

STUDIER AV TRANSPORTPROTEINER SOM HAR BETYDELSE FÖR UPPTAG OCH OMSÄTTNING AV LÄKEMEDEL HOS HÄST (PROJNR. 0447046)

Bakgrund

Transportproteiner som tillhör gruppen ATP-binding cassette (ABC) transporters har under de senaste åren fått uppmärksamhet såsom varande mycket betydelsefulla för upptag och omsättning i kroppen av ett flertal läkemedel (Fricker et al). Transportproteinerna är framförallt lokaliserade i epitelcellernas membran i olika vävnader och fungerar som uttransporterare för ett stort antal substanser, såsom t ex antibiotika, antiparasitära läkemedel och antihistaminer. De transportproteiner som räknas till de mest betydelsefulla är P-glykoprotein (P-gp), multidrug resistance protein 1 (MRP1) och 2 (MRP2) samt breast cancer resistance protein (BCRP). Man har studerat dessa transportörer hos olika djurslag och funnit att de i många fall delar ca 80-95% aminosyra-identitet med motsvarande (ortologa) humana transportproteiner. Det kan dock finnas avsevärda skillnader mellan olika species när det gäller uttryck och funktion av transportörerna. Det finns även individskillnader pga polymorfism. T ex har vissa individer av colliers ett defekt icke-funktionellt p-gp. Mycket litet är känt om uttryck och funktion av ABC-transportörerna hos häst.

En annan faktor som har stor betydelse för biotillgängligheten av läkemedel och andra främmande ämnen är mängd och aktivitet av cytokrom-P450 (CYP) enzymer som deltar i den initiala nedbrytningen av de flesta substanser (Guengerich). Även CYP enzymerna finns uttryckta i epitelcellerna i olika vävnader och de kan därför antas utöva en del av en barriär som begränsar upptag av främmande ämnen via magtarmkanalen och även via respirationsvägarna. Den metaboliska aktiviteten av CYP enzymerna bestäms inte bara av mängden enzym som finns uttryckt utan även av hur effektivt elektroner överförs till den katalytiska CYP cykeln (Nakajima et al). Elektronöverföringen till CYP cykeln sker med hjälp av NADPH cytokrom P450 reductas och cytokrom b₅. Därför är det viktigt att även känna till nivåerna av dessa co-faktorer för att kunna uppskatta aktiviteten av CYP enzymerna i olika vävnader.

Det har visat sig att många läkemedel är substrat både för transportproteinet P-gp och för CYP-enzymet CYP3A. P-gp och CYP 3A verkar ofta i samklang med varandra och deras uttryck i olika vävnader regleras via samma nukleära receptorer, nämligen constitutive androstane receptor (CAR) och pregnane X receptor (PXR) (Watkins, Wachter et al). Det innebär att på samma sätt som när det gäller CYP3A och andra CYP-enzymerna kan P-gp-medierad transport hämmas genom att substrat binder - eller tävlar om bindning - till transportproteinet. P-gp kan också induceras via de nukleära receptorerna med ökad aktivitet som följd. Inhibition eller induktion av transportproteiner kan ge kliniskt relevanta läkemedelsinteraktioner genom att förändra plasmanivåer och genom att påverka distributionen av läkemedel till målorganen för effekt eller toxicitet. Information om sådan interaktion börjar förekomma i läkemedelsfirmornas produktresuméer. Sannolikt kommer kunskapen om dessa processer att få allt större betydelse för förståelsen av hur läkemedel distribueras i kroppen och hur läkemedel kan interagera med varandra. Av den orsaken är det viktigt att undersöka om samtidig tillförsel av flera läkemedel som ges till hästar kan förändra läkemedlens kinetik.

Ett syfte med undersökningarna har varit att undersöka förekomst och uttryck av transportproteinet P-gp och av CYP3A i slemhinnorna i magtarmkanalen och i de övre respirationsvägarna, samt i njuren och levern. Vi har även studerat den metaboliska aktiviteten av CYP3A

och hur denna korrelerar med förekomsten av NADPH-cytokrom P450-reduktas och cytokrom b₅. Vi har dessutom i våra studier på häst undersökt hur farmakokinetiken av antihistaminerna fexofenadin och cetirizin påverkas av det antiparasitära medlet ivermektin, som visat sig både kunna både hämma och inducera transportproteiner. Resultaten av de planerade undersökningarna kan bli av betydelse för att uppnå optimala terapeutiska dosregimer, för att man ska klarlägga möjliga interaktionseffekter och för att undvika biverkningar av läkemedel hos häst.

Material och metoder

Hästar

Till de farmakokinetiska studierna används försökshästar tillhörande inst. för de kliniska vetenskaperna, SLU. Vävnadsmaterial som används till gen- och proteinbestämningarna samt enzymaktivitetsbestämningar togs från kliniskt friska svenska varmbloodstravare efter slakt. (Faringe slakteri i Huddunge).

Farmakokinetiska studier med fexofenadin, cetirizin och ivermektin

Oral tillförsel av fexofenadin och cetirizin utfördes via nässvalgssond. Fexofenadin administrerades intravenöst via en permanentkateter. Ivermektin administrerades som en oral pasta. Blod för analys av fexofenadin och cetirizin togs upp till ett dygn (via en permanentkanyl).

Halter av fexofenadin och cetirizin i blod

Plasmakoncentrationer av fexofenadin och cetirizin mättes i en liquid chromatography–electrospray–tandem-mass spektrometer (LC-ESI-MS/MS) på dopinglab vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt.

Farmakokinetiska analyser

Plasmakoncentrationerna plottades mot tiden och analyserades i ett kommersiellt tillgängligt program (Win Nonlin 2.0[®], Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

Genuttryck av P-gp och CYP3A

Genuttrycket för transportproteinerna och enzymerna undersöks i olika vävnader med kvantitativ "real-time Reversed-Transcription Polymerase Chain Reaction" (real-time RT-PCR) med specifika primers och SYBR green. De primers som används för DNA-amplifiering designas från konserverade nukleotidsekvenser gemensamma för människa och laboratedjur. Gendatabaserna NCBI i USA och EBI i England, som kan nås på webben, utnyttjas för att få information om de önskade sekvenserna. Sedan juni 2007 använder vi de nukleotidsekvenser hos häst som publicerades på databasen NCBI under 2007. Vi designar primers som ska generera PCR-produkter som sträcker sig över två exoner inom respektive gen.

Proteinuttryck och lokalisering av P-gp och CYP3A

Proteinuttryck för transportproteinerna och enzymerna studeras med antikroppar som finns kommersiellt tillgängliga. Den cellulära lokaliseringen spårades med immunohistokemi på formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt. Mängden protein bestämdes med immunoblotting på mikrosom- eller membranfraktioner från olika vävnader. Intensiteten på proteinbanden i gelen kvantifierades med ChemiDoc Gel Quantification System and Quantity-One software (Bio-Rad).

Enzymaktivitet av CYP3A

För att studera den katalytiska aktiviteten hos CYP3A användes en substans som specifikt metaboliseras av detta CYP-enzym, enligt ett protokoll från (Chauret et al).

Totalmängden CYP, NADPH cytochrome P450 reductase och cytochrome b₅ i vävnader

Totalmängden CYP och cytochrome b₅ bestämdes spektrofotometriskt enligt metoder adopterade från Omura et al och Rutten et al. NADPH P450 reduktas mättes i mikrosomala preparationer med ett Cytochrome c Reductase (NADPH) Assay Kit (Sigma).

Resultat och diskussion

Publikation 1 och 2. Farmakokinetik av antihistaminerna fexofenadin och ceterizin samt effekten av premedicinering med det antiparasitära medlet ivermectin på dessa substansers kinetik

I de här studierna bestämdes de farmakokinetiska parametrarna för antihistaminerna fexofenadin och ceterizin. Dessutom studerades vilken effekt förbehandling med den antiparasitära macrocykliska lactonen ivermectin hade på dessa parametrar. Fexofenadin administrerades både intravenöst och oralt, vilket gjorde det möjligt att bestämma den orala biotillgängligheten av den substansen. Dessutom studerades vid vilken lägsta dos fexofenadin hade en antihistamineffekt.

Resultat

Värdena för de farmakokinetiska parametrarna för oralt tillfört fexofenadin framgår av Table 1.

Table 1. Pharmacokinetic parameters calculated from drug plasma concentrations after oral administration of 10 mg/kg bw fexofenadine (n=5) or 0.2 mg/kg ivermectin + 10 mg/kg bw fexofenadine (n=5) using a non-compartmental model.

Parameter	Fexofenadine		Fexofenadine + ivermectin	
	Median	Range	Median	Range
AUC _{inf} (ng·h/mL)*	319	245-376	230	208-305
MRT _{inf} (h)	3.58	3.33-4.17	3.86	2.35-4.45
Cmax (ng/mL)	86	70-177	89	58-174
Tmax (h)	1.25	0.75-2.00	1.25	0.50-1.50
t _{1/2} λ (h)	5.0	4.0-5.6	3.8	3.3-7.1
λ	0.14	0.06-0.17	0.18	0.10-0.21
F (%)*	2.6	1.9-2.9	1.5	1.4-2.1

AUC: area under the concentration time curve from time 0 to infinity; MRT: mean residence time from time 0 to infinity; Cmax: peak plasma concentration; Tmax: time to peak plasma concentration; t_{1/2} λ: terminal half-life; λ: rate constant for the terminal portion of the curve; F: oral bioavailability; * represent significant differences (Student's t-test p = 0.03).

Efter oral tillförelse av fexofenadin (10 mg/kg bw) var biotillgängligheten 2,6 %.

Förbehandling med ivermectin (0,2mg/kg bw) 12 tim före oral giva av fexofenadin sänkte biotillgängligheten till 1,5%. Beräkningar av AUC ("area under the curve") visade en sänkning med 27 % av ytan, vilket innebär att en mindre mängd substans hade tagits upp till blodet (Fig 1). Vid intravenös administration av fexofenadin påverkades inte de farmakokinetiska parametrarna av förbehandling med ivermectin. Det indikerar att absorptionen men inte eliminationen av substansen påverkades. Beräkningar med en farmakokinetisk/farmakodynamisk modell visade att fexofenadin har antihistamineffekt vid låga plasmakoncentrationer (EC₅₀=16 ng/mL). Oral behandling av hästar med fexofenadin kan trots detta inte rekommenderas pga den låga biotillgängligheten.

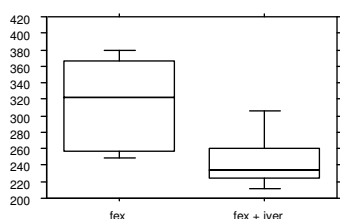


Fig 1. Box-plot of the area under the curve (AUC) of plasma concentration of fexofenadine after oral administration of 10 mg/kg fexofenadine or 0.2 mg/kg ivermectin + 10 mg/kg fexofenadine (n = 5). The box represents the middle half of the data, the whiskers extend to the extreme values and the line inside the box represents the median (Student's t-test, p = 0.03).

De farmakokinetiska parametrarna av histamine H1 antagonisten ceterizin efter oral administrering framgår av Table 2. Förbehandling med ivermectin (0.2 mg/kg bw) som administrerats oralt 1,5 tim före ceterizin påverkade inte de farmakokinetiska parametrarna. Emellertid gav en förbehandling med samma dos ivermectin 12 tim innan tillförelse av

cetirizin en ökad AUC med 60% (Figur 2). Dessutom blev det en signifikant ökning av den maximala plasmakoncentrationen, halveringstiden och mean residence time (MRT) efter förbehandling 12 tim innan.

Table 2. Pharmacokinetic parameters for cetirizine, calculated from drug plasma concentrations using a two-compartmental model. The horses were given cetirizine orally (0.2 mg/kg bw) alone, or following oral pre-treatment with ivermectin (0.2 mg/kg bw) either 1.5 h or 12 h before the administration of cetirizine.

Parameter	Cetirizine alone (n = 7)		Cetirizine + Ivermectin 1.5 h pre-treatment (n = 7)		Cetirizine + Ivermectin 12 h pre-treatment (n = 6)	
	Median	Range	Median	Range	Median	Range
AUC _{inf} (ng·h/mL)	420	381-564	480	352-588	678*	474-854
MRT _{inf} (h)	4.5	4.0-4.9	4.2	3.9-5.2	5.4*	4.7-6.0
C _{max} (ng/mL)	132	101-196	148	83-190	152*	135-177
T _{max} (h)	0.7	0.5-0.8	1.0	0.5-1.0	0.9	0.5-1.2
t _{1/2K01} (h)	0.2	0.1-0.2	0.3	0.1-0.6	0.2	0.1-0.6
t _{1/2α} (h)	0.5	0.4-0.8	0.4	0.3-1.4	0.4	0.2-0.6
t _{1/2β} (h)	3.4	2.9-3.7	3.9	3.1-4.1	4.0***	3.8-4.4
α	1.5	0.9-1.7	1.7	0.5-2.4	1.8	1.2-3.1
β	0.21	0.18-0.24	0.18	0.17-0.22	0.18	0.16-0.18

AUC: area under the concentration time curve from time 0 to infinity; MRT: mean residence time from time 0 to infinity; C_{max}: peak plasma concentration; T_{max}: time to peak plasma concentration; t_{1/2K01}: half-life for the absorption; t_{1/2α}: half-life for the first part of the curve; t_{1/2β}: terminal half-life; α: rate constant for the first part of the curve; β: rate constant for the terminal portion of the curve. *represent significant differences compared to treatment with cetirizine alone (Student's paired t-test * = p < 0.05 *** = p < 0.001).

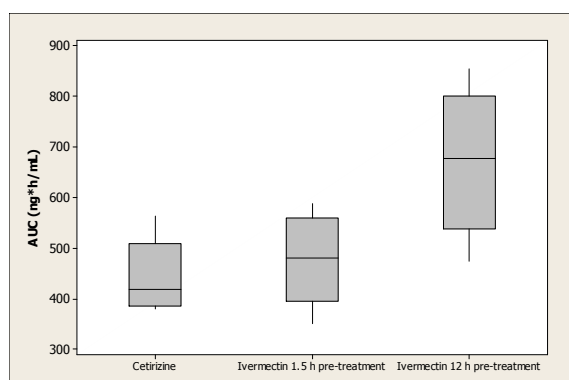


Figure 2. Box-plot of the area under the curve (AUC) for the plasma concentrations of cetirizine after oral administration of 0.2 mg/kg bw cetirizine in horses given the drug alone (n=7), and in horses pre-treated orally with ivermectin (0.2 mg/kg bw) 1.5 h before the administration of cetirizine (n=7) or 12 h before the administration of cetirizine (n=6). The boxes represent the middle half of the data, the whiskers extend to the extreme values and the lines inside the boxes represent the medians. The AUC-values differ significantly in the horses given cetirizine alone compared to the horses pre-treated with ivermectin 12 h before the administration of cetirizine (Student's paired t-test, p=0.02).

Diskussion

Dessa studier visar att upptag och elimination av de två antihistaminerna kan påverkas vid premedicinering med ivermektin. Ivermektin kan verka som en inhibitor av P-gp, dvs konkurrera om bindningsställerna på transportproteinet, men substansen kan verka även som en inducerare av P-gp genom att påverka de nukleära receptorerna CAR och PXP (Schinkel et al). Därigenom ökar aktiviteten av P-gp. P-gp finns hos häst uttryckt i tarmepitel, levercaniculi och njurtubuli (Tydén et al Publikation 3). Både antihistaminerna och ivermektin är substrat till P-gp. Det är också känt att ivermektin till största delen elimineras via aktiv utsöndring över tarmepitelet (Lafont et al). En möjlig förklaring till att biotillgängligheten av fexofenadin minskade är att P-gp i tarmslemhinnan har inducerats och kunde därigenom utöva en effektivare uttransport av absorberat fexofenadin från tarmepitelcellerna, så att en mindre del av substansen kan nå systemkretsloppet. Som nämnts finns P-gp uttryckt i tarmen på häst. Det har visats att rifampicin

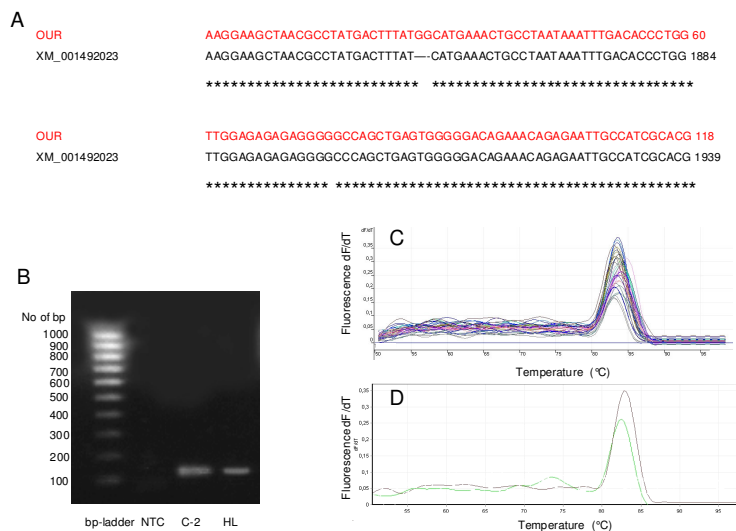
minskar den orala biotillgängligheten av fexofenadin hos människa - en process som förmodades involvera en induktion av P-gp (Hamman et al, Niemi et al). Cetrizin elimineras till största delen ometaboliserad hos människa (Benedetti et al). Den mest betydelsefulla effekten av ivermektin på farmakokinetiken av ceterizin kan antas bero på en minskad renal utsöndring. Utsöndring via urinen är den huvudsakliga eliminationsvägen för cetrizin hos människa och den sker via aktiv transport i njurtubuli och filtration i glomeruli (Benedetti et al). Den aktiva sekretionen av ceterizin medieras troligen av P-gp som fungerar som en exkretorisk pump av olika substanser i de luminala membranerna i proximala tubuli. Vi har visat att P-gp finns uttryckt i proximala tubuli i hästnjure (Tydén et al - Publikation 3). En inhibitorisk effekt på P-gp i proximala tubuli i njuren kan leda till en minskad aktiv utsöndring och en ökad reabsorption av ceterizin i njurtubuli. Observationen att MRT och $t_{1/2\beta}$ av cetrizin ökade efter 12 tim förbehandling med ivermectin styrker det antagandet.

Publikation 3. Förekomst av p-gp i olika vävnader hos häst

Som nämnts är P-gp är en viktig transportör av läkemedel och andra främmande ämnen i olika vävnader. I den här studien har gen- och proteinuttryck samt cellulär lokalisation av P-gp i tarm, lever och njure studerats hos häst. Dessutom har proteinsekvensen av P-gp hos häst jämförts med P-gp hos andra arter.

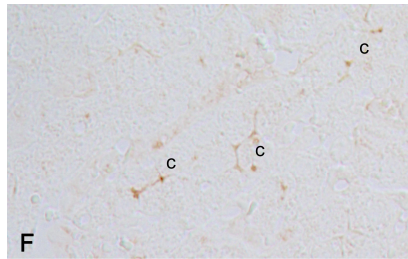
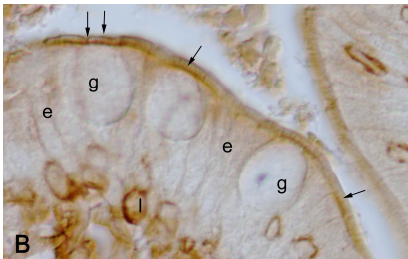
Resultat

Under tiden som den här studien utfördes sekvenserades och publicerades hästens genom och i samband med detta presenterades gensekvensen för P-gp (XM_001492023) på NCBI website (september 2007). En jämförelse med vår PCR-produkt med sekvensen på NCBI's websida visade en mycket hög homologitet i positionerna 1824-1939 på hästens genom (Figure 1A). Kromatografi på agarosgel och smältpunktsanalys visade att samma PCR produkt hade genererats i alla vävnader och produkten var av liknande storlek som den humana genprodukten för P-gp (Figur 1B, C och D).

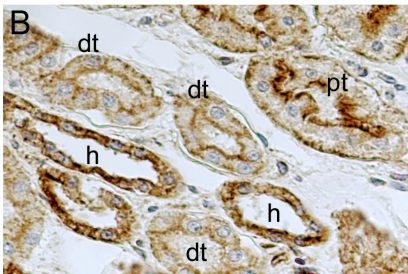


Figur 1 **A.** Alignment av PCR-product genererad i vår studie med den motsvarande segment av hästens gene (NCBI accession no. XM_001492023). **B.** Agarose gel chromatografi av RT-PCR-producter genererade från hästlöver RNA (HL) och humana Caco-2 cells RNA (C-2), användes som kontroller. PCR-produkter med en liknande storlek som för lever blev erhållna för alla de andra undersökta hästvävnaderna (data inte visade). **C** och **D.** Smältkurvs analyser av de genererade PCR-produkter vid real-time RT-PCR kvantifiering, i **C** finns alla vävnader utom perifera blod lymfocyter. **D** visar perifera blodlymfocyter (grön linje) och lever (brun linje).

Real time RT-PCR och immunoblotting visade P-gp-uttryck både på gen- och proteinnivå i alla delar av tarmslemhinnan, med de högsta nivåerna i duodenum samt i lever och njure. Immunohistokemi av olika tarmavsnitt visade att P-gp i häst är lokaliserat till apikala cellmembranet i enterocyterna längs hela tarmen samt i den lymfocyt-population som finns i tarmepitelet och lamina propria i tarmen (Figur 2 B). Perifera lymfocyter visade sig också innehålla P-gp. I lever var P-gp lokaliserat till membranerna i gallcanaliculi (Figur 2 F). I njuren var P-gp framför allt lokaliserat till de apikala cellmembranen i proximala tubuli men P-gp sågs även i de luminala cellmembranen i distala tubuli och i Henles slinga samt dessutom i de mesangiala cellerna i glomeruli. (Figure 3 B)



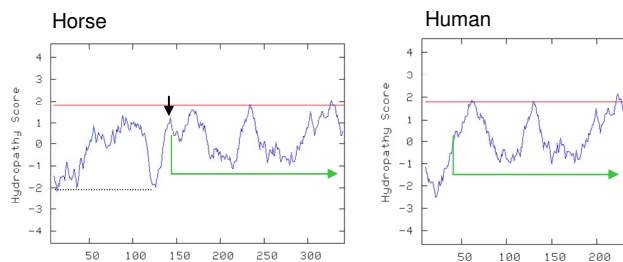
Figur 2. Immunohistokemisk färgning av P-gp i vävnader från häst. B jejunum; F. lever. P-gp immunoreaktiviteten syns som det brunfärgade visas med pilar i, B. Förkortningar: e, enterocytes; g, goblet celler; l, intraepitheliala lymfocyter;.



Figur 3 B. Immunohistokemisk färgning av P-gp i vävnader från häst. Lokalisation av P-gp syns i proximal och distal tubuli, i Henlia slinga. Förkortningar: dt, distala tubuli; gl, glomerulus; h, Henlys slinga; pt, proximala tubuli.

Proteinsekvens-alignment visade att P-gp hos häst till skillnad från flera andra arter har två ”extra” aminosyra-sekvenser närvarande vid N-terminal regionen av proteinet (Figur 4). Den ena är en 99 aminosyror lång sekvens som finns 20 aminosyror från den N-terminala änden. Den andra är 6 aminosyror lång som finns i position 140-145 från N-terminalen (Figur 4).

HORSE	MDLEGGRRNRRGKKNFLKINEESLQLRNKRRVVDDEDFDSYLKRRKWLLCRSSLAELSTAFASSLRGELLPLQPAADRPMPLTSLSV	85
DOG	MDPEGGR-KGSAEKNFWKMGKK-----	22
HUMAN	MDLEGDRNGGAKKNFFKLNK-----	22
RHESUS	MDLEGDRNGGAEKKNFFKLNK-----	22
SHEEP	MDLEGDRSGRAGGNFLKRDKKRF-----	24
MOUSE	MELEEDLKGRAD-KNFSKMGKK-----	22
RAT	MELEEDLNGRAD-KNFSKMGKK-----	22
	*: * . ** * ..:	
HORSE	FYKLLALQAKLIARALGPYATCCLLSGPSLASGKATTKKDEKKEKPTVSIFAMAGVISLFRYSNWLKLYMLLGTAAI IHGA	169
DOG	-----SKKNEKKEKPTVSTFAM-----FRYSNWLDRLYMLVGTMAAI IHGA	64
HUMAN	-----SEKD-KKEKPTVSFVSM-----FRYSNWLKLYMVGTLAAI IHGA	64
RHESUS	-----SKKD-KKERKPTVSFVSM-----FRYSNWLKLYMVGTLAAI IHGA	64
SHEEP	-----FSKDEKKEKPTVGTFTM-----FRYSNWLDRLCMVLGTAAI IHGA	69
MOUSE	-----SKKE-KKEKPAVSVLTM-----FRYAGWLDRLYMLVGTAAI IHGV	64
RAT	-----SKKE-KKEKPAVSVLTM-----FRYAGWLDRFYMLLGTAAI IHGI	64
	::*: **::*:*. ::* **::**::: **::** *****.	



Figur 4. Den övre bilden visar alignment med hästens P-gp och andra arter. De undre bilderna visar Kyte-Doolittle hydropathy plots och visar den konserverade regionen av P-gp börjar hos häst repektive människa (grön linje)

Diskussion

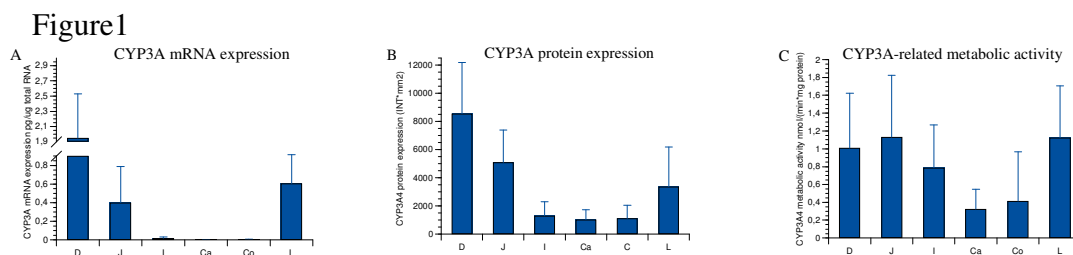
Resultaten av den här studien visar att P-gp finns uttryckt i cellulära membran i tarm, lever, njure samt lymfocyter hos häst. Vilken effekt på funktionen av hästens P-gp de ”extra” aminosyrasekvenserna har vet man ännu inte. Många substanser i växter har visat sig kunna modulera (inhibera eller inducera) uttrycket av P-gp. Exempel på sådana är flavonoider och hypericin (Zhou et al). En gräsätare som hästen kan få i sig en stor mängd sådana substanser och P-gp aktiviteten kan därför variera beroende på vad hästen äter. Observationen att P-gp finns uttryckt i höga nivåer i lever, njure och i början av tunntarmen indikerar en viktig funktion för detta transportprotein för oral biotillgänglighet, distribution och utsöndring av substanser hos häst.

Publikation 4. Karaktärisering av CYP3A-relaterad metabolism i hästtarm

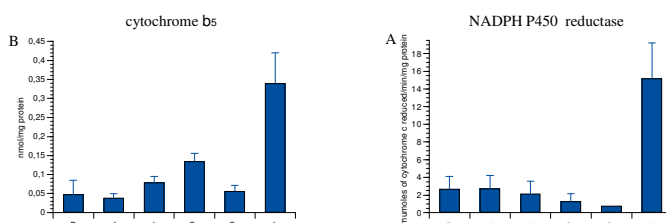
CYP3A har mycket stor betydelse för metabolismen av många läkemedel och andra främmande ämnen. Vid oralt intag har det CYP3A som finns i tarmslemhinnan avgörande betydelse för hur mycket absorberad substans som metaboliseras. Det CYP3A som finns i tarmen begränsar tillsammans med det CYP3A som finns i levern den mängd substans som når den allmänna cirkulationen (första-passage-effekt). I denna undersökning studerades CYP3A-relaterad metabolisk aktivitet, gen- och proteinuttryck av CYP3A samt förekomst av NADPH cytokrom P450 reduktas och cytokrom b5 i olika tarmavsnitt – från duodenum till colon – hos häst. De erhållna resultaten relaterades till sådana som erhöles i jämförande studier med levern.

Resultat

Nivåerna av gen- och proteinuttryck av CYP3A var mycket högre i tunntarmen än i grovtarmen. Trots detta så var den CYP3A-relaterade metaboliska aktiviteten relativt hög i grovtarmen. Nivåerna av NADPH cytokrom P450 reduktas and cytochrome b₅, vilka är hastighetsbegränsande i CYP-cykeln, var i relation till mRNA uttrycket högst i caecum, colon och ileum. (Figurer 1A, B, C och 2 A, B)



Figur 2



Diskussion

Att den metaboliska aktiviteten var relativt hög i grovtarmen hos hästarna kan troligen förklaras av en effektiv elektrontransport från NADPH cytokrom P450 reduktas och cytokrom b₅ till CYP3A i dessa tarmavsnitt. En intressant observation var att nivåerna av genuttryck och CYP3A-relaterad metabolisk aktivitet i levern korrelerade med dessa parametrar i tunntarmen, men inte i grovtarmen. Detta förklaras troligen med att substanser som hästar

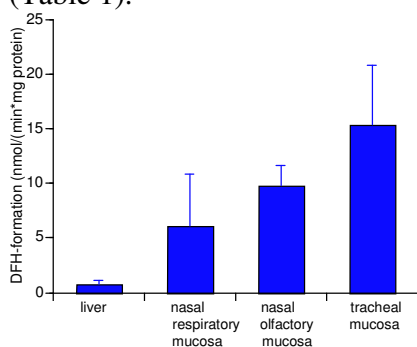
exponeras för oralt under absorptionen och metabolismen samtidigt kommer att inducera - eller hämma - CYP3A i levern och i tunntarmen. En sådan korrelation fanns inte mellan levern och grovtarmen, som huvudsakligen är engagerad i mikrobiell nedbrytning av de fibrösa komponenterna i hästens föda. Korrelationen lever-tunntarm indikerar att det kan vara möjligt att analysera genuttrycket (mRNA) för CYP3A i biopsier från duodenum och på basis av detta avgöra den CYP3A-relaterade metaboliska aktiviteten i levern. Detta kan få stor klinisk betydelse för att på ett enkelt sätt avgöra en hästs "genetiska CYP3A-status", dvs förmåga att metabolisera främmande ämnen, inkluderande läkemedel.

Publikation 5. CYP3A, NADPH-cytokrom P450-reduktas och cytokrom b₅ i de övre luftvägarna hos häst

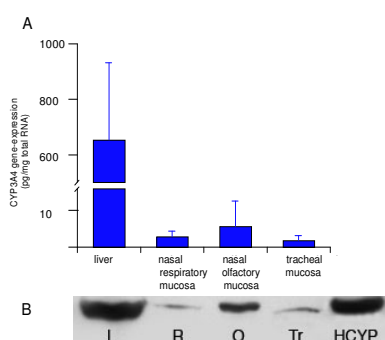
I denna studie undersöktes den CYP3A-beroende aktiviteten i de övre luftvägarna och i levern hos häst. Dessutom undersöktes NADPH cytokrom P450-reduktas och cytokrom b₅, som är viktiga co-faktorer av betydelse för CYP-relaterad metabolism.

Resultat

Mätningar av den CYP3A-relaterade metabolismen visade att metaboliseringshastigheten var betydligt högre i de övre luftvägarna än i levern (Figur 1). Levern hade däremot mycket högre gen- och proteinuttryck av CYP3A än vävnaderna i de övre luftvägarna (Figur 2 A, B). Undersökningar utfördes av aktivitet och uttryck av NADPH cytokrom P450-reduktas och cytokrom b₅ som förser den metaboliska CYP-cykeln med nödvändiga elektroner. Det visade sig att aktiviteten av NADPH cytokrom P450 reduktas och nivån av cytokrom b₅ i relation till gen- och proteinuttrycket av CYP3A var högre i de övre luftvägarna än i levern (Table 1).



Figur 1. CYP 3A4 relaterad katalytisk metabolism i de övre luftvägarna och levern hos häst



Figur 2. Gen-(A) och proteinuttryck (B) i de övre luftvägarna och levern hos häst

Table 1. Ratios of NADPH P450 reductase activity versus CYP3A gene expression, NADPH P450 reductase activity versus total CYP content, cytochrome b₅ content versus CYP3A gene expression and cytochrome b₅ content versus total P450 content in nasal respiratory and olfactory mucosa, tracheal mucosa and liver in horse.

Tissues	NADPH P450 reductase activity: CYP3A expression	NADPH P450 reductase activity: total CYP content	cytochrome b ₅ content: CYP3A expression	cytochrome b ₅ content: total CYP content
Liver	24	16	0.5	0.4
Nasal resp. mucosa	2840	*	20	*
Nasal olfact. mucosa	4020	112	25	0.7
Tracheal mucosa	5270	395	29	2.0

Diskussion

Det framgår av resultaten från denna studie att mönstret för den CYP3A-relaterade metaboliska aktiviteten inte korrelerar med gen- och proteinuttryck för CYP3A. Det är uppenbart att hastigheten av den CYP3A-relaterade metabolismen i olika vävnader hos häst inte enbart är beroende av hur mycket enzym som finns utan även på att det finns adekvata nivåer av NADPH P450 reduktas och cytokrom b₅.

Länk till beskrivning av projektet på institutionens (BVF, SLU) hemsida

http://pft.bvf.slu.se/ShowPage.cfm?OrgenhetSida_ID=6240

Publikationer som har finansierats med medel från projektet

1. Olsén L, Ingvast-Larsson C, Larsson P, Broström H, Bondesson U, Sundqvist M, Tjälve H. (2006) Fexofenadine in horses: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and effect of ivermectin pre-treatment. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 29, 129-135.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00724.x>
2. Olsén, L, Ingvast-Larsson C, Bondesson U, Broström H, Tjälve H, Larsson P. (2007) Cetirizine in horses: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and effect of ivermectin pre-treatment. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 30, 194-200. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00850.x>
3. Tydén E, Tallkvist J, Tjälve H and Larsson P. P-glycoprotein in intestines, liver, kidney and lymphocytes in horse. *Accepted in J. vet. Pharmacol. Therap*
4. Tydén E, Tjälve H and Larsson P. Characterization of CYP3A-Related Metabolism in Horse Intestines. *Submitted to Res Vet Sci.*
5. Tydén E, Olsén L, Tallkvist J, Tjälve H, Larsson P. (2008) Cytochrome P450 3A, NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) in the upper airways in horse. *Res Vet Sci.* Aug; 85(1): 80-5. Epub 2007 Nov 5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.012>

Avhandlingar där några av publikationerna ingår

- Lena Olsén. Drugs in Horses: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Disputation 4:e maj 2007. Publikation 1 och 2
- Eva Tydén. Cytochrome P450 3A and ABC-transport proteins in horse. Disputation ska äga rum 12te december 2008. Publikation 3, 4 och 5

Posters och föredrag vid internationella vetenskapliga konferenser

ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) i Manchester och 10thEAVPT (The European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology) i Turin.

- Tydén E, Tjälve H, Tallkvist J and P. Larsson. P-glycoprotein in the intestine and liver of the horse. *Drug Metab Rev*, 2006, 38, suppl 1:121-2. (poster)
- Tydén E, Tjälve H, Tallkvist J and P. Larsson. P-glycoprotein in the intestine, liver and kidney of the horse. *J Vet Pharmacol Ther*, 2006 Sep;29 Suppl 1:120-1.(poster)
- Tydén E, Larsson, P. Olsén, L, Tallkvist J and H. Tjälve. CYP3A and the allied co-factors NADPH-cytochrome P reductase and cytochrome b in the respiratory tissues in horse. *J Vet Pharmacol Ther.* 2006 Sep;29 Suppl 1:114-5. (muntlig presentation)

- Larsson, P., Olsén, L., Broström, H. Ingvast-Larsson, C., and H. Tjälve. Cetirizine in horse – pharmacokinetics and effects of ivermectin pre-treatment *J. vet. Pharmacol. Therap.* 29, Suppl 1: 250-1. (muntlig presentation)

Föredrag vid populärvetenskapliga konferenser

- Vad händer med läkemedlet i hästens kropp. Pia Larsson och Eva Tydén. Föredrag i samband med Hippocampusdagarna 25-26 oktober, SLU.
- Antihistaminer till häst. Lena Olsen. Hästsymposium i samband med Gothenburg Horse Show 2007, 22 februari.

REFERENSER

- Benedetti MS, Plisnier M, Kaise J, Maier L, Baltés E, Arendt C, McCracken N. (2001) Absorption, distribution, metabolism and excretion of [14C]levocetirizine, the R enantiomer of cetirizine, in healthy volunteers. *European journal of clinical pharmacology.* 57:571-582.
- Chauret N, Tremblay N, Lackman R L, Gauthier JY, Silva JM, Marois J, Yergey JA, Nicoll-Griffith DA. (1999) Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem* 276:215-226.
- Fricker G, Miller DS. (2002) Relevance of multidrug resistance proteins for intestinal drug absorption in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol* 90:5-13.
- Guengerich FP. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. 8, E101-11.
- Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, Hall SD. (2001) The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 69(3):114-121
- Laffont CM, Toutain PL, Alvinerie M, Bousquet-Melou A. (2002) Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos.* 30(6): 626-630.
- Nakajima M, Tane K, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. (2002) Evaluation of approach to predict the contribution of multiple cytochrome P450s in drug metabolism using relative activity factor: effects of the differences in expression levels of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) in the expression system and the differences in the marker activities. *J Pharm Sci* 91:952-963.
- Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. (2003) Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance *Clin Pharmacokinet.* 42(9):819-850.
- Omura T, Sato R, (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.
- Rutten AA, Falke, HE, Catsburg JF, Topp R, Blaauboer BJ, van Holsteijn I, Doorn L, van Leeuwen FX. (1987) Interlaboratory comparison of total cytochrome P-450 and protein determinations in rat liver microsomes. Reinvestigation of assay conditions. *Arch Toxicol* 61:27-33.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 77(4):491-502.
- Wacher VJ, Salphati L, Benet LZ. (2001) *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 89-102.
- Watkins PB. (1997) The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 27:161-170.