

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**INTERAKCIE VYBRANÝCH ANTI-HCV LIEČIV
S PLACENTÁRNÝM OCTN2 TRANSPORTNÝM PROTEÍNOM**

Rigorózna práca

Konzultantka rigorózneho práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Mgr. Vanda Machalová

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní 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 dňa

.....

PodĎakovanie

Chcem sa poĎakovať mojej konzultantke doc. PharmDr. Martine ĀeĀkovej, PhD. za vĥetku pomoc, usmernenie, konzultácie a cenné rady počas experimentálnej práce v laboratóriu ale aj pri vyhodnocovaní výsledkov a spracovávaní teórie do finálnej podoby.

Rovnako veľká vĎaka patrí Mgr. Rone Karahode, ktorá ma viedla počas experimentálnej práce, za venovaný čas a konzultácie spojené nielen s testovaním ale aj so spracovávaním výsledkov na záver.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Mgr. Vanda Machalová

Školiteľ: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Názov rigorózneho práce: Interakcie vybraných anti-HCV liečiv s placentárnym OCTN2 transportným proteínom.

Cieľom tejto rigorózneho práce bolo otestovať interakciu paritapreviru a daclatasviru, s placentárnym transportérom OCTN2, ktorý sprostredkováva transport L-karnitínu ako kofaktoru procesu oxidácie mastných kyselín pre získanie dostatočnej energie na správny vnútromaternicový rast plodu. Na liečbu chronickej hepatitídy C v tehotenstve zatiaľ nie sú schválené žiadne liečivá tejto skupiny, preto testovaním ich vplyvu na transport L-karnitínu cez OCTN2 tak pomôže vytvárať obraz ohľadom ich bezpečnosti pre plod i matku.

V prvej časti štúdie sa testoval transport radioaktívne značeného L-karnitínu cez monovrstvu buniek BeWo b30 v prítomnosti paritapreviru a daclatasviru a stanovila sa zároveň aj koncentrácia radioaktívne značeného L-karnitínu vo vnútri bunkovej vrstvy.

V druhej časti práce sme sa zamerali na hodnotenie vplyvu prítomnosti paritapreviru a daclatasviru na génovú expresiu karnitínových transportérov OCTN1 a OCTN2 (resp. ich kódujúcich génov *SLC22A4* a *SLC22A5*) pomocou qRT-PCR.

Výsledky transportných štúdií iba naznačili možný vplyv oboch látok na transport karnitínu pomocou OCTN2, v použítom usporiadaní štúdie sme viac-menej nevideli presvedčivý štatisticky významný efekt na prestup L-karnitínu cez placentu a akumuláciu vo vrstve trofoblastu, čo by naznačovalo relatívnu bezpečnosť týchto látok z pohľadu ovplyvnenia karnitínovej homeostázy v tehotenstve. Štúdie expresie karnitínových transportérov potom odhalili nepriamu interakciu paritapreviru s *SLC22A4* a *SLC22A5* pri 72-hodinovej expozícii, kedy dochádza k dočasnej up-regulácii génovej expresie na oboch génoch. Na základe zistených dát možno odhadnúť bezpečnosť liečby daclatasvirom aj paritaprevirom počas tehotenstva s ohľadom vychytávania L-karnitínu v placente, keďže

neznižujú množstvo tohto kofaktoru pre oxidáciu mastných kyselín, ktorá je nevyhnutná pre zdravý vývoj plodu a predchádzanie komplikácii u matky v tehotenstve.

Kľúčové slová

Hepatitída C; paritaprevir; daclatasvir; L-karnitín; OCTN2 transportér; bunky BeWo b30

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Vanda Machalová

Supervisor: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of rigorous thesis: Interaction of selected anti-HCV drugs with placental OCTN2 transport protein.

The aim of this rigorous work was to test the interaction of paritaprevir and daclatasvir with the placental OCTN2 transporter, which ensures the transport of L-carnitine as a cofactor of the fatty acid oxidation process to obtain sufficient energy for correct intra-arterial fusion growth. No drugs in this group have been approved for the treatment of chronic hepatitis C in pregnancy, therefore examining their effect on the transport of L-carnitine via OCTN2 can create certain image concerning to the fetal and maternal safety.

In the first part of my thesis the transport and accumulation of radioactively labeled L-carnitine via monolayers of BeWo b30 cells in the presence of paritaprevir and daclatasvir was assayed and the concentration of radiolabeled L-carnitine inside the cell layer.

In the second part of my thesis we focused on the evaluation of the presence of paritaprevir and daclatasvir on its gene expression of the OCTN1 and OCTN2 carnitine transporters (or their coding genes *SLC22A4* and *SLC22A5*) by qRT-PCR.

The results of the transport studies only suggested potential effects of both substances on the transport of carnitine by OCTN2, we did not see a more convincing statistically significant effect on the transfer of L-carnitine across the placenta and accumulation in the trophoblast layer, indicating the relative safety of these substances from the point of view effects of carnitine homeostasis in pregnancy. Expression studies of the carnitine transporters then revealed an indirect interaction of paritaprevir with *SLC22A4* and *SLC22A5* at 72-hour exposure, which temporarily upregulated gene expression on both genes. Based on data available, the safety of daclatasvir and paritaprevir during pregnancy with regard to L-carnitine in the placenta can be estimated as they do not reduce the amount of this cofactor for

the fatty acid oxidation that is essential for healthy fetal development and prevention of maternal complications during pregnancy.

Keywords

Hepatitis C; paritaprevir; daclatasvir; L-carnitine; OCTN2 transporter; BeWo b30 cells

Obsah

1	ZOZNAM SKRATIEK.....	1
2	ÚVOD.....	4
3	TEORETICKÁ ČASŤ.....	5
3.1.	Hepatitída C.....	5
3.1.1.	Infekcia hepatitídy C v tehotenstve.....	5
3.1.2.	Vírus hepatitídy C.....	6
3.1.3.	Farmakoterapia.....	7
█	Kombinácia pegylovaného interferónu α -2a/ α -2b a ribavirínu.....	8
█	Priamo pôsobiace antivirotiká (Direct-acting Antivirals, DAAs).....	8
3.1.4.	Farmakoterapia v tehotenstve.....	10
3.1.5.	Paritaprevir.....	11
3.1.6.	Daclatasvir.....	11
3.2.	Tehotenstvo a placenta.....	12
3.2.1.	L-karnitín a β -oxidácia mastných kyselín.....	14
3.2.2.	Nová podrodina organických katiónových transportérov (OCTN).....	15
3.2.3.	Regulácia génovej expresie OCTN v placente.....	16
3.3.	Význam dostupnosti karnitínu.....	17
4	CIEĽ PRÁCE.....	18
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	19
5.1.	Použitý materiál.....	19
5.1.1.	Bunkový model a kultivácia.....	19
5.1.2.	Prístroje a pomôcky.....	19
5.1.3.	Chemikálie.....	20

5.2. Testovanie miery transportu a akumulácie karnitínu v monovrstve buniek BeWo b30 pri inhibícii paritaprevirom a daclatasvirom	21
5.2.1. PRINCÍP	21
5.2.2. PRACOVNÝ POSTUP	22
5.3. Testovanie vplyvu paritapreviru a daclatasviru na zmenu expresie génu SLC22A4 a SLC22A5 v závislosti na čase.....	25
5.3.1. PRINCÍP	25
5.3.2. PRACOVNÝ POSTUP	26
5.4. Štatistická analýza	29
6 VÝSLEDKY.....	30
6.1. Transportné štúdie.....	30
6.1.1. Vplyv paritapreviru a daclatasviru na akumuláciu karnitínu v monovrstve BeWo buniek.....	30
6.1.2. Vplyv paritapreviru a daclatasviru na transport karnitínu cez monovrstvu BeWo buniek.....	31
6.2. Vplyv paritepraviru a daclatasviru na zmeny génovej expresie SLC22A4 a SLC22A5	32
6.2.1. Ovplyvnenie génovej expresie OCTN1 transportéru	32
6.2.2. Ovplyvnenie génovej expresie OCTN2 transportéru	32
7 DISKUSIA.....	34
8 ZÁVER.....	37
9 LITERATÚRA	38

1 ZOZNAM SKRATIEK

3HAD	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
AASLD/IDSA	American Association for the Study of Liver Disease/Infectious Disease Society of America
ACAD	acyl-CoA dehydrogenase
acetyl-CoA	acetyl-koenzým A
acyl-CoA	acylkoenzým A
ANOVA	one-way analysis of variance
anti- HCV	pôsobiace proti víru hepatitídy C
APASL	Asian Pacific Association for the Study of the Liver
API	aqua pro injectione
ATP	adenozíntrifosfát
BBM	brush-border membrane
BCA	kyselina bicínchonínová
CACT	carnitine/acylcarnitine carrier
CD81	cluster of differentiation 81
cDNA	complementary DNA
CPT1	carnitine palmitoyltransferase 1
CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2
DAAs	direct-acting antivirals, priamo pôsobiace antivirotiká
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glucose
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPM	disintegrations per minute
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	rastový faktor
EH	enoyl-CoA hydratase
EMA	European Medicines Agency
FA	fatty acid, mastné kyseliny
FAO	fatty acid oxidation, oxidácia mastných kyselín

FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
g-BBD	g-butyrobetaín-dioxygenáza
hCG	human chorionic gonadotropin
HCV	vírus hepatitídy C
HELLP	haemolysis-elevated liver enzymes-low platelets
ICP	intrahepatálna cholestáza tehotenstva
IFN	interferón
KAT	3-ketoacyl-CoA thiolase
LACS	long-chain acyl-CoA synthetase
MM	Master Mix
mRNA	mediátorová RNA
MTCT	mother-to-child-transmission, prenos z matky na dieťa počas tehotenstva
NI	nukleos(t)idové analógové inhibítory
NNI	nenukleos(t)idové analógové inhibítory
NS	nonstructural proteins, neštruktúrny proteín
NTR	nontranslated region, netranslatovaná časť
OCTN	organic cation transporter novel, nové organické kationové transportéry
OCTs	organic cation transporters, organické kationové transportéry
ORF	open reading frame, otvorený čítací rámec
PBS	phosphate-buffered saline
PCD	autozomálna recesívna porucha β -oxidácie mastných kyselín
PEG	polyethylene-glycol
PegIFN-α	pegylovaný interferón α
rcf	relative centrifugal force
RdRp	RNA-dependentná RNA-polymeráza
RH	risk-haplotype
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverse transcription
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLC	solute carrier
SLCO	solute carrier organic anion
SVR	trvalá virologická odpoveď

UV	ultrafialové žiarenie
VLACS	very-long-chain acyl-CoA synthetase
WHO	World Health Organisation
WR	working reagent

2 ÚVOD

V dnešnej dobe každým rokom umiera takmer 400 000 ľudí na komplikácie chronickej hepatitídy C. Táto problematika sa týka nielen dospelých ľudí, ale aj nenarodených detí, ktoré sú infikované už počas tehotenstva prenosom z matky na plod. Narodené deti javia známky často až fatálneho poškodenia pečene, preto je nevyhnutné zahájiť liečbu už počas tehotenstva. Keďže v tehotenstve ešte nie sú schválené žiadne liečebné režimy, je ideálne začať s liečbou ešte pred otehotnením, čo v mnohých prípadoch nie je reálne, pretože chronická infekcia má dlho asymptomatický priebeh.

Významným prevratom v liečbe hepatitídy C zaznamenali priamo pôsobiace antivirotiká, ktoré priamo inhibujú replikáciu víru v špecifických štruktúrach. Oproti predošlej nešpecifickej liečbe pegylovaným interferónom α s ribavirínom preukázali vyššiu úspešnosť v dosiahnutí trvalej virologickej odpovede a nižším výskytom nežiaducich účinkov. Testovanie ich bezpečnosti pre plod i matku počas tehotenstva je stále vo fáze vývoja, avšak u niektorých priamych antivirotik boli schválené a odporúčané kategórie, ktoré nedokázali negatívny vplyv na plod u zvierat.

Pre správny vývoj a rast plodu a predchádzanie komplikácii u matky počas tehotenstva, ako je syndróm HELLP spojený s hemolýzou, trombocytopéniou a zhoršenými pečevnými funkciami u matky vedúcimi k preeklampsii, je dostatočné dodávanie L-karnitínu cez OCTN2 transportný proteín, ktoré zabezpečí správnu funkciu oxidácie mastných kyselín a tým dostatok energie. Nedostatočný transport L-karnitínu cez OCTN2 do buniek placenty je dávaný do súvisu s deformáciou rastu u vyvíjajúceho sa plodu.

Keďže testovanie vplyvu novej generácie antivirotik proti hepatitíde C na OCTN2 predpovedalo jeho ovplyvnenie niektorými antivirotikami, bolo naším cieľom presnejšie zdefinovať túto interakciu a prispieť ďalšími poznatkami na zohľadnenie ich použitia aj v tehotenstve.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. *Hepatitída C*

Hepatitída C je vírusové ochorenie pečene s inkubačnou dobou 2 týždne až 6 mesiacov, ktoré môže mať akútny aj chronický priebeh. *Vírus hepatitídy C (HCV)* je prenášaný krvou, a preto vysoké riziko prenosu predstavuje injekčné užívanie drog, transfúzia infikovanej krvi a krvných produktov, riziková zdravotná starostlivosť (nedostatočná sterilizácia ihl), ale aj sexuálnym prenosom, tetovaním, užívaním intranazálnych liekov. *Akútna forma hepatitídy C* je väčšinou bezpríznaková a imunitný systém organizmu sa víru dokáže zbaviť bez použitia farmakoterapie do 6 mesiacov. V organizme zostanú prítomné protilátky proti HCV (anti-HCV) po odznení infekcie. (WHO, 2018, Prasad and Honegger, 2013) Progresia akútnej formy do chronickej sa pohybuje v 50-84% prípadov, pričom riziko stúpa so zvyšujúcim sa vekom pacientov. (Palumbo, 2011)

Chronická forma hepatitídy C môže trvať týždne až niekoľko rokov s príznakmi či bez, čo spôsobuje život ohrozujúce stavy ako cirhóza pečene, hepatocelulárny karcinóm a ďalšie extrahepatálne komplikácie vedúce k nutnosti transplantácie pečene. Sérologickým dôkazom chronickej formy je prítomnosť ribonukleovej kyseliny (RNA) víru. Medzi časté príznaky infekcie patrí únava, horúčka, nechutenstvo, zvracanie, tmavý moč, šedá stolica, bolesti kĺbov, žltacka (žltnutie kože a očných bielkov). Na komplikácie chronickej formy v celosvetovom meradle umiera *každý rok 399 000 ľudí* a častý výskyt infekcie u malých detí v rozvinutých zemiach je spôsobený prenosom z matky na dieťa počas tehotenstva (MTCT, mother-to-child-transmission). (Prasad and Honegger, 2013, WHO, 2018)

Očkovacia látka zatiaľ nie je vyvinutá, pri rozvinutí hepatitídy C sa odporúča očkovanie proti hepatitíde A a B, aby sa zabránilo koinfekcii. (WHO, 2018)

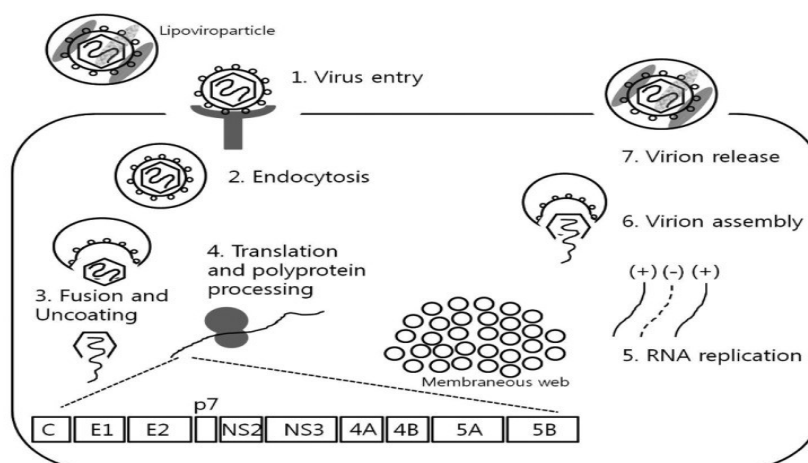
3.1.1. **Infekcia hepatitídy C v tehotenstve**

V súčasnosti sa vyskytuje *8% tehotných žien infikovaných hepatitídou C* v celkovej populácii, pričom detí infikovaných cestou MTCT je v USA a Európe 0,2-0,4% a v určitých regiónoch Afriky až 12-14%. Predpokladá sa prenos infekcie z matky na dieťa počas pôrodu alebo v maternici v priebehu ktoréhokoľvek trimestra, len výnimočne po pôrode. (Dibba et al.,

2018) Hepatitída C pre deti predstavuje riziko nízkej pôrodnej hmotnosti, nedostatočného rastu plodu v maternici či vrodené anomálie. Narodené infikované deti vyžadujú neonatálnu jednotku intenzívnej starostlivosti s riadenou ventiláciou a vykazujú mierne alebo fatálne poškodenie pečene. Tehotenstvo u matky infikovanej hepatitídou C rovnako predstavuje vyššie riziko intrahepatálnej cholestázy tehotenstva (ICP), predčasného pôrodu, gestačného diabetu, potratovosti. (Dibba et al., 2018, Page et al., 2017) Progresia pečenej fibrózy matky nemá zhoršujúcu tendenciu, naopak posledné štúdie dokázali mierny priaznivý účinok počas tehotenstva. (Page et al., 2017)

3.1.2. Vírus hepatitídy C

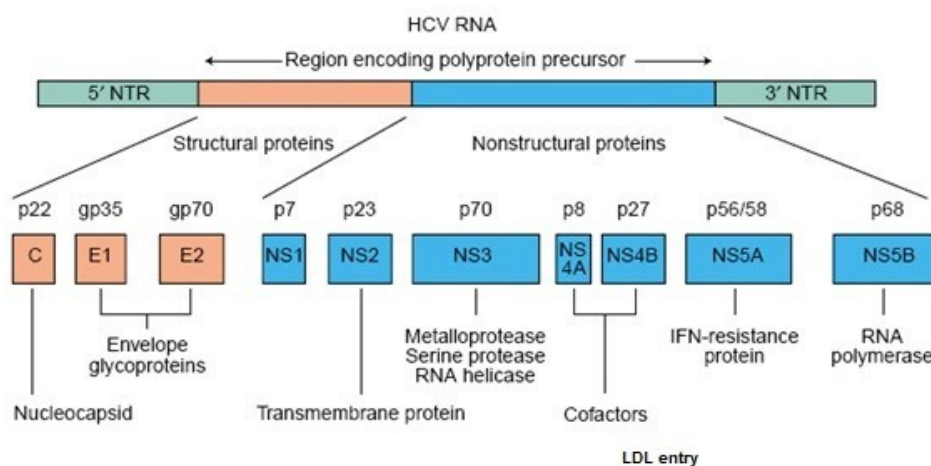
Vírus hepatitídy C je malý obalený RNA vírus (čľaď Flaviviridae, rod Hepacivirus), ktorého telo tvorí hepatotropná genómová jednoreťazcová RNA pozitívnej polarita v jadrovom proteíne a lipidová dvojvrstva 2 glykoproteínov (E1, E2) tvoriacich virión. (Li and Lo, 2015, Kim and Chang, 2013) Vírus sa pomocou viriónu viaže na receptorový komplex hepatocytov tvorený vysokodenzitným lipoproteínovým receptorom skupiny B typu 1, tetraspanínom CD81 (Cluster of differentiation 81), tight-junction spojovacím proteínom claudín-1 a occludínom. Po naviazaní sa do vnútra bunky uvoľní vírová RNA z nukleokapsidu (Obr. 1), ktorá využíva bunkové proteíny na vlastnú transláciu a replikáciu. (Li and Lo, 2015)



Obr. 1 Životný cyklus vírusu hepatitídy C v hepatocyte (Kim and Chang, 2013)

Vírovú RNA tvoria 3 časti – 5'NTR netranslatovaná časť, otvorený čítací rámec (ORF) kódujúci polyproteínový prekurzor s 3010 aminokyselinami a krátka časť 3'NTR. Rozlišujeme 6

hlavných genotypov a viac ako 80 subtypov. Najväčšiu sekvenčnú variabilitu spôsobuje oblasť glykoproteínu (E1, E2), pričom najviac zachovaná je sekvencia 5' NTR so špecifickými sekvenciami a sekundárnymi štruktúrami RNA dôležitými pre replikáciu a transláciu (Obr. 2). Táto variabilita je daná vysokou rýchlosťou replikácie a nedostatočnou korelačnou aktivitou RNA-dependentnej RNA-polymerázy (RdRp). Všetky genómy sú patogénne a hepatotropné, ale s odlišnou infekčnosťou a patogenitou. (Ashfaq et al., 2011)



Obr. 2 Zakódované proteíny v RNA víru hepatitídy C (Ashfaq et al., 2011)

Vstup vírovej RNA do bunky iniciuje transláciu polyproteínovej časti, ktorá je dokončená v hrubom endoplazmatickom retikule. Ďalším spracovaním bunkovými (signálne peptidázy) a vírovými proteázami (*nonstructural protein protease NS2, NS3/4A*) vzniká 10 konkrétnych vírových proteínov *E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS5A, NS5B*, vrátane glykoproteínov jadra a obalov. (Kim and Chang, 2013) Po celom svete prevažujú rôzne genotypy: Severná Amerika a Európa – genotyp 1a a 1b (50%), genotyp 3 (25%) a 4 (20%), genotypy 2,5,6 len vzácne; Západná Afrika – prevažne genotyp 2; Južná Ázia a časť Škandinávie – prevažne genotyp 3; Stredná a Severná Afrika – prevažne genotyp 4; Južná Afrika – prevažne genotyp 5; Juhovýchodná Ázia – prevažne genotyp 6. (Messina et al., 2015, Spengler, 2018)

3.1.3. Farmakoterapia

Vírus hepatitídy C bol objavený roku 1989 a jeho liečba zaznamenala v posledných rokoch prevrat. Cieľom liečby chronickej hepatitídy C je dosiahnutie *trvalej virologickej odpovede (SVR)*, čo znamená neprítomnosť RNA víru po 12-24 týždňoch od ukončenia liečby. (Page et al., 2017, Lynch and Wu, 2016)

■ Kombinácia pegylovaného interferónu α -2a/ α -2b a ribavirínu

Do pôvodnej štandardnej liečby patrila kombinácia pegylovaného interferónu α (*PegIFN- α*) a ribavirínu, ktorá dosiahla 40-80% SVR v závislosti od genotypu víru a má významné vedľajšie účinky (depresie, hemolytická anémia, flu-like syndróm, ťažké infekcie). (Page et al., 2017, Lynch and Wu, 2016) Kombinácia Peg-IFN α -2a alebo 2b sa štandardne používala od roku 2001, aby sa dosiahla prítomnosť kópií RNA víru v sére pod 1000/ml po 6 mesiacov od ukončenia liečby.

IFN α -2b je vo vode rozpustný proteín získaný bakteriálnou fermentáciou kmeňa *Escherichia coli*, ktorý je upravený rekombinantnou technológiou. Ten tvorí kovalentný konjugát s *monometoxy-polyetylen-glykolom (PEG)*. Biologická aktivita je viazaná na IFN α -2b časť konjugátu, ktorá znižuje bunkovú proliferáciu, indukuje určité enzýmy, má imunomodulačné účinky (zvýšenie špecifickej cytotoxicity lymfocytov, zvýšenie fagocytárnej schopnosti makrofágov), čím inhibuje replikáciu víru v bunke. Tento nešpecifický antivírusový stav nastavujú aj bunkách, ktoré nie sú infikované, čím ich preventívne chránia pred infekciou. *IFN α -2a* je tiež rekombinantnou metódou pripravený ľudský leukocytárny interferón, ktorý tvorí kovalentný konjugát s jednoreťazcovým *bis-monometoxy PEG*.

Ribavirín je distribuovaný do všetkých tkanív cez nukleozidové transportéry. Prevláda vo fosfátovej forme predovšetkým v červených krvinkách, pričom v menšej miere je v infikovaných bunkách premieňaný adenín-kinázou na aktívnu nukleotidovú formu, ktorá inhibuje syntézu DNA (deoxyribonukleová kyselina) počas génovej expzie. Časť ribavirínu uložená v červených krvinkách sa znova uvoľňuje do systému po ich rozpade v slezine (40 dní), z čoho sa predpokladá dlhodobý a teratogénny účinok u zvierat. (Palumbo, 2011)

■ Priamo pôsobiace antivirotiká (Direct-acting Antivirals, DAAs)

Od roku 2011 sa začali používať *priame inhibítory RNA replikácie*, ktoré pôsobia na proteázu NS3/4A, RNA-dependentnú polymerázu NS5B a proteín NS5A (Obr. 3). (Page et al., 2017) Tieto priamo pôsobiace antivirotiká (DAAs) priamo inhibujú replikáciu a indukujú bunkovú smrť na elimináciu víru, čím *zvýšili SVR na 60-100%*, skrátili dobu liečby a sú lepšie tolerované. (Page et al., 2017, Horsley-Silva and Vargas, 2017) Odporúča sa začať s liečbou až po prechode do chronickej fázy z dôvodu možného vysporiadania sa imunitného systému s vírusovou infekciou bez potreby farmakoterapie. (Page et al., 2017)

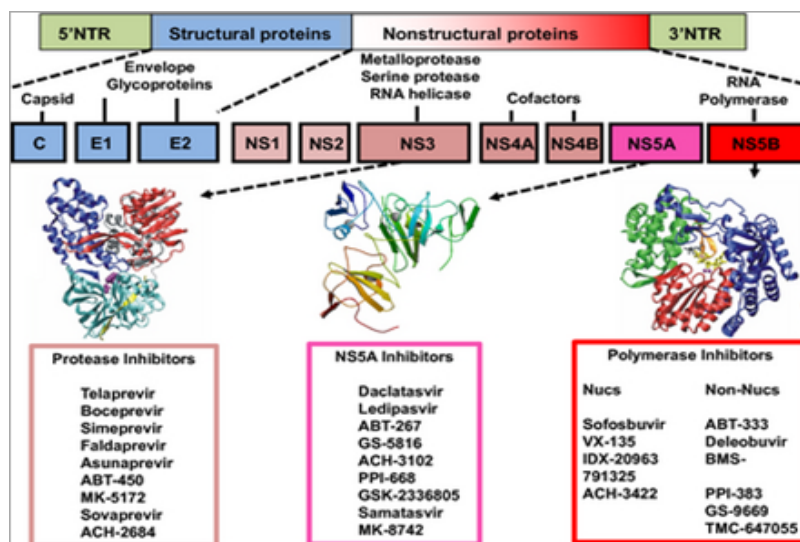
Do prvej generácie DAAs patria inhibítory serínovej proteázy NS3/4A (koncovka „-**previr**“), **telaprevir** a **boceprevir** špecifické pre genotyp 1, ktoré sa mali používať v kombinácii s IFN (interferón). Proteínové NS3 a NS4 serínové proteázy štiepia polyproteín na 4 miestach za vzniku nefunkčných proteínov HCV. (Spengler, 2018, Horsley-Silva and Vargas, 2017) Z dôvodu mnohých vedľajších účinkov a nízkej schopnosti zabrániť vírovej rezistencii sa tieto látky nepoužívajú. K novej generácii týchto proteázových inhibítorov patrí **simeprevir** (dostupný v USA od r. 2013; v kombinácii s sofosbuvikom bez IFN schválený Food and Drug Administration FDA, European Medicines Agency EMA od r.2014 na genotyp 1 a 4), **asunaprevir**, **paritaprevir** (s ritonavikom), **grazoprevir**, **vedroprevir**, **faldaprevir**, **glecaprevir**, **sovaprevir**, **deldeprevir** a **voxilaprevir**, ktoré majú širšie spektrum účinku s lepšou farmakokinetikou a vyššou odolnosťou voči rezistencii. (Spengler, 2018, Horsley-Silva and Vargas, 2017, Gupta et al., 2017)

Ďalšou skupinou anti-HCV liečiv (s koncovkou „-**asvir**“) sú inhibítory RNA-dependentnej RNA-polymerázy (RdRp), ktoré inhibíciou tohto enzýmu zabraňujú vzniku neštruktúrného komplexu NS5A potrebného na reguláciu replikácie, transláciu, stavbu membránovej štruktúry a viriónov HCV. (Spengler, 2018, Horsley-Silva and Vargas, 2017) Presný mechanizmus účinku zatiaľ nie je známy.(Horsley-Silva and Vargas, 2017) Patria sem **ledipasvir** (najúčinnjší z tejto skupiny, schválený FDA, EMA v kombinácii s sofosbuvikom pre genotypy 1,4,5,6), **ombitasvir** (schválený FDA, EMA v 3D režime s paritaprevikom, dasabuvikom a ritonavikom na genotyp 1 a 4), **daclatasvir** (vysoké náklady na liečbu), **elbasvir**, **velpatasvir** (účinný proti genotypom 1-6), **odasvir**, **samatasvir**, **ravidasvir**, **ruzavir**, and **pibrentasvir**, ktoré majú silný a širokospektrálny účinok s nízkou možnosťou rezistencie.(Horsley-Silva and Vargas, 2017, Spengler, 2018, Gupta et al., 2017)

Posledná nová skupina DAAs (s koncovkou „-**buvir**“) rozlišuje 2 typy inhibítorov NS5B polymerázy – nukleos(t)idové analógové inhibítory (NIs) a nenukleos(t)idové analógové inhibítory (NNIs), ktoré špecificky narušajú syntézu a replikáciu RNA víru. NIs fungujú ako kompetitívne analógy prirodzeného substrátu polymerázy, ktoré sú pomocou RdRp zakomponované do genómu a spôsobujú predčasné ukončenie replikácie nového reťazca víru. Majú silný pan-genotypický účinok s vysokou ochranou proti rezistencii víru. Patrí sem **sofosbuvir** (schválený FDA, EMA r. 2014 v kombinovanom režime pre všetky genotypy) a **MIV-802** (prešiel predklinickou fázou testovania, 2018).(Gupta et al., 2017, Spengler, 2018, Horsley-Silva and Vargas, 2017) NNIs fungujú ako nekompetitívne alosterické inhibítory, ktoré sa viažu na 4 miestach RdRp, zmenia jej funkcie a konformáciu NS5B. Majú užšie spektrum účinku aj vyššiu pravdepodobnosť rezistencie ako NIs a sú rôznej chemickej

štruktúry. Patrí sem **dasabuvir** (schválený v kombinácii s ritonavírom, paritaprevirom a ombitasvirom), **beclabuvir**, **deleobuvir** a **radalbuvir**. (Spengler, 2018, Horsley-Silva and Vargas, 2017)

Pred výberom vhodnej farmakoterapie treba zohľadniť stav a prítomnosť cirhózy pečene, zistiť genotyp HCV víru, zlyhanie liečby s IFN a komorbidity. (Spengler, 2018)



Obr. 3 Miesta účinku DAAs v genóme víru hepatitídy C (Schinazi et al., 2014)

Pre oba genotypy víru 1a a 1b odporúčajú organizácie (World Health Organisation WHO, American Association for the Study of Liver Disease/Infectious Disease Society of America AASLD/IDSA, Asian Pacific Association for the Study of the Liver APASL, European Association for the Study of the Liver EASL) všetky liečebné režimy sofosbuvir/ledipasvir a paritaprevir/ritonavir/ombitasvir/dasabuvir ale aj sofosbuvir/daclatasvir a sofosbuvir/simeprevir. DAAs sú v súčasnosti *liekmi prvej voľby* a pre liečbu všetkých 6 genotypov víru bol v USA nedávno schválený liečebný režim sofosbuvir/velpatasvir. (Lynch and Wu, 2016)

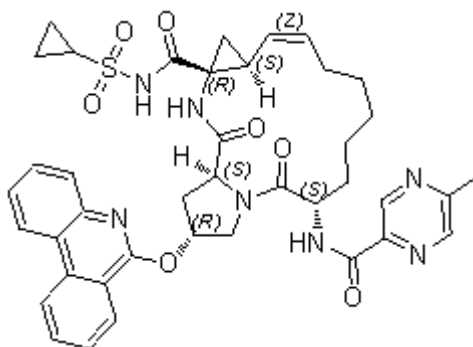
3.1.4. Farmakoterapia v tehotenstve

V súčasnosti *nie je schválená* žiadna terapia hepatitídy C v tehotenstve, ktorá by chránila matku a zabránila MTCT. Ribavirín má známe embryonálne a teratogénne účinky na zvieratá, *kategória X* (A-B-C-D-X kategórie bezpečnosti pre tehotenstvo, 2014) pre tehotenstvo a je kontraindikovaný u žien v tehotenstve a u mužov do 6 mesiacov po ukončení liečby

ribavirínom nesmie dôjsť k oplodneniu. Z nových generácií DAAs dostali od FDA iba 2 antivirotiká *kategóriu B* – sofosbuvir a ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, ktoré nevykazujú riziko pre plod u zvierat. Ďalšie DAAs novej generácie, u ktorých sa predpokladá pridelenie kategórie B, sú daclatasvir, ledipasvir, velpatasvir, ombitasvir/paritaprevir/ritonavir/dasabuvir a elbasvir/grazoprevir. Pre *kategóriu C* neskôr možno prideliť simeprevir, ktorý je fetálne toxický u zvierat. (Page et al., 2017)

3.1.5. Paritaprevir

Paritaprevir (Obr. 4) patrí medzi nové DAAs, ktoré inhibujú NS3/4A proteázu. Aplikuje sa spolu s ritonavírom, ktorý predlžuje jeho biologický polčas, metabolizuje sa cez izoenzým CYP3A4 cytochrómu P450 a je inhibítorom aj substrátom P-glykoproteínu. Používa sa na liečbu v 2D (+ombitasvir) a 3D režime (+ombitasvir, dasabuvir), kde kombinujú viacero mechanizmov účinku. (Menon et al., 2017) Paritaprevir vykazoval určitú inhibíciu transportu karnitínu v ľudskej placente ako bolo preukázané v zatiaľ nepublikovanej štúdii vykonanej na katedre Farmakológie a toxikológie FaF UK - (zatiaľ nepublikované dáta).

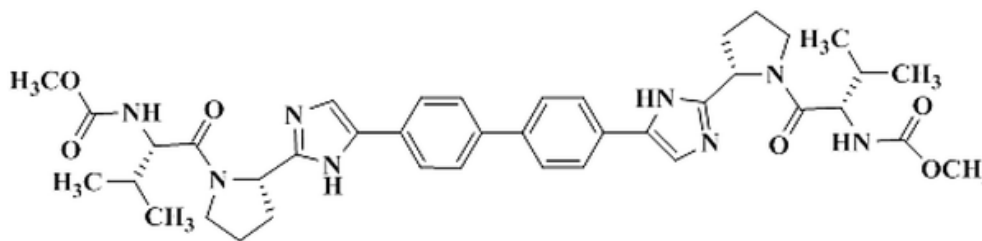


Obr. 4 Chemická štruktúra paritapreviru (MedKoo Biosciences, 2018)

3.1.6. Daclatasvir

Daclatasvir (Obr. 5) tiež patrí k novým DAAs, ale má iný mechanizmu účinku ako paritaprevir a ovplyvňuje NS5A polymerázový replikačný komplex víru. Je metabolizovaný izoenzýmom CYP 3A4 cytochrómu P450 a je substrátom P-glykoproteínu. Používa sa v kombinovaných režimoch (+asunaprevir; + asunaprevir, beclabuvir; + sofosbuvir; + PegIFN- α /ribavirín (Gandhi et al., 2018) Daclatasvir vykazoval určitú inhibíciu transportu

karnitínu v ľudskej placente ako bolo preukázané v zatiaľ nepublikovanej štúdií vykonanej na katedre Farmakológie a toxikológie FaF UK - (zatiaľ nepublikované dáta).

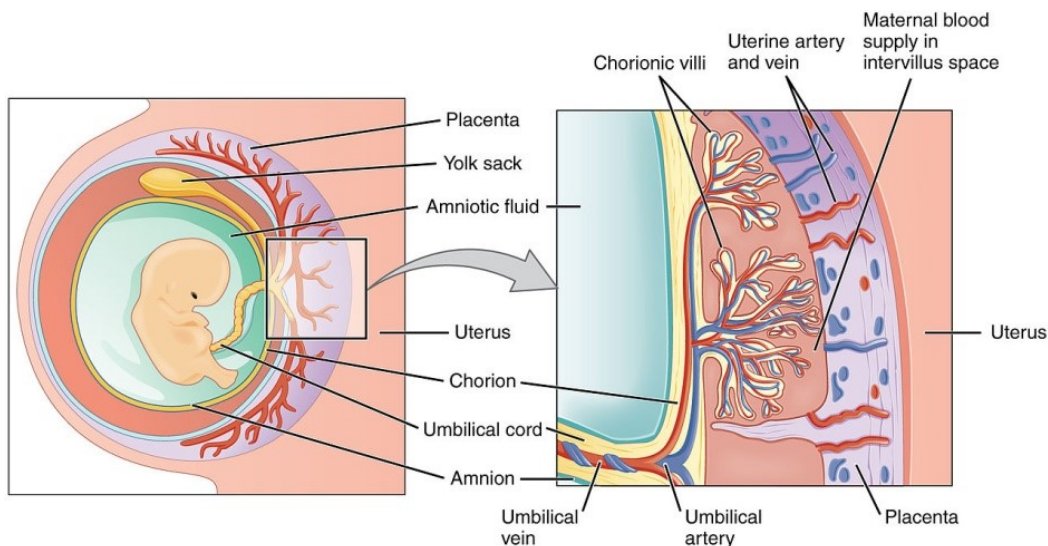


Obr. 5 Chemická štruktúra daclatasviru (Gandhi et al., 2018)

3.2. Tehotenstvo a placenta

Placenta je špecializovaným ľudským orgánom, ktorý je významný pre zdravie dieťaťa aj matky a umožňuje ich vzájomnú symbiózu. Je dokázané, že funkčné či štrukturálne abnormality placenty majú nepriaznivé následky počas tehotenstva. (Guttmacher et al., 2014)

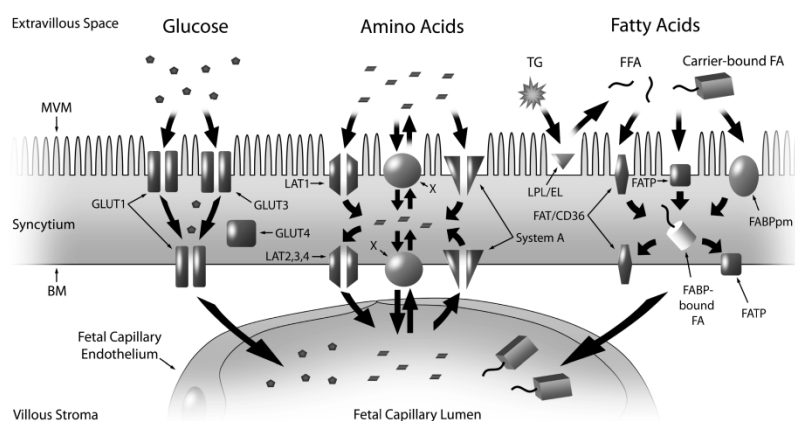
Po oplodnení sa v maternici zo zygoty vyvíja placenta a extraembryonálne (plodové) membrány. Trophoctoderm tvorí obal blastocysty, ktorá je vyplnená extraembryonálnym mezodermom. Z trophoctodermu sa diferencuje *trofoblast* a z neho následne placentárny epitel a invazívne extravilózne bunky trofoblastu. Mezoderm tvorí základ pre fibroblasty, vaskulárnu sieť a populáciu makrofágov. (Burton and Fowden, 2015) Po implantácii a invázii trofoblastu do maternice dôjde k remodelácii špirálovitej artérie maternice tak, aby fetoplacentárna jednotka mala zabezpečený prísun kyslíka a živín a odvádzanie splodín metabolizmu. Maternálna časť placenty je tvorená z endometria a fetálneho *chorionického plátu* obklopujúci *bazálny plát* (plod). Chorionický plát obsahuje rozvetvené chorionické cievy, ktoré sú pokračovaním ciev pupočníka. Ich terminálne časti tvoria bohato vetvené *chorionické vily*, ktoré umožňujú fetálno-maternálny transport látok (Obr. 6). Intervilózný priestor je obklopený *syncytiotrofoblastom* (viacjadrové syncytium). Materská krv vstupuje cez artérie endometria, obmýva chorionické vily v intervilóznom priestore a odteká žilami endometria tak, že sa krv matky a plodu nikdy nezmieša. Plodové membrány tvoria chorion (vrchná vrstva; obsahuje aj bunky trofoblastu) a amnion (vnútorná vrstva) vyplnený plodovou vodou. (Gude et al., 2004) Na rozhraní maternálnej a plodovej cirkulácie sú umiestnené *vezikuly s hraničnou membránou s typickými vchlípeninami (brush-border membrane BBM)*, ktoré umožňujú transport látok medzi matkou a plodom. (Lahjouji et al., 2004)



Obr. 6 Štruktúra placentárnej bariéry (College, 2018)

Placenta zastáva funkciu *transportnú* (Obr. 7), *endokrinnú*, *metabolickú* aj *ochrannú*, čím bráni vstupu infekcií, chorôb matky a xenobiotík. Xenobiotiká s malou molekulou môžu prejsť cez placentárnu bariéru jednoduchou difúziou, transcelulárne alebo paracelulárne. Faktorom, ktorý môže ovplyvniť expresiu transportného proteínu placenty je napätie kyslíka v krvi v intervilóznom priestore. (Gude et al., 2004)

Placenta aj plod využívajú ako primárny zdroj energie *energetický metabolizmus* oxidácie glukózy, ale významný zdroj je aj oxidácia mastných kyselín s dlhým reťazcom v mitochondriách. (Oey et al., 2003) Placenta exprimuje enzýmy potrebné na mitochondriálnu FAO (fatty acid oxidation). (Mendez-Figueroa et al., 2013)



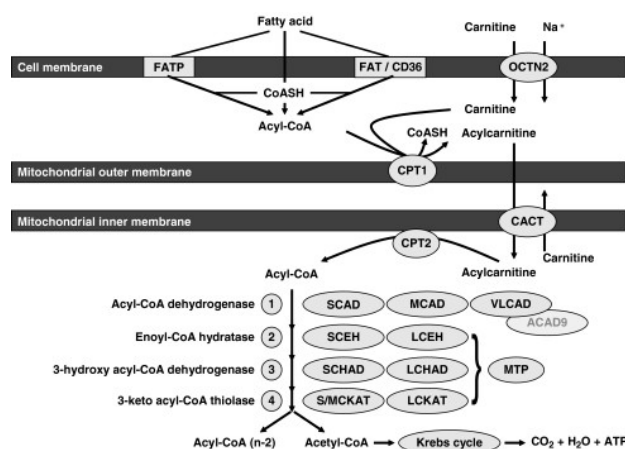
Obr. 7 Transport nutrientov cez placentárnu bariéru (Brett et al., 2014)

3.2.1. L-karnitín a β -oxidácia mastných kyselín

Karnitín (*3-hydroxy-4-N-trimetylaminobutyrate*) hrá dôležitú úlohu v oxidácii mastných kyselín tým, že umožňuje transport aktivovaných mastných kyselín s dlhým reťazcom cez vnútornú mitochondriálnu membránu (až 95% FAO prebieha v mitochondriách), peroxizomálnu β -oxidáciu látok a ich transport a ukladanie acetylkarnitínu v mitochondriách. (Oey et al., 2006, Mendez-Figueroa et al., 2013) Po dodaní karnitínu do tela z mäsa, rýb, mliečnych produktov, nastane jeho biochemická premena na L-karnitín vďaka enzýmu *g-butyrobetain-dioxygenáza* (*g-BBD*) v poslednom kroku, ktorá je prítomná iba v obličkách, mozgu a pečeni. Vychytávanie karnitínu z obehu do tkanív sprostredkováva Na^+ -závislý karnitínový transportér s vysokou afinitou *OCTN2* (*organic cation transporter novel 2*), ktorý je exprimovaný aj na povrchu placenty. Porucha oxidácie mastných kyselín s dlhým reťazcom u tehotných žien spôsobila častejší výskyt porúch vnútramaternicového rastu plodu či vnútramaternicovej smrti. Z toho vyplýva nevyhnutná prítomnosť karnitínu počas vývojových procesov u plodu. Bolo však dokázané, že *g-BBD* je prítomná v plodových tkanivách i placente, čiže fetoplacentárna jednotka je schopná vlastnej biosyntézy karnitínu. (Oey et al., 2006)

Mitochondriálnu β -oxidáciu mastných kyselín (Obr. 8) možno zhrnúť do 4 krokov – ester acyl-CoA (acyl-koenzým A) podlieha dehydrogenácii (*acyl-CoA dehydrogenáza*, *ACAD*), vzniknutý enoyl-CoA hydratácii (*enoyl-CoA hydratáza*, *EH*), následný 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenácii (*3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza*, *3HAD*) na 3-ketoacyl-CoA a ten tiolytickému štiepeniu (*3-ketoacyl-CoA tioláza*, *KAT*) na **acyl-CoA** a **acetyl-CoA** (acetyl-koenzým A). Peroxizómy čiastočne degradujú mastné kyseliny (fatty acid, FA) s dlhými reťazcami na voľné FA s krátkymi reťazcami a ester karnitínu, ktoré sú v mitochondriách oxidované až na CO_2 a H_2O . FA sú premieňané príslušnou *CoA-syntetázou dlhého reťazca* (*long-chain acyl-CoA synthetase*, *LACS*) a *veľmi dlhého reťazca* (*very-long-chain acyl-CoA synthetase*, *VLACS*) na odpovedajúce CoA-estery v mitochondriách, endoplazmatickom retikule a peroxizómoch. Tieto estery sú transportované prostredníctvom karnitínu do vnútra mitochondrií, kde β -oxidáciou vznikne acetyl-CoA a ten je dokončený v Krebsovom cykle (oxidatívna fosforylácia) na **CO_2** , **H_2O** a **ATP** (adenozíntrifosfát). Do karnitínového cyklu zasahujú 3 membránové proteíny – *karnitín-palmitoyltransferáza 1* (*CPT1*) a 2 (*CPT2*) a *karnitín/acylkarnitínový nosič* (*CACT*). *CPT1* katalyzuje vznik **acylkarnitínu** z voľného karnitínu a acyl-CoA. *CACT* umožňuje transport acylokarnitínu do mitochondrie výmenou za voľný **karnitín**, kde je premenený cez *CPT2* na **acyl-CoA**. Ten ďalej vstupuje do β -oxidácie.

Karnitínový cyklus v opačnom smere slúži na odstraňovanie acylkarnitínu z mitochondrií. (Wanders et al., 2010)



Obr. 8 Michodriálna β -oxidácia mastných kyselín (Wanders et al., 2010)

3.2.2. Nová podrodina organických kationových transportérov (OCTN)

Novú podrodinu *organických kationových transportérov (OCTs)* tvorí *OCTN 1,2,3* (podrodina rodiny *Solute Carrier 22, SLC22*), ktoré boli objavené r. 2005 u vyšších organizmov, interagujú s kationickými xenobiotikami a líšia sa afinitou a transportnou kapacitou *karnitínu*. (Lahjouji et al., 2004, Pochini et al., 2013)

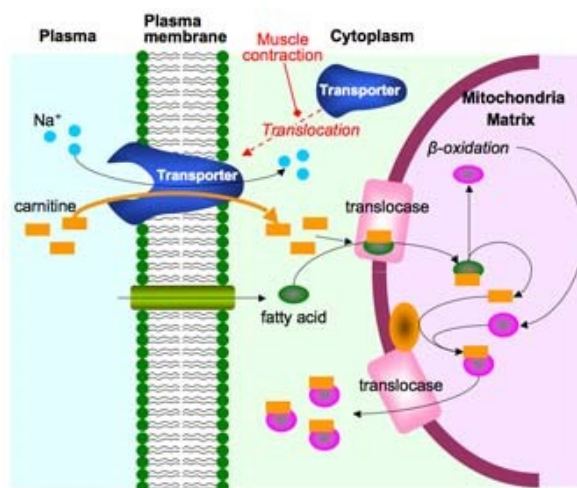
Fyziologickým substrátom *OCTN1* transportéru je acetylcholín, ktorý sa zapája mimo neurónov do regulácie bunkových funkcií (proliferácia, diferenciácia, lokálne uvoľňovanie oxidu dusnatého...). Je výrazne exprimovaný v obličkách, v menšej miere v ďalších tkanivách vrátane placenty a zároveň sprostredkováva malý transport karnitínu. (Pochini et al., 2013) *OCTN1* má určitú afinitu aj ku karnitínu a jeho transport je závislý na Na^+ . (Lahjouji et al., 2004)

OCTN2 je plazmatický proteínový transportér so substrátovou špecifitou pre karnitín a jeho deriváty, ktorý je nevyhnutným kofaktorom β -oxidácie mastných kyselín v mitochondriách (Obr. 9). Exprimuje sa v polarizovaných bunkách placenty (BBM), ale aj v iných bunkách mnohých tkanív (napr. obličky). *OCTN2* transportér je Na^+ -závislý a pracuje ako symport alebo antiport s karnitínom (karnitín 1:1 sodíkový kation Na^+). (Pochini et al., 2013, Lahjouji et al., 2004) Okrem karnitínu sprostredkováva transport organických kationov, ktorý nie je závislý na Na^+ . Tento transportér je saturabilný karnitínom a inhibovateľný

niektorými známymi liečivami ako verapamil (kompetitívna aj nekompetitívna inhibícia), valproát, pyrilmín a tetraetylamónium. (Lahjouji et al., 2004)

Rovnako *OCTN3* umožňuje transport karnitínu nezávisle od Na^+ , ale u ľudí zatiaľ nebol lokalizovaný ani v bunkách placenty. (Pochini et al., 2013)

Placenta cez BBM transportuje karnitín cez transportéry závislé na Na^+ , čo dokazuje prítomnosť *OCTN1* a *OCTN2* na membráne BBM. (Lahjouji et al., 2004)



Obr. 9 Lokalizácia a funkcia *OCTN2* transportéra na plazmatickej membráne (Kazumi, 2018)

3.2.3. Regulácia génovej expresie *OCTN* v placente

Nadrodinu *SLC* tvorí 55 rodín a 300 členov a možno ju rozdeliť do 2 podrodín *SLCO* (*Solute carrier organic anion*) a *SLC22A*, ide o ATP-nezávislé transportéry hydrofilných a nabitých častíc do bunky. Expresia *SLC22A4* (*OCTN1*) a *SLC22A5* (*OCTN2*) zatiaľ nie je známa. (Walker et al., 2017)

OCTN2 transportér je exprimovaný v apikálnej časti membrány syncytiotrofoblastu. Bola preukázaná zvýšená expresia jeho mRNA (mediátorová RNA) v trofoblaste, z ktorého sa diferencovali bunky syncytia v priebehu niekoľkých dní, čo súviselo sa vyššou sekréciou hCG (human chorionic gonadotropin) zo supernatantu buniek (regulácia cytotrofoblastom). (Grube et al., 2005) Expresiu mRNA *OCTN2* ovplyvňuje preeklampsia, ktorá má za následok jeho *down-reguláciu* a znížený príjem karnitínu do plodu. Hypoxia buniek placenty má za následok znížený transport karnitínu do buniek a *down-reguláciu* génovej expresie *OCTN2*. (Chang et al., 2011)

Na Faerských ostrovoch bol screeningom dokázaný významný výskyt mutácie génu *SLC22A5*, ktorý exprimuje veľmi nízky počet OCTN2 a tým poruchu v β -oxidácii mastných kyselín pre nedostatok l-karnitínu a rovnako nedostatočnú exkréciu l-karnitínu v obličkách. Toto ochorenie sa označuje ako *PCD (autozomálna recesívny porucha FAO)* a u pacientov spôsobuje až závažné arytmie, kardiomyopatie, únavu a lieči sa suplementáciou s l-karnitínom u závažných genotypov. Najzávažnejšie symptómy preukázala **mutácia genotypu c.95A > G/RH (risk-haplotype)** u homozygotných pacientov. Pre RH sa predpokladá základná genetická aberácia v mieste enhancera v blízkosti *SLC22A5*.(Rasmussen et al., 2014)

3.3. Význam dostupnosti karnitínu

Nedostatočná funkcia OCTN2 (SLC22A5) spôsobí deficit karnitínu v tkanivách, a tým nadmernú stratu karnitínu močom. Metabolický stav deficitu karnitínu v plazme a tkanivách sa uvádza ako strata 10-20% karnitínu vzhľadom k normálnym hodnotám.(Shekhawat et al., 2004) Prejavom *nedostatku karnitínu* v tkanivách a tým aj poruchy FAO je výskyt hypoglykémie, skeletálnej myopatie, kardiomyopatie, Reyeovho syndrómu, náhlejšej detskej smrti, viscerálnej steatózy a v tehotenstve predikuje spomalený rast plodu.(Shekhawat et al., 2004) (Hirano et al., 2008) *Poruchy FAO* môžu viesť k vzniku syndrómu HELLP u matiek, ktorý je charakterizovaný hemolýzou, zhoršenou enzymatickou funkciou pečene a trombocytopéniou, vedúceho k ťažkej preeklampsii.(Haram et al., 2009)

Dokázaná *teratogenita* neznámeho pôvodu vyvolaná liekmi môže byť spojená práve s inhibíciou transportu l-karnitínu, ako bol potvrdený inhibičný vplyv fluorochinolónov na OCTN2 transportér a tým transport karnitínu, čo sa dáva do súvislosti s ich známou teratogenitou.(Hirano et al., 2008) Je dokázané aj to, že deficit karnitínu spôsobuje aj mutáciu génu pre OCTN2 transportér. (Grube et al., 2005)

Prítomnosť enzýmov pre FAO v placente dokazuje, že karnitín je dôležitým substrátom nielen pre vyvíjajúci sa plod ale aj pre vlastné *placentárne metabolické funkcie*. V placente sa vyskytuje 7-10x väčšie množstvo karnitínu ako v srdci, ktoré prednostne využíva mastné kyseliny ako zdroj energie.(Shekhawat et al., 2004)

Karnitín je dôležitý pre dieťa aj *po narodení*, kedy zapojením do metabolizmu tukov umožňuje získavanie energie z mliečneho tuku.(Lahjouji et al., 2004)

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej rigoróznejšej práce bolo otestovať schopnosť ovplyvnenia funkcie a expzie OCTN2 transportného proteínu s daclatasvirom a paritaprevirom, antiretrovirotikami novej generácie, ktoré by v budúcnosti mohli byť použité na liečbu hepatitídy C u tehotných žien.

Čiastkovými cieľmi pritom boli:

- (i) Zistiť, do akej miery ovplyvňujú testované antivirotiká prestup karnitínu cez modelovú monovrstvu placentárnych buniek BeWo a akumuláciu tohto substrátu vnútri buniek.
- (ii) Zistiť, či pri expozícii naviazaného liečiva na transportnom proteíne OCTN2 na monovrstve buniek dochádza k zmene expzie príslušného génu SLC22A4 pre transportný proteín OCTN1 a génu SLC22A5 pre OCTN2 v závislosti na čase.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Bunkový model a kultivácia

V rámci tejto štúdie bola používaná bunková línia BeWo (klon b30), ktorú nám poskytla prof. Ch. Albrecht z Univerzity v Berne vo Švajčiarsku na základe dovolenia od Dr. A. Schwartz z Washingtonskej Univerzity v St. Louis v USA. Táto bunková línia je odvodená od ľudského zhubného choriokarcinómu placenty a exprimuje transportné proteíny OCTN1 a OCTN2 porovnateľne s placentou (Karahoda et al., zatiaľ nepublikovaná štúdia). Pri kultivácii *in vitro* dokáže vytvoriť polarizovanú monovrstvu buniek s tesnými spojmi, ktorá napodobňuje funkciu trofoblastu v tehotenstve. Na základe týchto vlastností ju možno použiť ako *in vitro* model transplacentárneho prestupu. (Li et al., 2013, Crowe and Keelan, 2012)

Pred začiatkom kultivácie či pasážovania sa všetky roztoky zahriali vo vodnom kúpeli na teplotu cca 37,5°C. Bunky sa kultivovali v živnom médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glucose) s pridaným 10% FBS (Fetal bovine serum) v inkubátore (37,5°C, atmosféra 5% CO₂), až kým sa dosiahla konfluencia 80-90%. Následne prebehlo pasážovanie prevedených buniek z vnútorného povrchu kultivačnej nádoby do suspenzie pomocou trypsínu/EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová). Po resuspendácii sa pridala časť čerstvého média k bunkám, preniesli sa do novej kultivačnej nádoby a doplnil sa objem čerstvého média v závislosti na veľkosti kultivačnej nádoby, alebo sa bunky počítali a nasadili na bunkové inzerty Transwell pre transportný experiment (Nasadenie buniek na Transwell). Línia sa používala na testovanie od 3. do 8.pasáže (transportný experiment), prípadne do 9.pasáže (experiment génovej expresie). Práca s bunkami a roztokmi používaných pri práci s nimi prebiehala v laminárnom boxe za dodržania podmienok aseptického práce.

5.1.2. Prístroje a pomôcky

- Laminárny box, Telstar
- Inkubátor (37°C, 5% CO₂), Sartorius Stedim
- Centrifuga Universal 32 R Hettich, Schoeller
- Spektrofotometer Tecan GENios Plus, Schoeller

- Termocyklér (pre reverznú transkripciu)
- QuantStudio 6 (Applied Biosystems)
- Analytické váhy CPA225D-0CE, Sartorius Stedim Biotech
- Vodný kúpeľ, PolyScience
- Mikroskop inverzný, Optika Microscopes
- Bürkerova počítacia komôrka (hĺbka 0,100 mm, 0,0025 mm²)
- Ručné počítadlo, Tally Counter
- Trepačka Vornado, Benchmark
- Automatické pipety Research plus, Eppendorf
- Multiplate reader Genios Plus pre meranie absorbcie
- Kultivačný plastik, Techno Plastic Products
- Transwell cell culture inserts (Corning Incorporated Costar)
- Analyzátor beta žiarenia Tri-Carb 2910 TR; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
- Millicell ERS-2 Voltohmmeter (Millipore, Merck)
- NanoDrop Microvolume Spectrophotometers and Fluorometer (ThermoScientific)

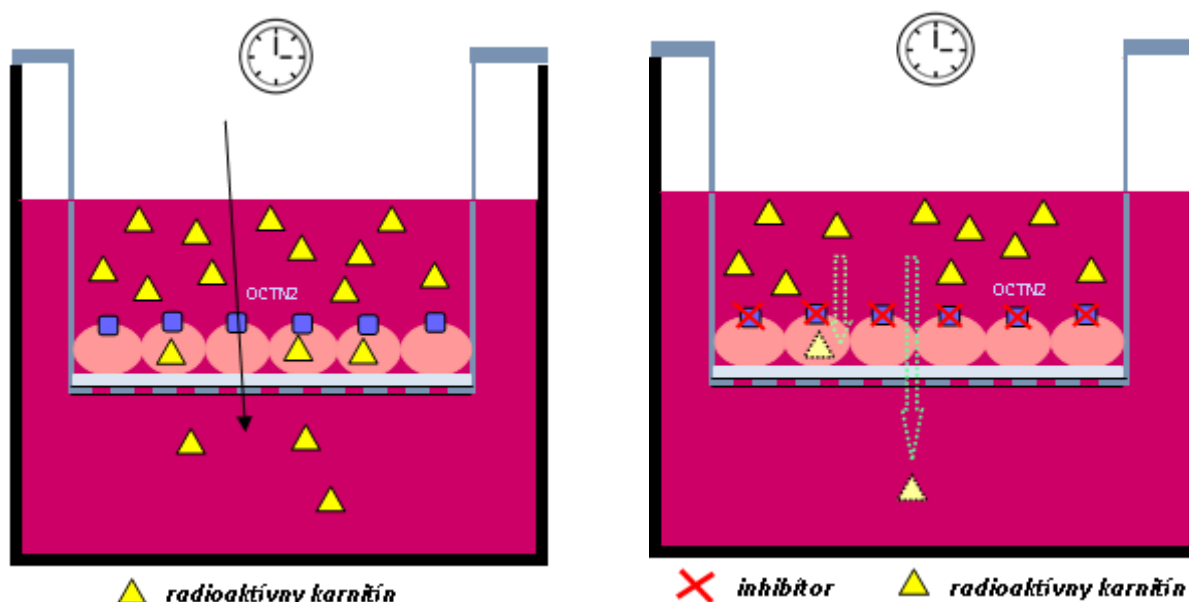
5.1.3. Chemikálie

- Anti-HCV antivirotiká: paritaprevir, daclatasvir (MedChem Express)
- Verapamil (MedChem Express)
- „cold“ L-karnitín (Sigma-Aldrich)
- „hot“ [³H]-L-karnitín (60 Ci/mmol), M.G.P. spol. s.r.o. Zlín
- Kultivačné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose (DMEM), Sigma-Aldrich
- Fetálne hovädzie sérum Fetal Bovine Serum (FBS), Diagnosticum
- Penicillin-Streptomycin 1% (P0781), Sigma-Aldrich
- Dimetylsulfoxid Dimethyl sulfoxide for molecular biology 100% (DMSO), Sigma-Aldrich
- Voda na injekcie, Aqua pro injectione (API) Braun, B|Braun
- Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific

5.2. Testovanie miery transportu a akumulácie karnitínu v monovrstve buniek BeWo b30 pri inhibícii paritaprevirom a daclatasvirom

5.2.1. PRINCÍP

Táto štúdia hodnotí mieru prestupu L-karnitínu cez placentárnu bunkovú monovrstvu a jeho akumuláciu vnútri vo vrstve. Zároveň umožňuje študovať mieru ovplyvnenia tohto karnitínového transportu a uptaku L-karnitínu pomocou iných látok. Pre tento typ experimentu sa k bunkám sa pridajú preinkubačné roztoky testovaných látok, v našom prípade paritapreviru a daclatasviru. Ako kontrolný inhibítor bol pridaný verapamil, pre kontrolu inhibície OCTN2 transportéru saturáciou bola použitá vysoká koncentrácia L-karnitínu. Vlastný transport karnitínu je zahájený pridaním inkubačného roztoku, ktorý bol tvorený opäť testovaným či kontrolným inhibítorom a radioaktívne značeným L-karnitínom v médiu (Obr. 10). Po pridaní inkubačných roztokov sa odoberali vzorky v pravidelných intervaloch z apikálneho i bazálneho kompartmentu. Radioaktívny [³H]-karnitín prítomný v inkubačných roztokoch zviditeľnil transport medzi kompartmentami a akumuláciu v monovrstve buniek. Tá bola hodnotená po lyzácii monovrstvy (tj. prevedením bunkovej monovrstvy do roztoku).



Obr. 10 Transport a akumulácia radioaktívne značeného karnitínu cez transportér OCTN2 monovrstvy buniek pred (vľavo) a po (vpravo) použití inhibítora v závislosti na čase

Radioaktivita každej vzorky sa merala 1 min na scintilátore Tri-Carb. Získané hodnoty DPM (disintegrations per minute) vyjadrujú počet dezintegrácií (rozpadov) za min, ktoré sa previedli na pmol daného substrátu cez štandard aplikovaného roztoku.

Po vyrezaní inzertov a zlyzovaní buniek sa lyzáty vyhodnotili biochemickou metódou pomocou kitu kyseliny bicínchóninovej (BCA), čím sa stanovila presná koncentrácia proteínu v lyzátoch z kalibračnej krivky štandardného proteínu (albumín o koncentrácii 20-2000 ug/ml, citlivosť 5 ug/ml). Počas BCA testu sa v alkalickom prostredí zredukovali ióny Cu^{2+} na Cu^+ , ktoré s aminokyselinami proteínu vzorky vytvorili farebný chelát. BCA viazala redukované ióny Cu^+ za tvorby farebného chelátu, ktorý vykazuje výraznú absorbanciu pri vlnovej dĺžke 562 nm. (Scientific, 2018) Výsledné hodnoty z merania radioaktivity a BCA testu vyjadrili vzťah obsahu substrátu (pmol) na presný obsah proteínu (mg/ml) v jednotlivých kompartmentoch inzertov v časových intervaloch.

$$\frac{A_{\text{št}} \times R_{\text{vz}}}{B \times V}$$

$$R_{\text{vz}} = \frac{\text{DPM}_{\text{vz}} - \text{NPC} \times V}{\text{DPM}_{\text{št}} \times r}$$

$A_{\text{št}}$aktivita štandardu v Ci/pmol

R_{vz}pomer radioaktivity vzorky v danom objeme vzťahnutá na radioaktivitu príslušného štandardu

Bkoncentrácia proteínu v mg/ml vypočítaná z kalibračnej krivky albumínu

Vobjem roztoku vzorky

DPM_{vz}hodnota radioaktivity vzorky v jednotkách DPM

NPChodnota radioaktivity média v jednotkách DPM

$\text{DPM}_{\text{št}}$ hodnota radioaktivity príslušného štandardu v jednotkách DPM

rriedenie vzhľadom na objem roztoku vzorky

5.2.2. PRACOVNÝ POSTUP

Nasadenie buniek na Transwell

Pre transportné experimenty boli použité polykarbonátové bunkové inzerty Transwell o veľkosti pórov 0,4 μm (Corning Incorporated Costar, 3404). Tie boli najprv potiahnuté vrstvou kravského kolagénu pre zaistenie lepšej adhézie buniek. Roztok kravského kolagénu

bol pripravený rozpustením 1mg kolagénu v 1ml roztoku 0,9 M kys. octovej a aplikovaný po 150 ul do každého inzertu. Plato s Transwell inzertami sa následne nechalo stáť počas noci pri teplote do 25°C a na nasledujúci deň sa vysterilizovalo pod UV (ultrafialovým žiarením) na 30 min. BeWo bunky boli potom nasadené v počte 100 000 buniek/cm², výmena média prebiehala obdeň. Po sterilizácii UV žiarením sa inzerty 3x premyli studeným PBS (Phosphate-buffered saline) a každý inzert sa predvlhčil z oboch strán živným médiom DMEM po dobu 30 min. Bunky BeWo boli nasadené na Transwell v počte 100 000 buniek na cm², tj. 112 000 buniek na jeden inzert. Objem sa doplnil médiom DMEM v apikálnej i bazálnej časti a doska sa inkubovala 5 dní. Po 1. a 3.dni sa vymenilo médium v každom inzerte za médium DMEM s pridaným rastovým faktorom EGF (1 ul/50 ml média).

Transportný experiment

Vlastný transportný experiment prebiehal 5.deň inkubácie, kedy sa pripravili preinkubačné a inkubačné roztoky v dostatočnom množstve pre triplikáty alebo quadruplikáty podľa tabuľky pre daný experiment (Tab. 1, Tab. 2).

Tab. 1 Schéma pipetovania preinkubačných a inkubačných štandardných roztokov

Preinkubačné roztoky				Inkubačné roztoky			
CTRL				HOT CAR			
CAR				HOT CAR + CAR			
VER				HOT CAR + VER			

CTRL – médium

CAR – karnitín (1 mM) v médiu

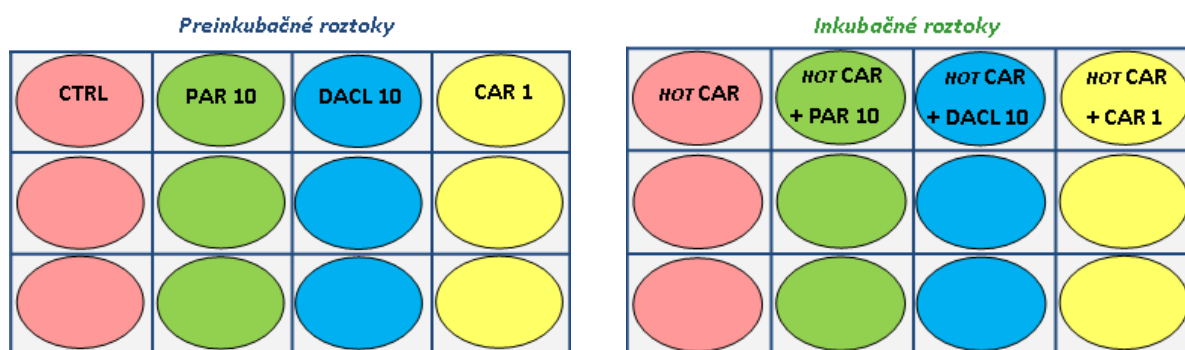
VER – verapamil (100 uM) v médiu

HOT CAR – [³H]-karnitín v médiu

HOT CAR + CAR – L-karnitín (1 mM) v HOT CAR

HOT CAR + VER – verapamil (100 uM) v HOT CAR

Tab. 2 Schéma pipetovania preinkubačných a inkubačných štandardných roztokov a roztokov antivirofík



CTRL – médium

PAR 10 – paritaprevir (10 uM) v médiu

DACL 10 – daclatasvir (10 uM) v médiu

CAR 1 – karnitín (1 mM) v médiu

HOT CAR – [³H]-karnitín v médiu

HOT CAR + PAR 10 – paritaprevir (10 uM) v *HOT CAR*

HOT CAR + DACL 10 – daclatasvir (10 uM) v *HOT CAR*

HOT CAR + CAR 1 – karnitín (1 mM) v *HOT CAR*

Pred experimentom sa skontrolovala rezistencia na každej membráne ponorením elektród systému Millicell ERS do média. Pripravené preinkubačné roztoky sa rozpítovali do apikálnej aj bazálnej časti každého inzertu a inkubovali 15 min. Po inkubácii sa odsali preinkubačné roztoky iba z apikálnej časti inzertov a objem sa doplnil príslušným inkubačným roztokom. Prebehla inkubácia a následné odoberanie 50 ul vzorky z apikálnej i bazálnej časti každého inzertu po 15 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 4 hod do scintilačnej vialky. Na porovnanie boli odoberaté aj vzorky z inkubačných roztokov. Po pridaní 1,5 ml scintilačného roztoku a zvortexovaní sa zmerala radioaktivita.

Tab. 3 Schéma počtu odobraných vzoriek z inzertov v časových intervaloch počas experimentu

	15min	30min	1hod	2hod	4hod
1.experiment					
A		x		x	xx
B		x	x	x	xx
2.experiment					
A	x	x	x	xx	
B	x	x	x	xx	
3.experiment					
A		x	x	x	xx
B		x	x	x	xx
4.experiment					
A		x	x	x	xx
B		x	x	x	xx

Po 4 hod sa inzerty 3x premyli studeným PBS, vyrezali skalpelom a ponorili na noc pri 4°C do 400-600 ul 0,02% roztoku SDS (Sodium dodecyl supfate). Na ďalší deň sa z každej vzorky

lyzátu odobralo 100 ul do scintilačných vialiek, pridalo 1,5 ml scintilačného roztoku a po zvortexovaní sa zmerala radioaktivita.

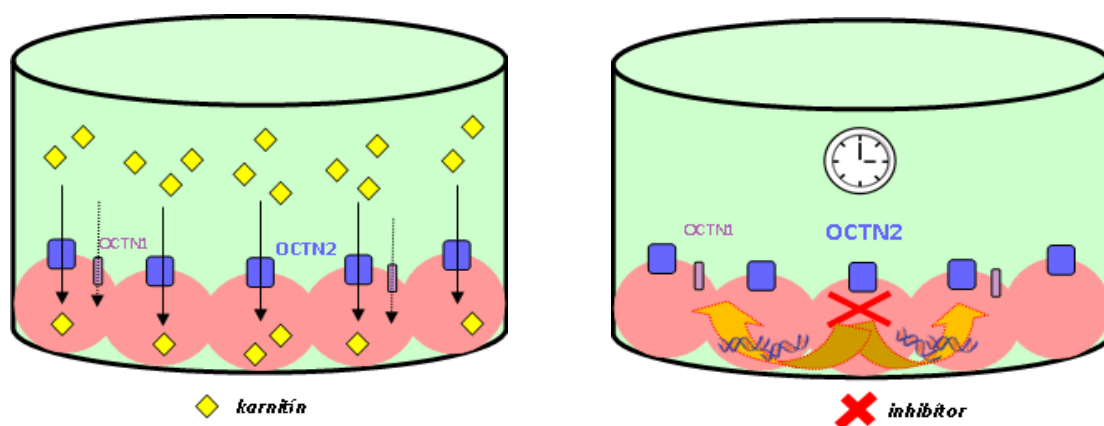
Zároveň sa z každého lyzátu odobralo 3x po 25 ul vzorky do 200-jamkovej dosky na BCA proteínový test. Riedením štandardu albumínu (2000 ug/ml) pomocou 0,02% roztoku SDS bola pripravená koncentračná rada (2000, 1500, 1000, 750, 500, 375, 250, 125, 25, 0 ug/ml) pipetovaná v triplikátoch po 25 ul. K obom sa rozpipetovala pripravená reagenčná zmes WR (Working Reagent) z reagentie A a B (pomer 50:1) po 200 ul do každej jamky. Po premiešaní sa doska inkubovala 30 min a zmerala sa absorbancia na spektrofotometri (v blízkosti vlnovej dĺžky 562 nm).

Na konci experimentu so štandardmi sa zachovali niektoré inzerty celistvé a znova sa otestovala priepustnosť monovrstvy buniek, u ktorých bola nameraná nízka rezistencia oproti ostatným inzertom. Do apikálnej časti sa pridal roztok fluoresceínu a do bazálnej časti PBS. Po hodine sa odobrali vzorky do 200-jamkovej dosky a zmerala sa fluorescencia na spektrofotometri.

5.3. Testovanie vplyvu paritapreviru a daclatasviru na zmenu expresie génu *SLC22A4* a *SLC22A5* v závislosti na čase

5.3.1. PRINCÍP

Pri tomto testovaní sa hodnotil vplyv študovaných anti-HCV liečiv na expresiu génov kódujúcich OCTN1 a OCTN2 karnitínový transportér v placentárnej bunkovej línii. BeWo bunky sa vystavili pôsobeniu paritapreviru a daclatasviru po dobu 1, 3 a 7 dní (Obr. 11). Po uplynutí príslušnej doby sa z buniek izolovala RNA. Pri izolácii sa najprv z roztoku oddelili 3 fázy – DNA, RNA a organická fáza (lipidy, proteíny), odobraná RNA-fáza sa precipitovala do pelet, ktoré sa rozpustili v API (aqua pro injectione). Pomocou reverznej transkriptázy sa z RNA pripravila cDNA (complementary DNA). Expresia génu *SLC22A4* a *SLC22A5*, ktoré kódujú OCTN1, resp. OCTN2 transportéry bola hodnotená pomocou qRT-PCR (Reverse transcription- Polymerase chain reaction) metódy. Podľa hodnoty C_t počtu cyklov, v ktorých miera fluorescencie značenej próby pre detekovaný gén prekročí podprahovú hodnotu, sa určí miera expresie génu pre OCTN1 alebo OCTN2 (regulácia up/down/bez zmeny) v porovnaní so štandardom (bunky kultivované v médiu bez pridaných testovaných látok).



Obr. 11 Transport karnitínu cez transportér OCTN2 a OCTN1 do monovrstvy buniek BeWo (b30) a vplyv anti-HCV inhibítora na expresiu génu *SLC22A5* a *SLC22A4* pre OCTN1 a OCTN2 v závislosti na čase

5.3.2. PRACOVNÝ POSTUP

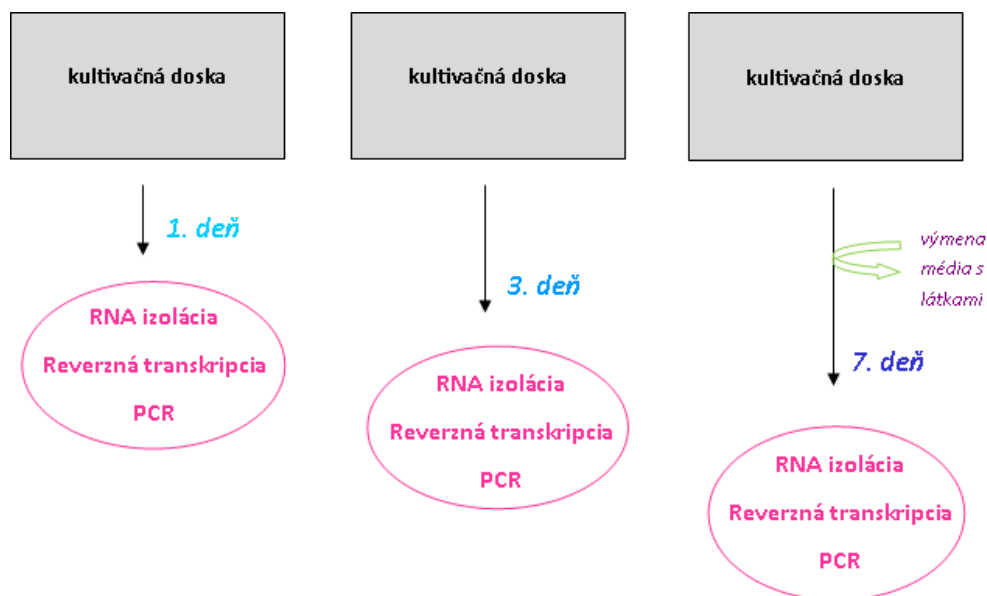
Spasáňované bunky sa po nariadení (5x) spočítali pomocou Bürkerovej komôrky a rozdelili tak, aby nasadené bunky na 24-jamkovú kultivačnú dosku odpovedali počtu 150 000 buniek na jednu jamku a objem sa doplnil kultivačným médiom DMEM na 1ml. Takto boli pripravené súčasne 3 kultivačné dosky, ktoré sa inkubovali 2 dni. Pripravili sa koncentrácie roztokov skúšaných liečiv a porovnávacích roztokov rozpustením v médiu. Potom sa opatrne odsalo médium z každej jamky a po kvapkách sa pridali pripravené roztoky v objeme 1 ml (Tab. 4).

Tab. 4 Schéma pipetovania roztokov štandardov a testovaných antivirov

CTRL	DMSO	PAR 10	PAR 1	DACL 10	DACL 1

CTRL – médium PAR 10 – paritaprevir 10 uM DACL 10 – daclatasvir 10 uM
DMSO – 0,01% DMSO v médiu PAR 1 – paritaprevir 1 uM DACL 1 – daclatasvir 1 uM

Nasledovala kultivácia v inkubátore a postupné odoberanie kultivačných dosiek po 1, 3 a 7 dňoch. V kultivačnej doske odoberanej po 7 dňoch sa v priebehu kultivácie vymenilo staré médium za čerstvé s novo rozpustenými látkami.



Z odobranej kultivačnej dosky sa odpipetovalo médium a pridalo sa 186 μ l roztoku TRI-Reagent do každej jamky. Po 5 min státi sa vzorky odoberali a kultivované quadruplikáty sa spojili a pokračovalo sa RNA izoláciou.

Ku každej vzorke sa pridalo 148,8 μ l chloroformu, vzorky sa intenzívne premiešavali 15 s a scentrifugovali (12,000g relative centrifugal force rcf, 15min, 4°C) do rozdelenia fáz. Zo vzoriek sa odobralo maximálne množstvo organickej (RNA) fáze, pridalo sa 372 μ l 2-propanolu a nechalo sa stáť pri izbovej teplote 10 min. Zľahka sa vzorky premiešali a scentrifugovali do precipitácie bielych pelet RNA na dne každej skúmavky (12,000 rcf, 10 min, 4°C). Tekutina sa odliala a pelety sa premývali 2x s pridaním 744 μ l 75% etanolu a scentrifugovaním (12,000 rcf, 5 min, 4°C). Etanol sa opatrne odliat a každá peleta sa po oschnutí („zgelovatení“) rozpustila pridaním 20-60 μ l API v závislosti na veľkosti pelety. Po zvertexovaní sa zmerala koncentrácia každého roztoku rozpustenej pelety odobratím 1,3 μ l do prístroja NanoDrop. Pripravili sa koncentrácie roztokov vzoriek v rozmedzí 450-550 ng/ μ l, skontroloval sa pomer kontaminácie proteínom a organickými zložkami a uchovávali sa niekoľko dní zmrazením na -80°C. Celý experiment bol opakovaný 3x.

Pri príprave cDNA reverznou transkripciou sa použila 96-jamková doska, RT kit/Master Mix (MM) 2x koncentrovaný, roztoky izolovanej RNA danej vzorky (c=500 ng/ μ l,

čiže 1000 ng v reakcii) a API. Do každej jamky boli pipetované jednotlivé zložky nasledovne – 10 ul RT kitu, 2 ul roztoku izolovanej RNA, 8 ul API. Doska sa prekryla filmom, krátko scentrifugovala a vložila do RT cykléra na odpovedajúci program teplotných cyklov pre reverznú transkripciu (RT).

Na PCR bola použitá 2x 384-jamková doska, MM 2x koncentrovaný, pripravená cDNA, API a génové assaye, pričom na jednu dosku sa pipetovala assay pre kvantifikáciu génu pre OCTN1 a pre druhú dosku assay pre kvantifikáciu génu pre OCTN2 spolu s assay pre beta-2-mikroglobulín, ako tzv. housekeeping (kontrolný) gén. Dohromady sa pripravila zmes látok pre každú génovú assay bez cDNA a rozpipetovala sa do jamiek tak, že v každej testovanej jamke obsahovala 2,5 ul MM, 1 ul API a 0,25 ul génu. Pripravená cDNA sa nariedila na koncentráciu 10 ng/ul a rozpipetovala sa po 1,25 ul do určenej jamky k napipetovanej zmesi. Takto pripravená doska sa krátko scentrifugovala a vložila do PCR termocykléra na teplotný program odpovedajúci použitým PCR reagensiami a celkový počet 40 amplifikačných cyklov.

5.4. *Štatistická analýza*

Výsledky z jednotlivých meraní boli spracované a vyhodnotené pomocou softvéru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California USA).

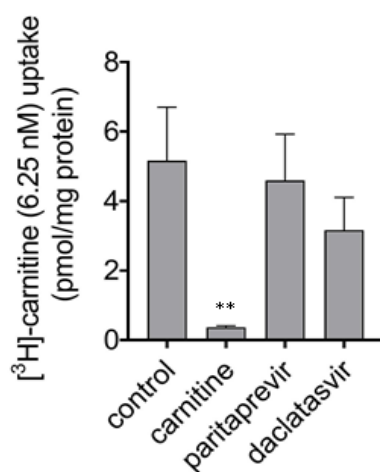
Štatistická významnosť výsledných hodnôt transwellovej štúdie transportu a akumulácie karnitínu ale i vplyvu antiviroťík na génovú expresiu daných transportérov sa stanovila metódou one-way ANOVA s hladinou významnosti $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$.

6 VÝSLEDKY

6.1. Transportné štúdie

6.1.1. Vplyv paritapreviru a daclatasviru na akumuláciu karnitínu v monovrstve BeWo buniek

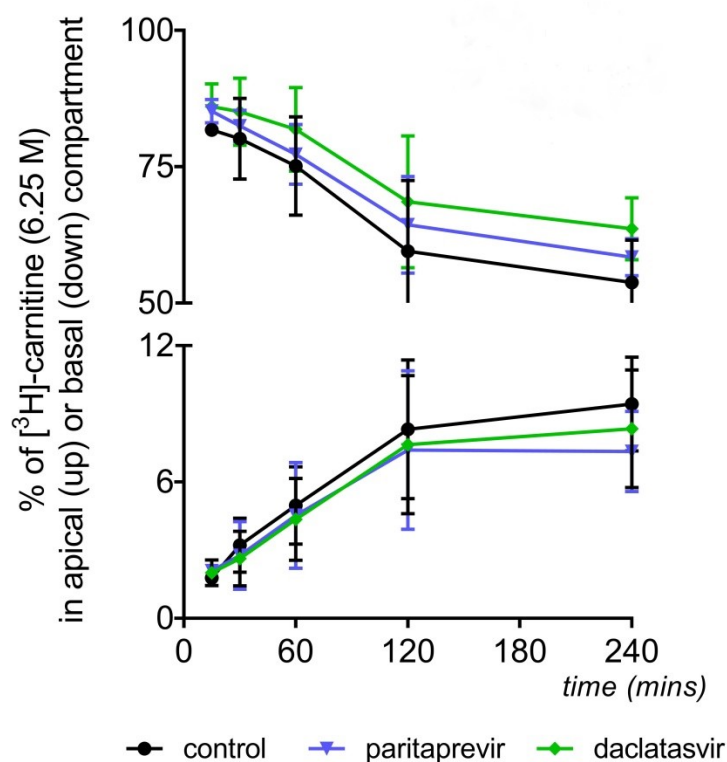
Výsledky našej transportnej štúdie preukázali, že sa L-karnitín aplikovaný z apikálnej strany (tj. odpovedajúcej maternálnej strane v prípade vrstvy trofoblastu) akumuluje v BeWo bunkách. Tento transport je zjavne sprostredkovaný membránovým proteínom a je vysytiteľný, čo je patrné z výrazného poklesu akumulácie „hot“ L-karnitínu v prítomnosti vysokej (1 mM) koncentrácie „cold“ L-karnitínu (Obr. 12). Predpokladáme, že týmto transportérom je OCTN2 a po jeho vysýtení prechádza L-karnitín do buniek v minimálnom množstve využitím iných transportných mechanizmov. Paritaprevir aplikovaný v koncentrácii 10 uM blokuje vychytávanie karnitínu do buniek. V porovnaní so situáciou pri saturácii transportéru je ale miera tejto inhibície výrazne menšia, a akumulácia je tak znížená v priemere na 85 %. Daclatasvir tiež ako anti-HCV inhibítor blokuje OCTN2 transportér v malej miere, ale oproti paritapreviru je miera ním navodenej inhibície vychytávania karnitínu vyššia, tvorí 62 % neinhibovanej kontroly. Paritaprevir ani daclatasvir v koncentrácii 10 uM nevyvolávajú zmenu funkcie transportéru OCTN2, ktorá by bola štatisticky významná.



Obr. 12 Akumulácia „hot“ L-karnitínu v bunkovej monovrstve BeWo buniek pri inhibícii paritaprevirom (10 uM) a daclatasvirom (10 uM) a „cold“ L-karnitínom (1 mM) (ANOVA, **p<0,01)

6.1.2. Vplyv paritapreviru a daclatasviru na transport karnitínu cez monovrstvu BeWo buniek

Kontrola/médium preukazuje prirodzený transport karnitínu z apikálneho do bazálneho kompartmentu na základe koncentračného gradientu, ktorý je výraznejší do 120.min, čiže krivka apikálu strmšie klesá a krivka bazálu strmšie stúpa až do vyrovnaní koncentrácií (časť karnitínu sa akumuluje v bunkách), po 120.min sa transport viditeľne spomaľuje (Obr. 13). Paritaprevir blokádu OCTN2 sa spomaľuje transport karnitínu z apikálu do bazálu, čo odrážajú obe krivky, ktoré majú v porovnaní s kontrolou miernejšie klesanie u apikálu a stúpanie u bazálu, rovnako však prestup karnitínu je výraznejší do 120.min, ktorý sa potom výrazne spomaľuje. Daclatasvir blokádu OCTN2 tiež spomaľuje transport karnitínu z apikálu do bazálu, ale oproti paritapreviru je transport ešte menší, rovnako však do 120.min je intenzívnejší a následne sa spomaľí.

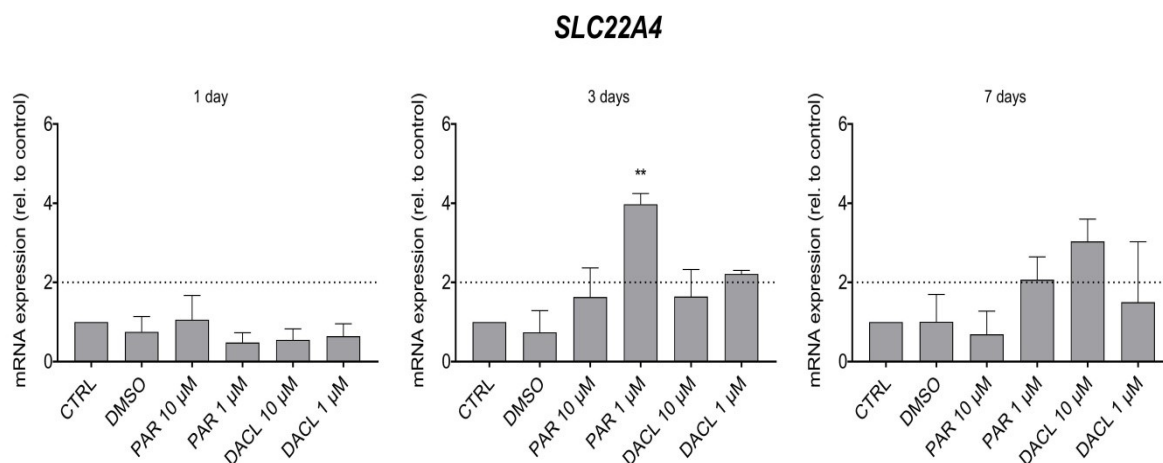


Obr. 13 Transport $[^3\text{H}]$ -L-karnitínu z apikálneho kompartmentu do bazálneho cez monovrstvu buniek BeWo v závislosti na čase

6.2. Vplyv paritapreviru a daclatasviru na zmeny génovej expresie *SLC22A4* a *SLC22A5*

6.2.1. Ovplyvnenie génovej expresie OCTN1 transportéru

Vyjadrenie zmeny expresie génu *SLC22A4* pre transportný proteín OCTN1, ktorý je exprimovaný na povrchu BeWo buniek v malej miere (Obr. 14). Po 1. dni nedošlo k výraznej zmene expresie u žiadnej použitej koncentrácii paritapreviru ani daclatasviru. Po 3. dni je viditeľná významná up-regulácia génu pre OCTN1 u 1 uM paritapreviru, ktorá je pod podmienkou štatistickej významnosti $**p \leq 0,01$, u ostatných vzoriek je viditeľná slabá up-regulácia bez štatistickej významnosti. Po 7. dni sa up-regulácia u 1 uM paritapreviru výrazne znížila, zatiaľ čo u 10 uM daclatasviru sa zvýšila až k hranicu štatistickej významnosti; u ostatných koncentrácií neboli pozorované výraznejšie zmeny expresie.

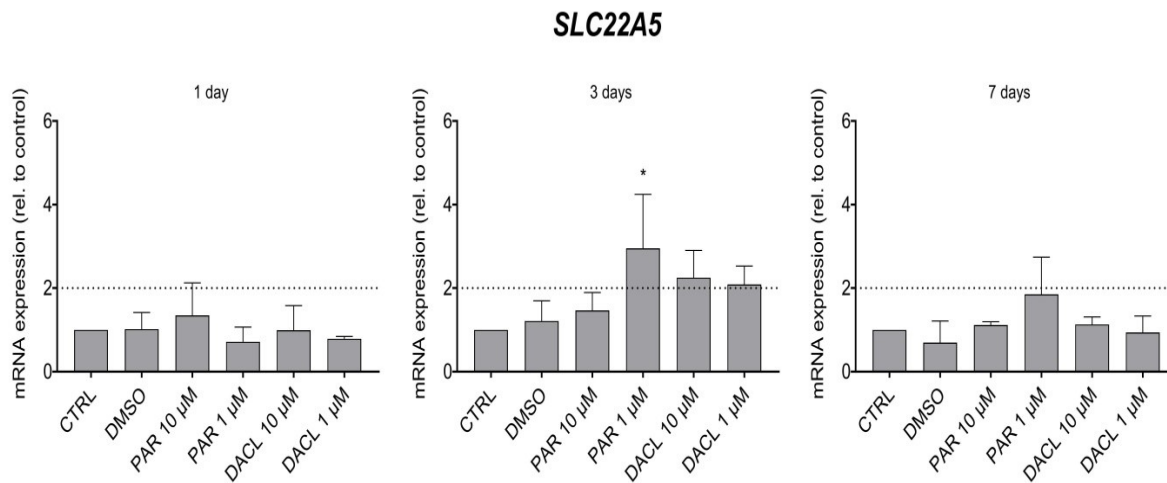


Obr. 14 Vplyv paritapreviru a daclatasviru na expresiu génu *SLC22A4* pre OCTN1 transportér monovrstvy BeWo buniek počas 7-dňovej expozície

6.2.2. Ovplyvnenie génovej expresie OCTN2 transportéru

Vyjadrenie zmeny expresie génu *SLC22A4* pre transportný proteín OCTN2 (Obr. 15), ktorý je exprimovaný na povrchu BeWo buniek vo veľkej miere v porovnaní s transportérom OCTN1. Po 1. dni nedošlo k výraznej zmene expresie u žiadnej použitej koncentrácii paritapreviru ani daclatasviru. Po 3. dni je viditeľná štatisticky významná up-regulácia génu pre OCTN2 u 1 uM paritapreviru, ktorá je pod podmienkou štatistickej významnosti $*p \leq 0,05$; u ostatných vzoriek je viditeľná slabá up-regulácia bez štatistickej významnosti. Po 7. dni sa

up-regulácia u 1 uM paritapreviru výrazne znížila; u ostatných koncentrácií neboli pozorované výraznejšie zmeny expresie.



Obr. 15 Vplyv paritapreviru a daclatasviru na expresiu génu *SLC22A5* pre OCTN2 transportér monovrstvy BeWo buniek počas 7-dňovej expozície

7 DISKUSIA

Naše dve testované antivirotiká paritaprevir a daclatasvir, ktoré majú odlišné mechanizmy účinku inhibície vírovej replikácie, sú schválené a používajú sa na liečbu hepatitídy C u ľudí, nie však u tehotných žien.(Page et al., 2017) Teratogenita, deformácie rastu plodu v maternici či preeklampsia spôsobená liečbou v tehotenstve sú dávane do súvislosti s poruchou funkcie placenty.(Banhidy et al., 2005, Hirano et al., 2008) Pre optimálny rast a fungovanie tohto orgánu hrá dôležitú rolu získavanie energie z β -oxidácie mastných kyselín, ktoré je po glukózovom metabolizme ďalším významným zdrojom energie pre vývoj.(Oey et al., 2003, Wanders et al., 2010) Karnitín pritom predstavuje kľúčový kofaktor β -oxidácie. Pre dosiahnutie jeho dostatočných koncentrácií v trofoblaste placenty je dôležité jeho vychytávanie z materskej krvi pomocou transportných proteínov, hlavne OCTN2.(Grube et al., 2005) V menšej miere potom môže za určitých okolností prispievať k uptaku karnitínu tiež OCTN1 transportér. Uptake karnitínu viac-menej môže byť ovplyvnený, a to ako na genetickom podklade, tak farmakologicky. V tejto štúdii sme sa zamerali na hodnotenie interakcie nových liečiv používaných v terapii hepatitídy C, paritapreviru a daclatasviru s funkciou OCTN2 transportéru v placente a ovplyvnenie expresie génov kódujúcich OCTN1 a OCTN2 týmito látkami.

Štúdie transportu a akumulácie karnitínu v monovrstve BeWo buniek u paritapreviru a daclatasviru ešte neboli predtým testované. Na základe skríningu viac než desiatky nových anti-HCV látok v zatiaľ nepublikovanej štúdii vykonanej na katedre Farmakológie a toxikológie FaF UK bol predpovedaný inhibičný vplyv týchto dvoch antivirotik na transport karnitínu v ľudskej placente - (zatiaľ nepublikované dáta). Naše výsledky tieto predpoklady nepotvrdili, pretože obe antivirotiká funkciu OCTN2 transportéru ovplyvňujú, znižujú akumuláciu karnitínu vo vrstve BeWo buniek imitujúcich trofoblast, avšak nedochádza k utlmeniu transportu cez monovrstvu a akumulácie karnitínu do takej miery, aby boli (aspoň v počte aplikovaných experimentov) štatisticky významné. Paritaprevir o koncentrácii 10 μ M aj daclatasvir o koncentrácii 10 μ M mierne znižujú prestup karnitínu v porovnaní s prestupom karnitínu bez použitia týchto antivirotik, z čoho daclatasvir spomalil transport karnitínu a tým aj znížil jeho akumuláciu o niečo výraznejšie ako paritaprevir. Z grafov možno ešte vidieť vyšší prestup karnitínu v prítomnosti antivirotika či bez do 120.min, ktorý sa následne spomalil, čiže transport karnitínu v priebehu 2 hod po podaní je najvýraznejší. To znamená, že obe antivirotiká prepustia určité percento karnitínu, ktoré sa po 2 hod výraznejšie

nemení. Daclatasvir aj paritaprevir čiastočne inhibujú OCTN2 transportér, ale väčšina karnitínu v porovnaní s médiom prechádza bunkami. Ako bolo vidieť u vysýtení OCTN2 transportéru karnitínom, malé množstvo karnitínu prechádza do bunky cez OCTN1 transportér alebo iným mechanizmom. Pozorovaná znížená miera akumulácie karnitínu odpovedala zníženej miere transportu cez kompartmenty a naopak. V klinickej praxi by tieto výsledky znamenali, že farmakologická liečba paritaprevirom či daclatasvirom u tehotných žien neovplyvňuje funkciu OCTN2 transportéra a teda nie je potrebná suplementácia karnitínom. Z toho vyplýva, že by malo dieťa dostatok energie na správny vývoj a matka potrebnú liečbu v prípade hepatitídy C. Z tohto pohľadu sú dané antivirotiká pre vyvíjajúci sa plod bezpečné a možno predpokladať, že neovplyvňujú vstup karnitínu do buniek cez OCTN2 transportéry ani iných tkanív a zabezpečia tak dostatok karnitínu pre oxidáciu mastných kyselín pre matku, čo predchádza vzniku komplikácii ako syndrómu HELLP a preeklampsii počas tehotenstva. (Haram et al., 2009) Tieto dáta prinášajú ďalší spôsob farmakologického ovplyvnenia transportéru OCTN2 ako už bolo preukázané v predchádzajúcej štúdiu pri liečbe antikonzulzívami (Wu et al., 2004) a fluorochinolónmi (Hirano et al., 2008).

Ďalším pozorovaným aspektom u paritapreviru a daclatasviru bola schopnosť ovplyvniť génovú expresiu *SLC22A4* a *SLC22A5*, génov kódujúcich OCTN1 a OCTN2 transportér, pri ich expozícii na monovrstve BeWo buniek. Predchádzajúce štúdie preukázali schopnosť regulácie expresie *SLC22A5* génu v BeWo bunkovej línii napr. forskolínom, ktorý expresiu zvyšuje alebo hypoxiou, behom ktorej naopak miera expresie OCTN2 klesá. (Huang et al., 2009)

Hodnotenie vplyvu testovaných antivirotik na expresiu karnitínového transportéru nebolo predtým nikým vykonané, čiže dosiahnuté výsledky boli v každom ohľade prekvapivé. Na základe našich výsledkov je možno pozorovať, že paritaprevir v koncentrácii 1 μM javí významnú up-reguláciu expresie pre oba gény po 3 dňoch expozície, s hladinou významnosti $**p \leq 0,01$ OCTN1 a $*p \leq 0,05$ OCTN2. Keďže zmena expresie nenastala hneď po 1.dni možno usúdiť, že preukázaná zmena v expresii nenastáva na mieste promotora reťazca DNA ale v iných miestach alebo iným mechanizmom, ktoré nie sme schopný z našich výsledkov presne určiť. Zároveň sa expresia po 7 dňoch vrátila opäť do normálu u všetkých koncentrácií vzoriek v porovnaní so štandardom, čo preukazuje nástup iných regulačných mechanizmov, ktoré up-reguláciu dorovnali. Podobne, v predtým uvedenej štúdiu zmieňujúcej up-reguláciu OCTN2 na génovej aj funkčnej úrovni forskolínom bol zároveň popísaný kompenzačný mechanizmus pomocou modulačných proteínov PDZK1, NHERF1 a NHERF2, ktorý viedol opäť k zníženiu uptaku karnitínu. (Huang et al., 2009)

Farmakologická up-regulácia expresie oboch transportérov OCTN1 aj OCTN2 mohla by priniesť pozitívne výsledky u pacientok s mutáciou génu SLC22A5, ktoré majú nedostatočné množstvo OCTN2 a preto aj nízke hladiny L-karnitínu spôsobujúce závažné symptómy (Rasmussen et al., 2014). Up-regulácia môže slúžiť ako kompenzačný mechanizmus, ktorým sa karnitín dostane cez väčší počet receptorov OCTN1/2 do buniek a následne do plodu, keďže bežne sa OCTN1 vyskytuje na povrchu trofoblastu v malom množstve a nie je primárnym transportérom karnitínu. Táto up-regulácia génu pre OCTN1/2 by mohla vyriešiť otázku prípadnej suplementácie karnitínu do plodu pri liečbe paritaprevirom hepatitídy C u tehotnej ženy.

Štatisticky významná up-regulácia génu pre OCTN1 v placentárnych bunkách môže zvýšiť príjem acetylcholínu do plodu, ktorý zastáva regulačné funkcie v bunkách mimo funkcie v neurónoch.(Pochini et al., 2013) Zvýšenú dostupnosť tohto substrátu cez placentu by bolo lepšie dodatočne preskúmať, aký vplyv by to u dieťaťa mohlo počas vnútromaternicového vývoja mat', prípadne na vylúčenie rizík, ak by sa paritaprevir použil počas tehotenstva.

Naše výsledky sú potvrdené na úrovni mRNA, ktoré by bolo vhodné dokončiť hodnotením expresie transportéru a úrovni proteínu a jeho transportnej funkcie. V našom experimente boli použité 2 koncentrácie paritapreviru 10 uM a 1 uM, pričom vplyv na zmenu expresie pre oba gény dokázala iba nižšia koncentrácia, z tohto dôvodu by bolo lepšie experiment zopakovať u oboch koncentrácií. Avšak u daclatasviru v použitej koncentrácii 1 uM a 10 uM a paritapreviru v použitej koncentrácii 10 uM nebol dokázaný ani vplyv na génovú expresiu OCTN1 ani OCTN2 v priebehu 7 dní, čo znamená značnú bezpečnosť liečby týmito antivirotikami v priebehu tehotenstva bez výhody zvýšeného transportu L-karnitínu do plodu.

V súčasnosti sa ani paritaprevir ani daclatasvir nepoužívajú samostatne, ale v kombinovaných režimoch s ďalšími antivirotikami (Schinazi et al., 2014), pričom z hľadiska našich výsledkov z pohľadu dôležitosti transportu karnitínu do plodu a prevencie vývojových deformácií u plodu a preeklampsie by tieto 2 antivirotiká mohli byť použité pri liečbe hepatitídy C v tehotenstve bez rizika pre plod a matku. Keďže sa používajú v kombinácii na dosiahnutie lepšieho účinku, by bolo vhodné otestovať v tomto smere aj antivirotiká s nimi kombinované, prípadne posúdiť liečbu jedným antivirotikom.

8 ZÁVER

Paritaprevir aj daclatasvir sú nové používané liečivá proti víru hepatitídy C, ktoré sú schválené zatiaľ v kombinovaných režimoch s ďalšími antivirotikami na dosiahnutie výraznejšieho účinku. Oproti štandardnej kombinačnej liečbe PegIFN- α s ribavirínom tieto nové antivirotiká priamo inhibujú replikáciu víru vo vnútri buniek zásahom špecifických štruktúr pri vírovej replikácii, čím zvýšili výskyt trvalej virologickej odpovede až na 100% a zasahujú široké spektrum genotypov tohto víru.

Keďže na použitie týchto antivirotik v tehotenstve ešte nie je dostatok dôkazov, naše výsledky ovplyvnenia dostupnosti a funkcie karnitínu cez OCTN2 transportér dokazujú sľubnú budúcnosť. Obe látky síce naznačili možný inhibičný vplyv na prestup karnitínu do vrstvy BeWo buniek imitujúcich trofoblast, ale v rozsahu a usporiadaní experimentu nepreukázali tieto zmeny štatistickú významnosť.

Na úrovni ovplyvnenia expresie génu pre karnitínové transportéry OCTN1 a OCTN2 daclatasvir nepreukázal interferenciu. Naopak paritaprevir dočasne zvyšuje up-reguláciu génovej expresie OCTN2 aj OCTN1, ktorá sa do 7 dní vráti do normálu.

Na základe týchto dát nebol dokázaný negatívny vplyv paritapreviru ani daclatasviru na dostupnosť karnitínu cez placentárnu bariéru. V tomto procese možno predpokladať ich bezpečnosť pri vývojových procesoch plodu a v priebehu tehotenstva z pohľadu hladín homeostázy karnitínu v placentе.

9 LITERATÚRA

- ASHFAQ, U. A., JAVED, T., REHMAN, S., NAWAZ, Z. & RIAZUDDIN, S. 2011. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Viol J*, 8, 161.
- BANHIDY, F., LOWRY, R. B. & CZEIZEL, A. E. 2005. Risk and benefit of drug use during pregnancy. *Int J Med Sci*, 2, 100-6.
- BRETT, K. E., FERRARO, Z. M., YOCKELL-LELIEVRE, J., GRUSLIN, A. & ADAMO, K. B. 2014. Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci*, 15, 16153-85.
- BURTON, G. J. & FOWDEN, A. L. 2015. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370, 20140066.
- CHANG, T. T., SHYU, M. K., HUANG, M. C., HSU, C. C., YEH, S. Y., CHEN, M. R. & LIN, C. J. 2011. Hypoxia-mediated down-regulation of OCTN2 and PPAR α expression in human placentas and in BeWo cells. *Mol Pharm*, 8, 117-25.
- COLLEGE, O. 2018. *Anatomy & Physiology* [Online]. Openstax College. Available: <https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@6.27:FwQJfRAS@3/Embryonic-Development> [Accessed 23.09. 2018].
- CROWE, A. & KEELAN, J. A. 2012. Development of a model for functional studies of ABCG2 (breast cancer resistance protein) efflux employing a standard BeWo clone (B24). *Assay Drug Dev Technol*, 10, 476-84.
- DIBBA, P., CHOLANKERIL, R., LI, A. A., PATEL, M., FAYEK, M., DIBBLE, C., OKPARA, N., HINES, A. & AHMED, A. 2018. Hepatitis C in Pregnancy. *Diseases*, 6.
- GANDHI, Y., ELEY, T., FURA, A., LI, W., BERTZ, R. J. & GARIMELLA, T. 2018. Daclatasvir: A Review of Preclinical and Clinical Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 57, 911-928.
- GRUBE, M., MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H., DRABER, K., PRAGER, D., MORITZ, K. U., LINNEMANN, K., FUSCH, C., JEDLITSCHKY, G. & KROEMER, H. K. 2005. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos*, 33, 31-7.
- GUDE, N. M., ROBERTS, C. T., KALIONIS, B. & KING, R. G. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*, 114, 397-407.
- GUPTA, V., KUMAR, A., SHARMA, P. & ARORA, A. 2017. Newer direct-acting antivirals for hepatitis C virus infection: Perspectives for India. *Indian J Med Res*, 146, 23-33.
- GUTTMACHER, A. E., MADDOX, Y. T. & SPONG, C. Y. 2014. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta*, 35, 303-4.
- HARAM, K., SVENDSEN, E. & ABILDGAARD, U. 2009. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*, 9, 8.
- HIRANO, T., YASUDA, S., OSAKA, Y., ASARI, M., KOBAYASHI, M., ITAGAKI, S. & ISEKI, K. 2008. The inhibitory effects of fluoroquinolones on L-carnitine transport in placental cell line BeWo. *Int J Pharm*, 351, 113-8.
- HORSLEY-SILVA, J. L. & VARGAS, H. E. 2017. New Therapies for Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 13, 22-31.

- HUANG, F. D., KUNG, F. L., TSENG, Y. C., CHEN, M. R., CHAN, H. S. & LIN, C. J. 2009. Regulation of protein expression and function of octn2 in forskolin-induced syncytialization in BeWo Cells. *Placenta*, 30, 187-94.
- KAZUMI, M. 2018. *Molecular determinants for selectivity of substrates in skeletal muscle during exercise* [Online]. Available: https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail_en.php?id=2668 Available: https://www.google.sk/search?rlz=1C1LENN_enSK501SK501&biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=H6qoW-OZKoO0kwXe-ZTYBQ&q=octn2+transporter&oq=octn2+transporter&gs_l=img.3...4353.5117.0.5260.10.5.0.0.0.111.327.0j3.3.0....0...1c.1.64.img..9.0.0....0.ZKQPyR_OLUU#imgrc=N6Rf3jRQn2bCTM: [Accessed 24.09. 2018].
- KIM, C. W. & CHANG, K. M. 2013. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*, 19, 17-25.
- LAHJOUI, K., ELIMRANI, I., LAFOND, J., LEDUC, L., QURESHI, I. A. & MITCHELL, G. A. 2004. L-Carnitine transport in human placental brush-border membranes is mediated by the sodium-dependent organic cation transporter OCTN2. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C263-9.
- LI, H., VAN RAVENZWAAY, B., RIETJENS, I. M. & LOUISSE, J. 2013. Assessment of an in vitro transport model using BeWo b30 cells to predict placental transfer of compounds. *Arch Toxicol*, 87, 1661-9.
- LI, H. C. & LO, S. Y. 2015. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol*, 7, 1377-89.
- LYNCH, S. M. & WU, G. Y. 2016. Hepatitis C Virus: A Review of Treatment Guidelines, Cost-effectiveness, and Access to Therapy. *J Clin Transl Hepatol*, 4, 310-319.
- MEDKOO BIOSCIENCES, I. 2018. *Paritaprevir* [Online]. Available: <https://www.medkoo.com/products/6514> [Accessed 23.09 2018].
- MENDEZ-FIGUEROA, H., CHIEN, E. K., JI, H., NESBITT, N. L., BHARATHI, S. S. & GOETZMAN, E. 2013. Effects of labor on placental fatty acid beta oxidation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26, 150-4.
- MENON, R. M., POLEPALLY, A. R., KHATRI, A., AWNI, W. M. & DUTTA, S. 2017. Clinical Pharmacokinetics of Paritaprevir. *Clin Pharmacokinet*, 56, 1125-1137.
- MESSINA, J. P., HUMPHREYS, I., FLAXMAN, A., BROWN, A., COOKE, G. S., PYBUS, O. G. & BARNES, E. 2015. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 61, 77-87.
- OEY, N. A., DEN BOER, M. E., RUITER, J. P., WANDERS, R. J., DURAN, M., WATERHAM, H. R., BOER, K., VAN DER POST, J. A. & WIJBURG, F. A. 2003. High activity of fatty acid oxidation enzymes in human placenta: implications for fetal-maternal disease. *J Inherit Metab Dis*, 26, 385-92.
- OEY, N. A., VAN VLIES, N., WIJBURG, F. A., WANDERS, R. J., ATTIE-BITACH, T. & VAZ, F. M. 2006. L-carnitine is synthesized in the human fetal-placental unit: potential roles in placental and fetal metabolism. *Placenta*, 27, 841-6.
- PAGE, C. M., HUGHES, B. L., RHEE, E. H. J. & KULLER, J. A. 2017. Hepatitis C in Pregnancy: Review of Current Knowledge and Updated Recommendations for Management. *Obstet Gynecol Surv*, 72, 347-355.
- PALUMBO, E. 2011. Pegylated interferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *Ther Adv Chronic Dis*, 2, 39-45.
- POCHINI, L., SCALISE, M., GALLUCCIO, M. & INDIVERI, C. 2013. OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development. *J Biomol Screen*, 18, 851-67.

- PRASAD, M. R. & HONEGGER, J. R. 2013. Hepatitis C virus in pregnancy. *Am J Perinatol*, 30, 149-59.
- RASMUSSEN, J., LUND, A. M., RISOM, L., WIBRAND, F., GISLASON, H., NIELSEN, O. W., KOBER, L. & DUNO, M. 2014. Residual OCTN2 transporter activity, carnitine levels and symptoms correlate in patients with primary carnitine deficiency. *Mol Genet Metab Rep*, 1, 241-248.
- SCHINAZI, R., HALFON, P., MARCELLIN, P. & ASSELAH, T. 2014. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. *Liver Int*, 34 Suppl 1, 69-78.
- SCIENTIFIC, T. F. 2018. *Pierce BCA Protein Assay Kit* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> [Accessed 16.09. 2018].
- SHEKHAWAT, P. S., YANG, H. S., BENNETT, M. J., CARTER, A. L., MATERN, D., TAMAI, I. & GANAPATHY, V. 2004. Carnitine content and expression of mitochondrial beta-oxidation enzymes in placentas of wild-type (OCTN2(+/+)) and OCTN2 Null (OCTN2(-/-)) Mice. *Pediatr Res*, 56, 323-8.
- SPENGLER, U. 2018. Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol Ther*, 183, 118-126.
- WALKER, N., FILIS, P., SOFFIENTINI, U., BELLINGHAM, M., O'SHAUGHNESSY, P. J. & FOWLER, P. A. 2017. Placental transporter localization and expression in the Human: the importance of species, sex, and gestational age differences†. *Biology of Reproduction*, 96, 733-742.
- WANDERS, R. J., RUITER, J. P., L, I. J., WATERHAM, H. R. & HOUTEN, S. M. 2010. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inherit Metab Dis*, 33, 479-94.
- WHO, W. H. O. 2018. *Hepatitis C* [Online]. Available: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> [Accessed 19.09. 2018].
- WU, S. P., SHYU, M. K., LIOU, H. H., GAU, C. S. & LIN, C. J. 2004. Interaction between anticonvulsants and human placental carnitine transporter. *Epilepsia*, 45, 204-10.