

University of Groningen

## Regulation of metabolizing enzymes and transporters for drugs and bile salts in human and rat intestine and liver

Khan, Ansar Ali

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Khan, A. A. (2009). *Regulation of metabolizing enzymes and transporters for drugs and bile salts in human and rat intestine and liver: a study with precision-cut slices*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*



## **Chapter 10**

### **Samenvatting (Dutch Summary)**

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was erop gericht om de regulatie van de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij het metaboliseren en het transport van geneesmiddelen en galzouten in de lever en de darm van de mens en de rat te bestuderen. Voor het voorspellen van metabolisme en transport van geneesmiddelen worden vooral gegevens gebruikt die verkregen worden uit dierproeven. Knaagdieren en met name ratten worden veel gebruikt voor het preklinisch onderzoek naar de farmacologische en toxicologische eigenschappen, inclusief het metabolisme en transport, van nieuw te ontwikkelen geneesmiddelen. Maar door de grote verschillen tussen mens en dier zijn deze voorspellingen vaak onnauwkeurig en onbetrouwbaar. Niet alleen de expressie van de metabole enzymen en de transporters zelf vertonen grote interspecies verschillen, ook bij de expressie van de nucleaire receptoren die betrokken zijn bij die regulatie worden grote verschillen tussen mens en dier gevonden. De belangrijkste nucleaire receptoren (NR) die betrokken zijn bij de expressie van geneesmiddel metaboliserende enzymen (GME) en transporters (GT) zijn de pregnan-X-receptor (PXR), de constitutieve androstaan receptor (CAR) de glucocorticoid receptor (GR), de vitamine D receptor (VDR), de aryl koolwaterstof receptor (Ahr) en de nuclear factor 2- gerelateerde factor 2 (Nrf2).

Gegevens over de regulatie van de GMEs en GTs in dieren kunnen worden verkregen uit in vivo dierproeven, maar bij de mens is dit veel moeilijker te onderzoeken. Soms kan hiervoor weefsel van patiënten worden gebruikt dat bij een operatie wordt verwijderd, maar het blijft moeilijk vast te stellen in hoeverre de ziekte invloed heeft op de gemeten parameters. Bovendien is het vrijwel onmogelijk om indirecte effecten van geneesmiddelen van directe effecten te onderscheiden. Om die directe effecten van geneesmiddelen op de regulatie van GMEs en GTs te meten zijn in vitro experimenten vereist. Hiervoor worden vaak geïsoleerde menselijke levercellen (hepatocyten) en darmcellen (enterocyten) gebruikt naast geïmmortaliseerde cellijnen zoals HepG2 cellen en Caco-2 cellen. Echter in de verse cellen is de expressie van de GMEs, GTs en NRs niet stabiel, terwijl die expressie in de cellijnen vaak niet overeenkomt met die in het weefsel. In het onderzoek beschreven in dit proefschrift worden precies gesneden leverslices en darmslices gebruikt als *in vitro* model. Daarmee is de regulatie van GMEs en GTs bestudeerd in ratten en humane lever en darm om zo de species verschillen en verschillen tussen de organen te onderzoeken. Omdat deze functies verschillen in de verschillende segmenten van de darm zijn slices gemaakt van jejunum, ileum en colon.

De nadruk van het onderzoek lag op de effecten van de liganden van de Vitamine D receptor  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , de actieve vorm van Vitamine D, en het galzout lithocholzuur (LCA). Om meer inzicht te verkrijgen in de specificiteit van deze regulatie werden de effecten van deze VDR liganden vergeleken met die van specifieke liganden van de andere NRs, zoals de FXR liganden chenodeoxycholzuur (CDCA) en GW4064, de PXR liganden pregnenolone-16 $\alpha$  carbonitril (PCN), het GR ligand budesonide (BUD) en dexamethason als ligand voor zowel GR als PXR.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van wat er bekend is over de orgaan en species verschillen in de expressie van de GMEs en GTs en van de beschikbare *in vitro* modellen die gebruikt worden om die regulatie te bestuderen.

In **hoofdstuk 2** werd eerst de mRNA expressie van de NRs VDR, PXR en FXR gekarakteriseerd in de verschillende delen van de darm (jejunum, ileum en colon) van de rat en de mens. Vervolgens werd de invloed van de liganden voor de verschillende NRs op de expressie van de cytochroom P450 3A (CYP3A) isoenzymen gemeten in slices van de lever en de verschillende darmsegmenten van de mens en de rat. Deze CYP3A isoenzymen zijn verantwoordelijk voor het metaboliseren van ca 60% van alle geneesmiddelen alsmede van een aantal endogene stoffen zoals galzouten. In de rattendarm werd een sterke inductie gevonden van CYP3A1 door het VDR ligand  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en een geringere inductie door de PXR en GR liganden. Deze inductie was verschillend in de verschillende darmsegmenten waarbij de richting van de gradient verschilde per ligand. Deze verschillen in mate van regulatie waren niet gecorreleerd met de expressie van de betrokken NRs. CYP3A2 werd alleen geïnduceerd door het VDR ligand en deze regulatie werd alleen in het ileum van de rat waargenomen. De expressie van CYP3A9 bleek voornamelijk te worden gereguleerd door PXR en GR liganden maar niet door het VDR ligand zowel in alle segmenten van de darm als in de lever. In de lever werd geen effect van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gemeten op de expressie van de CYP3A isoenzymen. Dit verschil tussen lever en darm kan verklaard worden door het feit dat in de rattenlever VDR nauwelijks voorkomt in de hepatocyten, waar de meeste CYP3A is gelokaliseerd, maar voornamelijk is gelokaliseerd in de galgangepitheelcellen. Daarentegen wordt bij de mens CYP3A4 door  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  geïnduceerd zowel in de darmslices als in de leverslices, aangezien in de humane hepatocyten wel VDR aanwezig is, hetgeen werd bevestigd op eiwitniveau m.b.v. immunohistochemie. (**Hoofdstuk4**) Deze *in vitro* gevonden effecten werden bevestigd in experimenten waarbij ratten *in vivo*  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kregen toegediend (**hoofdstuk 5**).

In **hoofdstuk 3** worden de effecten beschreven van een ander endogeen VDR ligand, LCA op de regulatie van CYP3A isoenzymen in de lever en de darm van de rat en de mens. LCA is een toxisch galzout dat door bacteriën in het ileum wordt gevormd uit het primaire galzout CDCA. In tegenstelling tot  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  is LCA ook een ligand voor FXR en PXR. Net als  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induceerde LCA de expressie van CYP3A1 in alle segmenten van de darm waarbij het grootste effect in het ileum werd gevonden. Ook werd uitsluitend in het ileum CYP3A2 geïnduceerd. In tegenstelling tot  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induceerde LCA ook de expressie van CYP3A9 in slices van de lever en van alle darmsegmenten, hetgeen waarschijnlijk aan een PXR effect kan worden toegeschreven. LCA induceerde de expressie van CYP3A4 in de humane ileum slices maar in tegenstelling tot  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  niet in de humane leverslices. Omdat LCA ook een FXR ligand is en FXR een belangrijke rol speelt in de galzout homeostasis, werden ook de effecten van LCA op de regulatie van CYP7A1, betrokken bij de synthese van galzouten, en van galzout transporters bestudeerd

en vergeleken met de effecten van CDCA, een FXR ligand met hoge affiniteit (**Hoofdstuk 4**). Deze resultaten staan samengevat in **hoofdstuk 8**.

In **hoofdstuk 4** werd de invloed van de VDR ligand  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  op de regulatie van de galzout homeostase in de lever vergeleken met die van de FXR ligand CDCA. Daarvoor werden de expressie van CYP7A1, betrokken bij de synthese van galzouten, en van galzouttransporters en de NR betrokken bij deze regulatie bestudeerd.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verlaagde de expressie van CYP7A1 en van de basolaterale transporter NTCP (de natrium afhankelijke taurocholaat cotransporter) in humane maar niet in rattenleverslices. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de gevonden verlaagde HNF4 $\alpha$  expressie, waarvan bekend is dat het essentieel is voor de basale expressie van NTCP in de humane maar niet in de rattenlever. De expressie van de galzoutexporttransporters BSEP en MRP2 werd niet beïnvloed. Zoals verwacht, verlaagde CDCA de NTCP expressie en verhoogde het de BSEP expressie, hoewel de verlaagde NTCP expressie in de humane lever niet significant was, zoals ook eerder was gevonden in ons lab. Deze uitkomsten bevestigen dat de effecten van FXR activatie in de slices goed overeenkomen met de effecten die *in vivo* worden gevonden. De speciesverschillen in de effecten van VDR activatie kunnen worden toegeschreven aan de afwezigheid van de VDR expressie in rattenhepatocyten, die werd bevestigd op eiwitniveau met immunohistochemische kleuring.

In **hoofdstuk 5** werd de VDR, FXR en GR gemedieerde regulatie van de apicale natrium afhankelijke galzouttransporter ASBT en de daarbij betrokken NR gekarakteriseerd in de darm en de lever van mens en rat. De VDR ligand  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  had een verlagend effect op de expressie van ASBT mRNA in de rattendarm en-lever en in de humane darm maar niet in de humane lever. Deze resultaten zijn in tegenspraak met die van Chen et al (**Mol. Pharmacol 69: 1913-1923, 2006**) die een positieve VDR responsive element in de ASBT promotor aantoonde en inductie van ASBT in de ileum van Sprague Dawley ratten na intraperitoneale injectie van hoge doses van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . De verlaging van ASBT in onze experimenten ging gepaard met een verlaging van HNF1 $\alpha$ , een NR die essentieel is voor de basale expressie van ASBT. Ook LCA veroorzaakte een verlaging van ASBT en van HNF1 $\alpha$ . Ook in de rattenlever werd ASBT verlaagd door  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , hetgeen te verklaren is doordat VDR en ASBT beide in de cholangiocyten tot expressie komen.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verlaagde ook de ASBT expressie in de humane ileum maar niet in de humane leverslices. Voor dit species-en orgaanverschil hebben we nog geen verklaring kunnen vinden. De *in vitro* gevonden verlaging van de expressie van ASBT in de ratten darm werd niet gevonden bij *in vivo* experimenten waarbij we Wistar ratten  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  intraperitoneaal toedienden, en waarbij de ASBT expressie niet veranderde. Dit zou kunnen worden veroorzaakt doordat de enterocyten in het ileum bij deze experimenten waarschijnlijk aan een lagere concentratie van  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  werden blootgesteld dan de slices, omdat ook de verhoging van de CYP3A1 expressie *in vivo* veel lager was dan *in vitro* (**zie hoofdstuk 2**). LCA verlaagde eveneens de ASBT expressie in de humane en rattendarm, hetgeen een VDR maar ook een FXR effect zou kunnen zijn aangezien ook

FXR activatie door CDCA een verlaging van ASBT in de humane ileum maar niet in de rattenileum veroorzaakte. Net als *in vivo* was aangetoond, induceerden de GR liganden Dex en BUD de ASBT expressie samen met de HNF1 $\alpha$  expressie, hetgeen aantoont dat ASBT inductie in slices kan plaatsvinden.

In **hoofdstuk 6** werd de regulatie van de basolaterale galzout export transporter Organic Solute Transporter (Ost) door VDR, FXR, GR en FXR liganden bestudeerd. Ost bestaat uit twee halftransporters, Ost $\alpha$  en Ost $\beta$  en is betrokken bij de uitscheiding van galzouten naar het bloed vanuit de enterocyten en de cholangiocyten. In het ileum van de rat maar niet van de mens werd een repressie van de expressie van Ost $\alpha$  en Ost $\beta$  gevonden door de VDR liganden 1,25(OH) $_2$ D $_3$  en LCA. Dit zou verklaard kunnen worden door een negatieve VDRE te postuleren. Zoals verwacht werden Ost $\alpha$  en Ost $\beta$  positief gereguleerd door de GR ligand DEX, maar er werd geen regulatie gevonden door de PXR liganden PCN. Om de rol van VDR bij de regulatie van ASBT nader te onderzoeken is meer onderzoek nodig.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we de regulatie van de expressie van de nucleaire receptor VDR. Zowel 1,25(OH) $_2$ D $_3$  als CDCA induceerden de expressie van VDR in de rattendarm en -lever. Maar omdat LCA VDR niet induceerde suggereren deze resultaten dat deze regulatie door CDCA en 1,25(OH) $_2$ D $_3$  niet door FXR of VDR wordt gemedieerd. De betrokkenheid van proteïnekinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) kon niet worden aangetoond in de darmslices maar wel in de leverslices waar de PKC $\alpha$  agonist phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA) de VDR expressie significant verhoogde. Ook in de humane darm werd VDR opgereguleerd door PMA en 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , maar niet door CDCA en LCA. Ook DEX verlaagde de VDR expressie in de humane darm en lever en in de rattenlever. Deze cross-talk tussen GR en VDR was nog niet eerder aangetoond.

In **hoofdstuk 8** worden de belangrijkste resultaten uit de hoofdstukken 2-7 samengevat en bediscussieerd.

In dit proefschrift is aangetoond dat de regulatie van de enzymen en transporters betrokken bij geneesmiddel- en galzoutmetabolisme en transport door de nucleaire receptoren VDR, FXR, PXR en GR weefsel-specifiek is. Het gebruikte *in vitro* model bleek regulatie, voor zover die bekend was uit *in vivo* studies, adequaat te reflecteren. In tegenstelling tot de situatie in een *in vivo* experiment waar secundaire effecten van liganden kunnen optreden die moeilijk van directe effecten kunnen worden onderscheiden, kunnen in het slice model directe effecten worden gemeten in verschillende organen onder gelijke omstandigheden waarbij deze effecten het netto resultaat zijn van niet alleen binding aan de nucleaire receptor maar ook van de opname, metabolisme en uitscheiding van de liganden alsmede van de aanwezigheid van co-activatoren en repressoren. Ook werden belangrijke speciësverschillen gevonden, waarmee wordt onderstreept dat extrapolatie van gegevens uit proefdieronderzoek niet zonder meer naar de mens kunnen worden geëxtrapoleerd. *In vitro*

onderzoek met humane slices kan een belangrijke bijdrage leveren om humane gegevens te verkrijgen en het dierproefgebruik te verminderen.