) znižuje biodostupnosť nadololu o 85% (Misaka *et al.*, 2014). Za uvedenú skutočnosť môžu látky nazývané katechíny, najmä (-)-epigallocatechin galát. Nadolol nepodlieha metabolitácii a je substrátom OATP1A2, ale aj P-gp, MATE1 a 2, OCT1 a 2. Uvedená klinicky relevantná interakcia je z veľkej časti pripisovaná OATP1A2 transportéru v črevách. Preto je dobré sa danej kombinácii vyhnúť (Abe *et al.*, 2018).

3.3.2 OATP2B1

OATP2B1 hrá významnú úlohu v prenose mnohých látok jednak v pečeni, jednak v črevách. Klinická relevancia mnohých *in vitro* zistených interakcií nie je dostatočne preskúmaná.

Za významnú sa považuje interakcia rosuvastatínu (hypolipidemikum, inhibítor enzýmu 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductázy) a ronacaleretu (kalcilytikum, liečba osteoporózy), pri ktorej ronacaleret znižuje plazmatickú koncentráciu rosuvastatínu o 50% ($IC_{50} = 12 \mu M$) (Johnson *et al.*, 2017). Výsledok tejto interakcie môže v konečnom dôsledku viesť k neúčinnnej farmakoterapii, uvoľneniu aterosklerotického plátu/trombu a môže ohroziť život pacienta.

Ďalšou klinickou interakciou je interakcia asunapreviru (kompetitívny NS3/4A proteázový inhibítor vírusovej hepatitídy typu C) s jednou dávkou OATP inhibítora, rifampinu (makrolidové antibiotikum), pri ktorej dochádza k nárastu c_{max} (21-násobne) a AUC_{inf} (15-násobne). Za uvedenú skutočnosť môžu pravdepodobne hepatálne OATP transportéry. Uvedená kombinácia liečiv je kontraindikovaná. V terapeuticky relevantných koncentráciách je asunaprevir slabý inhibítor ľudských OATP1B1, 2B1, 1B3 a senzitívny substrát OATP1B1, 2B1 (Eley *et al.*, 2015).

3.3.3 OATP1B1 a OATP1B3

Nachádzajú sa na sinusoidálnej (bazolaterálnej) membráne hepatocytov. Hrajú kľúčovú úlohu v prenose xenobiotík a endogénnych látok (bilirubín, steroidy, hormóny štítnej žľazy, žlčové kyseliny) z portálneho obehu do pečene. Ich inhibícia môže viesť k zvýšenej koncentrácii látok v krvnom riečisku a prehĺbeniu nežiadúcich účinkov či toxicite (Shitara, 2011). FDA (The USA Food and Drug Administration) a EMA (European Medicines Agency) doporučujú *in vitro* testovanie interakcií OATP1B1 a OATP1B3 pre liečivá, ktorých cestou eliminácie je práve pečeň a/alebo budú podávané so substrátmi týchto transportérov (Prueksaritanont *et al.*, 2013).

Veľká časť substrátov je pre oba transportéry spoločná, až na výnimky typické pre OATP1B3 (cholecystokinín, digoxín, docetaxel, paklitaxel, či dokonca toxín amantín prítomný v muchotrávkach) (Kalliokoski and Niemi, 2009). Medzi ich inhibítory patria, napríklad antibiotiká, statíny, gemfibrozil, cyklosporín A.

Klinicky významné interakcie sú popísané u statínov. Ich zvýšená koncentrácia v plazme spôsobuje bolesť svalov až rozpad svalových vlákien tzv. rhabdomyolýzu. Príkladom je interakcia cerivastatínu (hypolipidemikum, inhibítor HMG-CoA reduktázy) a gemfibrozilu (hypolipidemikum, fibrát), ktorá mala letálny dopad u niekoľkých pacientov v USA a viedla k stiahnutiu cerivastatínu z trhu (Maeda, 2015). Príčinou tejto interakcie je inhibícia cytochrómu CYP2C8 a OATP1B1 transportéru gemfibrozilom (Shitara *et al.*, 2004).

Rovnako významné interakcie sú popisované u cyklosporínu A a statínov. Cyklosporín inhibuje OATP1B3, OATP2B1, MDR1 and MRP2, and CYP3A4. Zvýšenie plazmatickej koncentrácie statínov je pri vzájomnej interakcii 2-25násobné (Regazzi, MB *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2001; Hasunuma *et al.*, 2003; Simonson, 2004), pričom najmenej citlivý je fluvastatín (Åsberg, 2003).

Pacienti, ktorí užívajú statíny a sú vystavení OATP inhibítorom, by mali mať pravidelný monitoring toxicity svalov (kreatínkináza) a tak isto kontrolu lipidového spektra. Sú určité kombinácie, napríklad gemfibrozil + simvastatín / cyklosporín + simva-, lova-, pitava- statín, ktorým sa treba pri terapii vyhnúť (Wiggins *et al.*, 2016).

Kajosaari *et al.* (2005) pozorovali, že gemfibrozil zvyšuje u zdravých ľudí AUC anti-diabetika repaglinidu ~2.5-násobne, Niemi *et al.* (2003) ~8.1-násobne. Uvedené výsledky sú spôsobené pravdepodobne inhibíciou hepatálneho enzýmu CYP3A4 a OATP1B1 tran-

sportéru a môžu viesť k závažnej hypoglykémii. V klinickej praxi je dobré sa danej kombinácii liečiv vyhnúť. Avšak pokiaľ je súčasné užívanie nevyhnutné, terapeutická dávka repaglinidu musí byť redukovaná a hladina glukózy v krvi prísne monitorovaná (Niemi *et al.*, 2003).

3.4 Modely štúdia črevnej absorpcie

Modely používané k štúdiu intestinálnej absorpcie napodobňujú črevnú bariéru a jej funkcie v tele. Dnes je známe množstvo modelov slúžiacich k hodnoteniu črevnej permeability a interakcií na úrovni transportérov. Od jednoduchej monovrstvy polarizovaných buniek až po komplikovanejšie tkanivá, orgány či živé organizmy. Tvoria ich hlavne *in vitro* metódy založené na líniiach buniek.

Za zlatý štandard sa považujú Caco-2 bunky, ktoré tvorí heterogénna rada buniek ľudského epiteliálneho kolorektálneho adenokarcinómu (Kovacsics, Patik and Özvegy-Laczka, 2017). Sú schopné vytvoriť monovrstvu tesne k sebe priliehajúcich polarizovaných buniek a diferencovať sa. Častý je aj model oocytov *Xenopus laevis* a *in vitro* metódy založené na tkanivách zvierat využívajúce Ussingovu komoru. Používané sú tiež *in situ* (perfúzia čriev), *ex vivo* (segmenty čriev) a *in vivo* modely (geneticky modifikované organizmy - napríklad myši) (Zhang and Surapaneni, 2012).

Pri skúmaní interakcií na úrovni OATP transportérov v čreve sú najčastejšie používané transfekované oocyty *Xenopus laevis* a línie buniek exprimujúce jeden/viacero druhov transportérov (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010).

3.4.1 *In vitro* modely

3.4.1.1 *Transfekované línie buniek*

Bunkové línie divokého typu (wild-type), kam patrí napríklad Caco-2, MDCK (Madin-Darby canine kidney) a LLC-PK1 (Lewis Lung Carcinoma-Porcine Kidney 1), sú často experimentálne využívané, avšak ich nevýhodou je významná expresia viacerých transportérov súčasne. Tým nemožno jednoznačne určiť úlohu konkrétnych transportérov. Na prekonanie tohto problému boli vyvinuté transfekované bunkové línie, ktoré v zvýšenej miere exprimujú jeden/niekoľko vopred zvolených transportérov a tým maximalizujú ich úlohu v konkrétnej štúdií. Najčastejšie používané bunkové línie pre stabilnú transfekciu sú bunky CHO (Chinese hamster ovary), HEK-293 a MDCK, pretože exprimujú nízke hladiny endogénnych transportérov. Úspešne sa etablovalo mnoho stabilných

bunkových línií. Hoci je ich vývoj náročný, takto získané bunky vo všeobecnosti ponúkajú výhody v oblasti nákladov, kolísania údajov a analytickej flexibility v porovnaní s inými modelmi transportérov (Zhang and Surapaneni, 2012; Kovacsics, Patik and Özvegy-Laczka, 2017).

3.4.1.2 Oocyty *Xenopus laevis*

Transportéry liečiv môžu byť prechodne exprimované v nezrelých vajíčkach *Xenopus laevis* injekčným vpichnutím cRNA zvolených transportérov do cytoplazmy oocytov. Výsledkom je nadmerná expresia jediného transportéra. Na vyhodnotenie sa ako referencie použijú oocyty, do ktorých bola vpravená voda a množstvo vychytávaných látok sa porovná medzi oocytmi injektovanými vodou a cRNA transportéru. Ide o pomerne rozšírenú metódu, jej nevýhodou je však krehkosť a variabilita oocytov (Zhang and Surapaneni, 2012; Brouwer *et al.*, 2013).

3.4.2 *Ex vivo* model ultratenkých tkanivových rezov

Vo vedeckej sfére je v súčasnosti veľa metód slúžiacich na pozorovanie a charakterizáciu absorpcie, distribúcie, metabolizmu, exkrécie a toxicity nových chemických entít a xenobiotík (Brouwer *et al.*, 2013). Veľmi podrobne sú popísané *in vitro* modely na bunkových kultúrach a *in vivo* modely na zvieratách, ktoré sa používajú na akademickej pôde a rovnako v priemysle. Nevýhodou bunkových kultúr je, že neodrážajú multicelularitu tkaniva a rovnako ani jeho 3D štruktúru a líšia sa od prirodzenej expresie transportérov a metabolických enzýmov v črevách. Nevýhodou *in vivo* modelov na zvieratách je technicky a časovo náročnejšie prevedenie a finančná stránka. Preto sa používajú metódy s využitím intaktných tkanív, kam patrí PCIS (precision-cut intestinal slices) (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016).

Pri využití PCIS sa pripravené črevo pred krájaním vyplní a zaleje agarózou. Použitím špecializovaného poloautomatického prístroja sú priečnym krájaním pripravené rezy s definovanou a reprodukovateľnou hrúbkou.

Výhodou tohto modelu je, že zachováva multicelularitu tkaniva a aj jeho 3D štruktúru, exprimuje transportéry a metabolické enzýmy rovnako ako daný segment čriev. Keďže črevo je veľmi heterogénny orgán, v ktorom sú výrazné štrukturálne a funkčné rozdiely medzi duodenom, jejunom, ileom a kolonom, PCIS metóda je vhodná na štúdium týchto rozdielov. Je možné vykonať jeden experiment na jednom potkanovi a pritom analyzovať celú časť čriev od duodena až po kolon. Prínosom je aj fakt, že z každej oblasti potkaních

čriev je možné získať viac než 100 rezov, tým pádom možno robiť súčasne viacero experimentov (vzorky ľudských čriev pochádzajú väčšinou z operácií a tvoria len malú časť segmentu, preto rezov býva menej). Medzi ďalšie výhody patrí napríklad pomerne nenáročná technika prevedenia (v priebehu niekoľkých hodín), úspora času, ale aj množstva použitých laboratórnych zvierat. Okrem akumuláčnych štúdií transportérov, možno PCIS metódu použiť aj na sledovanie metabolizmu a toxicity liečiv. Jednou z hlavných prekážok preklinického výskumu liečiv je variabilita medzi zvieratami a ľuďmi v jednotlivých izoformách, hladinách expresie a aktivite transportérov/metabolických enzýmov. Metódy využívajúce ľudské tkanivo, akou je PCIS, pomáhajú prekonať ťažkosti extrapolácie výsledkov medzi ľuďmi a zvieratami, pretože sa dajú aplikovať na ľudské aj zvieracie tkanivá.

Podobne ako iné metódy, aj PCIS má svoje limitácie a nevýhody. Patrí k nim napríklad krátka životaschopnosť tkaniva (8h tenké, 24h hrubé črevo) a tiež možné poškodenie štruktúr počas krájaní. Vzhľadom na kolmé krájanie intestinálnych rezov, oboje, mukózna aj serózna časť tkaniva sú vystavené rovnakému médiu. Výsledkom je, že touto metódou nemožno študovať vektorový transport liekov intestinálnou stenou (Van De Kerkhof *et al.*, 2007; De Graaf *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016).

4 HYPOTÉZA A CIELE

Veľká časť pacientov prichádzajúcich každodenne do lekárne je liečená polyfarmakoterapiou. Medikamenty, ktoré užívajú, sú často substrátmi alebo inhibítormi OATP infulných transportérov v črevnej bariére. Keďže tieto transportéry sa podieľajú na absorpcii látok, po ich inhibícii (perorálne podané lieky/potrava) dochádza k zníženej absorpcii substrátov. Výsledkom tejto interakcie je znížená plazmatická koncentrácia substrátov v cirkulujúcej krvi a teda nedostatočná farmakoterapia. Pre zaistenie účinnej a bezpečnej farmakoterapie pacienta treba mať prehľad o tom, ktoré látky sú substráty a ktoré inhibítory daného transportéru. Taktiež je potrebné poznať mechanizmus danej interakcie a jej výsledok. Keďže preklinické štúdie nie sú zamerané na črevné OATP transportéry, na niektoré klinicky relevantné interakcie sa príde až keď je liečivo zavedené na trh.

Cieľom tejto diplomovej práce bola :

- a) Optimalizácia *ex vivo* metódy ultratenkých tkanivových rezov pre štúdium interakcií na úrovni OATP transportérov v čreve.
- b) Analýza liekových interakcií v čreve pre vybrané liečivá na úrovni OATP transportérov za použitia modelového substrátu estron-3-sulfátu.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Chemikálie a reagensie

- KHP (Krebs-Henseleit pufr)
- Agaróza rozpustená vo fyziologickom roztoku (3% roztok) - Agarose, low gelling temperature, Type VII-A (Sigma-Aldrich, cat. no. A0701)
- WME (Williams E medium) s obsahom L-glutaminu (Invitrogen, cat. no. 32551) s prídavkom glukózy
- E3S (estron-3-sulfát) (MGP)
- [³H]E3S (estron-3-sulfátu rádioaktívne značený) (MGP)
- Verapamil - Verapamil hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Rosuvastatín - Rosuvastatin calcium (Sigma-Aldrich)
- Cyklosporín A - Cyclosporin A (Sigma-Aldrich)
- Naringín - Naringin (Sigma-Aldrich)
- Chrysin - Chrysin (Sigma-Aldrich)
- Kvercetín - Quercetin (Sigma-Aldrich)
- Ko - KO-143 hydrate (Sigma-Aldrich)
- CP - CP-100356 monohydrochloride (Sigma-Aldrich)
- Ly - LY-335979/ Zosuquidar hydrochloride (Sigma-Aldrich)
- ACN - (Sigma-Aldrich)
- Éter - (Penta)
- NaOH - (Penta)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, cat. no. 2322)

5.2 Prístrojové vybavenie

- Laminárny box (AURA 2000 M.A.C, BioAir S.c.r.l.)
- Krájač (Krumdieck Tissue Slicer MD4000) napojený na chladiaci okruh 4°C
- Inkubátor (Binder CB 60) s reguláciou teploty, O₂ a CO₂
- Mikrobiologický termostat BT 100 37°C (Laboratóní přístroje Praha)
- Plynové bomby (CO₂, O₂, pneumoxid)
- Horizontálna trepačka (f= 90kmitov/s)
- Výchrevná podložka (37°C)
- Homogenizátor (FastPrep-24™ 5G Instrument)
- Centrifúga (Gusto, Heathrow Scientific LLC, 7800 rcf)
- Beta spektrometer (Packard Tri-carb 2900TR Liquid Scintillation Analyzer; QuantaSmart Version 1.31)
- TECAN Infinite 200 Pro

5.3 *Ex vivo* metóda ultratenkých intestinálnych rezov

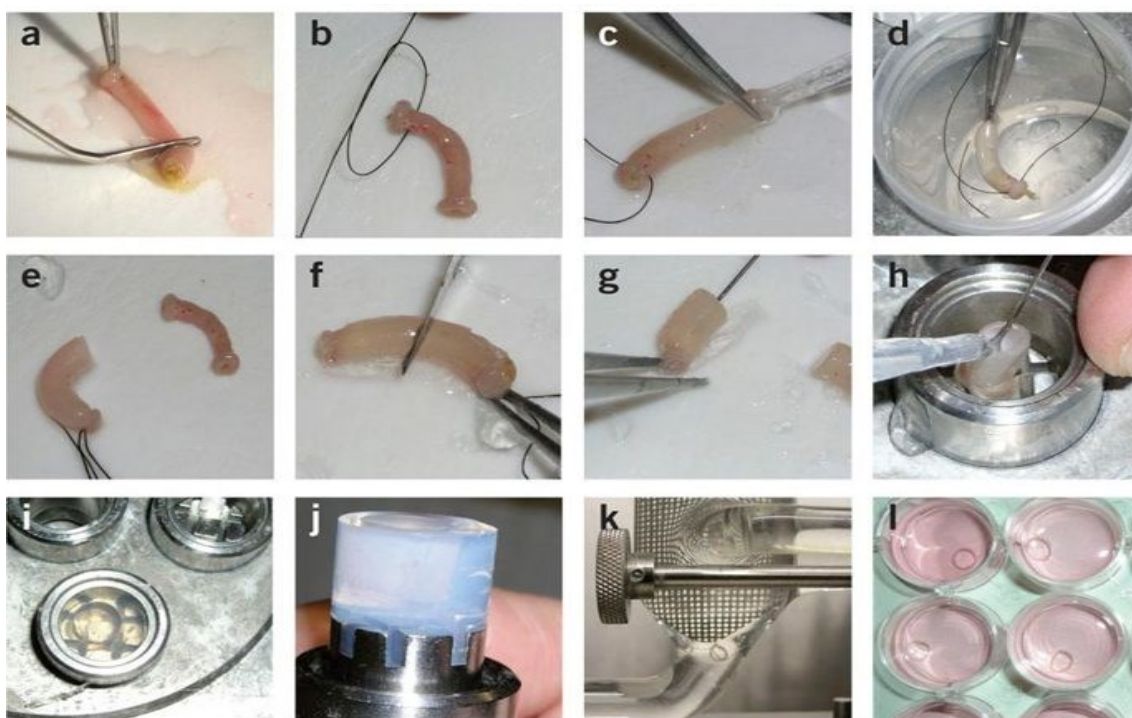
5.3.1 Príprava intestinálnych rezov

Pred začiatkom prípravy intestinálnych rezov (potkan/človek) sme Krebs-Henseleit pufovacia roztok (KHP) vychladili (4°C, celý experiment) a dostatočne okysličili prebublávaním pneumoxidom (95 % O₂, 5 % CO₂) po dobu 30 minút. Následne bolo zrovnané pH na hodnotu 7,42. Medzitým sme vo vodnom kúpeli (60°C) rozpustili agarózu, ktorú sme počas prípravy rezov udržiavali pri teplote 37°C.

5.3.1.1 Potkanie rezy

Inhaláciou éteru sme uviedli potkana (samec, kmeň Wistar, rozmedzie váhy 250- 500 g) do celkovej anestézie. Krátko potom bol usmrtený zlomením väzu a vykrvácaním z prerušenia karotíd. Črevo bolo ihneď po odobratí vložené do KHP. S tkanivom sa následne pracovalo na ľadom chladenej podložke, kde bolo neustále zvlhčované KHP, aby si zachovalo svoje vlastnosti. Priebeh prípravy je znázornený na Obr.3 (De Graaf *et al.*, 2010). Pomocou skalpela sa črevo rozdelilo na príslušné segmenty (duodenum, ileum, jejunum, kolon) podľa nami zvoleného prevedenia experimentu. Tieto intestinálne segmenty sme vložili zvlášť do KHP a udržiavali sme ich na ľade. Zo segmentu čreva, s ktorým sme pracovali, sme odrezali 4 cm dlhú časť. Z nej sme najskôr odstránili črevný obsah a následne sme ju 3× premyli KHP pomocou pasturovej pipety. Odstránili sme zvyšky KHP, na jednom konci sme črevo zaviazali chirurgickou niťou a naplnili agarózou. Pinzetou sme črevo pridržiavali za druhý koniec a ponechali rýchlo schladnúť agarózu po dobu 30 sekúnd v KHP. Takto naplnené črevo sme zbavili prebytočného tkaniva a rozdelili na dve rovnaké časti. Dve, prípadne 3 takto pripravené časti sme vložili do valčeka a zaliali agarózou. Po jej stuhnutí sme valček s tkanivom vložili do krájača (Krumdieck Tissue Slicer MD4000) napojeného na chladiaci okruh 4°C a krájali na rezy s hrúbkou 250 µm.

Experiment bol povolený Odbornou komisiou pre zaistovanie dobrých životných podmienok pokusných zvierat, pod číslom MSMT8358/2016-14.



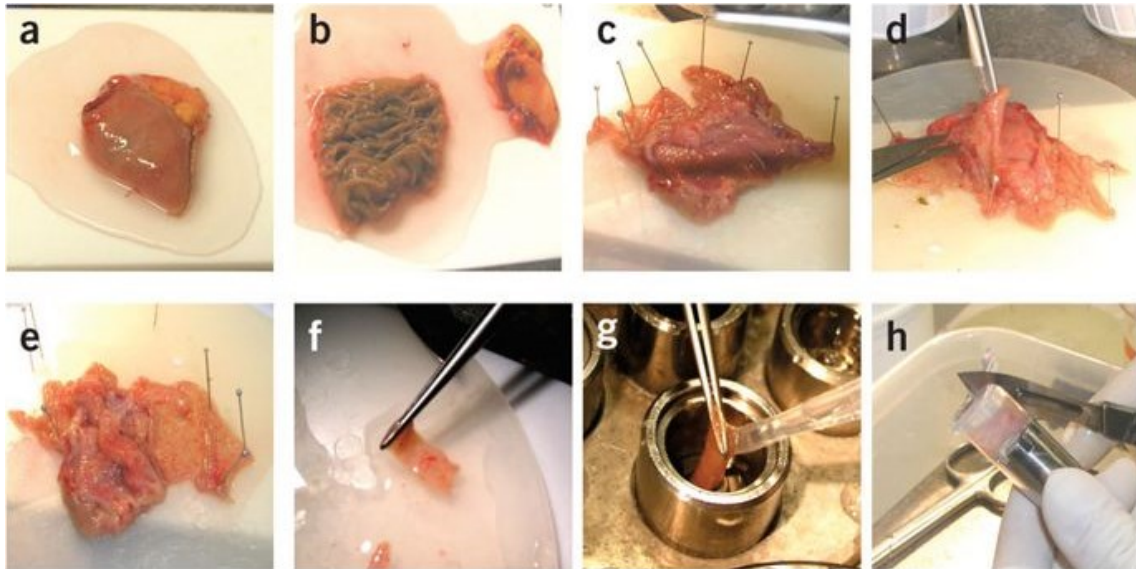
Obrázok 3: Preparácia a inkubácia potkaních intestinálnych rezov. Po odstránení črevného obsahu (a), sa jedna strana zaviaže niťou (b). Segment sa naplní 37°C agarózou (c) a schladí v KHP (d). Vytvorí sa približne 5 mm hrubý valček (e), ktorý sa rozdelí na dve polovice (f). Pomocou špendlíka (g) segment vložíme do predchladenej valcovej formy (h) a zalejeme agarózou (i). Vzniknutý valček (j) premiestnime do krájača a krájame na ultratenké rezy (k). Tie následne inkubujeme v 24-jamkovej doštičke. Prevzaté a upravené (De Graaf *et al.*, 2010).

5.3.1.2 Ľudské rezy

Po dohode s operačnou sálou chirurgickej kliniky Fakultnej nemocnice Hradec Králové, bola časť vyoperovaného čreva okamžite vložená do nami vopred pripraveného KHP. Tkanivo bolo transportované v uzatvárateľnej nádobe naplnenej KHP, ktorá bola vložená do termosky naplnenej ľadom.

V laboratóriu sme s tkanivom pracovali na chladenej gumenej podložke (4°C). Po celý čas sme tkanivo udržiavali zvlhčené pomocí KHP, aby nevysychalo. Príprava rezov je znázornená na Obr.4 (De Graaf *et al.*, 2010). Tkanivo sme dostali zašité (zasvorkované), odstránili sme stehy (svorky) a pozdĺžne sme ho rozstrihli – výsledkom bol útvar podobný obdĺžniku. Z takto rozostretého čreva sme opatrne pomocou očných nožničiek a pinzety odstránili mukóznú vrstvu od zvyšku tkaniva. Pomáhali sme si špendlíkmi, ktorými sme mukóznú vrstvu pripichovali ku gumenej podložke a napínali. Z oddelenej a napnutej mukóznej vrstvy sme rezali skalpelom obdĺžniky veľkosti približne 4mm×4cm, ktoré sme priečne predelili na dve polovice. Na dno valčeka sme naliali malé množstvo agarózy

a vložili 2 takto pripravené útvary tak, aby sa nedotýkali a opreli sme ich o steny valčeka. Valček sme rýchlo naplnili agarózou, pričom tkanivo sme pridržovali pinzetou vo vertikálnej polohe. Po stuhnutí agarózy sme valček premiestnili do krájača (typ ako pri potkaniích rezoch) a krájali rezy hrúbky 200, prípadne 250 μm .



Obrázok 4: Preparácia ľudského čreva pro prípravu rezu. (a) Zošitá časť ľudského jejuna. Svorky a tukové tkanivo sa odstraňuje, tým sa črevo otvorí (mukóznou stranou smeruje nahor) (b). Segment sa potom upevní (mukóznou stranou) špendlíkmi na vychladenú podložku (c) a zvyšok tkaniva sa jemne odizoluje (d, e). Získaná mukóza sa nareže na kúsky s veľkosťou približne 4mm×2cm (f) a zaleje sa agarózou (g, h). Pre-vzaté a upravené (De Graaf et al., 2010).

5.3.2 Aplikácia metódy PCIS na akumuláčn é štúdie

Za pomoci entomologickej pinzety sme celistvé rezy zbavili agarózy. Na výhrevnú podložku s teplotou 37 °C¹ sme umiestnili 12 jamkovú doštičku naplnenú 500 μl pneumoxidom nasýteného (80 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) WME s/bez prítomnosti inhibítora. Každý rez sme samostatne vložili do jamky a nechali 20-30 minút preinkubovať na horizontálnej trepačke (f= 90 kmitov/s) v inkubátore (Binder CB 60) s prívodom pneumoxidu pri 37°C. Po pre-inkubácii sme vzorky premiestnili do 12 jamkovej doštičky (TPP® tissue culture plates, Sigma, cat. no. Z707783) s obsahom 500 μl pneumoxidom nasýteného (80 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) WME s prítomnosťou modelového substrátu OATP transportérov, [³H]estron-3-sulfátu. Inkubácia prebiehala za rovnakých podmienok ako pre-inkubácia a rezy boli odoberané v krátkych časových intervaloch podľa nami

¹ Skúmali sme aj akumuláciu estron-3-sulfátu pri zníženej teplote, kedy sme sa počas pre-inkubácie aj inkubácie snažili zachovať teplotu tkaniva 4°C.

pripraveného protokolu (2, 5, 10, 30, prípadne 60 minút). Jednotlivé rezy sa po vytiahnutí z WME 2× opláchli v studenom KHP a uložili do mikroskúmavky predplnenej sklenenými guľčkami (1,25-1,65 mm, Carl Roth, cat. no. A555.1.). Ku každému rezu v skúmavke sme pridali 600 µl roztoku ACN:H₂O (2:1). Takto naplnené skúmavky sme uložili do homogenizátoru (FastPrep-24™ 5G Instrument) a nechali tkanivo zhomogenizovať štyrikrát po dobu 40 sekúnd. Následne sme skúmavky vložili do centrifúgy (Gusto, Heathrow Scientific LLC; 10 min, 7800 rcf). Zo supernatantu homogenizátu sme odobrali 300 µl a stanovili koncentráciu [³H]estron-3-sulfátu meraním rádioaktivity pomocou beta spektrometru (Packard Tri-carb 2900TR Liquid Scintillation Analyzer; QuantaSmart Version 1.31).

5.3.3 Stanovenie obsahu proteínu

Keďže nie všetky rezy majú rovnakú hrúbku, čím bude rez hrubší, tým viac enterocytov je na ňom prítomných. Tým sa predpokladá aj väčší počet transportérov. Z tohto dôvodu stanovujeme najskôr rádioaktivitu [³H]estron-3-sulfátu v jednotlivých rezoch, ktorú prepočítame pomocou rádioaktivity pôvodných zásobných roztokov na koncentráciu akumulovaného [³H]estron-3-sulfátu a tú normalizujeme na množstvo proteínu jednotlivých rezov.

Z mikroskúmaviek naplnených sklenenými guľčkami a rezmi odparíme roztok ACN:H₂O. K rezom potom pridáme 200 µl 5M čerstvo pripraveného NaOH a lýzu tkaniva podporíme jeho homogenizáciou. Objem rozpusteného proteínu doplníme vodou na 1ml, aby sme dosiahli koncentráciu 1M NaOH (potrebná na analýzu). Množstvo proteínu stanovíme využitím Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Z hovädzieho sérového albumínu zhotovíme kalibračnú krivku v rozsahu 0-500 µg/ml. Na 96-jamkovú doštičku (TPP® tissue culture plates, Sigma, cat. no. Z707902) nanášame 10 µl zvortexovaného proteínu z každej mikroskúmavky a kalibračnej krivky v duplikáte. Po pridaní 200 µl reagentu pripraveného v čase potreby (súčasť Pierce™ BCA Protein Assay Kit) vložíme doštičky so vzorkami do inkubátoru (37°C) a ponecháme v týchto podmienkach aspoň 30 minút. Po ofarbení meriame absorbanciu na prístroji TECAN Infinite 200 Pro (vlnová dĺžka 562 nm, šírka vlnového pásma 9 nm, počet zábleskov 25).

5.4 Štatistická analýza dát

Štatistická analýza a grafické vyjadrenie výsledkov boli vypracované prostredníctvom programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Pre porovnanie akumulácie E3S (37°C) v jednotlivých intestinálnych segmentoch potkana medzi sebou v rámci jedného časového intervalu bola použitá One-way ANOVA s post-hoc Tukeyho testom.

Pre porovnanie rozdielu akumulácie E3S pri teplote 37°C a 4°C v príslušných časoch zvlášť v každom intestinálnom segmente bol použitý nepárový, parametrický t-test. .

Na sledovanie zmeny akumulácie E3S vplyvom účinku inhibítora a porovnanie tohto účinku voči kontrole a bol použitý nepárový, parametrický t-test.

Označenie štatistickej významnosti: * pre $p \leq 0,05$; ** pre $p \leq 0,01$, *** pre $p \leq 0,001$ a **** pre $p \leq 0,0001$.

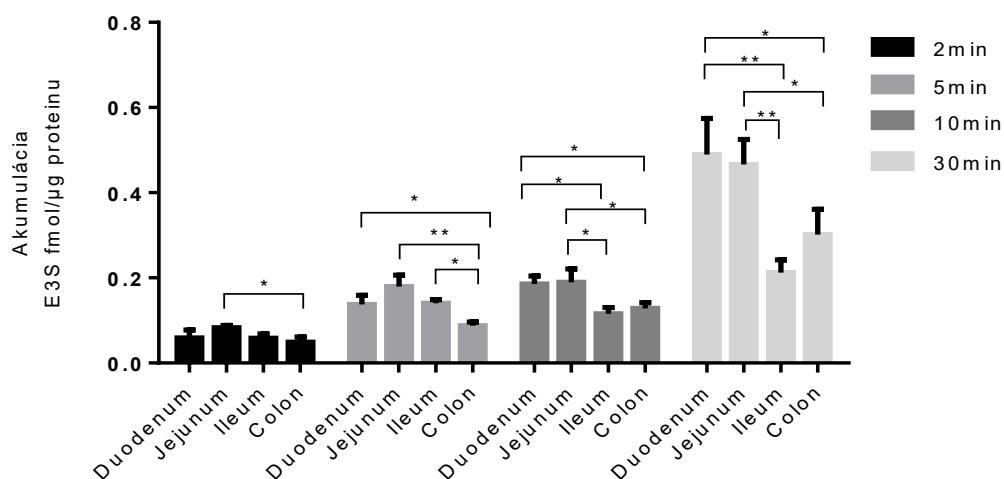
6 VÝSLEDKY

Väčšina prezentovaných výsledkov v tejto práci sú výsledky pilotných štúdií (n=1), pri ktorých sme sa snažili bližšie porozumieť OATP transportérom v čreve a optimalizovať metódu PCIS.

6.1 Potkan

6.1.1 Akumulácia estron-3-sulfátu v intestinálnych segmentoch

Pomocou metódy PCIS sme vyhodnocovali akumuláciu modelového substrátu OATP1A2 a 2B1 transportérov, E3S (0,01 μ M), pri teplote 37° v časových intervaloch 2, 5, 10 a 30 minút na potkaních intestinálnych segmentoch. Na Obr. 5 je pre každý časový interval znázornená a porovnávaná akumulácia v jednotlivých intestinálnych segmentoch.



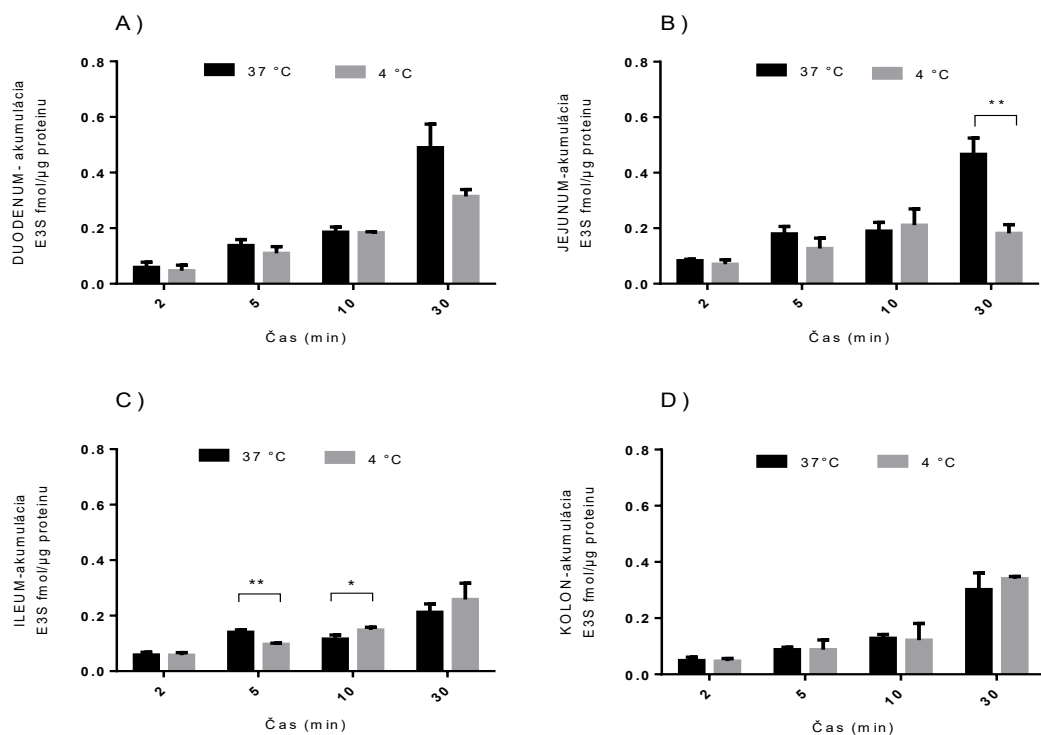
Obrázok 5: Akumuláciu E3S (0,01 μ M) v segmentoch čriev pri teplote 37°C pre časové intervaly 2, 5, 10, 30 minút. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom triplikáte. Pre porovnanie akumulácie E3S v intestinálnych segmentoch medzi sebou v rámci jedného časového intervalu bola použitá One-way ANOVA s post-hoc Tukeyho testom. Hladiny významnosti: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

V čase 2 minúty je akumulácia E3S významne vyššia v kolone v porovnaní s jejunom. Pri časovom intervale 5 minút vykazuje akumulácia E3S najviac signifikantný rozdiel medzi jejunom a kolonom, ale aj medzi duodenom a kolonom a ileom a kolonom. V čase

10 minút pozorujeme signifikantný rozdiel akumulácie E3S medzi duodenom a ileom, duodenom a kolonom, značný je aj rozdiel v akumulácii medzi jejunom a ileom a jejunom a kolonom. Signifikantné rozdiely v akumulácii E3S boli pozorované aj pre časový interval 30 minút, pri ktorom je najvyšší rozdiel v akumulácii medzi duodenom a ileom a medzi jejunom a ileom, je tu však pozorovateľný aj signifikantný rozdiel v akumulácii E3S aj pre duodenum a kolon a jejunum a kolon.

Principiálne rovnaký experiment na akumuláciu E3S sme uskutočnili aj za zníženej teploty, 4°C, pretože sa predpokladá, že pri 4°C je aktivita transportérov minimálna a látky prechádzajú bariérou pomocou pasívneho transportu (Sugano *et al.*, 2010).

Na Obr. 6 (A-D) je znázornené porovnanie akumulácie E3S pri 37°C a 4°C zvlášť pre jednotlivý intestinálny segment (A-duodenum, B-jejunum, C-ileum, D-kolon) v časových intervaloch 2, 5, 10 a 30 minút.



Obrázok 6: Akumulácia E3S (0,01 μ M) pri teplote 37°C a 4°C. Dáta sú prezentované zvlášť pre jednotlivý intestinálny segment (A-duodenum, B-jejunum, C-ileum, D-kolon) v časových intervaloch 2, 5, 10 a 30 minút. Uvedené hodnoty sú vyjadrené priemer \pm smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom triplikáte. Pre porovnanie akumulácie E3S v jednotlivých intestinálnych segmentov pri teplote 37°C a 4°C v príslušných časoch bol použitý nepárový, parametrický t-test. Hladiny významnosti: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

Signifikantný je rozdiel v akumulácii E3S v jejunu pre časový interval 30 minút (Obr. 6B), v ktorom môžeme pozorovať značne zvýšenú akumuláciu E3S pri teplote 37°C v porovnaní s akumuláciou E3S pri teplote 4°C. Ďalší signifikantný rozdiel v akumulácii si môžeme všimnúť v ileu (Obr 6C) v čase 5 minút, v ktorom došlo k zvýšeniu akumulácie E3S pri teplote 37°C v porovnaní so 4°C, avšak v čase 10 minút je signifikantne nižšia akumulácia E3S pri teplote 37°C v porovnaní s 4°C.

Celkovo najvyšší nárast akumulácie E3S sme pozorovali v duodene a jejunu. Preto sme predpokladali, že aktivita influxných transportérov bude v týchto intestinálnych segmentoch najvyššia. Keďže väčšina liečiv sa podľa Gavhane and Yadav (2012) vstrebáva z jejunu a ilea, v nasledujúcich experimentoch sme používali potkanie/ľudské jejunum.

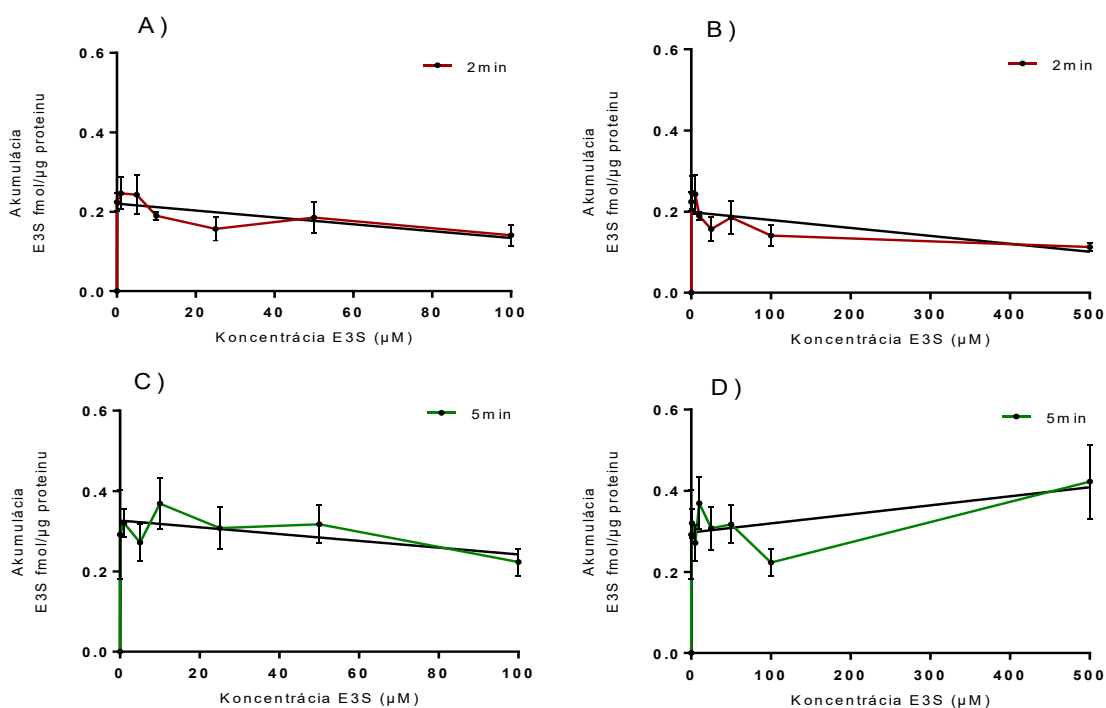
6.1.2 Saturačná krivka estron-3-sulfátu

Naším cieľom bolo skúmať akumuláciu E3S v závislosti na jeho koncentrácii v čase 2 a 5 minút a pokúsiť sa vypočítať kinetické parametre K_m (Michaelisova konštanta) a V_{max} (maximálna rýchlosť transportu substrátu).

Zvolili sme si časové intervaly 2 a 5 minút, pretože predpokladáme, že vtedy prebieha hlavne transport pomocou influxných transportérov.

Na prípravu roztokov sme vždy použili rádioaktívne značený $[^3H]E3S$ ($0,008\mu M$) v kombinácii s neznačeným, pretože sa predpokladá, že bunka bude transportovať E3S bez ohľadu na značenie a pomer medzi značeným a neznačeným E3S ostane zachovaný.

Výsledkom experimentu sú krivky znázornené na Obr. 7, pre časy 2 minúty (A, B) a 5 minút (C, D), z ktorých hodnotu K_m nemožno určiť (Obr. 7A, zobrazujúci závislosť akumulácie E3S na koncentrácii ($c=0-100\mu M$), je výňatok z Obr. 7B ($c=0-500\mu M$), to isté platí aj pre obrázky 7C, ktorý je výňatkou z Obr. 7D).



Obrázok 7: Saturačná krivka E3S vyjadrujúca závislosť akumulácie E3S na jeho koncentrácii. Experiment sme uskutočnili na pre časy 2 minúty (A, B) a 5 minút (C, D). Krivka A a B, respektívne C a D zobrazujú rovnaké experimenty, avšak pre lepšiu prehľadnosť, sme pri krivkách A a C zvolili koncentráciu len do $100\mu M$. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom hexaplikáte.

6.1.3 Vybrané inhibítory transportérov OATP1A2 a OATP2B1

6.1.3.1 Naringín (NRG)

Naringín je flavonoidný glykozid obsiahnutý v šupke pomaranča a grepu, ktorý im dodáva typickú horkú chuť. Spolu s jeho aglykónom, naringenínom, vykazujú protizápalovú a antioxidačnú aktivitu. Suplementácia naringínom je prospešná pri liečbe obezity, metabolického syndrómu, diabetu a hypertenzie (Alam *et al.*, 2014).

Na úrovni buniek je inhibítorom OATP1A2 (Bailey *et al.*, 2007), OATP2B1 (Shirasaka *et al.*, 2012) a P-gp (kompetitívny) transportérov (Tourniaire *et al.*, 2005). U zvierat bol pozorovaný jeho modulačný účinok (zvýšená citlivosť na chemoterapeutikum doxorubicín a znížená expresia P-gp) na P-gp transportér v rakovinových bunkách (Ali *et al.*, 2009).

6.1.3.2 Chrysin (CHR)

Chrysin je prirodzene aktívna zlúčenina skupiny flavónov. Môžeme ju získať napríklad z medu, propolisu a rastlín. Vykazuje chemopreventívnu aktivitu, protizápalové a antioxidačné účinky (Lin *et al.*, 2012).

Navrátilová *et al.* (2018) pozorovali inhibičný účinok chrysinu na OATP1A2 a OATP2B1 bunkových transportéroch, Schumacher *et al.* (2010), inhibíciu P-gp, MRP2 a BCRP na Caco-2 bunkovej línii.

6.1.3.3 Kvercetín (QER)

Jedná sa o látku patriacu do skupiny flavonoidných glykozidov. Nájdeme ju v ovocí (citrusy, čučoriedky), zelenine (cibuľa, brokolica, listová zelenina), ale aj zelenom čaji či červenom víne. Je zdrojom antioxidantov chrániacich telo pred účinkom voľných radikálov. Má protizápalovú, antihypertenznú a vazodilatačnú aktivitu a chráni cievy pred vznikom aterosklerózy (Anand David, Arulmoli and Parasuraman, 2016).

Jeho inhibičný účinok na OATP1A2, OATP2B1, P-gp, MRP1 a BCRP transportéry bol pozorovaný na bunkových líniiach (Nguyen, Zhang and Morris, 2003; Patel *et al.*, 2004; Zhang, 2004; Mandery *et al.*, 2010).

6.1.3.4 Cyklosporín A (CsA)

Cyklosporín A je imunosupresívum používané pri liečbe autoimunitných ochorení a na prevenciu rejekcie transplantovaných orgánov (Kockx and Kritharides, 2012). Pôsobí ako kalcineurinový inhibítor, čím zabraňuje aktivácii T lymfocytov. Podlieha absorpcii v tenkom čreve a je metabolizovaný cytochrómom P450 v čreve a v pečeni (Forsythe and Paterson, 2014). Má veľký interakčný potenciál, úzke terapeutické okno a môže navodiť nefrotoxicitu, preto sa u pacientov liečených CsA odporúča terapeutický monitoring (Mohammadpour *et al.*, 2011).

Cyklosporín A je *in vitro* inhibítorom BCRP (Xia *et al.*, 2007), P-gp (Anglicheau *et al.*, 2006), MRP 2 (Hesselink *et al.*, 2005), NTCP (sodium/taurocholate cotransporting peptides, SLC) (Watashi *et al.*, 2014), OATP1B1 a OATP1B3 (Shitara *et al.*, 2012), OATP2B1 (Ho *et al.*, 2006) transportérov. Je aj silným inhibítorom CYP3A4 (Taguchi *et al.*, 2016). FDA uvádza cyklosporín ako príklad klinického inhibítora využívaného na výskum klinicky relevantných liekových interakcií na P-gp, BCRP, OATP1B1 a OATP1B3 transportéroch (FDA, 2019).

6.1.3.5 Verapamil (VER)

Verapamil patrí do skupiny blokátorov kalciových kanálov, nedihydropyridínov. Blokuje L-typ kalciových kanálov, výsledkom je pokles tonusu hladkého svalstva v stenách ciev a ich dilatácia (terapia anginy pectoris, hypertenzie). Znižuje tiež vedenie impulzov cez atrioventrikulárny uzol (antiarytmikum, IV. trieda) a používa sa na liečbu clusterových bolestí hlavy (Hortonov syndróm) (Tfelt-Hansen and Tfelt-Hansen, 2009).

Je *in vitro* inhibítorom OATP1A2 (Rebello *et al.*, 2012) transportéru a *in vivo* inhibičná aktivita bola preukázaná pri OCT1 (Cho *et al.*, 2014) a P-gp (Härtter *et al.*, 2013; FDA, 2019). Tiež inhibuje CYP3A4 (Neuvonen, Niemi and Backman, 2006).

6.1.3.6 Rosuvastatín (ROS)

Rosuvastatín je vysoko efektívne liečivo, slúžiace k liečbe dyslipidémie a prevencii kardiovaskulárnych ochorení. Patrí do skupiny hypolipidemik, inhibítorov HMG-CoA reductázy, kľúčového enzýmu v syntéze cholesterolu. Výhodou rosuvastatínu, v porovnaní s ostatnými statínmi, je viac väzbových interakcií s enzýmom a jeho vysoko efektívny inhibičný účinok (Crouse, 2008).

Rosuvastatín je *in vitro* substrátom transportérov OATP1A2, OATP1B1, OATP2B1, OATP1B3, NTCP (Ho *et al.*, 2006), MRP2, BCRP (Kellick, Bottorff and Toth, 2014;

Kitamura *et al.*, 2014). Je uvedený FDA ako klinický substrát OATP1B1, OATP1B3 a BCRP pre štúdium klinických liekových interakcií (FDA, 2019).

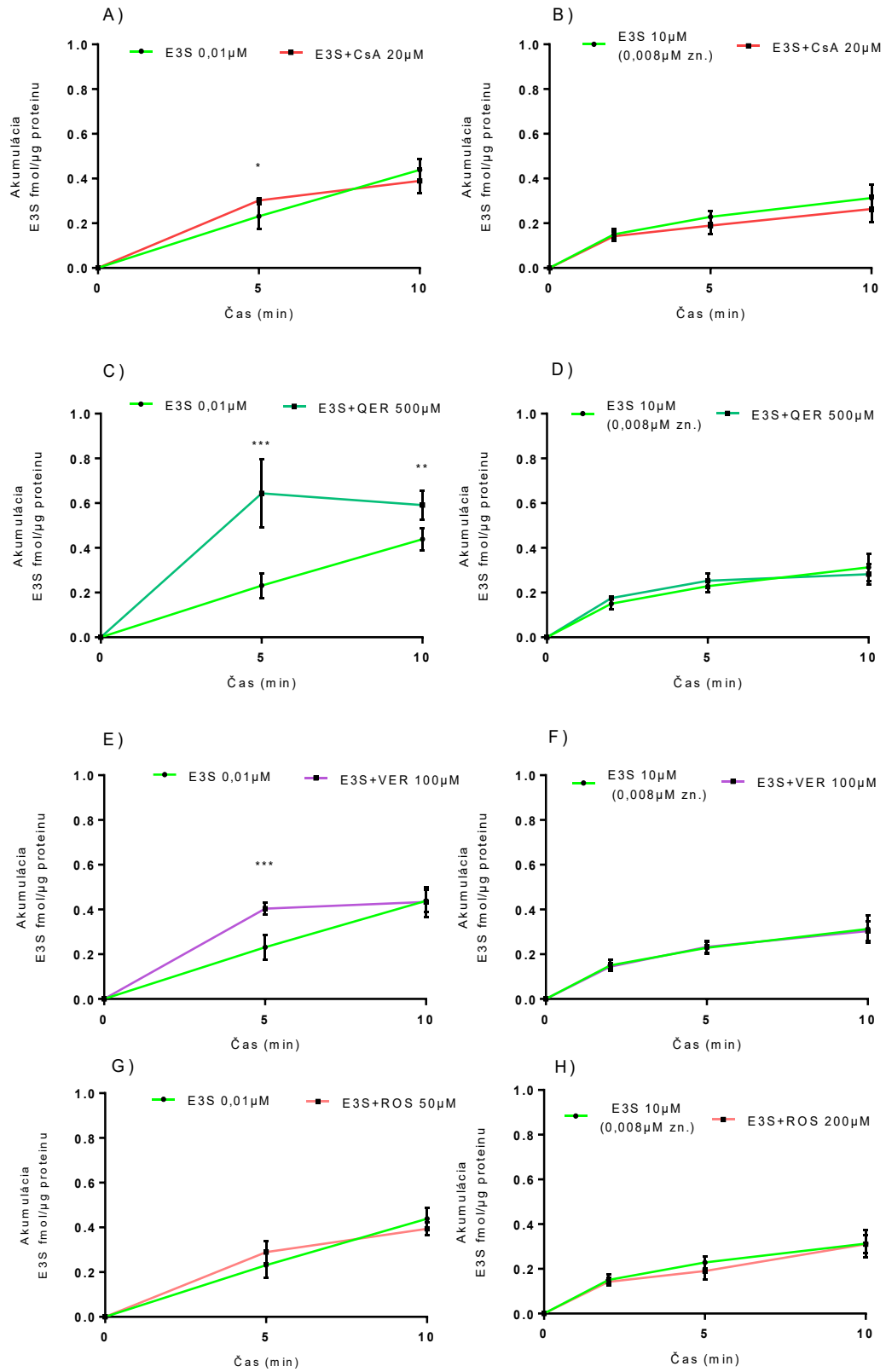
6.1.3.7 Výsledky experimentov s vybranými inhibítormi OATP1A2 a OATP2B1 transportérov

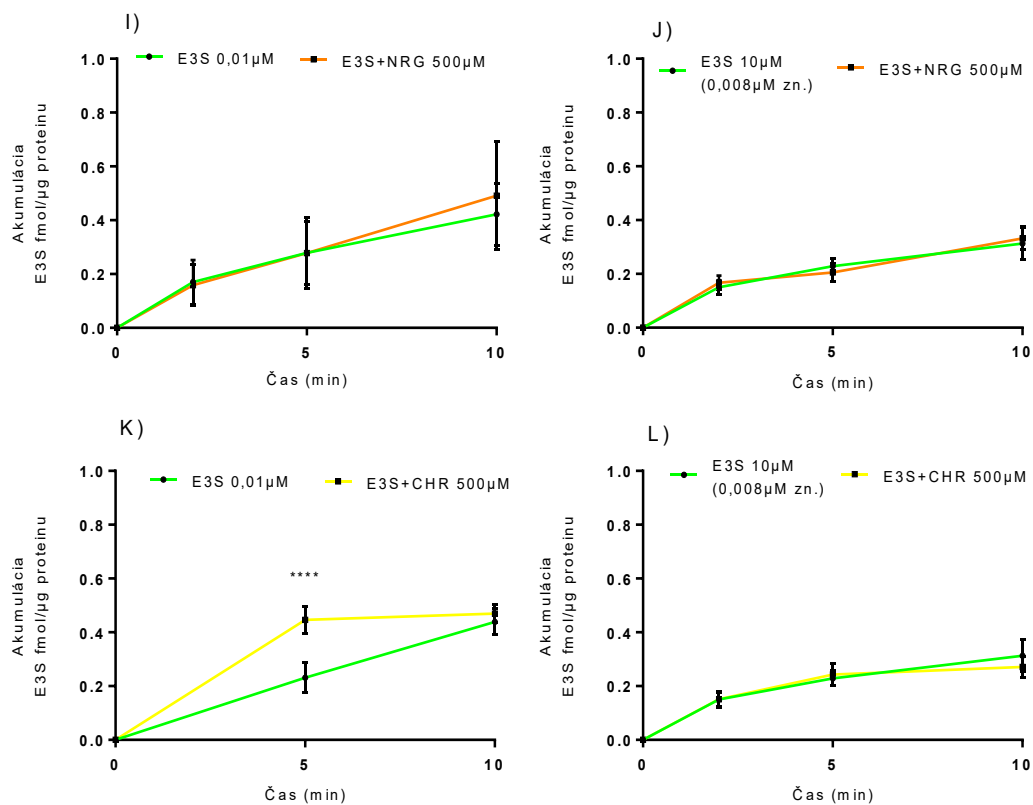
Zamerali sme sa na prírodné látky zo skupiny flavonoidov (naringín, kvercetín, chry-sín) a liečivé látky (cyklosporín A a verapamil) majúce silný interakčný potenciál. Tak-tiež sme použili pri experimentoch hypolipidemikum rosuvastatín, ktorý je substrátom OATP transportérov, preto sme pri ňom predpokladali kompetitívnu inhibíciu OATP in-tes-tinálnych transportérov.

Keďže OATP1A2 a OATP2B1 transportéry v čreve sa podieľajú na absorpcii látok z lumen čriev do enterocyty, očakávali sme, že ich inhibíciou v jejune sa zníži koncentrá-cia modelového substrátu, E3S.

Na experiment sme najskôr zvolili E3S 0,01 μ M (Obr.8 A, C, E, G, I, K). Pri použití inhibítorov cyklosporínu A 20 μ M (Obr.8 A), kvercetínu 500 μ M (Obr.8 C), verapamilu 100 μ M (Obr.8 E) a chry-sínu 500 μ M (Obr.8 K), dochádzalo k signifikantnému zvýšeniu koncentrácie E3S v čase 5 minút v porovnaní so samotným E3S. Najvyššia signifikancia ,v porovnaní so samotným E3S, bola zaznamenaná pri chry-síne, ďalej pri verapamile a kvercetíne. Signifikanciu v čase 10 minút vykazoval iba kvercetín. Pri použití inhibíto-rov rosuvastatínu 50 μ M (Obr. 8G) a naringínu 500 μ M (Obr. 8I) nedochádzalo k signifi-kantným zmenám v akumulácii E3S v porovnaní s kontrolou.

Aby sme nasýtli transportér, použili sme v nasledujúcom experimente E3S 10 μ M ($[^3\text{H}]$ E3S 0,008 μ M). Taktiež sme skúsili zvýšiť koncentráciu rosuvastatínu na 200 μ M. Výsledky zobrazené na Obr. 8 (B, D, F, H, J, L)) nepreukazujú signifikantnú inhibíciu OATP influxných transportérov. Miestami je však viditeľné, že dochádza k poklesu kon-centrácie E3S po pridaní inhibítora, napr. rosuvastatín 200 μ M (Obr. 8 H) v čase 5 minút, cyklosporín A 20 μ M (Obr. 8 B) v čase 5 a 10 minút.





Obrázok 8: Vplyv testovaných látok (naringín, chrysin, cyklosporin A, kvercetin, verapamil, rosuvastatin) na akumuláciu E3S 0,01 μM (A, C, E, G, I, K) a 10 μM (B, D, F, H, J, L) v rezoch jejuna. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom hexaplikáte.

°Výnimku tvorí experiment s 0,01 μM E3S a naringínom (I) – uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka z dvoch nezávislých experimentov vykonaných v technických hexaplikátoch (n=3).

Pre porovnanie akumulácie E3S samotného a s inhibítorom bol použitý nepárový, parametrický t-test. Označenie štatistickej významnosti: * pre $p \leq 0,05$; ** pre $p \leq 0,01$, *** pre $p \leq 0,001$ a **** pre $p \leq 0,0001$.

6.1.4 Inhibícia efluxných ABC transportérov

Estron-3-sulfát sa experimentálne používa ako substrát OATP transportérov. Podľa databázy FDA je navyše *in vitro* substrátom BCRP (ale aj OAT3, NTCP, ktoré v čreve nie sú exprimované) (FDA, 2019). Keďže efluxné transportéry zásadne ovplyvňujú absorpciu liečiv črevnou bariérou, našim cieľom bolo sledovať ich podiel na akumulácii E3S. K tomuto účelu sme využili inhibítory Ko 1 μ M, Ly 1 μ M a CP 2 μ M.

6.1.4.1 Ly-335979/Zosuquidar

Zosuquidar je účinný a vysoko selektívny inhibítor P-gp. Výhodou je, že nemá inhibičný účinok na ostatné ABC transportéry a neovplyvňuje izoformy cytochrómu P450 pri koncentráciách pod mikromolárnym rozsahom (Dantzig *et al.*, 1999; Cripe *et al.*, 2010).

6.1.4.2 Ko-143

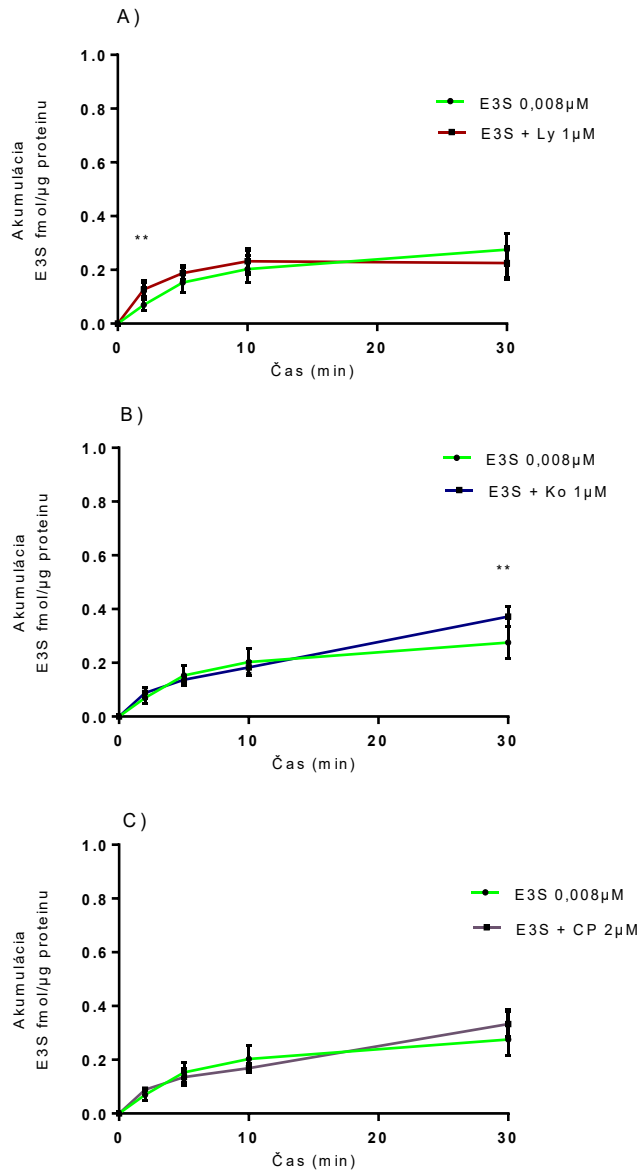
Jedná sa o látku, ktorá je účinným inhibítom BCRP transportéru. Pri vyšších koncentráciách ($\geq 1 \mu\text{M}$) však ovplyvňuje aj transportnú aktivitu P-gp a MRP1 transportéru (Weidner *et al.*, 2015). Inhibítory BCRP v klinickej praxi slúžia ako chemosenzibilizátory (zvyšujú citlivosť na liečbu, znižujú rezistenciu) a pomáhajú zlepšiť farmakokinetiku substrátových chemoterapeutických liečiv (Allen *et al.*, 2002).

6.1.4.3 CP-100356

CP-100356 je špecifický inhibítor P-gp transportéru (Bradshaw-Pierce *et al.*, 2013). Kalgutkar *et al.* (2009) pozorovali inhibíciu prazosínového transportu v MDCKII bunkách transfekovaných proteínom BCRP, čo naznačuje, že pôsobí ako duálny inhibítor P-gp a BCRP.

6.1.4.4 Výsledky experimentov s inhibítormi efluxných ABC transportérov

Na Obr. 9 je zobrazená akumulácia E3S v prítomnosti Ly 1 μ M (Obr. 9A) , Ko 1 μ M (Obr. 9B), a CP 2 μ M (Obr. 9C). E3S je substrátom BCRP, čo dokazuje aj Obr. 9B a C, kde môžeme približne od 15. minúty pozorovať mierne zvýšenie akumulácie, ktorá je daná pravdepodobne blokádou tohto efluxného transportéru. Keďže E3S nie je substrátom P-gp, nie je celkom jasné, prečo dochádza pri použití Ly 1 μ M v čase 2 minúty k signifikantnému zvýšeniu akumulácie E3S (Obr. 9A).



Obrázok 9: Vplyv testovaných inhibítorov P-gp (CP,Ly) a BCRP (CP,Ko) na akumuláciu E3S v rezoch jejuna. (A – Ly 1 μM, B – Ko 1 μM, C – CP 2 μM) Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom hexaplikáte).

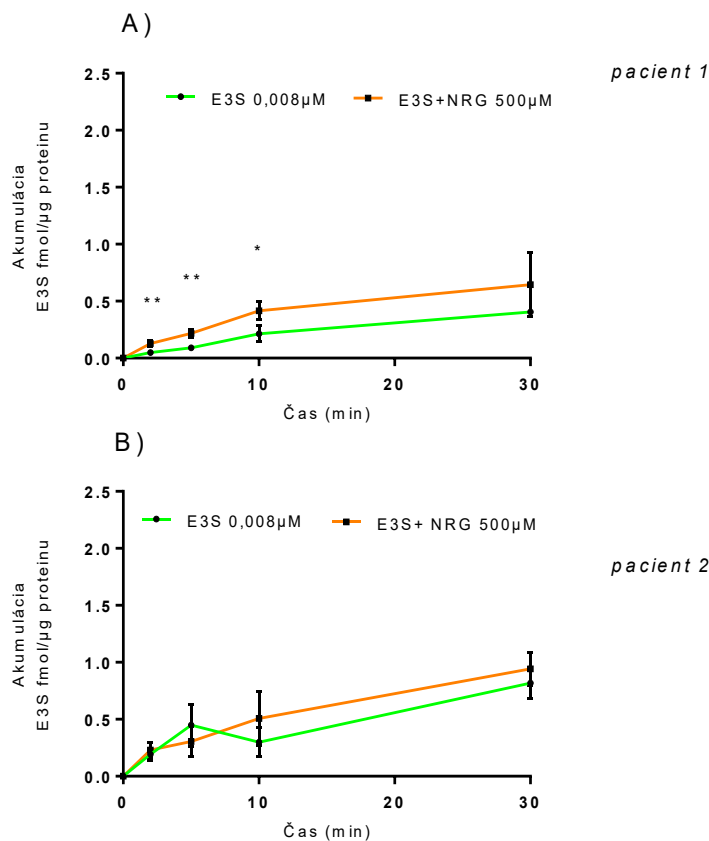
Na porovnanie akumulácie E3S samotného a s prítomnosťou inhibítora bol použitý nepárový, parametrický t-test . Hladiny významnosti: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

6.2 Človek

6.2.1 Inhibičný účinok naringínu a cyklosporínu A na OATP1A2 a OATP2B1 transportéry

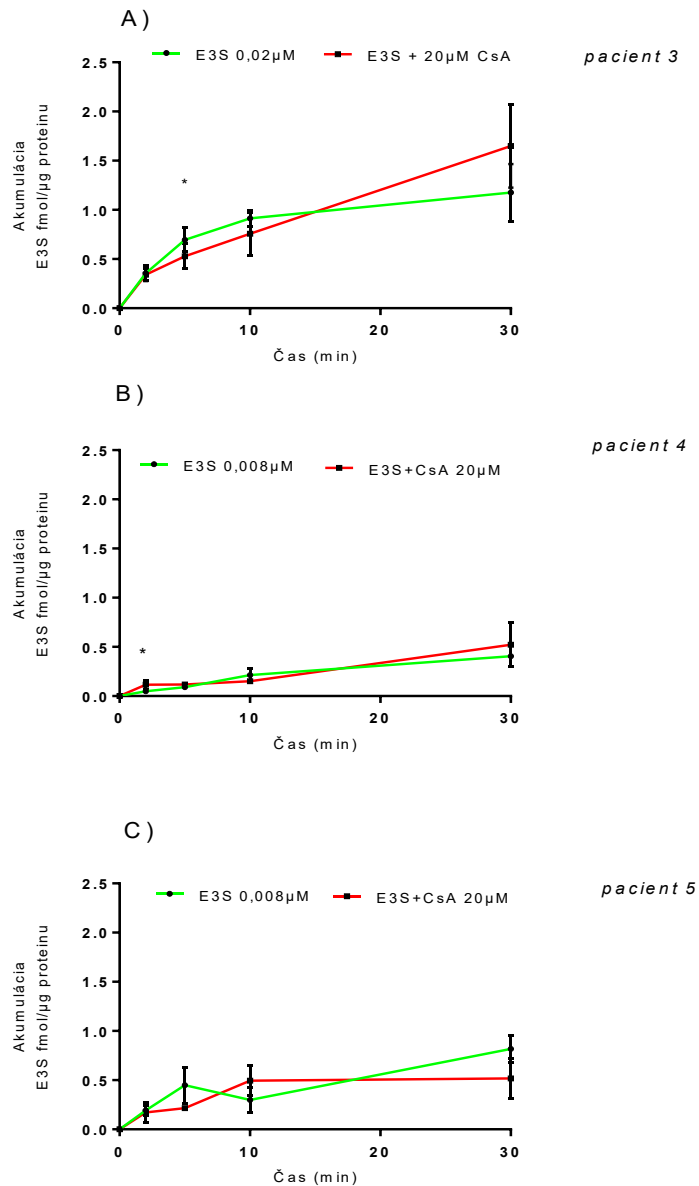
Keďže pri OATP1A2 a OATP2B1 transportéroch u ľudí a potkanov je značná medzidruhová variabilita, našou snahou bolo otestovať vybrané inhibítory na ľudskom jejunu (chirurgicky získané pri operácii pankreasu) s využitím PCIS.

Ako inhibítor sme použili naringín (500 μ M). Na Obr. 10A je možné pozorovať signifikantné zvýšenie akumulácie po pridaní naringínu v čase 2, 5, 10 minút v porovnaní s kontrolou, E3S. Na Obr. 10B približne v 2. a 5. minúte mierne zníženie akumulácie E3S vo vzorkách s pridaným naringínom, ktoré však nie je signifikantné.



Obrázok 10: Vplyv inhibičného účinku naringínu na OATP1A2 a OATP2B1 transportéry na rezoch jejuna. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v technickom quadrplikáte (A), triplikáte (B). Na porovnanie akumulácie E3S samotného a s prítomnosťou inhibítora bol použitý nepárový, parametrický t-test. Hladiny významnosti: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

Na experimenty sme použili aj inhibítor, cyklosporín A ($20\mu\text{M}$). Na Obr. 11A a C je vidieť mierne zníženie akumulácie E3S v 2. a 5. minúte. Toto zníženie nastalo pravdepodobne vplyvom inhibície influxných transportérov. V prípade pacienta 3, prezentovaného na Obr. 11A, je toto zníženie v 5. minúte významné. V prípade pacienta 4, prezentovaného na Obr. 11.B, došlo po použití cyklosporínu A k významnému zvýšeniu akumulácie E3S oproti akumulácii E3S bez prítomnosti inhibítora v čase 2 minúty.



Obrázok 11: Vplyv inhibičného účinku cyklosporínu A na OATP1A2 a OATP2B1 na rezoch jejuna. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka z jedného experimentu vykonaného v hexaplikáte (A), quadraplikáte (B), triplikáte (C). Na porovnanie akumulácie E3S samotného a s prítomnosťou inhibítora bol použitý nepárový, parametrický t-test. Hladiny významnosti: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

7 DISKUSIA

V terapii pacientov s chronickým ochorením prevažuje orálna cesta podania. Črevná bariéra exprimuje radu transportérov ovplyvňujúcich farmakokinetiku liečiv (Sai and Tsuji, 2004). Úlohou intestinálnych influxných OATP transportérov je prenos látok (telu vlastné, lieky, potrava a.i.) z lumen čriev do enterocytov. Odtiaľ sú tieto látky prenášané inými transportérmi membránou enterocytu do krvného obehu. Intestinálne influxné OATP transportéry sú miestom pôsobenia liekových interakcií. Keďže akékoľvek zmeny v črevnej transportnej aktivite môžu zmeniť systémovú expozíciu lieku, dôkladné pochopenie celkového intestinálneho absorpčného mechanizmu je nevyhnutné na dosiahnutie optimálnej terapeutickkej účinnosti liečiv. Preto sa v posledných desaťročiach farmakologický výskum zameriava, okrem iného, na transportné procesy a transportéry prítomné v črevnej bariére (Sai and Tsuji, 2004).

Výskum intestinálnych OATP je založený hlavne na bunkových líniách, ktoré exprimujú jeden/niekoľko druhov transportérov (The International Transporter Consortium *et al.*, 2010). Pretože bunkové línie neodrážajú skutočnú 3D štruktúru črevného tkaniva, ktoré funguje komplexnejšie, je snaha zaviesť nové metódy, či zdokonaľiť tie, ktoré poznáme (Kovacsics, Patik and Özvegy-Laczka, 2017).

V tejto diplomovej práci sme sa snažili optimalizovať *ex vivo* metódu ultratenkých intestinálnych rezov (PCIS). Tkanivové rezy predstavujú 3D model črevnej bariéry, ktorý je oproti bunkám komplexnejší. Sú tu prítomné transportéry a metabolické enzýmy vo fyziologicky relevantnom množstve. Metódu PCIS sme použili pre štúdium interakcii liečiv s intestinálnymi influxnými OATP transportérmi. Hoci bola táto metóda pôvodne vyvíjaná na skúmanie metabolizmu a toxicity liečiv, dnes sa používa aj na štúdium transportu s využitím modelových látok (napríklad P-gp transportér) (Van De Kerkhof *et al.*, 2007; De Graaf *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016; Kovacsics, Patik and Özvegy-Laczka, 2017).

Aj keď je príprava PCIS pomerne jednoduchá na prevedenie, existuje zopár kritických miest, na ktoré netreba zabúdať, pretože majú vplyv na životnosť tkaniva a teda aj na výsledky experimentov. Pri práci črevo a tkanivo z neho získané rýchlo strácajú životaschopnosť a sú náchylné na ischémiu a nekrózu. Preto sa uchováávajú v KHP pri teplote 4°C počas celej prípravy rezov. Ďalším kritickým krokom počas prípravy intestinálnych

rezov je teplota agarózy, ktorá nesmie prevyšovať 37°C, pretože môže poškodiť slizničnú vrstvu. Rezy musia mať primeranú hrúbku, ideálne 150 – 450 µm. Pri rezoch pod túto hranicu hrozí, že ostane len malá časť tkaniva vitálna, pri rezoch nad túto hranicu nekroza kvôli zlému prechodu živín enterocytmi (De Graaf *et al.*, 2010). My sme zvolili hrúbku rezov 200 – 250 µm.

Na základe akumulácie modelového substrátu OATP transportérov, E3S (0,01µM), v intestinálnych segmentoch čriev potkana sme si zvolili jejunum ako časť, na ktorej budeme aplikovať ďalší výskum. U človeka bolo k dispozícii jedine jejunum, hoci v tomto segmente OATP1A2 transportér podľa Glaeser *et al.* (2007) nie je exprimovaný. Avšak OATP2B1 je exprimovaný vo všetkých črevných segmentoch a jeho zastúpenie naprieč tenkým črevom je približne rovnaké (Meier *et al.*, 2007; Gröer *et al.*, 2013). Pri lokalizácii OATP transportéra a smere transportu sú názory nejasné (Kobayashi, 2003; Mooij *et al.*, 2016; Keiser *et al.*, 2017). Pokiaľ však prispieva k rovnováhe žlčových kyselín a transportu hormónov, jeho lokalizácia by mala byť na apikálnej membráne enterocytu (Kobayashi, 2003; Hagenbuch, 2019).

Snažili sme sa zistiť K_m a V_{max} pre E3S na potkaních rezoch. Uskutočnili sme experiment, v ktorom sme sledovali akumuláciu E3S v závislosti na koncentrácii – saturačnú krivku. Tento experiment sme uskutočnili zvlášť pre časový interval 2 minúty a 5 minút. Výsledkom experimentu boli krivky nepravidelného tvaru (Obr. 7A-D), z ktorých hodnotu K_m a V_{max} nebolo možné určiť. Táto skutočnosť môže súvisieť s faktom, že OATP2B1 transportér má 2 miesta viažuce substrát, stranu s vyššou a stranu s nižšou afinitou, a pravdepodobne bisaturačnú krivku (Shirasaka *et al.*, 2012). Možno sa nám krivky prekrývajú a na určenie K_m by sme potrebovali komplikovanejšiu farmakokinetickú či matematickú analýzu.

Keďže pre OATP transportéry v čreve nie je známy selektívny inhibítor, vybrali sme si do experimentu látky, o ktorých z literatúry vieme, že inhibujú tieto transportéry na úrovni buniek. Nevýhodou týchto látok je, že nie sú selektívne len pre tieto transportéry. Ich koncentráciu sme zvolili podľa čo najvyššej rozpustnosti v médiu. Ako kontrolu sme použili rádioaktívne značený E3S (0,008-0,01µM) bez prítomnosti inhibítora. OATP transportéry sú influxné transportéry a na intestinálnej bariére sú exprimované na apikálnej membráne enterocytov (Kobayashi, 2003). Po ich inhibícii by malo dochádzať k zní-

ženi množstva substrátu v bunkách oproti kontrole. Väčšina našich výsledkov však ukazuje presný opak. Signifikantne zvýšenú akumuláciu E3S v čase 5 minút sme pozorovali pri použití inhibítorov cyklosporínu A 20 μ M (Obr.8 A), kvercetínu 500 μ M (Obr.8 C), verapamilu 100 μ M (Obr.8 E) a chrysínu 500 μ M (Obr.8 K) v porovnaní so samotným E3S. Najvyššia signifikancia bola zaznamenaná pri chrysíne, ďalej pri verapamile a kvercetíne. Signifikanciu v čase 10 minút vykazoval iba kvercetín.

Keď sme tento experiment opakovali s 10 μ M E3S (z toho 0,008 μ M rádioaktívne značený E3S) na potkaních segmentoch, pomer medzi E3S \pm inhibítor bol menší, a pri rosuvastatíne (200 μ M) (Obr. 8H) a cyklosporíne A (20 μ M) (Obr. 8B) bolo vidieť mierne zníženie akumulácie E3S (nesignifikantné). Skúsila by som tento experiment zopakovať s využitím vyššej koncentrácie E3S, keďže literatúra pre experimenty na bunkách udáva OATP2B1 K_m (6,3) (Kullak-Ublick *et al.*, 2001) a (20,9 μ M) (Hirano *et al.*, 2006), a pre OATP1A2 K_m (13,6 μ M) (Badagnani, 2006).

Kvôli medzidruhovej variabilite a snahe priblížiť sa skutočnému klinickému prostrediu, sme experiment s E3S a s inhibítormi OATP črevných transportérov (cyklosporínom A 20 μ M a naringínom 500 μ M) otestovali na ľudských rezoch a výsledky boli podobné tým, ktoré vyšli u potkana. Signifikantné zníženie akumulácie po pridaní cyklosporínu A nastalo v 5. minúte len v prípade pacienta 3, prezentovaného na Obr. 11A. V ostatných prípadoch prevažovala zvýšená akumulácia E3S po pridaní inhibítorov. Signifikantné zvýšenie akumulácie voči kontrole bolo pozorované u pacienta 1 po pridaní naringínu 500 μ M v čase 2, 5, 10 minút (výsledky, Obr. 10A). Aký transportér/dej stojí za touto anomáliou nám nie je jasné, keďže E3S je v čreve okrem OATP transportérov iba substrátom BCRP.

Na vylúčenie účinku ABC transportérov sme použili inhibítory P-gp (CP 2 μ M, Ly 1 μ M) a BCRP (CP 2 μ M, Ko 1 μ M). Pri použití Ko 1 μ M (Obr. 9B) a CP 2 μ M (Obr. 9C) sme pozorovali zvýšenú akumuláciu E3S \pm 15 min od začiatku inkubácie, ktorá predstavuje inhibíciu BCRP (v 30 minútach pre Ko signifikantná). Avšak mierne zvýšenú akumuláciu sme pozorovali aj pri Ly 1 μ M (Obr. 9A) v čase 2 minút (signifikantná), hoci E3S nie je popísaným substrátom P-gp transportéru, pre ktorý je tento inhibítor selektívny. Čo môže za túto skutočnosť, nie je známe.

Keďže bolo na bunkách pozorované, že transport niektorých substrátov OATP1A2 (Badagnani, 2006; Eechoute *et al.*, 2011) a OATP2B1 (Kobayashi, 2003; Varma *et al.*,

2011) je pH dependentný a vykazovali pri nižšom pH zvýšený prenos, bolo by vhodné vykonať experimenty za podmienok, pri ktorých by sme slizničnú vrstvu udržali pri fyziologickom pH jejuna, ktoré je neutrálne až slabo zásadité (Wilson, 2019).

Podľa môjho názoru by sa mal pre porovnanie transportu používať model transfekovaných buniek. Vieme totiž, že OATP2B1 transportér má 2 miesta viažuce substrát, a aby interakcia fungovala, musí sa substrát a inhibítor viazať na to isté miesto (Shirasaka *et al.*, 2012; Tamai and Nakanishi, 2013). Preto keď vieme, že látka je inhibítorom OATP2B1, nemusí to znamenať, že bude inhibovať každý substrát OATP2B1.

Funkcia OATP transportérov sa bežne skúma pomocou rádioaktívne značených testovaných substrátov, hoci použitie fluorescenčne značených zlúčenín by bolo jednoduchšie, bezpečnejšie a nákladovo efektívnejšie. My sme pri výskume pozorovali, že rádioaktivita sa vychytáva na plast, čo mohlo ovplyvniť výsledky (data nie sú uvedené). V prípade OATP1A2 a 2B1 boli fluorescenčné testy opísané len nedávno (Kovacsics, Patik and Özvegy-Laczka, 2017). Vhodné a dobre charakterizované *in vitro* testy by pomohli reprodukovať a mapovať OATP interakcie s liečivami.

Výsledky prezentované v tejto diplomovej práci sú výsledkami pilotných štúdií. Pre potvrdenie/vyvrátenie záverov je treba ďalší výskum.

8 ZÁVER

Úlohou tejto práce bola optimalizácia metódy PCIS ako *ex vivo* modelu pre štúdium liekových interakcií OATP transportérov exprimovaných na črevnej bariére. Ako modelový substrát sme použili trícium značený estron-3-substrát (v niektorých experimentoch v kombinácii s neznačeným). Sledovali sme jeho akumuláciu v jednotlivých intestinálnych segmentoch pri teplote 37°C a 4°C, a potom zvolili jejunum ako časť, kde budú prebiehať nasledujúce experimenty. Pokúsili sme sa zostrojiť saturačnú krivku estron-3-sulfátu, ktorej výsledkom však bola krivka nepravidelného tvaru. Keďže selektívny inhibítor črevných OATP transportérov nie je známy, vyskúšali sme inhibičnú aktivitu látok o ktorých vieme, že sú *in vitro* inhibítormi (chrysin, naringín, kvercetin, verapamil, cyklosporín A) alebo substrátmi (rosuvastatín - potenciálny kompetitívny inhibítor) OATP1A2 a OATP2B1 transportérov. Testovaním týchto látok dochádzalo o prevažne k zvýšeniu akumulácie estron-3-sulfátu v sledovaných časových intervaloch 0-10 minút, pričom inhibíciou OATP transportérov malo dôjsť k zníženiu. Vieme, že E3S je substrátom BCRP, pre vylúčenie aktivity efluxných transportérov (mohla by vysvetľovať uvedený jav) v nami sledovanom intervale 0-10 minút sme zvolili inhibítory Ko-143 (BCRP), CP-100356 (P-gp, BCRP) a Ly-335979 (P-gp).

U sledovaných OATP transportérov je značná medzidruhová variabilita, preto sme experimenty s cyklosporínom A a naringínom, ako inhibítormi OATP, vykonali na ľudskom jejune. Výsledky boli porovnateľné s výsledkami na potkanoch.

Metódu PCIS pre výskum intestinálnych OATP transportérov sa uvedenými experimentami nepodarilo optimalizovať. Keďže o OATP transportéroch exprimovaných na črevnej bariére a ich klinických interakciách sa vie málo, do budúcnosti by k optimalizácii tejto metódy mohla pomôcť kombinácia PCIS s bunkami transfekovanými OATP1A2 a OATP2B1 transportérmi, a využitie informácií o OATP transportéroch, ktoré sú súčasťou tejto práce.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Abe, O. *et al.* (2018) 'Role of (-)-epigallocatechin gallate in the pharmacokinetic interaction between nadolol and green tea in healthy volunteers', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 74(6), pp. 775–783. doi: 10.1007/s00228-018-2436-2.
- Alam, M. A. *et al.* (2014) 'Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action', *Advances in Nutrition*, 5(4), pp. 404–417. doi: 10.3945/an.113.005603.
- Ali, M. M. *et al.* (2009) 'Modulation of Anticancer Drug-Induced P-Glycoprotein Expression by Naringin', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(1–2), pp. 109–116. doi: 10.1515/znc-2009-1-218.
- Allen, J. D. *et al.* (2002) 'Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C.', *Molecular cancer therapeutics*, 1(6), pp. 417–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477054>.
- Anand David, A., Arulmoli, R. and Parasuraman, S. (2016) 'Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid', *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), p. 84. doi: 10.4103/0973-7847.194044.
- Anglicheau, D. *et al.* (2006) 'Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine–sirolimus interaction', *Kidney International*, 70(6), pp. 1019–1025. doi: 10.1038/sj.ki.5001649.
- Åsberg, A. (2003) 'Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs: Implications for organ transplant recipients', *Drugs*, 63(4), pp. 367–378. doi: 10.2165/00003495-200363040-00003.
- Badagnani, I. (2006) 'Interaction of Methotrexate with Organic-Anion Transporting Polypeptide 1A2 and Its Genetic Variants', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2), pp. 521–529. doi: 10.1124/jpet.106.104364.
- Bai, X., Moraes, T. F. and Reithmeier, R. A. F. (2017) 'Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins', *Molecular Membrane Biology*, 34(1–2), pp. 1–32. doi: 10.1080/09687688.2018.1448123.
- Bailey, D. G. *et al.* (2007) 'Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(4), pp. 495–502. doi: 10.1038/sj.clpt.6100104.
- Bardal, S. K. *et al.* (2011) 'Pharmacokinetics', in *Applied Pharmacology*. Elsevier Saunders, pp. 17–34, ISBN 9781437703108.
- Bradshaw-Pierce, E. L. *et al.* (2013) 'Tumor P-Glycoprotein Correlates with Efficacy of PF-3758309 in in vitro and in vivo Models of Colorectal Cancer', *Frontiers in Pharmacology*, 4(March), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphar.2013.00022.
- Brouwer, K. L. R. *et al.* (2013) 'In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(1), pp. 95–112. doi: 10.1038/clpt.2013.81.
- Cho, S. K. *et al.* (2014) 'Verapamil decreases the glucose-lowering effect of metformin in

healthy volunteers', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(6), pp. 1426–1432. doi: 10.1111/bcp.12476.

Cripe, L. D. *et al.* (2010) 'Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999', *Blood*, 116(20), pp. 4077–4085. doi: 10.1182/blood-2010-04-277269.

Crouse, J. R. (2008) 'An evaluation of rosuvastatin: pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(3), pp. 287–304. doi: 10.1517/17425255.4.3.287.

Dantzig, A. H. *et al.* (1999) 'Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 290(2), pp. 854–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411602>.

Dresser, G. K. *et al.* (2002) 'Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 71(1), pp. 11–20. doi: 10.1067/mcp.2002.121152.

Dresser, G. K., Kim, R. B. and Bailey, D. G. (2005) 'Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: possible role of organic anion transporting polypeptides.', *Clinical pharmacology and therapeutics*, 77(3), pp. 170–7. doi: 10.1016/j.clpt.2004.10.005.

Drozdik, M. *et al.* (2014) 'Protein Abundance of Clinically Relevant Multidrug Transporters along the Entire Length of the Human Intestine', *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), pp. 3547–3555. doi: 10.1021/mp500330y.

Eechoute, K. *et al.* (2011) 'Environmental and Genetic Factors Affecting Transport of Imatinib by OATP1A2', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Nature Publishing Group, 89(6), pp. 816–820. doi: 10.1038/clpt.2011.42.

El-Kattan, A. and Varm, M. (2012) 'Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability', in *Topics on Drug Metabolism*. InTech. doi: 10.5772/31087.

Eley, T. *et al.* (2015) 'Organic anion transporting polypeptide-mediated transport of, and inhibition by, asunaprevir, an inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 97(2), pp. 159–166. doi: 10.1002/cpt.4.

Englund, G. *et al.* (2006) 'Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3–4), pp. 269–277. doi: 10.1016/j.ejps.2006.04.010.

Estudante, M. *et al.* (2013) 'Intestinal drug transporters: An overview', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 65(10), pp. 1340–1356. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.042.

FDA (2019) *Drug Interactions & Labeling - Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers*, U.S. Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#inVitro> (Accessed: 9 April 2019).

Finch, A. and Pillans, P. (2014) 'P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions', *Australian Prescriber*, 37(4), pp. 137–139. doi: 10.18773/austprescr.2014.050.

- Forsythe, P. and Paterson, S. (2014) 'Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy', *Veterinary Record*, 174(Suppl 2), pp. 13–21. doi: 10.1136/vr.102484.
- Franke, R. M., Scherkenbach, L. A. and Sparreboom, A. (2009) 'Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2', *Pharmacogenomics*, 10(3), pp. 339–344. doi: 10.2217/14622416.10.3.339.
- Gavhane, Y. N. and Yadav, A. V. (2012) 'Loss of orally administered drugs in GI tract', *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(4), pp. 331–344. doi: 10.1016/j.jsps.2012.03.005.
- Gessner, A., König, J. and Fromm, M. F. (2019) 'Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. doi: <https://doi.org/10.1002/cpt.1360>.
- Glaeser, H. *et al.* (2007) 'Intestinal Drug Transporter Expression and the Impact of Grapefruit Juice in Humans', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81(3), pp. 362–370. doi: 10.1038/sj.cpt.6100056.
- De Graaf, I. A. M. *et al.* (2010) 'Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies', *Nature Protocols*, 5(9), pp. 1540–1551. doi: 10.1038/nprot.2010.111.
- Gröer, C. *et al.* (2013) 'LC–MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, pp. 253–261. doi: 10.1016/j.jpba.2013.07.031.
- Groschwitz, K. R. and Hogan, S. P. (2009) 'Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, 124(1), pp. 3–20. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- Hagenbuch, B. (2019) *SLCO family of organic anion transporting polypeptides, IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*. Available at: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=238> (Accessed: 30 January 2019).
- Hagenbuch, B. and Meier, P. J. (2004) 'Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties', *Pflugers Archiv European journal of physiology*, 447(5), pp. 653–665. doi: 10.1007/s00424-003-1168-y.
- Han, H.-K. (2011) 'Role of transporters in drug interactions', *Archives of Pharmacal Research*, 34(11), pp. 1865–1877. doi: 10.1007/s12272-011-1107-y.
- Härtter, S. *et al.* (2013) 'Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(4), pp. 1053–1062. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04453.x.
- Hasunuma, T. *et al.* (2003) 'The drug-drug interactions of pitavastatin (NK-104), a novel HMG-CoA reductase inhibitor and cyclosporine', *Clin Ther Med.*, 19, pp. 381–389.
- Hesselink, D. A. *et al.* (2005) 'Cyclosporine Interacts with Mycophenolic Acid by Inhibiting the Multidrug Resistance-Associated Protein 2', *American Journal of Transplantation*, 5(5), pp. 987–994. doi: 10.1046/j.1600-6143.2005.00779.x.
- Hilgendorf, C. *et al.* (2007) 'Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human

- Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(8), pp. 1333–1340. doi: 10.1124/dmd.107.014902.
- Hirano, M. *et al.* (2006) 'DRUG-DRUG INTERACTION BETWEEN PITAVASTATIN AND VARIOUS DRUGS VIA OATP1B1', *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7), pp. 1229–1236. doi: 10.1124/dmd.106.009290.
- Ho, G.-T., Moodie, F. M. and Satsangi, J. (2003) 'Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?', *Gut*, 52(5), pp. 759–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692067>.
- Ho, R. H. *et al.* (2006) 'Drug and Bile Acid Transporters in Rosuvastatin Hepatic Uptake: Function, Expression, and Pharmacogenetics', *Gastroenterology*, 130(6), pp. 1793–1806. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.034.
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U. and Kroemer, H. K. (2006) 'Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(3), pp. 351–366. doi: 10.1517/17425255.2.3.351.
- Johnson, M. *et al.* (2017) 'Inhibition of intestinal OATP2B1 by the calcium receptor antagonist ronacaleret results in a significant drug-drug interaction by causing a 2-fold decrease in exposure of rosuvastatin', *Drug Metabolism and Disposition*, 45(1), pp. 27–34. doi: 10.1124/dmd.116.072397.
- Kajosaari, L. *et al.* (2005) 'Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(4), pp. 388–399. doi: 10.1016/j.clpt.2005.07.005.
- Kalgutkar, A. S. *et al.* (2009) 'N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2[1H]-yl)-6,7-dimethoxyquinazolin-2-amine (CP-100,356) as a "chemical knock-out equivalent" to assess the impact of efflux transporters on oral drug absorption in the rat', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12), pp. 4914–4927. doi: 10.1002/jps.21756.
- Kalliokoski, A. and Niemi, M. (2009) 'Impact of OATP transporters on pharmacokinetics', *British Journal of Pharmacology*, 158(3), pp. 693–705. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x.
- Keiser, M. *et al.* (2017) 'The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(9), pp. 2657–2663. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.001.
- Kellick, K. A., Bottorff, M. and Toth, P. P. (2014) 'A clinician's guide to statin drug-drug interactions', *Journal of Clinical Lipidology*, 8(3), pp. S30–S46. doi: 10.1016/j.jacl.2014.02.010.
- Van De Kerkhof, E. G. *et al.* (2007) 'Induction of phase I and II drug metabolism in rat small intestine and colon in vitro', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(6), pp. 898–907. doi: 10.1124/dmd.106.014563.
- Kiela, P. R. and Ghishan, F. K. (2016) 'Physiology of Intestinal Absorption and Secretion', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(2), pp. 145–159. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007.
- Kitamura, S. *et al.* (2014) 'Involvement of Multiple Transporters in the Hepatobiliary Transport of Rosuvastatin', 36(10), pp. 2014–2023. doi: 10.1124/dmd.108.021410.it.
- Kobayashi, D. (2003) 'Involvement of Human Organic Anion Transporting Polypeptide OATP-B

- (SLC21A9) in pH-Dependent Transport across Intestinal Apical Membrane', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), pp. 703–708. doi: 10.1124/jpet.103.051300.
- Kockx, M. and Kritharides, L. (2012) 'Cyclosporin A-Induced Hyperlipidemia', in *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*. InTech. doi: 10.5772/47866.
- Kovacsics, D., Patik, I. and Özvegy-Laczka, C. (2017) 'The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(4), pp. 409–424. doi: 10.1080/17425255.2017.1253679.
- Kullak-Ublick, G. A. *et al.* (2001) 'Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver.', *Gastroenterology*, 120(2), pp. 525–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159893>.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G. and Cole, S. P. C. (2005) 'Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), pp. 216–237. doi: 10.1016/j.taap.2004.10.012.
- Li, M., de Graaf, I. A. M. and Groothuis, G. M. M. (2016) 'Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(2), pp. 175–190. doi: 10.1517/17425255.2016.1125882.
- Lin, C.-C. *et al.* (2012) 'Chrysin, a natural and biologically active flavonoid, influences a murine leukemia model in vivo through enhancing populations of T-and B-cells, and promoting macrophage phagocytosis and NK cell cytotoxicity.', *In vivo (Athens, Greece)*, 26(4), pp. 665–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773581>.
- Locher, K. P. (2004) 'Structure and mechanism of ABC transporters.', *Current opinion in structural biology*, 14(4), pp. 426–31. doi: 10.1016/j.sbi.2004.06.005.
- MacLean, C. *et al.* (2010) 'Regional absorption of fexofenadine in rat intestine', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V., 41(5), pp. 670–674. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.007.
- Maeda, K. (2015) 'Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs.', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 38(2), pp. 155–68. doi: 10.1248/bpb.b14-00767.
- Mandery, K. *et al.* (2010) 'Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1', *Biochemical Pharmacology*, 80(11), pp. 1746–1753. doi: 10.1016/j.bcp.2010.08.008.
- McFeely, S. J. *et al.* (2019) 'Organic anion transporting polypeptide 2B1 – More than a glass-full of drug interactions', *Pharmacology & Therapeutics*, 196, pp. 204–215. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.12.009.
- Meier, Y. *et al.* (2007) 'Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract.', *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(4), pp. 590–4. doi: 10.1124/dmd.106.013342.
- Misaka, S. *et al.* (2014) 'Green tea ingestion greatly reduces plasma concentrations of nadolol in healthy subjects', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(4), pp. 432–438. doi: 10.1038/clpt.2013.241.

- Miyachi, E. *et al.* (2016) 'Quantitative Atlas of Cytochrome P450, UDP-Glucuronosyltransferase, and Transporter Proteins in Jejunum of Morbidly Obese Subjects', *Molecular Pharmaceutics*, 13(8), pp. 2631–2640. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00085.
- Mohammadpour, N. *et al.* (2011) 'A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs', *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(6), pp. 485–498.
- Mooij, M. G. *et al.* (2016) 'Human Intestinal PEPT1 Transporter Expression and Localization in Preterm and Term Infants.', *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 44(7), pp. 1014–9. doi: 10.1124/dmd.115.068809.
- Navrátilová, L. *et al.* (2018) 'Honey flavonoids inhibit hOATP2B1 and hOATP1A2 transporters and hOATP-mediated rosuvastatin cell uptake in vitro', *Xenobiotica*, 48(7), pp. 745–755. doi: 10.1080/00498254.2017.1358469.
- Neuvonen, P. J., Niemi, M. and Backman, J. T. (2006) 'Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance.', *Clinical pharmacology and therapeutics*, 80(6), pp. 565–81. doi: 10.1016/j.clpt.2006.09.003.
- Nguyen, H., Zhang, S. and Morris, M. E. (2003) 'Effect of Flavonoids on MRP1-Mediated Transport in Panc-1 Cells', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(2), pp. 250–257. doi: 10.1002/jps.10283.
- Ni, Z. *et al.* (2010) 'Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).', *Current drug metabolism*, 11(7), pp. 603–17. doi: 10.2174/138920010792927325.
- Niemi, M. *et al.* (2003) 'Effects of gemfibrozil, itraconazole, and their combination on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide: potentially hazardous interaction between gemfibrozil and repaglinide', *Diabetologia*, 46(3), pp. 347–351. doi: 10.1007/s00125-003-1034-7.
- Nies, A. T. and Keppler, D. (2007) 'The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2).', *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 453(5), pp. 643–59. doi: 10.1007/s00424-006-0109-y.
- Oswald, S. (2018) 'Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine', *Pharmacology & Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.007.
- Park, J. W. *et al.* (2001) 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluvastatin in heart transplant recipients taking cyclosporine A.', *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 6(4), pp. 351–61. doi: 10.1177/107424840100600404.
- Patel, J. *et al.* (2004) 'In Vitro Interaction of the HIV Protease Inhibitor Ritonavir with Herbal Constituents: Changes in P-gp and CYP3A4 Activity', *American Journal of Therapeutics*, 11(4), pp. 262–277. doi: 10.1097/01.mjt.0000101827.94820.22.
- Prueksaritanont, T. *et al.* (2013) 'Drug–Drug Interaction Studies: Regulatory Guidance and An Industry Perspective', *The AAPS Journal*, 15(3), pp. 629–645. doi: 10.1208/s12248-013-9470-x.
- Rebello, S. *et al.* (2012) 'Intestinal OATP1A2 inhibition as a potential mechanism for the effect of grapefruit juice on aliskiren pharmacokinetics in healthy subjects', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68(5), pp. 697–708. doi: 10.1007/s00228-011-1167-4.
- Regazzi, MB *et al.* (1993) 'Altered disposition of pravastatin following concomitant drug

therapy with cyclosporin A in transplant recipients', *Transplantation Proceedings*, 25, pp. 2732–2734.

Ronaldson, P. T. and Davis, T. P. (2013) 'Targeted drug delivery to treat pain and cerebral hypoxia.', *Pharmacological reviews*, 65(1), pp. 291–314. doi: 10.1124/pr.112.005991.

Sai, Y. and Tsuji, A. (2004) 'Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches.', *Drug discovery today*, 9(16), pp. 712–20. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03198-8.

Schumacher, M. *et al.* (2010) 'Chrysin blocks topotecan-induced apoptosis in Caco-2 cells in spite of inhibition of ABC-transporters', *Biochemical Pharmacology*, 80(4), pp. 471–479. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.038.

Shirasaka, Y. *et al.* (2012) 'Functional Pleiotropy of Organic Anion Transporting Polypeptide OATP2B1 Due to Multiple Binding Sites', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(3), pp. 360–364. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-SH-080.

Shitara, Y. *et al.* (2004) 'Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction', *J Pharmacol Exp Ther*, 311(1), pp. 228–236. doi: 10.1124/jpet.104.068536.proportion.

Shitara, Y. (2011) 'Clinical Importance of OATP1B1 and OATP1B3 in Drug-Drug Interactions', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(3), pp. 220–227. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-094.

Shitara, Y. *et al.* (2012) 'Long-lasting Inhibitory Effects of Cyclosporin A, but Not Tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated Uptake', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(4), pp. 368–378. doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-096.

Simonson, S. (2004) 'Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(2), pp. 167–177. doi: 10.1016/j.clpt.2004.03.010.

Sugano, K. *et al.* (2010) 'Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport', *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), pp. 597–614. doi: 10.1038/nrd3187.

Taguchi, T. *et al.* (2016) 'Characterization of Long-Lasting Oatp Inhibition by Typical Inhibitor Cyclosporine A and In Vitro–In Vivo Discrepancy in Its Drug Interaction Potential in Rats', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), pp. 2231–2239. doi: 10.1016/j.xphs.2016.04.025.

Takano, M., Yumoto, R. and Murakami, T. (2006) 'Expression and function of efflux drug transporters in the intestine', *Pharmacology & Therapeutics*, 109(1–2), pp. 137–161. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.06.005.

Tamai, I. and Nakanishi, T. (2013) 'OATP transporter-mediated drug absorption and interaction', *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), pp. 859–863. doi: 10.1016/j.coph.2013.09.001.

Tfelt-Hansen, P. and Tfelt-Hansen, J. (2009) 'Verapamil for Cluster Headache. Clinical Pharmacology and Possible Mode of Action', *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 49(1), pp. 117–125. doi: 10.1111/j.1526-4610.2008.01298.x.

- The International Transporter Consortium *et al.* (2010) 'Membrane transporters in drug development', *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), pp. 215–236. doi: 10.1038/nrd3028.
- Tourniaire, F. *et al.* (2005) 'Molecular mechanisms of the naringin low uptake by intestinal Caco-2 cells', *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(10), pp. 957–962. doi: 10.1002/mnfr.200500088.
- Varma, M. V. *et al.* (2011) 'pH-Sensitive Interaction of HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) with Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1', *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), pp. 1303–1313. doi: 10.1021/mp200103h.
- Watashi, K. *et al.* (2014) 'Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)', *Hepatology*, 59(5), pp. 1726–1737. doi: 10.1002/hep.26982.
- Weidner, L. D. *et al.* (2015) 'The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), pp. 384–393. doi: 10.1124/jpet.115.225482.
- Wiggins, B. S. *et al.* (2016) 'Recommendations for Management of Clinically Significant Drug-Drug Interactions with Statins and Select Agents Used in Patients with Cardiovascular Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association', *Circulation*, 134(21), pp. e468–e495. doi: 10.1161/CIR.0000000000000456.
- Wilson, M. (2019) *The Human Microbiota in Health and Disease: An Ecological and Community-based Approach*. Garland Science, 2018, ISBN: 978-0-8153-4585-5.
- Xia, C. Q. *et al.* (2007) 'Interactions of Cyclosporin A with Breast Cancer Resistance Protein', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(4), pp. 576–582. doi: 10.1124/dmd.106.011866.
- Zhang, D. and Surapaneni, S. (2012) *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*, *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*. Edited by D. Zhang and S. Surapaneni. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781118180778.
- Zhang, S. (2004) 'Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport', *Molecular Pharmacology*, 65(5), pp. 1208–1216. doi: 10.1124/mol.65.5.1208.
- Zhou, Y. *et al.* (2015) 'Genetic Polymorphisms and Function of the Organic Anion-Transporting Polypeptide 1A2 and Its Clinical Relevance in Drug Disposition', *Pharmacology*, 95(3–4), pp. 201–208. doi: 10.1159/000381313.