

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



Studium interakcí antivirotik s vybranými placentárními transportéry

Study of interactions of antiviral drugs with selected placental transporters

Dizertační práce

Mgr. Sára Karbanová

Školitel: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele prof. PharmDr. Františka Štauda, Ph.D. a konzultanta doc. PharmDr. Lukáše Červeného, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

v Hradci Králové dne

.....

Mgr. Sára Karbanová

Poděkování

Mé poděkování zde patří prof. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D. za přijetí do jeho výzkumné skupiny, podporu mého zapojení do projektů se zajímavými experimentálními modely a jeho důvěru v mou samostatnost. Zároveň by ale bez vstřícnosti, cenných rad a zejména trpělivosti doc. PharmDr. Lukáše Červeného, Ph.D. nebylo možné této samostatnosti dosáhnout.

Velký dík patří také všem členům skupiny Experimentální farmakologie a lékových interakcí, se kterými jsem měla tu možnost během svého postgraduálního studia spolupracovat. Za odbornou, ale často především lidskou podporu děkuji jmenovitě doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D., která mi vždy ochotně poradila.

Za téměř každodenní spolupráci nejen při experimentech se zvířaty a skvělou pracovní atmosférou děkuji Renatě Exnarové, a především Daně Součkové, která mě častokrát podpořila v experimentálně náročných časech.

Nevyslovitelně velké díky patří všem mým nejmilejším kolegům, jmenovitě pak mým blízkým přátelům Mgr. Lucii Jiráskové a PharmDr. Aleši Šorfovi, Ph.D., bez kterých by se dokončení mého studia limitně blížilo nule.

Děkuji rovněž za finanční podporu GAUK 324215/C/2015, GAČR 17-16169S, SVV 260-293, EFSA-CDN No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své nejbližší rodině, která mě podporovala psychicky i finančně během celých let studií, a bez jejichž empatie by bylo celé studium velmi obtížné. Poděkování patří také mému partnerovi za jeho extrémní odolnost a trpělivost zejména při sepisování této práce.

Tuto dizertační práci věnuji dvěma nejdůležitějším ženám mého života, své matce a své babičce, které ve mě, bez ohledu na okolnosti, vždy věřily.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Sára Karbanová

Školitel: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název disertační práce: Studium interakcí antivirotik s vybranými placentárními transportéry

Terapie infekce HIV u těhotných žen je založena na podávání kombinované antiretrovirální terapie zajišťující vysokou efektivitu potlačení proliferace viru v krevním oběhu matky. Součástí je vždy také antiretrovirotikum s dobrým placentárním přechodem, které zajišťuje profylaxi plodu proti vertikální nákaze. Pro gravidní pacientky infikované hepatitidou C (HCV) doposud žádný doporučený farmakoterapeutický postup není k dispozici, nicméně současné důkazy naznačují, že snížení množství viru v oběhu matky koreluje se sníženou pravděpodobností přenosu viru na plod. Aby bylo možné dále rozvíjet farmakoterapeutické postupy léčby těchto onemocnění v těhotenství a zajistit jejich bezpečnost pro plod, je nutné znát mechanismy placentárního přestupu anti(retro)virotik z matky do plodu. V této disertační práci jsme se věnovali látkám odvozeným od nukleosidů (anti-HIV abakaviru, emtricitabinu, zidovudinu, tenofoviru disoproxil fumarátu a anti-HCV ribavirinu) s popsáním vysokým placentárním přestupem a hlavním tématem bylo zkoumání hypotézy, zda je materno-fetální přestup těchto látek přes placentu usnadňován nukleosidovými transportéry. Navíc jsme se věnovali ontogenezi exprese placentárních nukleosidových transportérů a v této souvislosti řešili také otázku, zda je placentární exprese epigeneticky regulována a souvisí s mírou diferenciací cytotrofoblastu. Pro studium jsme použili široké spektrum *in vitro*, *ex vivo* a *in situ* experimentálních přístupů. Zjistili jsme, že nukleosidový transportér ENT1 usnadňuje materno-fetální transfer abakaviru a ribavirinu, zatímco emtricitabin a zidovudin prostupuje placentou za účasti jiných mechanismů. Popsali jsme vysokou variabilitu genové exprese nukleosidových transportérů v lidské placentě v prvním a třetím trimestru. V této souvislosti naše výsledky ukázaly, že ekvilibrační nukleosidové transportéry jsou exprimovány spíše konstitutivně, zatímco genová exprese koncentračních nukleosidových transportérů v průběhu gestace roste a je u nich možnost epigenetické regulace. Nad rámec původně stanovených cílů jsme také přinesli první informaci o tom, že S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin, inhibitor používaný pro selektivní inhibici ekvilibračních nukleosidových transportérů, blokuje rovněž efluxní aktivitu jednoho z placentárních ABC transportérů.

Výsledky předkládané v rámci této dizertační práce přispívají k porozumění problematice transplacentární kinetiky antivirových léčiv a jejich vlivu na expresi vybraných transportérů v placentě a dalších mateřských i fetálních orgánech.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Sára Karbanová, MSc.

Supervisor: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Consultant: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of Dissertation Thesis: Study of interactions of antiviral drugs with selected placental transporters

The backbone of HIV treatment in pregnant women is the combination antiretroviral therapy which effectively suppresses the viral proliferation in maternal blood circulation. One of drugs in this therapy regimen should be a molecule with high placental transfer to assure the prophylaxis of viral transfer to fetus. There is no approved guideline for pharmacotherapy of pregnant women infected with hepatitis C (HCV), however recent evidence suggests that lowering the maternal viral load could correlate with lower likelihood of HCV transmission to the fetus. To assure and further develop the effective and safe pharmacotherapeutic approaches for treatment of HIV and HCV in pregnancy with respect to fetal safety, it is essential to understand mechanisms of placental transfer of anti(retro)viral drugs. In this Dissertation thesis we focused on molecules derived from nucleosides (anti-HIV abacavir, emtricitabine, zidovudine, tenofovir disoproxil fumarate and anti-HCV ribavirin) with reported high transplacental passage. The main theme of the proposed thesis was to investigate our hypothesis whether materno-fetal transport is mediated via nucleoside transporters. Moreover, we also studied ontogenesis of expression of placental nucleoside transporters and searched for an answer if this expression is epigenetically regulated, and thus can be related to cytotrophoblast differentiation. To address those goals, we used broad spectrum of *in vitro*, *ex vivo* and *in situ* experimental approaches. Our findings propose the equilibrative nucleoside transporter named ENT1 to be responsible for transport of abacavir and ribavirin across the placental barrier, while emtricitabine and zidovudine tend to cross the placenta via other mechanism(s). We described high variability of gene expression of nucleoside transporters in the first and third trimester human placenta. Results obtained in this study indicate that equilibrative nucleoside transporters are expressed constitutively, whereas

concentrative nucleoside transporters are expressed asymmetrically – their expression rises with gestation age and there is also a possibility of epigenetic regulation. Apart from originally set goals, we also bring the first evidence that S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin, a supposedly selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters also blocks the efflux activity of one placental transporter from the ABC transporter superfamily.

In conclusion, our data presented in this dissertation thesis contribute to understanding of the transplacental kinetics of selected antivirals and their impact on the transporter expression in placenta and other maternal or fetal organs.

Obsah

Seznam zkratk	11
1. Teoretický úvod	13
1.1 Struktura lidské placenty	13
1.2 Mechanismy prostupu léčiv přes placentu	14
1.2.1 Membránové transportéry	15
Nukleosidové transportéry	15
CNT (SLC28)	16
CNT1 (SLC28A1)	17
CNT2 (SLC28A2)	17
CNT3 (SLC28A3)	17
ENT (SLC29)	18
ENT1 (SLC29A1)	19
ENT2 (SLC29A2)	19
ENT3 (SLC29A3)	20
ENT4 (SLC29A4)	20
ABC transportéry	21
1.2.2. Role transportérů v lékových interakcích	22
1.3 Metody studia transportu látek placentou	22
1.4 Infekce HIV a HCV	24
HIV infekce a AIDS	24
Hepatitida C (HCV)	24
1.4.1 HIV a HCV v těhotenství	25
1.4.2 Antivirotika používaná k léčbě HIV a HCV	26
1.4.3 Antivirotika studovaná v rámci této dizertační práce	30
Zidovudin	30
Emtricitabin	31
Abakavir	32
Tenofovir	32
Ribavirin	32
2. Cíle práce	34
3. Podíl předkladatelky na jednotlivých publikacích	35
4. Přehled předkládaných prací s komentářem	37
P1: Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents.	37
Jiraskova L, Cervený L, Karbanova S , Ptackova Z, Staud F.	37

Mol Pharm. 2018 Jul 2;15(7):2732-2741. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238. Epub 2018 May 25.....	37
P2: Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine.	39
Karbanova S , Cerveny L, Ceckova M, Ptackova Z, Jiraskova L, Greenwood S, Staud F.	39
Placenta. 2017 Dec ; 60:86-92. doi: 10.1016/j.placenta.2017.10.011. Epub 2017 Nov 10.	39
P3: Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, <i>SLC29A1</i>) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta.	40
Cerveny L, Ptackova Z, Ceckova M, Karahoda R, Karbanova S , Jiraskova L, Greenwood SL, Glazier JD, Staud F.	40
Drug Metab Dispos. 2018 Nov ;46(11):1817-1826. doi: 10.1124/dmd.118.083329. Epub 2018 Aug.....	40
P4: Transport of ribavirin across the rat and human placental barrier: Roles of nucleoside and ATP-binding cassette drug efflux transporters.	42
Karbanova S , Cerveny L, Jiraskova L, Karahoda R, Ceckova M, Ptackova Z, Staud F.	42
Biochem Pharmacol. 2019 May ; 163:60-70. doi: 10.1016/j.bcp.2019.01.024. Epub 2019 Feb 2.....	42
P5: Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 expression in the placenta and in maternal and fetal organs....	44
Cerveny L, Neumanova Z, Karbanova S , Havlova I, Staud F.....	44
J Pharm Pharmacol. 2016 Jan ;68(1):84-92. doi: 10.1111/jphp.12495. Epub 2016 Jan 4.	44
P6: S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) is not a selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters but also blocks efflux activity of breast cancer resistance protein..	45
Karbanova S , Sorf A, Jiraskova L, Lalinska A, Ptackova Z, Frantisek S, Cerveny L.	45
5. Souhrn a závěry	46
6. Seznam doposud publikovaných prací kandidátky	49
6.1 Recenzované publikace v odborných časopisech s IF	49
6.2 Přednášky na odborných konferencích	50
6.3 Postery prezentované na odborných konferencích	51
7. Seznam příloh.....	53
8. Seznam použité literatury	55
9. Přílohy.....	65

Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“ rodina transportérů
ABCB1	p-glykoprotein, MDR1
ABCC2	Multidrug Resistance-Associated Protein 2, MRP2
ABCG2	Breast Cancer Resistance Protein, BCRP
AIDS	syndrom získaného imunodeficitu
BeWo	buněčná linie odvozená od choriokarcinomu placenty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cART	kombinovaná antiretrovirální terapie
CCR5	C-C chemokinový receptor 5
CD4	cluster of differentiation 4
CNTs	koncentrační nukleosidové transportéry
EMA	Evropská léková agentura
ENTs	ekvilibrační nukleosidové transportéry
ei	ekvilibrační insenzitivní (ENT2)
es	ekvilibrační senzitivní (ENT1)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HIV	virus lidského imunodeficitu
HCV	virus hepatitidy typu C
ITC	international transporter consortium
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MVM	vezikuly z izolované mikrovilózní membrány
NBMPR	nitrobenzylthioinosin
NNRTI	ne-nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
NRTI	nukleosidový/nukleotidový inhibitor reverzní transkriptázy
PI	inhibitor proteázy
SLC	„Solute Carrier“ rodina transportérů
WHO	Mezinárodní zdravotnická organizace

1. Teoretický úvod

Více než polovina všech těhotných dnes chronicky užívá medikaci vázanou či nevázanou na lékařský předpis [2-4], a zároveň během celé gestace užije **každá těhotná žena v průměru alespoň dvě léčiva** ať už preskripčně vázaná či nikoliv [5]. Stále rostoucí čísla ve spotřebě léčiv a potravních doplňků v období gravidity podmiňují potřebu sběru účinnostních a bezpečnostních dat u těhotných.

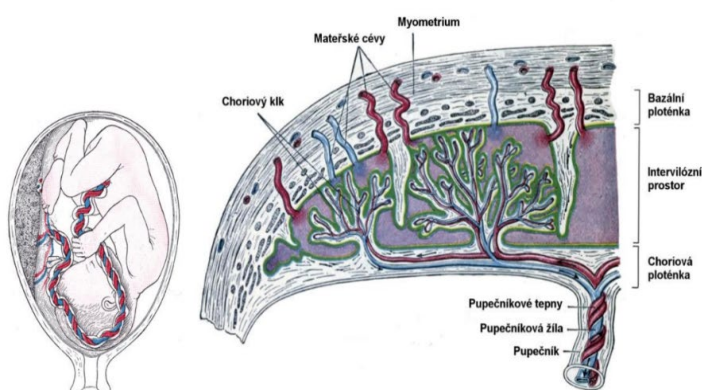
I těhotných žen se může týkat onemocnění z řad velmi závažných infekcí jako je **virus lidské imunodeficience** (HIV, z angl. human immunodeficiency virus) nebo **virus hepatitidy C** (HCV). Obě choroby se mohou vertikálně přenášet na plod a ohrozit tím tak samotné těhotenství, vývoj plodu i další postnatální vývoj jedince. Doporučení WHO pro omezení přenosu HIV z matky na plod spočívá především ve snížení virémie matky a zajištění profylaxe plodu. U HIV pozitivních matek je ihned zahájena **kombinovaná antiretrovirová terapie** (cART) sestávající nejméně ze tří léčiv, z nichž jedno má být ze skupiny antiretrovirotik s dobrým placentárním přestupem, a to bez ohledu na počet CD4+ T-lymfocytů. Ačkoliv je dostupná evidence o snížení přenosu viru na plod, nejsou v případě HCV u těhotných postupy farmakoterapie dosud ustanoveny. Starší režimy pro léčbu HCV (obsahující ribavirin nebo pegylované interferony) jsou totiž kontraindikovány kvůli možnému vzniku deformit a malformací reportovaných v souvislosti s jejich užíváním, a zároveň nejnovější molekuly používané pro terapii HCV zatím postrádají bezpečnostní data pro užívání v těhotenství [2, 6, 7]. Ve většině případů je u pacienta diagnostikována infekce HIV nebo HCV, nicméně i výskyt koinfekce je relativně vysoký [3, 4], v takovém případě je postupováno pouze dle doporučených postupů pro farmakoterapii HIV v období těhotenství, přestože při koinfekci jsou rizika plynoucí z obou onemocnění pro matku i dítě ještě větší.

Podrobný popis osudu dotyčných léčiv v organismu během těhotenství je důležitým ukazatelem účinnosti a bezpečnosti pro matku i plod. Esenciální roli v materno-fetálním přenosu léčiv sehrává bariéra oddělující krevní oběh matky od krevního oběhu plodu, známá jako placenta.

1.1 Struktura lidské placenty

Lidská placenta je dočasný diskovitý orgán, který vzniká krátce po oplození. Placenta je jediným společným orgánem matky a plodu a spolu s plodovou vodou hraje nezastupitelnou roli po celou dobu prenatálního vývoje. První fází vývoje placenty je tzv. decidualizace endometria, během které je sliznice anatomicky a imunitně připravena na tvorbu placenty (a vývoj embrya). Po zanoření blastocysty do děložní stěny se vyvíjí cytotrofoblast, který následně zraje do formy syncytiotrofoblastu. Ve zralé fázi je mateřská část utvářena bazální ploténkou (*decidua basalis*) a

fetální stranu představuje choriová ploténka (*chorion frondosum*). Na Obrázku 1 je mezi těmito dvěma stranami patrný intervilozní prostor tvořený choriovými klky, které jsou omývány mateřskou krví [8, 9]. Ačkoliv se fetální krev s mateřskou nemísí, tato bariéra zajišťuje **správný vývoj a růst plodu** tím, že zásobuje plod živinami, odvádí z plodu nežádoucí produkty metabolismu a zprostředkovává výměnu kyslíku a oxidu uhličitého mezi krevními řečišti plodu a matky. Dále má funkci imunologickou a endokrinní; zajišťuje syntézu některých hormonů (β -choriového gonadotropinu, estrogenů), peptidů a různých látek steroidní povahy dle fáze gestace [10, 11]. Přestože je relativně prostupná, reguluje transport xenobiotik a jejich metabolismus [10].



Obrázek 1 Schéma anatomie lidské placenty.

Převzato a upraveno dle [1]

Placenta se skládá z bazální (mateřské) a choriové (fetální) ploténky, které ohraničují tzv. intervilozní prostor. V něm dochází k látkové výměně mezi matkou a plodem omýváním vilozních stroměčků mateřskou okysličenou krví.

1.2 Mechanismy prostupu léčiv přes placentu

Placenta omezuje vstup léčiv z těla matky do plodu. Tato limitace však není dokonalá, a mnoho molekul potenciálně ohrožujících plod může touto bariérou projít. Malé (do molekulové hmotnosti okolo 600 Da) neionizované hydrofobní molekuly difundují placentární bariérou v podstatě neomezeně [9]. Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiva, vazba léčiva na plazmatické bílkoviny, fyziologické změny během gravidity (rozdílné pH ve fetální a mateřské krvi, rychlost průtoku krve placentou, velikost povrchu i šířka placentární bariéry, které se mění v průběhu gestace) jsou faktory výrazně ovlivňující míru prostupu přes placentární bariéru pasivní difuzí [12]. Na regulaci průniku řady léčiv přes placentu se v mnoha případech významně podílí také **přenašečové systémy**, které můžeme nalézt na obou pólech syncytiotrofoblastu [13, 14]. Kromě výše zmíněných mechanismů membránového transportu existují další, minoritní, formy placentárního přestupu jako je endocytóza či exocytóza [15], případně transcytóza, která je typická pro imunoglobuliny. [13].

1.2.1 Membránové transportéry

Membránové transportéry tvoří skupinu více než čtyř set proteinů, které se významně podílejí na transportu rozličných (především biogenních) substrátů [16]. Jsou zpravidla pevně integrovány do membrány a obvykle je tvoří 10 - 17 transmembránových domén (TMDs) [17]. Lze je dělit do dvou velkých rodin: ATP-binding cassette (ABC) a Solute Carrier (SLC) transportérů [18]. Můžeme je nalézt v membráně polarizovaných buněk, kde mohou být exprimovány na apikální a/nebo bazolaterální/bazální straně. Na obou stranách pak zprostředkovávají transport buď z buňky (eflux) a/nebo do buňky (influx) [19].

Kromě tělu vlastních substrátů transportérové systémy přenášejí řadu xenobiotik zahrnujících i hojně užívané léčivé látky a ovlivňují jejich absorpci, distribuci a exkreci. Mohou tak být místem terapeuticky významných lékových interakcí. Znalost lékových interakcí s membránovými transportéry je nutná pro zajištění efektivní a bezpečné terapie. Ukazatelem **klinického významu studia lékových interakcí** s membránovými transportéry je rostoucí zájem největších světových lékových agentur, U.S. Food and Drug Administration (FDA) a European Medicines Agency (EMA). Ty zařadily v nedávných letech popis interakcí s těmito typy transportérů na seznam povinných registračních dokumentů. Novela jejich doporučení je očekávána s velkými obavami, že nároky na testování interakcí s transportéry ještě vzrostou, jak již v roce 2017 naznačoval publikovaný "concept paper" [20]. EMA a její „Pharmacokinetics Working Party (PKWP)“ kromě přípravy novely CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2 „Guideline on the investigation of drug interactions [21]“ vypracovává odpovědi na četné dotazy týkající farmakokinetiky v klinickém a preklinickém testování včetně interakcí [22]. V polovině ledna 2020 FDA vydala návod pro farmaceutický průmysl k *in vitro* testování farmakokinetických interakcí [23]. Další důležitou autoritou v oblasti výzkumu léčiv, která akcentuje studium interakcí membránových transportérů s léčivy je Mezinárodní transportérové konsorcium (International Transporter Consortium (ITC)) [24].

Dále budou v předkládané dizertační práci stručně popsány obě rodiny membránových transportérů s bližším zaměřením na jednotlivé zástupce, jejichž role v placentárním transportu přes placentu byla studována v rámci řešení této dizertační práce.

Nukleosidové transportéry

V rodině SLC (z angl. Solute Carrier) transportérů nyní rozpoznáváme přes tři sta zástupců. Tito se zapojují do nejrůznějších fyziologických a patofyziologických dějů a farmakokinetiky léčiv [25]. Jejich struktura je zpravidla utvářena 300 – 800 aminokyselinovými

zbytky s molekulovou hmotností 40 – 90 kDa [17, 26]. Transport ligandů přes buněčnou membránu zprostředkovaný těmito přenašeči je různě dynamický proces. Často se jedná o sekundárně aktivní transport, kdy je substrát přenášen po směru elektrochemického gradientu vytvořeného aktivním transportérem (symport) nebo naopak proti němu (antiport). Mezi takové transportéry patří i proteiny z podrodiny koncentračních nukleosidových transportérů (CNT, **SLC28**). Může se ale jednat také o obousměrné transportéry nezávislé na vnější energii podílející se na procesu facilitované difuze, například ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENT, **SLC29**) [27]. CNT i ENT jsou exprimovány téměř ve všech typech savčích buněk, kde zajišťují dodávku hydrofilních nukleosidů, které jinak prostupují bariérami velmi omezeně a mají tak zásadní roli při tvorbě nukleových kyselin. Kromě nukleosidů jsou nukleosidové transportéry schopné rozpoznávat mnohé od nukleosidů odvozené molekuly, mezi které se řadí například cytotoxické látky (antimetaboly) nebo některé typy antivirotik [28-30]. Jejich exprese může být ovlivněna různými endogenními a exogenními faktory [31], což je jedním z možných důvodů značné interindividuální variability v jejich expresi [32-34]. Mezi možné faktory podílející se na regulaci NTs jsou dráhy spojené s diferenciací jako jsou protein kinázové kaskády [35-37] nebo navrhované epigenetické mechanismy (**P1**)

CNT (*SLC28*)

Podrodina CNTs čítá tři zástupce CNT1 (*SLC28A1*), CNT2 (*SLC28A2*) a CNT3 (*SLC28A3*). Jsou to integrální membránové proteiny zajišťující jednosměrný aktivní transport svých substrátů proti koncentračnímu spádu dovnitř buněk a současného symportu sodných kationtů [28, 38, 39]. CNT1-3 vykazují podobnosti ve struktuře, především v počtu transmembránových domén (TMDs), kterých mají shodně třináct. Naopak částečně se liší například ve své substrátové specifitě a afinitě k jednotlivým typům nukleosidům. Jejich substráty z řad xenobiotik pak zpravidla respektují strukturální specifitu daných transportérů vůči endogenním molekulám, které přirozeně přenášejí [30, 40].

Transportéry CNT2 a CNT3 jsou známé svou expresí v placentě, zatímco exprese CNT1 v lidské placentě zůstává přinejmenším sporná [41] (**P1**). Funkční exprese některých zástupců byla také prokázána v BeWo buněčné linii (**P1**) a v placentě potkana [42]. Pro expresi *SLC28* genů je typická výrazná variabilita, a to jak inter-individuální, tak i v rámci průběhu gestace. Nejvyšší množství *SLC28* mRNA byla popsána v terminální placentě (**P1**).

Exprimovány jsou často tandemově s ENT, se kterými pravděpodobně kooperují [28]. Přehled o CNTs nabízí Tabulka 1.

CNT1 (*SLC28A1*)

CNT1 transportuje zejména pyrimidinové báze a adenosin, z xenobiotik pak především látky odvozené právě od pyrimidinu, jako jsou mnohá antivirotika nebo léky užívané v terapii nádorových onemocnění. Stechiometrie transportu nukleosid:sodné kationty jsou 1:1 [43]. CNT1 nalezneme primárně na apikální straně endotelových buněk různých orgánů a tkání (játra, ledviny, tenké střevo, kostní dřeň, makrofágy, některé části mozku) [44-46]. Exprese *SLC28A1* je vázána na stav tkáně a je závislá na fázi buněčného cyklu. Jeho množství se také mění v závislosti na míře diferenciaci; vysoká exprese *SLC28A1* je charakteristická pro fázi, kdy extenzivně probíhá transkripce [47-50]. Nově byl pak, díky své schopnosti zapojit se do signálních drah a podmiňovat fenotypové změny v nádorové tkáni, popsán CNT1 jako tzv. transceptor [45, 51]. Transceptor, jakožto nově zavedený pojem, definuje dvojí funkci proteinu, a to transportérovou a receptorovou. Jeho obsazením dochází nejenom k přenosu ligandu na druhou stranu membrány, ale také k modulaci signálních drah [52].

CNT2 (*SLC28A2*)

CNT2 je protein schopný přenést přes membrány purinové nukleosidy a uridin. Kromě přirozeně se vyskytujících nukleosidů má také vysoký potenciál k transportu antivirových a protinádorových léčivých látek (viz Tabulka 4) [40]. Stechiometrie transportu nukleosid:sodné kationty jsou 1:1 [53]. CNT2 je exprimovaný v různé míře téměř napříč celým lidským tělem, zejména pak v ledvinách, játrech, srdci, placentě, pankreatu, slezině, příčně pruhovaném svalstvu a tenkém i tlustém střevě včetně rekta. Významný je také výskyt CNT2 v některých strukturách mozku (amygdala, hippokampus, cerebellum a neokortex) a v podstatě všech typech buněk imunitního systému [46, 54]. Na úrovni mRNA je nejvíce zastoupeným CNT v placentě (**P1**).

CNT3 (*SLC28A3*)

CNT3 má širokou substrátovou specifitu, rozpoznává jak purinové, tak pyrimidinové nukleosidy. Podobně jako oba předchozí zástupci, CNT1 a CNT2, dokáže přenášet mnohá protivirová i protinádorová léčiva [11, 55]. CNT3 je však unikátní mezi ostatními CNTs v tom, že k uskutečnění translokace svého substrátu potřebuje využití sodno-vodíkového kotransportu [30]. Takto zprostředkovaný přenos substrátů je elektrogenní, přispívá tedy k tvorbě a udržení membránového potenciálu. Je exprimován na apikální straně buněk pankreatu, ale také v průdušnici, kostní dřeni nebo prsní žláze. V menších množstvích ho nalézáme také v játrech, plicích, prostatě nebo placentě [56].

Tabulka 1 Přehled koncentračních nukleosidových transportérů, jejich lokalizace, substrátů a inhibitorů.

Zpracováno dle [26].

	Lokalizace	Endogenní substráty	Experimentální substráty	Léčiva reportovaná jako substráty	Inhibitory
<i>CNT1</i>	střevo, ledviny, játra, mozek	uridin, tymidin, cytosin	uridin	zidovudin, lamivudin, zalcitabin, cytarabin, stavudin, gemcitabin, mizoribin, trifluridin	adenosin (potentní), phloridzin (parciální)
<i>CNT2</i>	střevo, ledviny, játra, mozek, buňky imunitního systému, příčně pruhovaná svalovina, slezina, placenta, slinivka břišní, srdce	adenosin, uridin, inosin, guanosin	adenosin, uridin, inosin	ribavirin, zidovudin, mizoribin, clofarabin, kladribin, fluoropyrimidin, formycin B, didanosin, maribavir, floxuridin	KGO-2141 a KGO-2173
<i>CNT3</i>	slinivka břišní, hrtan, kostní dřeň, prsní žláza, střevo, játra, plíce, placenta, prostata, varlata, mozek, srdce	adenosin, uridin, cytidin, guanosin, inosin, tymidin	adenosin, uridin	kladribin, fludarabin, 5-fluorouridin, 5-fluoro-29-deoxyuridin, zebularin, gemcitabin, didanosin, pirarubicin, ribavirin	phloridzin (parciální)

ENT (*SLC29*)

Tuto podrodinu ekvilibračních nukleosidových transportérů tvoří čtyři zástupci ENT1, ENT2, ENT3 a ENT4). Jsou tvořeny 11 TMD a všechny zprostředkovávají **obousměrnou facilitovanou difuzi**, přičemž ENT3 a ENT4 vykazují kation-dependentní chování a jsou stimulovány nižším pH [57, 58]. Další společnou vlastností je jejich schopnost transportovat přes membrány adenosin, který se účastní regulace mnoha fyziologických i patofyziologických procesů včetně zásoby myokardu kyslíkem, průtoku koronárními cévami, zánětu nebo neurotransmise [28]. Liší se však ve své afinitě k nitrobenzylthioinosinu (nitrobenzylmerkaptopurin ribosid, NBMPR), podle toho se i dříve označoval ENT1 jako “equilibrative sensitive” (es), ENT2, který je citlivý až k výrazně

vyšším koncentracím NBMPR byl pojmenován jako “equilibrative insensitive” (ei). ENT3 a ENT4 ještě v té době nebyly prozkoumány, nicméně dnes je známo, že ENT3 je v běžně užívaných koncentracích k NBMPR prakticky bez afinity, kdežto ENT4 afinitu vykazuje [28, 59, 60]. Mají schopnost transportovat kromě biogenních substrátů také některá xenobiotika, a není bez zajímavosti jejich častá koexprese [61, 62]. Přehled v tabulce níže (Tabulka 2).

ENT1 (*SLC29A1*)

ENT1 najdeme v cytoplasmatické membráně buněk téměř všech savčích tkání. Jeho ortology lze nalézt také v dalších eukaryotických organismech, jako jsou kvasinky, prvoci, nematoda nebo rostliny. V lidské i potkaní placentě je ENT1 exprimován hojně, je lokalizovaný apikálně a jeho exprese se zdá být nezávislá na délce gestace (**P3**), i u HCV pozitivních žen zůstává placentární koncentrace ENT1 v podstatě nezměněna [63]. Míra jeho exprese je závislá na buněčném cyklu, jeho koncentrace se mezi G1 a G2-M fázemi až zdvojnásobí [64-66]. Jeho endogenní substráty jsou veškeré nukleosidy [28]. ENT1 hraje obecně svou funkcí významnou roli v proliferaci buněk, není tedy překvapením, že v buňkách se zvýšenou proliferací (např. buňky nádorové) naměříme vyšší koncentrace ENT1 [67]. Jeho down-regulace by mohla přispět ke klinické rezistenci k cytotoxickým látkám jako jsou některá protinádorová chemoterapeutika [68-72]. Během gestace ho detekujeme na apikální straně syncytiotrofoblastu (**P3**).

ENT2 (*SLC29A2*)

Tento transportér je přítomen v mnoha různých tkáních a zodpovídá za transport nukleosidů, ale i nukleových bazí a podobně jako ENT1 se tak podílí na udržování buněčné homeostázy. Velký význam má především ovlivnění koncentrací adenosinu dostupného pro adenosinové receptory. Tímto mechanismem lze modulovat například převod vzruchu v sinoatriálním uzlu srdce podobně jako se ho účastní CNT1 [73]. V porovnání s ENT1, byl ENT2 detekován v lidské placentě jen velmi slabě, a to na její apikální i bazálně straně. Malý nárůst v expresi a inter-individuální variabilitě byl pozorován v terminální placentě v porovnání s prvotrimestrálními vzorky (**P3**). V placentě HCV pozitivních těhotných pacientek jsou hladiny ENT2 srovnatelné s těmi u zdravých matek [63]. Regulace jeho exprese není doposud podrobně popsána. Od výše jmenovaného ENT1 ho lze experimentálně rozlišit díky jejich rozdílné citlivosti k NBMPR. ENT2 potřebuje cca 1000x vyšší koncentraci než ENT1 [28]. Afinita ENT2 k nukleosidům se ale obecně jeví v porovnání s ENT1 o něco vyšší [59].

ENT3 (*SLC29A3*)

Třetí zástupce skupiny ENTs se vyznačuje svou lokalizací v intracelulárních membránách, zejména lysozomů a mitochondrií [28, 74]. Strukturálně se od předchozích dvou liší svým výrazně delším hydrofilní N-terminálním koncem [58]. Kinetické parametry ENT3 nejsou ještě zcela objasněny, nicméně afinita k nukleosidům a NBMPR je velmi malá, naopak k dipyridamolu se jeví jako relativně vysoká [28, 74].

ENT4 (*SLC29A4*)

Nejméně prozkoumaným nukleosidovým transportérem je v pořadí čtvrtý ENT. Je citlivý k působení k NBMPR, s IC_{50} rovné 2.3 μ M [60]. Pravděpodobně ho lze taktéž nalézt ve většině lidských tkání [28], jeho funkce je však poněkud rozdílná od ostatních NT. Jeho typickými substráty jsou namísto nukleosidů (vyjma adenosinu) monoaminy, např.: neurotransmitery dopamin či serotonin, proto je jeho dalším označením „plasma membrane monoamine transporter“ (PMAT) [75, 76]. Jeho funkce je signifikantně pH dependentní a má zřejmě význam především v mozku a srdci [77].

Tabulka 2 Přehled ekvilibračních nukleosidových transportérů, jejich lokalizace, substrátů a inhibitorů.

Zpracováno dle [26].

	Lokalizace	Endogenní substráty	Experimentální substráty	Léčiva reportovaná jako substráty	Inhibitory
ENT1	v celém těle	purinové i pyrimidinové nukleosidy	uridin, adenosin	kladribin, cytarabin, fludarabin, gemcitabin, capecitabin, fialuridin, ribavirin	NBMPR, dipyridamol, dilazep, draflazin
ENT2	v celém těle	adenosin, inosin, hypoxantin, guanin, uridin, guanosin, tymin, tymidin, cytosin	adenosin, hypoxantin	2-chloroadenosin, formycin B, tubercidin, gemcitabin, fludarabin, kladribin, vidarabin, cytarabin	NBMPR, dipyridamol, dilazep, draflazin, solufazin, mioflazin
ENT3	intracelulárně	adenosin, cytidin, inosin, tymidin, uridin, ATP	adenosin, tymidin, uridin	kladribin, klofarabin, didanosin, fludarabin, zebularin	dipyridamol
ENT4	mozek, tenké střevo, srdce, ledviny	endogenní monoaminy (dopamin, serotonin), adenosin, tryptamin	adenosin, MPP+, metformin, 5-HT	metformin	decynium-22, lopinavir, NBMPR, chinidine, dipyridamol, dilazep

ABC transportéry

Lidský genom nese 49 genů pro ABC (z angl. ATP-binding cassette) transportéry, výsledné proteiny jsou složeny z 1 200 – 1 500 aminokyselinových zbytků s molekulovou hmotností v rozmezí 140 – 180 kDa [17, 78, 79]. Tato rodina čítá sedm podrodin definovaných strukturální podobností (pozice domén), umístěním v genomu a homologii aminokyselin (ABCA-ABCG) [79, 80].

ABC transportéry pumpují přenášené molekuly **proti koncentračnímu spádu za účasti hydrolýzy** ATP své substráty ven z buňky nebo z/do buněčných organel [81-83]. Spektrum substrátů, které mohou přenášet je poměrně široké od malých anorganických a organických molekul (aminokyseliny, sacharidy, nukleosidy nebo vitaminy) zvládají transportovat i velké organické sloučeniny jako jsou peptidy, oligonukleotidy, polysacharidy či lipidové struktury [84, 85].

Významnými, a zároveň nejlépe popsányi zástupci lokalizovanými v apikální membráně placentární bariéry jsou efluxní ABC transportéry, **P-glykoprotein** (P-gp, ABCB1), **Breast Cancer Resistance Protein** (BCRP, ABCG2) a **Multidrug Resistance Protein 2** (MRP2, ABCC2) [86-88], kde se podílejí na protekci placenty a vyvíjejícího se plodu tím, že zabraňují transportu potenciálně toxických látek přes apikální membránu syncytiotrofoblastu [83, 89]. Všechny tyto zástupce nalezneme i v dalších tkáních. Ve střevě mohou omezovat absorpci látek, v ledvinách a játrech urychlují exkreci, a také limitují vstup hematoencefalickou či hematotestikulární bariérou. **ABCB1** patří mezi nejlépe popsané transportéry vůbec a byl objeven v souvislosti s **mnohočetnou lékovou rezistencí**. Jeho aktivita a substrátová specifita je často spjata s cytochromy P450 rodiny 3A, a zároveň je funkce obou regulována zejména za pomoci **pregnanového receptoru X (PXR)** [79]. Placentární ABCB1 hraje roli v ochraně plodu tím, že funguje jako efluxní pumpa pro celou řadu pro plod toxických látek (např. cytostatika, antibiotika, antivirotika, antiepileptika, antiarytmika) [89]. Míra jeho exprese v lidském syncytiotrofoblastu v průběhu gestace klesá [31]. **ABCG2 je také transportérem spojeným s mnohočetnou lékovou rezistencí** a zodpovídá především za transport látek steroidní povahy (např. cholesterol, estradiol, progesteron a testosteron) a organické anionty, z léčiv jsou to pak často substráty vykazující zároveň afinitu k ABCB1, například cytostatika, antivirotika, antibiotika, hypolipidemika či perorálních antidiabetika [89]. Jeho exprese je v placentě regulována steroidními látkami, cytokiny a růstovými faktory, s mechanismy zahrnující peroxisom proliferátory-aktivující receptory (**PPARs**), hypoxií indukovaný faktor1 (**HIF-1**), **PXR a nukleární faktor kappa b** [90-92]. V průběhu těhotenství je mRNA ABCG2 exprimována relativně konstantně, avšak hladiny proteinu mají s pokročilejší fází

gestace tendenci narůstat. Stejně tak i jeho inter-individuální variabilita [93]. Podrodina ABCC transportérů je značně diverzifikována a její zástupci tak vykazují různé funkce. **ABCC2 je extenzivně exprimován v játrech**, kde napomáhá exkreci zejména toxických léčiv ve formě konjugátů (nejčastěji s kyselinou glukuronovou) do žluči, avšak tuto funkci plní i v **lidské placentě** [79, 94], kde aktivně zbavuje syncytiotrofoblast cytostatik, antivirotik, antiepileptik nebo některých antihypertenziv tím, že umožňuje jejich přechod do krevního oběhu matky [89]. Regulace jeho exprese v syncytiotrofoblastu není doposud široce popsána, známá je její indukce ethinylestradolem [92].

1.2.2. Role transportérů v lékových interakcích

Jak bylo popsáno výše, lékové transportéry můžeme nalézt ve všech tkáních těla, kde jejich funkce může být influxní, efluxní i ekvilibrační. Podílejí se na absorpci, distribuci, eliminaci a v určitém smyslu i metabolismu xenobiotik. Jejich význam v bariérových orgánech tkví zejména v tom, že **limitují nebo naopak umožňují prostup do citlivých tkání** (mozek, varlata, plod). Velké množství membránových transportérů nalezneme také v játrech a ledvinách kde se podílí na detoxikaci. Jejich substrátová specifita se různí, avšak velká část transportérů je schopna přenášet molekuly různorodé povahy, stávají se tak místem lékových interakcí. Se zvyšující se evidencí o jejich vlivu na různá xenobiotika se také zvyšuje potřeba tyto transportéry studovat, neboť mohou významně ovlivňovat farmakokinetiku léčiv a mohou být místem lékových interakcí [19, 95]. Riziko takových interakcí se přirozeně zvyšuje při současném užívání více než dvou léčiv, a **právě takovým terapeutickým přístupem je i kombinační terapie** (Tabulka 3) v případě léčby závažných virových infekcí jako je HIV a HCV [3, 4, 6]. Bezpečnost a efektivita kombinačních režimů je nezdědka přímo závislá na výskytu lékových interakcí na membránových transportérech. U těhotných žen, kde je limitujícím orgánem prostupu léčiv k plodu placenta, je funkce transportních proteinů spojená také s účinností a bezpečností ve vztahu k plodu.

1.3 Metody studia transportu látek placentou

Studium transportních mechanismů v placentě, případně jejich ontogeneze a regulace přímo u těhotných žen, je z etických důvodů velmi omezeno. Analýzou mateřské a pupečnickové krve v době porodu lze získat informaci o materno-fetálních koncentracích léčiv na konci gestace. Tímto přístupem však nelze kvantifikovat zapojení placentárních mechanismů podílejících se na placentární kinetice, podobně jako to nelze zjistit pomocí klinických observačních studií. Identifikaci jednotlivých mechanismů je však možné provést experimenty *in vitro*, *ex vivo* a/nebo *in situ*. *Ex vivo perfúze lidské placenty* je model velmi blízký k fyziologickým podmínkám, nicméně

pro malou dostupnost vhodného biologického materiálu je možné též placentu zpracovat pro *in vitro* experimenty. Lze preparovat celé různé části vilózní tkáně a studovat tak uptake do relativně velkých a **kompaktních fragmentů** preparovaných z čerstvé placenty v různé fázi gestace, případně izolovat tkáň a následně připravit **vezikuly z placentárního trofoblastu** (z apikální či bazální membrány), čímž se významně navýší počet využitelných vzorků. Obě metody jsou poměrně náročné na techniku, ale přináší výhodu skutečné lidské tkáně. U fragmentové metody je také zachována přirozená struktura placenty jako funkční jednotky. Na rozdíl od fragmentů lze u vezikul připravených z izolovaného syncytiotrofoblastu studovat vybrané transportéry lokalizované v apikální či bazální membráně. Dalšími experimentálními modely jsou *in situ* **duálně perfundovaná potkaní placenta**. Tento unikátní model nabízí komplexitu živého organismu, je finančně a technicky méně náročný v porovnání s experimenty na lidské placentě a lze sledovat materno-fetální i feto-maternální transport skrze placentu, a to i v přítomnosti více substrátů. Přes shodnou lokalizaci nejvýznamnějších ABC transportérů je však nutné brát v potaz mezidruhové rozdíly v anatomii, fyziologii, v míře zastoupení jednotlivých transportérů atd. *In vitro* metodiky jsou obecně jednodušší na techniku a manipulaci, avšak nedovolují pozorování inter-individuální variability. V případě studia interakcí s placentárními transportéry můžeme jmenovat především **buněčné linie odvozené od lidského choriokarcinomu** (BeWo, BeWo b30, JEG-3). Tyto buňky velmi dobře simulují buňky lidského trofoblastu, avšak pozorujeme zde odlišnost v expresních profilech transportérů oproti lidské placentě. Buněčnou linii BeWo b30 lze dokonce kultivovat v monovrstvě na semi-permeabilní membráně, což umožňuje studium transepiteliálního transportu [31, 96]. Dalším typem buněk vhodným pro studium interakce s vybranými transportními proteiny jsou buňky odvozené od linie psích ledvinných buněk (**MDCKII linie**), které jsou autoritami (FDA, EMA) doporučovány jako vhodný model pro studium lékových interakcí na bariérách obecně. Využívá se linií, které po genetické modifikaci exprimují jeden z požadovaných lidských transportérů, čímž nabízí možnost kvantifikace dané lékové interakce. Na semipermeabilní membráně tyto buňky tvoří monovrstvu, díky které lze studovat přestup látek mezi kompartmenty jak donor-akceptorovým způsobem, tak v ekvilibriu [89]. Jejich nevýhodou však může být možné zapojení endogenních psích transportérů do studované interakce [97, 98].

Kombinace výše zmíněných metod je nevyhnutelná pro komplexní pohled na problematiku přestupu léčiv přes placentu na konci gestace a pro odhad placentární kinetiky léčiv v časnějším fázích těhotenství.

1.4 Infekce HIV a HCV

HIV infekce a AIDS

Z epidemiologických dat přelomu let 2018 a 2019 je patrné, že HIV se svými až čtyřiačtyřiceti miliony nakaženými stále představuje celosvětové riziko [99]. Virus lidské imunodeficience patří do podčeledi *Lentivirinae* rodiny *Retroviridae* a tvoří jej pouze devět genů [100]. Podobně jako u dalších retrovirů, *gag* geny HIV-1 a HIV-2 kódují strukturální proteiny jádra (p24, p7, p6), matrix (p17) a tzv. *env* gen kóduje povrchové podjednotky obalového glykoproteinu (gp120 a gp41), které jsou zodpovědné za rozpoznání CD4 receptoru a C-C chemokinového receptoru (CCR5) obsažených v membráně buněk imunitního systému, zodpovědné za fúzi s membránou cílové buňky, díky čemuž je pak virus schopen proniknout do cytoplazmy. Dále v genomu HIV najdeme *pol* oblast, která je zodpovědná za tvorbu enzymů hrajících zásadní roli ve fázi replikace viru – reverzní transkriptázu, která zprostředkovává konverzi virové RNA do DNA, integrázu umožňující vložení virové DNA do hostitelské DNA a proteázu, jež štěpí velké prekurzory Gag a Pol proteinů na finální komponenty a zajišťuje tak zrání viru [101]. Charakteristickou vlastností HIV je **vysoká mutagenita a s ní spojená variabilita** a schopnost uniknout imunitnímu systému hostitele [101]. V prvním stadiu onemocnění (během dvou měsíců od prvoinfekce) se onemocnění projevuje podobně jako chřipka (flu-like syndrom), napadené CD4+ Th-lymfocyty jsou poškozené a imunitní systém reaguje tvorbou protilátek, zvýšením tělesné teploty, otokem uzlin apod. Druhá fáze onemocnění je obvykle bezpříznaková (střídavě se může objevovat zmíněný flu-like syndrom) a trvá až do deseti let od nákazy. Třetí stadium je již rozvinutý AIDS, kde narušený imunitní systém ztrácí své obranné schopnosti. Začínají se projevovat oportunní infekce, nádorová onemocnění a neurologické obtíže. Ve čtvrtém stadiu AIDS jsou pak klinicky plně rozvinuté výše zmíněné symptomy [102].

Hepatitis C (HCV)

Virus hepatitidy typu C patří mezi Hepaciviry z rodiny *Flaviridae*. Je to obalený RNA virus napadající jaterní buňky člověka s vysokou pravděpodobností přechodu z akutní infekce do chronické [103]. Každoročně zemře okolo 400 tisíc nakažených HCV, nejčastěji v důsledku cirhózy a hepatocelulárního karcinomu [104]. V roce **2015 bylo nově diagnostikováno 1.75 milionu** infikovaných, nicméně data o incidenci jsou z důvodu asymptomatické fáze a často i sociálního statusu nakažených zřejmě podhodnocena [104]. Akutní infekce virem hepatitidy C je často, i po své až 12 týdnů dlouhé inkubační době, bez zjevných klinických příznaků. Pravděpodobnost přechodu do chronicity se pohybuje mezi 40 – 100% v závislosti na věku, velikosti infekční dávky, konfekci s HBV či HIV. Ve své chronické fázi se, mimo latentní asymptomatické fáze, projevuje jak

jaterními, tak extrahepatálními symptomy. Ikterický průběh, ženské pohlaví, polymorfismy genu *IL28B* a nízký věk jsou faktory asociované se spontánní eliminací HCV. Po více než půl roce od přenosu již prakticky nedochází k eliminaci viru, při pozitivním průkazu sérové HCV RNA a anti-HCV protilátek tedy můžeme považovat stadium za chronické [105, 106].

1.4.1 HIV a HCV v těhotenství

V období těhotenství se přizpůsobuje farmakoterapie gestačním změnám. Po čas prenatalního vývoje dochází k mnoha změnám nejen v těle plodu, ale významné proměnné nacházíme i ve fyziologii těla matky. Fyziologické změny během těhotenství zahrnují i **alterace, které mohou mít vliv na farmakokinetické parametry** mnoha léčiv, a to na úrovni absorpce, distribuce, metabolismu i exkrece [107]. Mezi nejvýznamnější farmakokinetické parametry, ve kterých se během těhotenství projeví pozměněná fyziologie matky jsou: eliminační poločas, plocha pod křivkou (AUC), biodostupnost, clearance, vaznost na proteiny [108, 109]. Onemocnil-li těhotná žena některým ze zmiňovaných virových onemocnění během těhotenství, anebo otěhotnila pacientka nakažená virem HIV nebo HCV, je nutné brát v potaz významná rizika. Takovými se rozumí například rychlejší rozvoj AIDS nebo zvýšenému riziku jaterního selhání u HCV-infikovaných žen, a samozřejmě riziko přenosu onemocnění na plod [6]. V případě HIV je indikováno okamžité nasazení cART u všech pacientek bez ohledu na počet CD4+ lymfocytů – dochází totiž nejen k terapii matky, ale zároveň se velmi výrazně snižuje riziko přenosu na plod [2-4, 6]. Jedná se o jednoznačně přínosný postup, který prodlužuje život matce a zabraňuje vertikálnímu šíření viru. Nicméně pro další zlepšování efektivity a bezpečnosti jednotlivých farmakoterapeutických postupů je nutné získat klinické informace z obsáhlejšího vzorku pacientek a také o mechanismech podílejících se na placentární kinetice antiretrovirotik [4, 110]. Nejčastějším pozorovaným **nežádoucím účinkem** u novorozenců je nízká porodní váha a vývojové vady. Také výskyt předčasných porodů a náhlých kojeneckých úmrtí může být při cART vyšší [111-113]. Pokud je těhotná zároveň HCV pozitivní, zpravidla se cART nastavená v rámci HIV terapie ponechává, protože žádný z používaných terapeutických režimů při HCV infekci není považován za bezpečný v období těhotenství [2-4, 6].

Mezi preferované cART u gravidních žen bez předchozí antiretrovirální léčby patří režim, kde základem je kombinace (často již ve fixní formě, viz Tabulka 5) dvou léčiv, které snadno pronikají i do fetální cirkulace: abakavir/lamivudin, tenofovir disoproxil fumarát/emtricitabin, tenofovir disoproxil fumarát /lamivudin. Jako třetí léčivo do kombinace k nim se pak nejčastěji

přidává léčivo ze skupiny INSTIs, které přecházejí přes placentu také snadno, dolutegravir či nyní preferovanější raltegravir. Namísto INSTIs lze rovněž použít látky, které neprostupují placentou ve větší míře, a způsobují supresi viru především v krevním oběhu matky. Takovými zástupci jsou například atazanavir či darunavir. V alternativních terapeutických cART režimech (používaných u specifických genotypů nebo u dalších komorbidit) se objevují ještě například efavirenz, rilipivirin či zidovudin [2-4, 6]. Při zvládnání HCV byl pacientkám dle retrospektivních dat podáván v mnoha případech **ribavirin**, přičemž hlášených bezpečnostních rizik bylo jen malé množství, celkový počet farmakovigilančních signálů spojených ribavirinem a těhotenstvím bylo ke dni 2.2.2020 hlášeno pouze 466, a to od roku 1987. Vzhledem k tomu, že pro tyto pacientky zatím neexistuje doporučená léčba a zároveň je **přenos HCV z matky na plod možný v každém stadiu** (z toho 73-92% bývá ve stadiu chronickém) [3, 4, 6], dávají tato data možný prostor pro opětovné zvážení jeho místa v terapii těhotných HCV-pozitivních pacientek a přispět tím ke snížení pravděpodobnosti nákazy plodu [114, 115] (**P4**).

1.4.2 Antivirotika používaná k léčbě HIV a HCV

Léčba je doporučena všem pacientům, včetně těch s nízkou viremíí HIV, v případě žen ve fertilním věku pak léčbu indikujeme jak před otěhotněním, tak v průběhu těhotenství [6, 101, 116]. Přestože byl syntetizován v šedesátých letech minulého století, nejvýznamnějším milníkem pro pacienty nakažené HIV byl rok 1987, kdy FDA v této indikaci schválila léčbu **zidovudinem** [117], řadí se mezi takzvané nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (**NRTIs**) a stal se modelovou molekulou pro vývoj dalších antiretrovirotik. K dnešnímu dni se od té doby guidelines proměňovaly až do podoby nynějších platných terapeutických postupů, podle kterých se pro zajištění efektivity anti-HIV terapie podává kombinovaná antiretrovirová terapie (cART), která se sestává nejméně ze tří léčiv zasahujících do replikace viru různými mechanismy, přičemž nejméně jedno má být látkou s vysokým placentárním prostupem [118, 119]. Takové skupiny strukturně odlišných léčiv jsou: nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (**NNRTIs**), léčiva zacílená na další proteinové struktury jako inhibitory aspartylproteázy (**PIs**) nebo inhibitory integrázy (**INSTIs**). V posledních letech ještě přibýly molekuly s funkcí inhibice **CCR5** a inhibitory fúze. Tento farmakoterapeutický režim (cART) zajišťuje dlouhodobou supresi proliferace viru, čímž je oddálen nebo plně zastaven rozvoj AIDS a je minimalizováno riziko vzniku rezistence. Přehled léčiv a jejich fixních kombinací uveden v Tabulkách 4 a 5.

Antiretrovirová léčba je doporučována všem osobám s HIV pro snížení rizika progresse nemoci a k prevenci dalšího přenosu infekce virem. cART by měla být zahájena u všech pacientů co nejdříve po diagnóze HIV-positivity bez ohledu na aktuální počet CD4+ lymfocytů.

Tabulka 4 Přehled doporučených antivirálních léčiv užívaných dle doporučených postupů lékových agentur.
Zpracováno dle [119].

skupina		zkratka	brand	hlavní nežádoucí účinky	rok schválení
nukleosidové a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy	tenofovir disoproxil fumarát	TDF	Viread	nauzea, zvracení, průjem renální insuficience, pokles kostní denzity KI: adefovir	2001
	tenofovir alafenamid fumarát	TAF	Vemlidy	nauzea, průjem, renální insuficience, pokles kostní denzity (méně pravděpodobně než u TDF)	2018
	abacavir	ABC	Ziagen	hypersenzitivní reakce (5 %)	1998
	zidovudin (azidotymidin)	ZDV (AZT)	Retrovir	anémie, méně neutropenie nauzea xerostomie, pigmentace nehtů myopatie KI: ribavirin	1987
	emtricitabin	FTC	Emtriva	minimálně toxický průjem, nauzea cefalalgie hyperpigmentace dlaní, plosek a nehtů	2003
	lamivudin	3TC	Epivir	minimálně toxický, výjimečně cefalalgie, únava	1995
nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy	efavirenz	EFV	Stocrin	vertigo, nespavost, „živé“ sny, zmatenost exantém KI: vorikonazol, triazolam, p.o. midazolam, boceprevir, simeprevir, třezalka	1998
	etravirin	ETV	Intence	exantém hypersenzitivní syndrom DRESS syndrom, KI: carbamazepin, rifampicin, fenobarbital, fenytoin, simeprevir, třezalka	2008
	rilpivirin	RPV	Edurant	exantém deprese, nespavost, bolest hlavy hepatotoxicita prodloužení intervalu QTc na EKG KI: PPI, carbamazepin, fenobarbital, fenytoin, rifabutin, rifampicin, třezalka	2011
	doravirin	DOP	Pifeltro	poruchy spánku, závratě, deprese KI: carbamazepin, fenobarbital, fenytoin, rifampicin, třezalka	2018

inhibitory aspartylproteázy	lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra	průjem hyperlipidémie elevace aminotransferas KI: warfarin, amiodaron, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2000
	darunavir	DRV	Prezista	exantém, průjem, nauzea KI: warfarin, amiodaron, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2006
	atazanavir	ATV	Reyataz	nepřímá hyperbilirubinémie až viditelný ikterus prodloužení PR na EKG KI: warfarin, amiodaron, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2003
	darunavir/cobicistat	DRV/c	Rezolsta	exantém, průjem, nauzea KI: warfarin, amiodaron, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2015
	atazanavir/cobicistat	ATV/c	Evotaz	nepřímá hyperbilirubinémie až viditelný ikterus prodloužení PR na EKG KI: warfarin, amiodaron, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2015
	fosamprenavir	FPV	Telzir	exantém průjmy KI: warfarin, amiodaron, flekainid, propafenon, rifampicin, midazolam, triazolam, lovastatin, simvastatin, třezalka	2003
inhibitory integrázy	raltegravir	RAL	Isentress	hypersenzitivní reakce průjem, nauzea bolest hlavy, horečka svalová slabost, elevace CK	2007
	raltegravir HD	RAL HD	Isentress HD	hypersenzitivní reakce průjem, nauzea bolest hlavy, horečka svalová slabost, elevace CK	2017
	dolutegravir	DTG	Tivicay	hypersenzitivní reakce hepatopatie nespavost, bolesti hlavy KI: carbamazepin, fenobarbital, fenytoin, ETV, třezalka, zvýšení plazmatické koncentrace metforminu	2013
	elvitegravir	EVG	Vitekta	nauzea, průjem nefropatie KI: rifabutin, rifampicin, triazolam, midazolam, metylprednisolon, ergotamin, prednisolon, triamcinolon, boveprevir, simeprevir, lovastatin, simvastatin, sildenafil, jiná AR léčiva, třezalka	2014
	bictegravir jen v kombinaci s TAF a FTC	BIC	Biktarvy	průjem nauzea bolest hlavy; nedoporučuje se při CrCl	2018
inhibitory vstupu - inhibitor fúze,	enfuvirtid	T-20	Fuzeon	kožní iritace v místě vpichu – bolest a zarudnutí po aplikaci periferní neuropatie (2 %)	2003

antagonista CCR5 a inhibitor připevnění				záněty horních dýchacích cest až pneumonie	
	maraviroc	MVC	Celsentri	bolesti břicha kašel slabost až ortostatická hypotenze KI: rifampicin, telaprevir, třezalka	2007
	ibalizumab	IBA	Trogarzo	možnost vzniku IRIS, průjem, exantém	2018

Tabulka 5 Přehled dostupných fixních kombinací užívaných dle doporučených postupů dle světových lékových agentur.

Zpracováno dle [119].

fixní kombinace		dávkování
Abakavir / lamivudin	Kivexa	1 × (600/300) mg/d
Tenofovir DF/ emtricitabin	Truvada	1 × (300/200) mg/d
Tenofovir AF/ emtricitabin	Descovy	1 × (25/200) mg/d, resp. 1 × (10/200) mg/d
Zidovudin / lamivudin	Combivir	2 × (300/150) mg/d
Zidovudin / lamivudin / abakavir	Trizivir	2 × (300/150/300) mg/d
Lopinavir / ritonavir	Kaletra	2 × (400/100) mg/d nebo 1 × (800/200) mg/d
Darunavir / cobicistat	Rezolsta	1 × (800/150) mg/d
Tenofovir AF / emtricitabin / Darunavir / cobicistat	Symtuza	1 × (10/200/800/150) mg/d
Atazanavir / cobicistat	Evotaz	1 × (300/150) mg/d
Tenofovir DF / emtricitabin / efavirenz	Atripla	1 × (300/200/600) mg/d
Tenofovir DF / emtricitabin / rilpivirin	Eviplera	1 × (300/200/25) mg/d
Tenofovir AF / emtricitabin / efavirenz	Odefsey	1 × (25/200/25) mg/d
Tenofovir DF / lamivudin / doravirin	Delstrigo	1 × (300/300/100) mg/d
Tenofovir AF / emtricitabin / bictegravir	Biktarvy	1 × (25/200/50) mg/d
Abacavir / lamivudin / dolutegravir	Triumeq	1 × (600/300/50) mg/d
Tenofovir DF / emtricitabin / elvitegravir / cobicistat	Stribild	1 × (300/200/150/150) mg/d
Tenofovir AF / emtricitabin / elvitegravir / cobicistat	Genvoya	1 × (10/200/150/150) mg/d
Dalutegravir / rilpivirin	Juluca	1 × (50/25) mg/d

U HCV se před zahájením terapie u běžné populace kromě virologických parametrů nutně stanovuje také pokročilost jaterního postižení a případná další orgánová postižení (jaterní cirhóza a pokročilá fibróza). Mezi virologické parametry přitom u HCV patří nejen standardní stanovení virémie, ale určuje se i genotyp (1 až 6, u genotypu 1 i subtyp 1a či 1b), protože mají význam při volbě léčebného režimu. Podobně jako u HIV, všichni pacienti s chronickou HCV infekcí by měli

být léčeni. Režimy léčby se dělí na bezinterferonové (Tab. 6), které představují optimální léčebný postup pro každého pacienta s chronickou HCV infekcí a ve vybraných individuálních případech na ty, které jsou založené na podání pegylovaného interferonu- α .

Tabulka 6 Přehled dostupných fixních kombinací u jednotlivých genotypů HCV.

Zpracováno dle [4]

KOMBINACE	genotypy HCV				
	genotyp 1	genotyp 2	genotyp 3	genotyp 4	genotyp 5 a 6
SOFOSBUVIR/LEDIPASIVIR \pm RIBAVIRIN	ano	ne	ne	ano	ano
SOFOSBUVIR/VELPATASVIR \pm RIBAVIRIN	ano	ano	ano	ano	ano
OMBITASVIR/PARITAPREVIR/(R) + DASABUVIR \pm RIBAVIRIN	ano	ne	ne	ne	ne
OMBITASVIR/PARITAPREVIR/(R) \pm RIBAVIRIN	ne	ne	ne	ano	ne
GRAZOPREVIR/ELBASVIR \pm RIBAVIRIN	ano	ne	ne	ano	ne
SOFOSBUVIR + DACLATASVIR \pm RIBAVIRIN	ano	ano	ano	ano	ne
SOFOSBUVIR + SIMEPREVIR \pm RIBAVIRIN	suboptimalní	ne	ne	ano	ne

1.4.3 Antivirotika studovaná v rámci této dizertační práce

Antivirální látky studované v předkládané dizertační práci jsou používány v těhotenství, ať už v rámci guidelines nebo jako off label ribavirin. Všechny níže popsané látky mají potenciál k interakci s membránovými transportéry v placentě; s mnohými ABC a SLC transportéry již dříve byly popsány interakce ve smyslu substrátové či inhibiční aktivity.

Zidovudin

Prvním lékem schváleným proti HIV-1 americkou FDA byl zidovudin. Strukturně je odvozen od tymidinu a vykazuje aktivitu nejen vůči HIV-1, ale i dalším patogenům jako např. HIV-2, HTLV-1 (z angl. human T-lymphotropic virus), zvířecí lentivirům, bakteriím rodu *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a dalším [120]. Biodostupnost po perorálním podání je mezi 60 – 70 %. Obsah plochy pod křivkou (AUC) se pohybuje okolo 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$. s T_{max} 0,65 h a plasmatickým poločasem ($t_{1/2}$) blížícím se jedné hodině. Na plasmatické bílkoviny je vázán z 34 – 38 % [121, 122]. Po prostupu do buněk je téměř ihned postupně 3x fosforylován na aktivní metabolit zidovudin-5'trifosfát.

Jeho farmakokinetika je při opakovaném podání (2 mg/kg každých 8 hodin a 10 mg/mg každé 4 hodiny) na dávce nezávislá. Zidovudin dobře přechází přes placentu a jeho poměr mezi

fetální a maternální krvi v době porodu je téměř roven jedné [123-125]. Dnes se využívá zejména v kombinacích s lamivudinem a/nebo abakavirem (Tabulka 7).

Role placentárních transportérů v placentárním přenosu zidovudinu je doposud relativně sporná zejména u ABCB1 [126-128]. Transportní protein ABCG2 se na přestupu zidovudinu podílí [127, 129, 130], kdežto k transportérům ABCC2 a ABCC5 substrátovou afinitu nevykazuje [127, 131]. Ačkoliv starší literatura popisuje placentární přestup zidovudinu jako saturabilní, a navrhuje zidovudin jako substrát nukleosidových transportérů, afinita k ENT1 ani ENT2 se nepotvrdila [132, 133] (P2).

Emtricitabin

Emtricitabin se svým datem schválení FDA, 2003 patří mezi zavedené molekuly [134]. Kromě HIV-1 vykazuje aktivitu i proti virům hepatitidy typu B [135, 136]. Základní farmakokinetika je dobře popsána, je lineární v dávce 100 až 1200 mg. Po perorálním podání se velmi snadno absorbuje z gastrointestinálního traktu a jeho absorpce není ovlivněna potravou. Při opakovaném podávání denní dávky 200 mg dosahuje jeho průměrná koncentrace v plasmě v ustáleném stavu přibližně 2 µg/ml. AUC dosahuje průměrně 9 – 10 µg.h/ml s eliminačním poločasem ($t_{1/2}$) je 8 – 9 hodin. Ovšem eliminační poločas aktivního metabolitu emtricitabin trifosfátu uvnitř buněk je přibližně 38 hodin [135, 136]. Exkrece emtricitabinu samotného kombinací glomerulární filtrace a aktivní tubulární sekrece močí v nezměněné podobě (86%) a proto musí být jeho dávky redukovány u pacientů s poruchou funkce ledvin [135, 137, 138]. Malé procento metabolitů zahrnuje diastereomery 3'-sulfoxidu a jejich glukuronidy. Vazba na plazmatické bílkoviny je u emtricitabinu menší než 4 % [135]. Velmi dobře proniká do tkání, poměr koncentrace emtricitabinu v plodové krvi ku maternální v době porodu se blíží jedné [139]. Dnes se využívá zejména v kombinacích s tenofovirem disoproxil fumarátem, tenofovirem alafenamid fumarátem, darunavirem, efavirenzem a rilpivirinem (Tabulka 5).

Potenciál této molekuly k interakcím s lékovými transportéry byl studován jak na úrovni inhibice, tak substrátové afinity. Emtricitabin je substrátem ABCC1 a SLC47A1 [134, 140-142], ne však ABCB1, ABCC2, ABCG2, SLC22A1 nebo SLC22A2 [142-144]. Byl popsán jako inhibitor ABCC1, ABCC2, ABCC3, avšak bez inhibičního vlivu na ABCB1, ABCG2, SLC22A1 ani SLC22A2 [144-146]. Data o interakcích s nukleosidovými transportéry jsou protichůdná, avšak nepotvrdila se afinita k ENT1 ani ENT2 transportéru [140] (P1).

Abakavir

Syntetický, karbocyklický analog guanosinu používaný od konce 90. let [147, 148]. Jeho aktivní nitrobenzofuranová forma je trifosforylovaný abakavir, tedy karbovir 5'-trifosfát. Toto široce používané léčivo patří mezi léky volby u HLA5701-negativních pacientů při zahajovací terapii HIV infekce i prevenci vertikálního přenosu viru z matky na plod [2, 6].

Abakavir vykazuje lineární farmakokinetiku. Po perorálním podání je rychle absorbován a dosahuje maximální plazmatické koncentrace mezi 4,10 – 5,46 µg/ml. Jeho absolutní biodostupnost po perorálním podání je 83 %, podání s jídlem snižuje jeho C_{max} i T_{max} , ovšem hodnoty AUC ovlivněny nejsou. Abakavir je asi z 50 % vázán na plazmatické bílkoviny. V játrech probíhá jeho extenzivní metabolizace různými enzymy včetně alkohol dehydrogenázy, v druhé fázi metabolismu pak probíhá také glukuronidace. Zodpovědným eliminačním orgánem jsou pro něj tedy játra a jeho eliminační poločas je menší než 2 hodiny. Exkrece metabolitů a parentní látky (méně než 2 % z podané dávky) je majoritně do moči. Eliminační čas jeho farmakologicky aktivní formy CBV-TP má eliminační poločas delší než 20 hodin [148-152].

Abakavir je popsán substrátem ABCB1 a ABCG2 [153] na rozdíl od membránových proteinů ABCC2, SLC22A1 a SLC22A2 k nimž žádnou substrátovou afinitu nevykazuje [129, 144, 153]. Abakavir *in vitro* snižuje uptake nukleosidů, a byl navrženým substrátem placentárního ENT1 [154] (P3).

Tenofovir

Tenofovir (TFV) byl schválen FDA ve formě proléčiva tenofovir disoproxil fumarátu (TDF) v roce 2001 a ve formě alafenamid fumarátu (TAF) v roce 2018. Oba estery zlepšují biologickou dostupnost TFV po podání *per os*. TDF i TAF jsou již dnes na trhu dostupné ve fixních kombinacích (Tabulka 7). TDF a TAF jsou purinová antivirotika, účinná i na HBV. Účinná látka TFV je ve své aktivní formě (difosfát). Poměr koncentrací v krvi matky a plodu na konci gestace dosahuje hodnoty kolem jedné, což naznačuje kvantitativní placentární přestup [139, 155, 156].

Afinita TFV, TDF a TAF k transportérům je rozdílná. TDF i TAF jsou popsány substráty ABCB1, ABCG2, zatímco TFV neinteraguje ani s jedním z nich, avšak je substrátem ABCC4, SLC22A6, SLC22A8 [157-159].

Ribavirin

Ribavirin, purinový analog je jedním z prvních léčiv, která tvořila základ léčebných režimů infekce HCV. K tomuto účelu byl FDA schválen v roce 2002. Vykazuje však širokou *in vitro* aktivitu

vůči RNA i DNA virům, a lze jej použít u všech genotypů HCV [4, 45, 109, 160]. Po jednorázové dávce (400 mg) je dobře absorbován, avšak kvůli extenzivní first-pass metabolizaci v játrech je absolutní biodostupnost mezi 45 – 65 %. Maximálních plasmatické koncentrace (C_{max}) 2,6 μ M dosahuje u zdravých dobrovolníků po 1,5h (T_{max}). Jeho plazmatický poločas dosahuje až 170h, distribuční objem se pohybuje mezi 4500 – 6000 l, přičemž se masivně kumuluje především v příčně pruhovaném svalstvu, játrech a erytrocytech. Jeho vazba na plasmatické proteiny je zanedbatelná [160]. Navzdory kontraindikaci kvůli prokázané teratogenitě na zvířecích modelech (dle FDA nedoporučen k užívání u těhotných žen nebo žen ve fertilním věku bez spolehlivé kontracepce), byl gravidním ženám podáván [114]. Vzhledem k tomu, že dle interim analýzy (ClinicalTrials.gov ID: NCT00114712) nebyl zachycen jasný signál teratogenity spojený s ribavirinem u lidí, a zároveň dle farmakovigilančních dat bylo v souvislosti s ribavirinem a těhotenstvím v rámci jakékoliv blíže nespecifikované kauzality zachyceno 466 hlášení během posledních třiatřiceti let, zůstává kandidátem pro prevenci vertikálního přenosu z matky na plod. V rámci studia ribavirinu byl navrhovaným transportním proteinem ENT1 [161-164] (P2).

2. Cíle práce

Hlavní náplní předkládané dizertační práce bylo **studium nukleosidových a ABC transportérů exprimovaných v placentě** a jejich interakce s významnými antiviroty, která jsou v praxi podávána těhotným pacientkám s diagnostikovanou HIV a/nebo HCV infekcí. Často totiž jejich bezpečnostní profil není kompletní a chybí zde mimo jiné informace o mechanismech jejich přestupu přes placentární bariéru a tím není znám jejich potenciál k farmakokinetickým **lékovým interakcím**.

Dílní cíle shrnuté v této dizertační práci byly:

- i) Evaluace exprese SLC28A v lidské placentě ve vztahu k fázi gestace a efekt vybraných diferenciačních agens za pomoci kvantitativní PCR a využití modelu BeWo buněk
- ii) Popis vlivu nukleosidových transportérů na transplacentární farmakokinetiku antivirotek zidovudinu, emtricitabinu, abakaviru a ribavirinu
- iii) Popis vlivu ABC transportérů (ABCB1, ABCG2, ABCC1) na transplacentární farmakokinetiku ribavirinu
- iv) Popis vlivu dlouhodobé expozice březích samic potkana kmene Wistar antivirotikům tenofoviru a emtricitabinu na expresi Abcb1a, Abcb1b a Abcg2 transportérů v placentě a dalších vybraných orgánech v těle matek i jejich plodů pomocí RT-PCR v reálném čase

3. Podíl předkladatelky na jednotlivých publikacích

P1: Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents.

Jiraskova L, Cerveny L, **Karbanova S**, Ptackova Z, Staud F.

Mol Pharm. **2018 Jul** 2;15(7):2732-2741. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238.

Epub 2018 May 25.

IF₂₀₁₈=3.853 (Q1)

- podíl na části buněčných experimentů

P2: Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine.

Karbanova S, Cerveny L, Ceckova M, Ptackova Z, Jiraskova L, Greenwood S, Staud F.

Placenta. **2017 Dec**;60:86-92. doi: 10.1016/j.placenta.2017.10.011. Epub 2017 Nov

10.

IF₂₀₁₇=2.434 (Q1)

- první autor, realizace *in vitro* experimentů, *in situ* experimentů, *ex vivo* experimentů, analýza dat, příprava manuskriptu, příprava odpovědí oponentům

P3: Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, *SLC29A1*) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta.

Cerveny L, Ptackova Z, Ceckova M, Karahoda R, **Karbanova S**, Jiraskova L, Greenwood SL, Glazier JD, Staud F.

Drug Metab Dispos. **2018 Nov**;46(11):1817-1826. doi: 10.1124/dmd.118.083329.

Epub 2018 Aug

IF₂₀₁₈=3.354 (Q1)

- podíl na sběru lidských a potkaních placent, podíl na části *in vitro* a *ex vivo* experimentů

P4: Transport of ribavirin across the rat and human placental barrier: Roles of nucleoside and ATP-binding cassette drug efflux transporters.

Karbanova S, Cerveny L, Jiraskova L, Karahoda R, Ceckova M, Ptackova Z, Staud F.

Biochem Pharmacol. **2019 May**;163:60-70. doi: 10.1016/j.bcp.2019.01.024. Epub 2019 Feb 2.

IF_{2018/2019}=4.825 (Q1, 1. decil)

- první autor, realizace většiny *in vitro* experimentů, všech *in situ* experimentů, všech *ex vivo* experimentů, analýza dat, příprava manuskriptu, příprava odpovědí oponentům

P5: Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 expression in the placenta and in maternal and fetal organs.

Cerveny L, Neumanova Z, **Karbanova S**, Havlova I, Staud F.

J Pharm Pharmacol. **2016 Jan**;68(1):84-92. doi: 10.1111/jphp.12495. Epub 2016 Jan

4.

IF₂₀₁₆=2.405 (Q2)

- sběr potkaních orgánů, podíl na části *in vitro* experimentů (RT-qPCR)

P6: S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) is not a selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters but also blocks efflux activity of breast cancer resistance protein

Karbanova S, Sorf A, Jiraskova L, Lalinska A, Ptackova Z, Frantisek S, Cerveny L.

Pharm Res. 2020 Feb ;37:58. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-020-2782-5>.

IF_{2018/2019}=3.896 (Q1)

- první autor, provedení *in situ* a části *in vitro* experimentů, příprava manuskriptu, příprava odpovědí oponentům

4. Přehled předkládaných prací s komentářem

P1: Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents.

Jiraskova L, Cervený L, **Karbanova S**, Ptackova Z, Staud F.

Mol Pharm. **2018 Jul 2**;15(7):2732-2741. doi:

10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238. Epub 2018 May 25.

Koncentrační (CNT, SLC28A) a ekvilibrační (ENT, SLC29A) nukleosidové transportéry společně přispívají ke správnému vývoji placenty a také plodu tím, že transportují tělu přirozené nukleosidy nezbytné pro novotvorbu nukleových kyselin. Zároveň mají také schopnost transportovat i léčiva od nukleosidů či nukleotidů odvozená, jako jsou například některé protivirové látky nebo cytostatika. Exprese CNTs může v průběhu gestace kolísat v závislosti na aktuální potřebě vyvíjejících se tkání transportovat nukleotidy, případně další molekuly příbuzné struktury. V rámci této studie jsme pomocí kvantitativní PCR naměřili rozdílné množství mRNA jednotlivých zástupců SLC28A rodiny. V prvním i třetím trimestru je exprimováno nejvíce SLC28A2, avšak celkové množství a interindividuální variabilita je v terminální placentě asi 3x vyšší než během prvního trimestru. Zatímco v první třetině gestace mRNA SLC28A3 v placentě téměř nenalzáme, ve třetím trimestru je zde relativní exprese mRNA patrná. Genová exprese SLC28A1 nebyla ve vzorcích prvotrimestrálních placent detekována vůbec. V terminální fázi těhotenství byly jisté hladiny transkriptů SLC28A1 mRNA v placentě naměřeny, avšak byly velmi nízké. V BeWo buněčné linii jsme pak studovali vliv diferenciačních agens na expresi SLC28A. Testovanými látkami byly 5-azacytidin, tretinoin (ATRA z angl. all-trans-retinoic acid), valproát sodný, butyrát sodný a forskolin. V tomto modelu jsme v základu detekovali relativně vysoké hladiny SLC28A2 i SLC28A3, a také SLC2. 9A1 i SLC29A2. K ovlivnění zmiňovanými chemikáliemi však došlo pouze u mRNA SLC28A2 a SLC28A3. V časně fázi byly jejich hladiny ovlivněny valproátem sodným (ne však butyrátem), 5-azacytidinem, tretinoinem i forskolinem, která způsobil dokonce 25-krát vyšší hladiny SLC28A2 mRNA. Upregulace v tomto transportéru byla také funkčně ověřena zvýšeným vychytáváním jeho přirozeného substrátu adenosinu. Za použití KT-5720 a inhibitorů fosfodiesteráz bylo dále potvrzeno, že významným prvkem v regulační kaskádě SLC28A2 je cesta cyklického adenosin monofosfátu a proteinkinázy A (cAMP/pkA). V kontrastu s SLC28A jsou SLC29A exprimovány konstitutivně, a žádné z použitých agens signifikantně nezměnilo expresi po

24 a 72 hodinách inkubace. Tato práce přináší evidenci, že metylace a aktivace retinoidních receptorů ovlivňují *SLC28A2* i *SLC28A3* transkripci v placentě. Substráty koncentračního nukleosidového transportéru 2 mohou souviset s přemírou aktivace cAMP/pkA kaskády, s predominancí v terminální placentě.

P2: Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine.

Karbanova S, Cerveny L, Ceckova M, Ptackova Z, Jiraskova L, Greenwood S, Staud F.

Placenta. **2017 Dec**; 60:86-92. doi: 10.1016/j.placenta.2017.10.011. Epub 2017 Nov 10.

Zidovudin a emtricitabin jsou velmi dobře tolerovaná antiretrovirotika, rutinně užívaná jak pro léčbu infekce HIV, tak v prevenci materno-fetálního transferu viru. Avšak přes dlouholetou terapeutickou praxi nebyly dosud uspokojivě popsány mechanismy, které se uplatňují v jejich přestupu přes feto-maternální bariéru. Obě studovaná léčiva patří do skupiny od nukleosidů odvozených léčiv, a jsou proto kandidátními molekulami pro studium jejich možné interakce s ekvilibračními nukleosidovými transportéry (ENTs, SLC29A). K ověření této hypotézy jsme využívali jak *in vitro* akumulární eseje na buněčné linii odvozené od lidského choriokarcinomu (BeWo buňky), tak *ex vivo* metodu akumulace do fragmentů vilózní tkáně připravené z čerstvé lidské placenty. Nakonec, pro komplexní *in situ* pohled, jsme studovali také přenos zidovudinu a emtricitabinu přes placentu za pomoci potkaního modelu duálně perfundované terminální placenty. Zablokování ENT transportérů pomocí NBMPR na BeWo buňkách nezpůsobilo změny v nitrobuněčných koncentracích zidovudinu ani emtricitabinu. Tyto výsledky jsme ověřili na modelu využívající fragmenty zralé lidské placenty, ani zde se signifikantní změny v akumulaci testovaných látek neprojevíly. Na modelu duálně přebudovaných potkaních placent v terminálním stadiu gestace jsme nepozorovali změny celkové clearance z matky do plodu, ani z plodu do matky jak v případě zidovudinu, tak emtricitabinu. Žádným z výše jmenovaných experimentálních přístupů jsme nepotvrdili zapojení ekvilibračních nukleosidových transportérů do transplacentárního přenosu antivirotik zidovudinu ani emtricitabinu. Na základě získaných dat lze vyvodit, že průnik těchto léčiv placentou není usnadněn ENT1 ani ENT2 transportéry, a nebudou tedy ani místem případných lékových interakcí zidovudinu a emtricitabinu s dalšími látkami.

P3: Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, *SLC29A1*) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta.

Cervený L, Ptáčková Z, Cečková M, Karahoda R, **Karbanová S**, Jirásková L, Greenwood SL, Glazier JD, Staud F.

Drug Metab Dispos. **2018 Nov**;46(11):1817-1826. doi: 10.1124/dmd.118.083329. Epub 2018 Aug

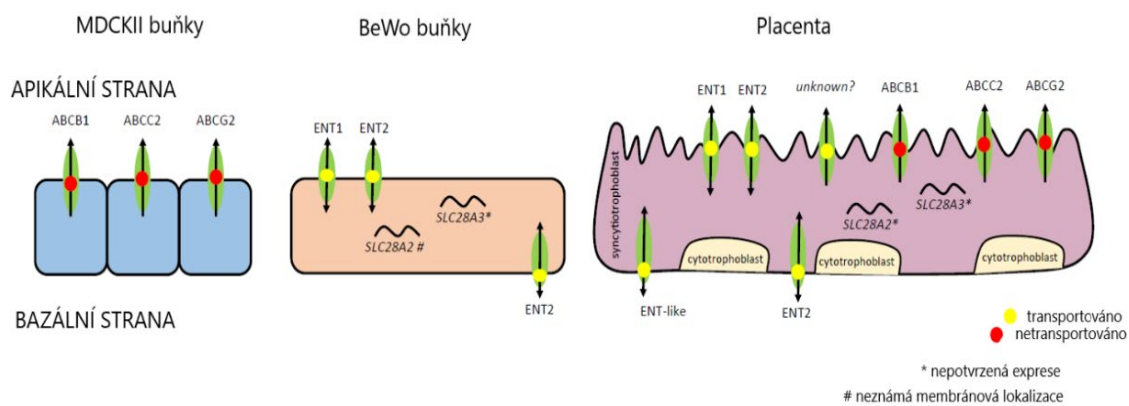
Abakavir, jako jedno z preferovaných léčiv infekce HIV u těhotných žen, se dnes hojně užívá v cART pro prevenci přenosu HIV z matky na plod. Přesto však detailní mechanismy jeho prostupu přes placentární bariéru nebyly protazím detailněji popsány. Abakavir je vzhledem ke své nukleosidové struktuře a fyzikálně-chemickým vlastnostem kandidátním substrátem koncentračních transportérů (CNTs, *SLC28A*), které zprostředkovávají na sodných kationtech závislý transport a/nebo ekvilibračních nukleosidových transportérů (ENTs, *SLC29A*), které umožňují svým substrátům vstup membránou formou facilitované difuze. Danou hypotézu jsme testovali za použití baterie *in vitro*, *ex vivo* a *in situ metodik*. Prvním krokem bylo za pomoci radioaktivně značených fyziologických molekul, [³H]-adenosinu (substrátem ENT1, ENT2, CNT2 a CNT3) a [³H]-tymidinu (substrátem ENT1, ENT2, CNT1 a CNT3) popsat aktivitu sledovaných nukleosidových transportérů na úrovni jejich funkce. Tímto přístupem jsme popsali funkční aktivitu ENT1 a CNT2 v BeWo buňkách. V modelech reprezentujících pouze apikální membránu syncytiotrofoblastu (fragменты z lidské vilózní placentární tkáně a vezikuly z plasmatických membrán mikrovilózní tkáně) jsme naproti tomu potvrdili jen aktivitu jen ENT1 transportéru. V experimentech sledujících uptake [³H]-abakaviru do fragmentů z lidského syncytiotrofoblastu jsme pozorovali signifikantní změny v akumulaci především při zablokované funkci ENT1. V BeWo buněčné linii byl však pozorovatelný také efekt inhibice na sodíku závislého transportu. Vzhledem k průkazu funkční exprese CNT2 v tomto modelu proto spekulujeme o zapojení právě tohoto transportéru. Následně provedené experimenty na modelu duálně perfundované potkaní placenty potvrdily zapojení ENT1 transportéru do přenosu abakaviru přes placentu. Závěrečnou kvantifikací exprese genů pro ENT1 (*SLC29A1*) a ENT2 (*SLC29A2*) v lidské placentární tkáni bylo potvrzeno, že dominantní isoformou pro první i třetí trimestr gestace je *SLC29A2*. Exprese obou genů v průběhu těhotenství se významně nemění, avšak obě isoformy vykazují značnou interindividuální variabilitu. Abakavir je tedy potvrzeným substrátem ENT1 transportéru. Jako další z možných transportérů, který může mít na dispozici abakaviru vliv navrhuje CNT2; míra jeho zapojení a potenciál být místem k interakcím zůstává podkladem k dalšímu výzkumu. Také

efekt interindividuální variability placentárního ENT1 na koncentrace abakaviru ve fetální cirkulaci si zaslouží další rozsáhlejší testování.

P4: Transport of ribavirin across the rat and human placental barrier: Roles of nucleoside and ATP-binding cassette drug efflux transporters.

Karbanova S, Cervený L, Jirasková L, Karahoda R, Cecková M, Ptáčková Z, Staud F. *Biochem Pharmacol.* **2019 May**; 163:60-70. doi: 10.1016/j.bcp.2019.01.024. Epub 2019 Feb 2.

Ribavirin je hydrofilní léčivo odvozené od nukleosidů používané jako širokospektré antivirotikum s největším uplatněním ve farmakoterapii HCV. Dostupná data naznačují, že teratogenní efekt pozorovaný na zvířecích modelech se pravděpodobně neprojevuje u člověka. Nicméně pro nedostatek bezpečnostních dat, zůstává zatím pro použití v těhotenství u HCV infikovaných žen kontraindikován. Z výše zmíněných důvodů je evidentní potřeba získat více dat o jeho možné prenatální toxicitě a mechanismech jeho placentárního přestupu. V této experimentální práci jsme pomocí vybraných *in vitro*, *in situ* a *ex vivo* modelů studovali zapojení nukleosidových transportérů v jeho přestupu přes placentu. Již *in vitro* data získaná pomocí akumulčních studií využívajících buněčnou linii BeWo ukázaly zapojení ENT1 v průniku ribavirinu do buněk odvozených od lidského choriokarcinomu. Následné experimenty využívající čerstvě zpracovanou tkáň z lidských terminálních placent zapojení ENT1 do placentárního vychytávání ribavirinu potvrdily. Těmito metodami jsou i) vezikuly z plasmatických membrán mikrovilózní tkáně reprezentující čistou apikální membránu a ii) izolované fragmenty lidské vilózní placentární tkáně, které si zachovávají přirozenou architekturu vilózního stromu. Zapojení CNTs do tohoto procesu bylo pozorováno pouze na modelu BeWo buněk. Experimenty *in situ* s duálně perfundovanými potkaními placentami v tzv. otevřeném uspořádání podpořily výše jmenované výsledky. Při zablokování ENT transportérů přidáním jejich inhibitoru, NBMPR, jsme pozorovali signifikantní pokles v materno-fetálním i feto-maternálním transportu ribavirinu. Přenos ribavirinu byl významně vyšší ve směru z plodu do matky, což by naznačovalo aktivní transport v tomto směru. Z tohoto důvodu jsme dále testovali významné placentární efluxní transportéry, avšak tyto experimenty nepotvrdily zapojení ABCB1, ABCG2 ani ABCC2 v jeho placentárním transferu. Souhrnné výsledky ze všech modelů shrnuje Obrázek 2. Materno-fetální transfer ribavirinu je významně usnadňován ENT1 transportérem a zároveň ABCB1, ABCG2 ani ABCC2 nesnižují jeho placentární přestup v tomto směru. Nicméně při pohledu na všechna data získaná v rámci této studie se zdá, že transport ribavirinu přes placentu je ovlivňován ještě dalším, dosud blíže nepopsaným transportérem.



Obrázek 2 Expres a funkce jednotlivých transportérů v různých experimentálních modelech.

ABC a nukleosidové transportéry exprimované v lidské placentě, BeWo buňkách a MDCK II buňkách s vyznačenou transportní afinitou ribavirinu k jednotlivým subtypům.

P5: Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Abcg2* expression in the placenta and in maternal and fetal organs.

Cervený L, Neumanová Z, **Karbanová S**, Havlova I, Staud F.

J Pharm Pharmacol. **2016 Jan**;68(1):84-92. doi: 10.1111/jphp.12495. Epub 2016 Jan 4.

Tenofovir a emtricitabin jakožto velmi efektivní a zároveň dobře tolerovaná léčiva reprezentují základ antiretrovirové kombinační terapie pro prevenci prenatálního/perinatálního přenosu viru HIV. Vzhledem k tomu, že terapie HIV pozitivní matky trvá po celou dobu těhotenství, bylo cílem této studie popsat vliv dlouhodobé expozice tenofoviru a emtricitabinu na expresi dvou významných determinant transplacentární farmakokinetiky. Expresi p-glykoproteinu (kódovaný genem *ABCB1*) a breast cancer resistance proteinu (kódovaný genem *ABCG2*) jsme ve vybraných tkáních matek a plodů potkana kmene Wistar studovali po desetidenní expozici (od 12. do 21. dne gestace) vždy jedné z jmenovaných látek. Březím samicím jsme denně aplikovali tenofovir (2,25 mg/kg/den), emtricitabin (3,5 mg/kg/den) nebo fyziologický roztok ve formě i.m. injekce. Ve dni 22 byla pokusná zvířata usmrcena a odebrané orgány (placenta, maternální a fetální tenké střevo, mozek, ledviny a játra) jsme po zvážení promptně homogenizovali za použití tekutého dusíku. Z homogenizovaných tkání jsme vyizolovali celkovou RNA k následné analýze potkaních ortologů pro *ABCB1* a *ABCG2* transportéry. Tyto ortology *Abcb1a*, *Abcb1b* a *Abcg2* jsme analyzovali metodou real-time RT-PCR. V této práci jsme tak popsali expresní profil těchto genů ve všech odebraných orgánech. Naše výsledky ukazují, že dlouhodobé podávání tenofoviru ani emtricitabinu nemá signifikantní vliv na expresi *Abcb1a*, *Abcb1b* a *Abcg2* v žádném ze sledovaných orgánů matek ani jejich plodů. Dalším sledovaným parametrem byl poměr mezi váhou placenty a porodní váhou plodu. V případě tenofoviru jsme pozorovali signifikantní zvýšení tohoto poměru oproti kontrolní skupině. Tento poměr je považován za významný prediktor možných chorob jak u novorozence, tak i v pozdějších letech jeho života. Data získaná touto studií pomohla k rozšíření dat v rámci bezpečnostního profilu obou léčiv, tenofoviru a emtricitabinu, při jejich dlouhodobém podávání v těhotenství.

P6: S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) is not a selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters but also blocks efflux activity of breast cancer resistance protein

Karbanova S, Sorf A, Jiraskova L, Lalinska A, Ptackova Z, Frantisek S, Cervený L. Pharm Res. 2020 Feb ;37:58. doi: 10.1007/s11095-020-2782-5.

S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin (NBMPR) je po celé dekády užíván jako selektivní inhibitor pro ekvilibrační nukleosidové transportéry. Nejčastěji slouží k rozlišení dvou nejvýznamnějších zástupců této skupiny, a to ENT1, který je inhibován koncentrací 0,10 μ M NBMPR a ENT2, jenž reaguje na NBMPR až okolo koncentrace 0,10 mM. V několika předchozích studiích jsme ukázali, že 0,10 mM NBMPR může inhibovat aktivní placentární eflux zidovudinu a tenofoviru disoproxil fumarátu. Na modelu BeWo buněk, kde je potvrzena funkční exprese ABCG2 a zároveň ENT a CNT transportérů se oproti očekávání přidáním 0,10 mM NBMPR zvýšila akumulace zidovudinu i tenofoviru disoproxil fumarátu uvnitř buněk. Proto jsme se rozhodli pro ověření jedné z možných hypotéz, tedy že NBMPR inhibuje některý z placentárních efluxních transportérů. Mezi nejvýznamnější a nejlépe popsané efluxní transportéry v našich modelech patří p-glykoprotein (ABCB1) a breast cancer resistance protein (ABCG2), na ty jsme se tedy v rámci studie blíže zaměřili. Nejprve jsme provedli experimenty ve formě akumulační esaje na buňkách odvozených od linie psích ledvinných buněk (MDCKII), ty jsou transdukovány tak, aby exprimovaly vždy jeden ze zmiňovaných typů transportérů, což umožňuje pozorovat interakci přímo s transportérem zájmu. Schopnost těchto buněk akumulovat substrát ABCB1 a ABCG2, Hoechst 33342 byla pozorována pouze u linie MDCKII-ABCG2, avšak nikoliv u MDCKII-ABCB1 ani u MDCKII-parentní linie. NBMPR v koncentraci 0,10 mM také inhiboval transport radioaktivně značeného léčiva glyburidu přes monovrstvu MDCKII-ABCG2 buněk. V kontextu celého organismu se na modelu duálně perfundované potkaní placenty *in situ* potvrdil efekt 0,10 mM NBMPR na feto-maternální přestup již zmíněného glyburidu terminální potkaní placentou. Výsledky všech provedených experimentů společně prokazují afinitu NBMPR (v jeho běžně užívaných koncentracích pro selektivní inhibici ENT2) také k ABCG2 transportéru. Pro plánování experimentů na modelech společně exprimujících ENT a ABCG2 transportéry je třeba vhodně volit substráty či jinak ošetřit případný vliv inhibice ABCG2 a vyhnout se tak zkreslené interpretaci získaných dat.

5. Souhrn a závěry

V terapii HIV infekce je standardním léčebným postupem co nejčasnější zahájení **cART složené vždy alespoň ze tří léčiv** [6]. Tato medikace se užívá bez výjimky po celou dobu gravidity nejen pro léčbu HIV-pozitivní matky, ale také pro omezení přenosu viru z matky na plod během těhotenství a porodu [6, 111]. Při cART je riziko vzájemného ovlivnění podávaných léčiv velmi vysoké, přičemž jedním z míst možné významné interakce jsou transportní proteiny v placentě. Ačkoliv významně roste klinická evidence užívání cART v těhotenství, tato terapie je stále spjata se závažnými nežádoucími účinky.

Pro **těhotné ženy nakažené HCV doposud žádné doporučené léčebné režimy** nebyly etablovány. Dostupná data naznačují vztah mezi virálním zatížením HCV a jeho vertikální transmisí, lze tedy očekávat při nižší virémii v těle matky menší potenciál přenosu HCV na plod [165, 166]. Stále však není jasný přístup pro snížení rizika přechodu choroby u matky do chronicity ani omezení vertikálního transferu HCV na plod. Je tomu tak zejména z důvodu nedostatečných informací jednak o bezpečnosti anti-HCV léčiv a dále o materno-fetálním přestupu [3, 63].

Abychom mohli u obou těchto závažných zdravotních komplikací zajistit nejenom efektivní léčbu matce, ale také bezpečně zamezit přechodu onemocnění na plod s minimalizací potenciálních nežádoucích efektů na oba jedince, je důležité komplexně popsat děje, které se podílejí na prostupu léčiv placentární bariérou co možná nejdělněji.

Antivirotika s aktivitou proti HIV studovaná v rámci této práce patří mezi léčiva s dlouhou klinickou praxí a jsou také běžně používána u těhotných pacientek při léčbě HIV infekce. Ačkoliv jsou obecně dobře tolerována, pojí se s nežádoucími účinky a jejich užívání může mít vztah k některým onemocněním, která děti matek užívajících cART provázejí i v dospělosti, jako například některá kardiovaskulární onemocnění. Bezpečnostní data anti-HCV léčiva ribavirinu jsou zatím zcela nedostatečná. Současné důkazy však signalizují, že by tato látka mohla být využita pro potlačení HCV infekce u těhotných matek i pro prevenci přenosu HCV na plod.

Vzhledem k chemické povaze zde studovaných léčiv je jednou ze skupin přenašečů, které mohou být místem interakce s antivirotikem rodina nukleosidových transportérů. Tyto transportéry jsou exprimovány v placentě a vykazují schopnost přenosu svých substrátů skrze syncytiotrofoblast. Jedním z hlavních cílů předkládané práce bylo studium interakcí **zidovudinu, emtricitabinu, abakaviru a ribavirinu** s tímto typem transportních proteinů.

Ke zkoumání výše popsaných premis jsme využili řadu experimentálních přístupů. Při ověřování exprese NTs v placentě to byla zejména qRT-PCR a end-point PCR následovaná gelovou elektroforézou. Pro základní screening jsme používali zejména *in vitro* metody – buněčné linie odvozené od lidského choriokarcinomu, ale také MDCKII linie doporučené světovými autoritami (EMA, FDA, ITC) ke studiu interakcí látek s vybranými transportéry, a z modelů odvozených od terminální lidské placenty také metodu vezikulárního transportu. Následovaly modely funkčně či strukturně bližší skutečnému fyziologickému profilu těhotné ženy – metody *ex vivo* a *in situ*.

Při studiu transportérové výbavy placentární tkáně jsme vůbec poprvé přinesli informace o kvantitativní expresi **mRNA CNT2, CNT3, ENT1 i ENT2 v placentě**. V BeWo buňkách jsme popsali přítomnost *SLC28A2* a *SLC28A3* genů. V kontextu dříve publikovaných prací tyto výsledky nekorelují se studii, které popisují v BeWo buněčné linii a lidské placentě pouze *SLC28A3* [167, 168] nebo naopak geny pro všechny tři CNTs [41, 168]. Jak jsme zjistili, placentární exprese **CNTs mRNA se mění s fází gestace**, navíc míra exprese jejich je relativně nízká, což může být jedním z důvodů této diskrepance. V případě BeWo buněk se v podobném smyslu může lišit míra jejich diferenciací v závislosti na kultivačních podmínkách [169-172], což může vést k rozdílech v expresi CNTs. **Nejvyšší míru exprese v placentě** s významným rozdílem oproti zbylým zástupcům má dle našich výsledků **ENT1 - ta se zdá být konstitutivní**, tedy nezávislá na gestaci a přítomnosti diferenciací či epigenetiku ovlivňujících agens. To koreluje s faktem, že po celou dobu gestace je zvýšený energetický metabolismus buněk a zároveň je významná potřeba zásobovat placentu i plod nukleosidy [173, 174]. Přestože v expresi mRNA ENT1 vykazuje výraznou interindividuální variabilitu, jako jediný ze studovaných transportérů byl v našich experimentech potvrzen v apikální membráně syncytiotrofoblastu také na funkční úrovni. Výsledky studia **abakaviru a ribavirinu naznačují, že se ENT1 podílí na jejich transplacentárním přenosu**, přičemž zapojení ENT1 do transportu ribavirinu může vzhledem jeho hydrofilní povaze být zcela zásadní. U abakaviru jsme pozorovali snížené clearance na modelu perfundované potkaní placenty v obou směrech, a zároveň významně sníženému fetu-maternálnímu transportu v témže modelu v uzavřeném uspořádání. Tyto výsledky nás ve světle dříve prezentovaných dat [41, 153, 175, 176] vedly k vyslovení hypotézy nad současným zapojením ENT1 a efluxních ABCB1 a ABCG2. Protože ENT1 je transportérem s velkou kapacitou, ale nízkou afinitou, budou případné lékové interakce abakaviru i ribavirinu na tomto proteinu málo pravděpodobné. Navzdory vodítkům, které naznačují možné zapojení NTs do přenosu sledovaných léčiv **tenofoviru, zidovudinu a emtricitabinu přes placentu** (nukleosidová struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti, významné koncentrace naměřené v plodu i přesto, že jejich transport je limitován některými efluxními

transportéry [18, 56, 127, 153, 177]) **se zapojení NTs neprokázalo**. Ribavirin, který se na potkaním modelu zdá být aktivně transportován ve feto-maternálním směru, a zároveň celkově nedosahuje vysokých fetálních koncentrací, jsme později testovali, zda podobně jako abakavir nemá afinitu k některému z významných lékových přenašečů v placentě ze skupiny ABC transportérů – ABCB1, ABCG2 nebo ABCC2. Na rozdíl od abakaviru, ribavirin ani jedním ze jmenovaných transportován není. Tyto, a další výsledky z dlouhodobého studia lékových transportérů v rámci naší výzkumné skupiny nás zavedly k dalším experimentům: Pomocí vybraných metod jsme cílili na ověření selektivity NBMPR, rutinně používaného inhibitoru, který byl popisován jako selektivní pro ENTs [42, 132, 178-180]. Naše experimenty odhalily, že **NBMPR** v koncentracích běžně používaných pro studium farmakokinetiky ENTs není inhibitor selektivní pouze pro tyto transportéry, ale **inhibuje také ABCG2** protein, který hojně nalézáme i v placentě.

Protože cART je podávána i těhotným pacientkám po celou dobu gestace a často i po porodu, jedním z cílů této dizertační práce byl vliv dlouhodobého podávání antivirotik. Konkrétně jsme volili jednu z nejčastěji podávaných kombinací – tenofoviru a emtricitabinu a vliv jejich dlouhodobé expozice na expresi potkaních ortologů ABCB1 a ABCG2 transportérů (*Abcb1a*, *Abcb1b* a *Abcg2*) nejen v placentě, ale také v dalších vybraných orgánech. Po desetidenní aplikaci nedošlo v placentě, mozku, střevech, ledvinách ani játrech u matek ani jejich plodů k signifikantní alteraci exprese sledovaných ABC transportérů ani u jedné z léčených skupin. V tomto nastavení přinášíme první výsledky, předchozí práce popisují vliv těchto látek na *in vitro* úrovni nebo pouze v krátkodobém horizontu [181-183], ani **dlouhodobá expozice tenofoviru či emtricitabinu nemění expresi *Abcb1a*, *Abcb1b* a *Abcg2***. V tomto experimentu jsme sledovali také poměr hmotnosti plodů a jejich příslušných placent, a není bez zajímavosti, že při dlouhodobé expozici tenofoviru byla signifikantně vyšší hmotnost placent oproti zachované hmotnosti plodů. Tento významný ukazatel může napovídat o možných rizicích a zdravotních komplikacích pro plod od jeho narození až do dospělosti [184-187].

Jak již na začátku roku 2020 nastínila nová doporučení FDA, dle pohledu světových lékových agentur klinický význam transportních proteinů stále narůstá, a budou se nadále zaměřovat na popis interakce nových léčiv s membránovými transportéry. **Data získaná v rámci předkládané dizertační práce rozšiřují dosud nekompletní informace o farmakokinetice daných léčiv v těhotenství a rozšiřují tak jejich bezpečnostní profil. Tyto informace tak přispívají, v rámci HIV a HCV onemocnění, k tvorbě celkové mozaiky problematiky terapie těhotných žen a jejich potomků.**

6. Seznam doposud publikovaných prací kandidátky

6.1 Recenzované publikace v odborných časopisech s IF

Karbanova S, Sorf A, Jiraskova L, Lalinska A, Ptackova Z, Frantisek S, Cerveny L.: *S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) is not a selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters but also blocks efflux activity of breast cancer resistance protein*. Pharm Res. 2020 Feb ;37:58.

Karbanova S, Cerveny L, Jiraskova L, Karahoda R, Ceckova M, Ptackova Z, Staud F. *Transport of ribavirin across the rat and human placental barrier: Roles of nucleoside and ATP-binding cassette drug efflux transporters*. Biochem Pharmacol. 2019 May;163:60-70

Cerveny L, Ptackova Z, Ceckova M, Karahoda R, **Karbanova S**, Jiraskova L, Greenwood SL, Glazier JD, Staud F. *Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, SLC29A1) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta*. Drug Metab Dispos. 2018 Nov;46(11):1817-1826.

Jiraskova L, Cerveny L, **Karbanova S**, Ptackova Z, Staud F. *Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents*. Mol Pharm. 2018 Jul 2;15(7):2732-2741.

Karbanova S, Cerveny L, Ceckova M, Ptackova Z, Jiraskova L, Greenwood S, Staud F. *Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine*. Placenta. 2017 Dec;60:86-92.

Cerveny L, Neumanova Z, Karbanova S, Havlova I, Staud F. *Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 expression in the placenta and in maternal and fetal organs*. J Pharm Pharmacol. 2016 Jan;68(1):84-92.

6.2 Přednášky na odborných konferencích

ENTECAVIR TRANSPORT ACROSS PLACENTA AND THE ROLE OF NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

Sára Karbanová, Lukáš Červený, František Štaud

8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK

Hradec Králové, 24. – 25. 1. 2018.

NBMPR, AN ESTABLISHED SPECIFIC INHIBITOR OF EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS, INHIBITS ABCG2 EFFLUX TRANSPORTER

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Aleš Šorf, František Štaud

7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK

Hradec Králové, 7. – 8. 2. 2017.

TRANSPORT OF RIBAVIRIN ACROSS THE RAT AND HUMAN PLACENTAL BARRIER; ROLE OF NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Ptáčková Zuzana, František Štaud

SOLVO Meet the Experts Transporter Conference

Budapest, Hungary, 11. – 13. 5. 2016

RIBAVIRIN TRANSPORT ACROSS PLACENTA AND THE ROLE OF NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Ptáčková Zuzana, František Štaud

6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK

Hradec Králové, 9. – 10. 2. 2016.

6.3 Postery prezentované na odborných konferencích

AN ESTABLISHED SPECIFIC INHIBITOR OF EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS, NBMPR, INHIBITS ABCG2 EFFLUX TRANSPORTER

Sára Karbanová, Aleš Šorf, Martina Čečková, Lukáš Červený, František Štaud

68. Česko-slovenské farmakologické dny

Hradec Králové, 5. – 7. 9. 2018.

THE ROLE OF NUCLEOSIDE TRANSPORTERS IN ENTECAVIR TRANSPORT ACROSS PLACENTA

Sara Karbanova, Lukas Cervený, Frantisek Staud

22nd North American ISSX Meeting

Montreal, Kanada, 15. – 19. 7. 2018

NBMPR, THE INHIBITOR OF ENTS, IS NEWLY IDENTIFIED AS AN INHIBITOR OF ABCG2 EFFLUX TRANSPORTER

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Aleš Šorf, František Štaud

BioMedical Transporter

Lausanne, Švýcarsko, 6. – 10. 8. 2017

ROLE OF EQUILIBRATIVE AND CONCENTRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS IN TRANSPLACENTAL PERMEATION OF RIBAVIRIN

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Ptáčková Zuzana, František Štaud

66. Česko-slovenské farmakologické dny

Brno, 13. – 15. 9. 2016

PLACENTAL NUCLEOSIDE TRANSPORTERS AND THEIR ROLE IN TRANSPLACENTAL PASSAGE OF RIBAVIRIN

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Ptáčková Zuzana, František Štaud

Toxcon

Stará Lesná, Slovensko, 21. – 24. 6. 2016

TRANSPORT OF RIBAVIRIN ACROSS THE RAT AND HUMAN PLACENTAL BARRIER; ROLE OF NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

Sára Karbanová, Lukáš Červený, Ptáčková Zuzana, František Štaud

SOLVO biotechnology, Meet the Experts Transporter Conference

Budapešť, Maďarsko, 10. – 12. 5. 2016

ENT1 AND ENT2 DOES NOT AFFECT TRANSPORT OF ZIDOVUDINE ACROSS THE PLACENTA

Sára Karbanová, Zuzana Neumanová, Lukáš Červený, František Štaud

65. Česko-slovenské farmakologické dny

Praha, 16. – 18. 9. 2015

NUCLEOSIDE TRANSPORTERS DOES NOT AFFECT TRANSPORT OF ZIDOVUDINE ACROSS THE PLACENTA

Sára Karbanová, Zuzana Neumanová, Lukáš Červený, František Štaud

Toxcon

Brno, 27. – 29. 5. 2015

7. Seznam příloh

- P1:** Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents.
Jiraskova L, Cerveny L, **Karbanova S**, Ptackova Z, Staud F.
Mol Pharm. **2018 Jul** 2;15(7):2732-2741. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00238.
Epub 2018 May 25.
- P2:** Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine.
Karbanova S, Cerveny L, Ceckova M, Ptackova Z, Jiraskova L, Greenwood S, Staud F.
Placenta. **2017 Dec**;60:86-92. doi: 10.1016/j.placenta.2017.10.011. Epub 2017 Nov 10.
- P3:** Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, *SLC29A1*) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta.
Cerveny L, Ptackova Z, Ceckova M, Karahoda R, **Karbanova S**, Jiraskova L, Greenwood SL, Glazier JD, Staud F.
Drug Metab Dispos. **2018 Nov**;46(11):1817-1826. doi: 10.1124/dmd.118.083329.
Epub 2018 Aug
- P4:** Transport of ribavirin across the rat and human placental barrier: Roles of nucleoside and ATP-binding cassette drug efflux transporters.
Karbanova S, Cerveny L, Jiraskova L, Karahoda R, Ceckova M, Ptackova Z, Staud F.
Biochem Pharmacol. **2019 May**;163:60-70. doi: 10.1016/j.bcp.2019.01.024. Epub 2019 Feb 2.
- P5:** Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 expression in the placenta and in maternal and fetal organs.
Cerveny L, Neumanova Z, **Karbanova S**, Havlova I, Staud F.

J Pharm Pharmacol. **2016 Jan**;68(1):84-92. doi: 10.1111/jphp.12495. Epub 2016 Jan 4.

P6: S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) is not a selective inhibitor of equilibrative nucleoside transporters but also blocks efflux activity of breast cancer resistance protein

Karbanova S, Sorf A, Jiraskova L, Lalinska A, Ptackova Z, Frantisek S, Cervený L.

Pharm Res. 2020 Feb ;37:58. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-020-2782-5>.

8. Seznam použité literatury

1. Gray, H., *Gray's anatomy of the human body (1918)*. URL: <http://www.bartleby.com/107/> [accessed November 2010], 1918.
2. Society, E.E.A.C. *Guidelines Version 10.0*. 2019; Available from: <https://www.eacsociety.org/guidelines/eacs-guidelines/eacs-guidelines.html>.
3. UNDOC, W.a., *Implementing comprehensive HIV and HCV programmes with people who inject drugs*. 2017.
4. WHO, *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection*. 2014.
5. Mitchell, A., et al., *Medication use in pregnancy*. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 2001. **10**: p. S146.
6. AIDSinfo, *Recommendations for the Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant Women with HIV Infection and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States*. 2020.
7. Kushner, T. and N.A. Terrault, *Hepatitis C in Pregnancy: A Unique Opportunity to Improve the Hepatitis C Cascade of Care*. *Hepatology*, 2019. **3**(1): p. 20-28.
8. Rampersad, R., M. Cervar-Zivkovic, and M. Nelson, *Development and Anatomy of the Human Placenta*, in *The Placenta*. 2011. p. 17-26.
9. van der Aa, E.M., et al., *Mechanisms of drug transfer across the human placenta*. *Pharm World Sci*, 1998. **20**(4): p. 139-48.
10. Allegaert, K. and J.N. van den Anker, *Editorial: Neonatal Clinical Pharmacology: A Rapidly Maturing Discipline*. *Curr Pharm Des*, 2017. **23**(38): p. 5767-5768.
11. Marta, J., *Hypertextový atlas fetální patologie*. 2010.
12. McElhatton, P.R., *General principles of drug use in pregnancy*. *Pharm J*, 2003. **270**: p. 232-4.
13. Marin, J.J., O. Briz, and M.A. Serrano, *A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs*. *Current drug delivery*, 2004. **1**(3): p. 275-289.
14. Myllynen, P. and K. Vähäkangas, *Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue*. *Toxicology in vitro*, 2013. **27**(1): p. 507-512.
15. Burton, G.J. and A.L. Fowden, *The placenta: a multifaceted, transient organ*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015. **370**(1663): p. 20140066.
16. Hillgren, K.M., et al., *Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2013. **94**(1): p. 52-63.
17. Sai, Y., *Biochemical and molecular pharmacological aspects of transporters as determinants of drug disposition*. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2005. **20**(2): p. 91-99.
18. Kis, O., et al., *The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters*. *Trends in pharmacological sciences*, 2010. **31**(1): p. 22-35.
19. Han, H.-K., *Role of transporters in drug interactions*. *Archives of pharmacal research*, 2011. **34**(11): p. 1865-1877.
20. EMA, *Concept paper on the revision of the guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population*. *EMA/CHMP/448599/2016*. European medicines agency, 2017.
21. EMA, *Guideline on the investigation of drug interactions*. *CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2***. European medicines agency, 2013.

22. EMA, *Work plan for the Pharmacokinetics Working Party (PKWP) for 2018*. EMA/CHMP/365756/2017. European medicines agency, 2018.
23. FDA, *In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*. U.S. Food and Drug Administration, 2020.
24. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nature reviews Drug discovery, 2010. **9**(3): p. 215.
25. Alexander SPH, K.E., Mathie A, Peters JA, Veale EL, Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators, *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20: Transporters*. British Journal of Pharmacology, 2019. **176**(S1): p. S397-S493.
26. Biotechnology, S., *Transporter Book*. EXPERTS ONLY Transporter, ed. s. edition. 2013, Budaörs, Hungary: SOLVO Biotechnology.
27. Young, J.D., *The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey*. Biochemical Society Transactions, 2016. **44**(3): p. 869-876.
28. Baldwin, S.A., et al., *The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 735-743.
29. Gray, J.H., R.P. Owen, and K.M. Giacomini, *The concentrative nucleoside transporter family, SLC28*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 728-734.
30. Young, J.D., et al., *The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29*. Molecular aspects of medicine, 2013. **34**(2-3): p. 529-547.
31. Staud, F. and M. Ceckova, *Regulation of drug transporter expression and function in the placenta*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2015. **11**(4): p. 533-555.
32. Ahmadimoghaddam, D. and F. Staud, *Transfer of metformin across the rat placenta is mediated by organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) protein*. Reprod Toxicol, 2013. **39**: p. 17-22.
33. Gil, S., et al., *P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy*. Placenta, 2005. **26**(2-3): p. 268-70.
34. Meyer zu Schwabedissen, H.E., et al., *Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP)*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(4): p. 524-33.
35. Espinoza, J., A.F. Espinoza, and G.G. Power, *High fetal plasma adenosine concentration: a role for the fetus in preeclampsia?* Am J Obstet Gynecol, 2011. **205**(5): p. 485 e24-7.
36. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
37. Tomi, M., et al., *Role of protein kinase A in regulating steroid sulfate uptake for estrogen production in human placental choriocarcinoma cells*. Placenta, 2014. **35**(8): p. 658-60.
38. Gray, J.H., et al., *Functional and genetic diversity in the concentrative nucleoside transporter, CNT1, in human populations*. Molecular pharmacology, 2004. **65**(3): p. 512-519.
39. Podgorska, M., K. Kocbuch, and T. Pawelczyk, *Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters*. Acta Biochimica Polonica, 2005. **52**(4): p. 749-758.
40. Errasti-Murugarren, E. and M. Pastor-Anglada, *Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(6): p. 809-841.
41. Errasti-Murugarren, E., et al., *Expression and distribution of nucleoside transporter proteins in the human syncytiotrophoblast*. Molecular pharmacology, 2011. **80**(5): p. 809-817.

42. Nishimura, T., et al., *Mechanism of nucleoside uptake in rat placenta and induction of placental CNT2 in experimental diabetes*. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2012: p. 1202130362-1202130362.
43. Smith, K.M., et al., *Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in Xenopus oocytes*. The Journal of physiology, 2004. **558**(3): p. 807-823.
44. Huang, Q.-Q., et al., *Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(27): p. 17757-17760.
45. Pastor-Anglada, M. and S. Pérez-Torras, *Who is who in adenosine transport*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 627.
46. Pennycooke, M., et al., *Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. **280**(3): p. 951-959.
47. del Santo, B., et al., *Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver*. Journal of hepatology, 2001. **34**(6): p. 873-880.
48. Pawelczyk, T., M. Podgórska, and M. Sakowicz, *The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats*. Molecular pharmacology, 2003. **63**(1): p. 81-88.
49. Soler, C., et al., *Lipopolysaccharide-induced apoptosis of macrophages determines the up-regulation of concentrative nucleoside transporters Cnt1 and Cnt2 through tumor necrosis factor- α -dependent and-independent mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(32): p. 30043-30049.
50. Valdés, R., F.J. Casado, and M. Pastor-Anglada, *Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle-dependent nucleoside-derived anticancer drugs*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **296**(3): p. 575-579.
51. Pérez-Torras, S., et al., *Concentrative nucleoside transporter 1 (hCNT1) promotes phenotypic changes relevant to tumor biology in a translocation-independent manner*. Cell death & disease, 2013. **4**(5): p. e648-e648.
52. Kriel, J., et al., *From transporter to transceptor: signaling from transporters provokes re-evaluation of complex trafficking and regulatory controls: endocytic internalization and intracellular trafficking of nutrient transceptors may, at least in part, be governed by their signaling function*. Bioessays, 2011. **33**(11): p. 870-879.
53. Lang, T.T., et al., *Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells*. Molecular pharmacology, 2001. **60**(5): p. 1143-1152.
54. Guillén-Gómez, E., et al., *Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats*. Journal of neurochemistry, 2004. **90**(4): p. 883-893.
55. Errasti-Murugarren, E., M. Pastor-Anglada, and F.J. Casado, *Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs*. The Journal of physiology, 2007. **582**(3): p. 1249-1260.
56. Ritzel, M.W., et al., *Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib)*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(4): p. 2914-2927.
57. Baldwin, S.A., et al., *Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development*. Molecular medicine today, 1999. **5**(5): p. 216-224.

58. Hyde, R.J., et al., *The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms*. *Molecular membrane biology*, 2001. **18**(1): p. 53-63.
59. Boswell-Casteel, R.C. and F.A. Hays, *Equilibrative nucleoside transporters—A review*. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2017. **36**(1): p. 7-30.
60. Wang, C., et al., *Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4)*. *Biochemical pharmacology*, 2013. **86**(11): p. 1531-1540.
61. Minuesa, G., et al., *Drug uptake transporters in antiretroviral therapy*. *Pharmacology & therapeutics*, 2011. **132**(3): p. 268-279.
62. Molina-Arcas, M., F.J. Casado, and M. Pastor-Anglada, *Nucleoside transporter proteins*. *Current vascular pharmacology*, 2009. **7**(4): p. 426-434.
63. Pfeifer, E., et al., *Regulation of human placental drug transporters in HCV infection and their influence on direct acting antiviral medications*. *Placenta*, 2018. **69**: p. 32-39.
64. Pressacco, J., et al., *Effects of thymidylate synthase inhibition on thymidine kinase activity and nucleoside transporter expression*. *Cancer research*, 1995. **55**(7): p. 1505-1508.
65. Pressacco, J., et al., *Modulation of the equilibrative nucleoside transporter by inhibitors of DNA synthesis*. *British journal of cancer*, 1995. **72**(4): p. 939-942.
66. Bicket, A.C., *Underlying mechanisms which regulate Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1): From fundamental forms of regulation to unifying signalling pathways*. 2016.
67. Huang, W., et al., *Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1*. *Protein & cell*, 2017. **8**(4): p. 284-295.
68. Galmarini, C.M., J.R. Mackey, and C. Dumontet, *Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment*. *The lancet oncology*, 2002. **3**(7): p. 415-424.
69. Hu, Q., et al., *FBW7 increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine through upregulation of ENT1*. *Oncology reports*, 2017. **38**(4): p. 2069-2077.
70. Leisewitz, A.V., et al., *Imatinib-resistant CML cells have low ENT activity but maintain sensitivity to gemcitabine*. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 2008. **27**(6-7): p. 779-786.
71. Ueno, H., K. Kiyosawa, and N. Kaniwa, *Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy?* *British journal of cancer*, 2007. **97**(2): p. 145-151.
72. Wiley, J., M. Snook, and G.P. Jamieson, *Nucleoside transport in acute leukaemia and lymphoma: close relation to proliferative rate*. *British journal of haematology*, 1989. **71**(2): p. 203-207.
73. Musa, H., et al., *Immunocytochemical demonstration of the equilibrative nucleoside transporter rENT1 in rat sinoatrial node*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2002. **50**(3): p. 305-309.
74. Baldwin, S.A., et al., *Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(16): p. 15880-15887.
75. Engel, K. and J. Wang, *Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter*. *Molecular pharmacology*, 2005. **68**(5): p. 1397-1407.
76. Engel, K., M. Zhou, and J. Wang, *Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(48): p. 50042-50049.

77. Zhou, M., et al., *Adenosine transport by plasma membrane monoamine transporter: reinvestigation and comparison with organic cations*. Drug metabolism and disposition, 2010. **38**(10): p. 1798-1805.
78. Schmitt, L. and R. Tampé, *Structure and mechanism of ABC transporters*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(6): p. 754-760.
79. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. Human genomics, 2009. **3**(3): p. 281.
80. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Journal of lipid research, 2001. **42**(7): p. 1007-1017.
81. Borst, P. and R.O. Elferink, *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annual review of biochemistry, 2002. **71**(1): p. 537-592.
82. Rees, D.C., E. Johnson, and O. Lewinson, *ABC transporters: the power to change*. Nature reviews Molecular cell biology, 2009. **10**(3): p. 218-227.
83. Schinkel, A.H. and J.W. Jonker, *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**: p. 138-153.
84. ter Beek, J., A. Guskov, and D.J. Slotboom, *Structural diversity of ABC transporters*. Journal of General Physiology, 2014. **143**(4): p. 419-435.
85. Wilkens, S., *Structure and mechanism of ABC transporters*. F1000prime reports, 2015. **7**.
86. Dean, M., *ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2009. **14**(1): p. 3-9.
87. Chen, Z., et al., *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade*. Cancer letters, 2016. **370**(1): p. 153-164.
88. Leonard, G.D., T. Fojo, and S.E. Bates, *The role of ABC transporters in clinical practice*. The oncologist, 2003. **8**(5): p. 411-424.
89. Staud, F., L. Cervený, and M. Ceckova, *Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure*. Journal of drug targeting, 2012. **20**(9): p. 736-763.
90. Malekshah, O.M., et al., *PXR and NF- κ B correlate with the inducing effects of IL-1 β and TNF- α on ABCG2 expression in breast cancer cell lines*. European journal of pharmaceutical sciences, 2012. **47**(2): p. 474-480.
91. Mao, Q., *BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation*. Pharmaceutical research, 2008. **25**(6): p. 1244-1255.
92. Ni, Z. and Q. Mao, *ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta*. Current pharmaceutical biotechnology, 2011. **12**(4): p. 674-685.
93. Yeboah, D., et al., *Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 2006. **84**(12): p. 1251-1258.
94. zu Schwabedissen, H.E.M., et al., *Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation*. Drug metabolism and disposition, 2005. **33**(7): p. 896-904.
95. Endres, C.J., et al., *The role of transporters in drug interactions*. European journal of pharmaceutical sciences, 2006. **27**(5): p. 501-517.
96. Li, H., et al., *Assessment of an in vitro transport model using BeWo b30 cells to predict placental transfer of compounds*. Archives of toxicology, 2013. **87**(9): p. 1661-1669.
97. Kuteykin-Teplyakov, K., et al., *Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport*. British journal of pharmacology, 2010. **160**(6): p. 1453-1463.

98. Wang, Z., et al., *Influence of overexpression of efflux proteins on the function and gene expression of endogenous peptide transporters in MDR-transfected MDCKII cell lines*. International journal of pharmaceutics, 2013. **441**(1-2): p. 40-49.
99. WHO. *Global HIV & AIDS statistics*. 2020 01-02-2020]; Available from: <https://www.who.int/gho/hiv/en/>.
100. Campbell-Yesufu, O.T. and R.T. Gandhi, *Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection*. Clinical infectious diseases, 2011. **52**(6): p. 780-787.
101. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. Annali dell'Istituto superiore di sanita, 2010. **46**: p. 5-14.
102. Simon, V., D.D. Ho, and Q.A. Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. The Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
103. Kim, C.W. and K.-M. Chang, *Hepatitis C virus: virology and life cycle*. Clinical and molecular hepatology, 2013. **19**(1): p. 17.
104. WHO. *WHO HCV statistics*. 2019 27-10-2019]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
105. Puchades Renau, L. and M. Berenguer, *Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies*. Hemodialysis International, 2018. **22**: p. S8-S21.
106. Reid, M., et al., *Contribution of liver fibrosis and microbial translocation to immune activation in persons infected with HIV and/or hepatitis C virus*. The Journal of infectious diseases, 2018. **217**(8): p. 1289-1297.
107. Costantine, M., *Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy*. Frontiers in pharmacology, 2014. **5**: p. 65.
108. Loebstein, R., A. Lalkin, and G. Koren, *Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance*. Clinical pharmacokinetics, 1997. **33**(5): p. 328-343.
109. Soma-Pillay, P., et al., *Physiological changes in pregnancy*. Cardiovascular journal of Africa, 2016. **27**(2): p. 89.
110. McCormick, M.C., *The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity*. New England journal of medicine, 1985. **312**(2): p. 82-90.
111. Fowler, M.G., et al., *Benefits and risks of antiretroviral therapy for perinatal HIV prevention*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(18): p. 1726-1737.
112. Newell, M.-L. and M.J. Bunders, *Safety of antiretroviral drugs in pregnancy and breastfeeding for mother and child*. Current Opinion in HIV and AIDS, 2013. **8**(5): p. 504-510.
113. Uthman, O.A., et al., *Timing of initiation of antiretroviral therapy and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet HIV, 2017. **4**(1): p. e21-e30.
114. Sinclair, S.M., et al., *The Ribavirin Pregnancy Registry: an interim analysis of potential teratogenicity at the mid-point of enrollment*. Drug safety, 2017. **40**(12): p. 1205-1218.
115. WHO-UJP. *VigiAccess*. 2020; Available from: <http://www.vigiaccess.org/>.
116. Suligoi, B., et al., *The epidemic of HIV infection and AIDS, promotion of testing, and innovative strategies*. Annali dell'Istituto superiore di sanita, 2010. **46**: p. 15-23.
117. Brook, I., *Approval of zidovudine (AZT) for acquired immunodeficiency syndrome: a challenge to the medical and pharmaceutical communities*. Jama, 1987. **258**(11): p. 1517-1517.
118. De Clercq, E. and G. Li, *Approved antiviral drugs over the past 50 years*. Clinical microbiology reviews, 2016. **29**(3): p. 695-747.
119. AIDSinfo, *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV*. 2020.
120. McLeod, G.X. and S.M. Hammer, *Zidovudine: five years later*. Annals of Internal Medicine, 1992. **117**(6): p. 487-501.

121. dos Reis Serra, C.H., et al., *Bioequivalence and pharmacokinetics of two zidovudine formulations in healthy Brazilian volunteers: An open-label, randomized, single-dose, two-way crossover study*. Clinical therapeutics, 2008. **30**(5): p. 902-908.
122. PAR, *ZIDOVUDINE*. Public Assessment Report.
123. Bennetto-Hood, C., et al., *Zidovudine, lamivudine, and nelfinavir concentrations in amniotic fluid and maternal serum*. HIV clinical trials, 2009. **10**(1): p. 41-47.
124. Chappuy, H., et al., *Maternal-fetal transfer and amniotic fluid accumulation of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus-infected pregnant women*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2004. **48**(11): p. 4332-4336.
125. Watts, D.H., et al., *Pharmacokinetic disposition of zidovudine during pregnancy*. Journal of Infectious Diseases, 1991. **163**(2): p. 226-232.
126. De Souza, J., et al., *Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers*. Journal of pharmaceutical sciences, 2009. **98**(11): p. 4413-4419.
127. Neumanova, Z., et al., *Role of ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC5 transporters in placental passage of zidovudine*. Biopharmaceutics & drug disposition, 2016. **37**(1): p. 28-38.
128. Shaik, N., et al., *P-glycoprotein-mediated active efflux of the anti-HIV1 nucleoside abacavir limits cellular accumulation and brain distribution*. Drug metabolism and disposition, 2007. **35**(11): p. 2076-2085.
129. Giri, N., et al., *Investigation of the Role of Abcg2/Bcrp1 on Pharmacokinetics and CNS Penetration of Abacavir (ABC) and Zidovudine (AZT) in the Mouse*. Drug Metabolism and Disposition, 2008.
130. Wang, X., et al., *Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein*. Biochemical pharmacology, 2004. **68**(7): p. 1363-1370.
131. Jorajuria, S., et al., *ATP binding cassette multidrug transporters limit the anti-HIV activity of zidovudine and indinavir in infected human macrophages*. Antiviral therapy, 2004. **9**: p. 519-528.
132. Sai, Y., et al., *Characterization of the mechanism of zidovudine uptake by rat conditionally immortalized syncytiotrophoblast cell line TR-TBT*. Pharmaceutical research, 2008. **25**(7): p. 1647-1653.
133. Nishimura, T., et al., *Enhancement of zidovudine uptake by dehydroepiandrosterone sulfate in rat syncytiotrophoblast cell line TR-TBT 18d-1*. Drug metabolism and disposition, 2008. **36**(10): p. 2080-2085.
134. Bousquet, L., et al., *Emtricitabine: inhibitor and substrate of multidrug resistance associated protein*. European journal of pharmaceutical sciences, 2008. **35**(4): p. 247-256.
135. PAR, *EMTRICITABINE*. Public Assessment Report.
136. Saravolatz, L.D. and M.S. Saag, *Emtricitabine, a new antiretroviral agent with activity against HIV and hepatitis B virus*. Clinical infectious diseases, 2006. **42**(1): p. 126-131.
137. Liotta, D.C. and G.R. Painter, *Discovery and development of the anti-human immunodeficiency virus drug, emtricitabine (Emtriva, FTC)*. Accounts of chemical research, 2016. **49**(10): p. 2091-2098.
138. Wang, L.H., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of emtricitabine support its once daily dosing for the treatment of HIV infection*. AIDS Research & Human Retroviruses, 2004. **20**(11): p. 1173-1182.
139. Hirt, D., et al., *Population pharmacokinetics of emtricitabine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their neonates*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**(3): p. 1067-1073.

140. Nakatani-Freshwater, T. and D.R. Taft, *Renal excretion of emtricitabine I: effects of organic anion, organic cation, and nucleoside transport inhibitors on emtricitabine excretion*. Journal of pharmaceutical sciences, 2008. **97**(12): p. 5401-5410.
141. Nakatani-Freshwater, T. and D.R. Taft, *Renal excretion of emtricitabine II. Effect of trimethoprim on emtricitabine excretion: in vitro and in vivo studies*. Journal of pharmaceutical sciences, 2008. **97**(12): p. 5411-5420.
142. Reznicek, J., et al., *Emtricitabine is a substrate of MATE1 but not of OCT1, OCT2, P-gp, BCRP or MRP2 transporters*. Xenobiotica, 2017. **47**(1): p. 77-85.
143. Berg, T., et al., *Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) versus emtricitabine plus TDF for treatment of chronic hepatitis B (CHB) in subjects with persistent viral replication receiving adefovir dipivoxil (ADV)*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2008. **46**(09): p. V21.
144. Jung, N., et al., *Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection*. Drug Metabolism and Disposition, 2008. **36**(8): p. 1616-1623.
145. Storch, C.H., et al., *Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein*. Biochemical pharmacology, 2007. **73**(10): p. 1573-1581.
146. Weiss, J., et al., *Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. Drug metabolism and disposition, 2007. **35**(3): p. 340-344.
147. Hervey, P.S. and C.M. Perry, *Abacavir*. Drugs, 2000. **60**(2): p. 447-479.
148. Yuen, G.J., S. Weller, and G.E. Pakes, *A review of the pharmacokinetics of abacavir*. Clinical pharmacokinetics, 2008. **47**(6): p. 351-371.
149. Chittick, G.E., et al., *Abacavir: absolute bioavailability, bioequivalence of three oral formulations, and effect of food*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 1999. **19**(8): p. 932-942.
150. McDowell, J.A., et al., *Pharmacokinetics of [¹⁴C] abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1999. **43**(12): p. 2855-2861.
151. McDowell, J.A., et al., *Multiple-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of abacavir alone and in combination with zidovudine in human immunodeficiency virus-infected adults*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000. **44**(8): p. 2061-2067.
152. PAR, *ABACAVIR*. Public Assessment Report.
153. Neumanova, Z., et al., *Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir*. Reproductive Toxicology, 2015. **57**: p. 176-182.
154. Li, R.W.S., et al., *Relaxation effect of abacavir on rat basilar arteries*. PloS one, 2015. **10**(4).
155. Best, B.M., et al., *Pharmacokinetics of tenofovir during pregnancy and postpartum*. HIV medicine, 2015. **16**(8): p. 502-511.
156. Colbers, A.P., et al., *The pharmacokinetics, safety and efficacy of tenofovir and emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women*. Aids, 2013. **27**(5): p. 739-748.
157. Neumanova, Z., et al., *Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta*. Aids, 2014. **28**(1): p. 9-17.
158. PAR, *TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARÁT*. Public Assessment Report.
159. PAR, *TENOFOVIR ALAFENAMID FUMARÁT*. Public Assessment Report.
160. PAR, *RIBAVIRIN*. Public Assessment Report.
161. Endres, C.J., et al., *The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1 (-/-) mice*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **331**(1): p. 287-296.

162. Endres, C.J., et al., *The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1 (-/-) mouse erythrocytes*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **329**(1): p. 387-398.
163. Iikura, M., et al., *ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2012. **56**(3): p. 1407-1413.
164. Nishimura, T., et al., *Quantification of ENT1 and ENT2 Proteins at the Placental Barrier and Contribution of These Transporters to Ribavirin Uptake*. Journal of pharmaceutical sciences, 2019. **108**(12): p. 3917-3922.
165. Benova, L., et al., *Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(6): p. 765-73.
166. Yeung, C.Y., et al., *Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives*. World J Hepatol, 2014. **6**(9): p. 643-51.
167. Ma, Z., et al., *Multiple SLC and ABC Transporters Contribute to the Placental Transfer of Entecavir*. Drug Metab Dispos, 2017. **45**(3): p. 269-278.
168. Yamamoto, T., et al., *Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and Xenopus laevis oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters*. Eur J Pharmacol, 2007. **557**(1): p. 1-8.
169. Grden, M., et al., *High glucose suppresses expression of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in rat cardiac fibroblasts through a mechanism dependent on PKC-zeta and MAP kinases*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 151-60.
170. Grden, M., et al., *Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(3): p. 392-8.
171. Leung, G.P., R.Y. Man, and C.M. Tse, *D-Glucose upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2756-62.
172. Valdes, R., et al., *Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1623-30.
173. Huber-Ruano, I., et al., *Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells*. J Cell Physiol, 2010. **225**(2): p. 620-30.
174. Raivio, K.O. and K. Vetteranta, *Changes in trophoblastic purine metabolism with aging of the placenta*. Adv Exp Med Biol, 1989. **253A**: p. 399-406.
175. Barros, L.F., et al., *Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms*. Pflugers Arch, 1995. **429**(3): p. 394-9.
176. Govindarajan, R., et al., *In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2007. **293**(5): p. R1809-R1822.
177. Kell, D.B., P.D. Dobson, and S.G. Oliver, *Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only*. Drug Discov Today, 2011. **16**(15-16): p. 704-14.
178. Cerveny, L., et al., *Interactions of protease inhibitors atazanavir and ritonavir with ABCB1, ABCG2, and ABCC2 transporters: Effect on transplacental disposition in rats*. Reprod Toxicol, 2018. **79**: p. 57-65.
179. Chishu, T., et al., *Potential of various drugs to inhibit nucleoside uptake in rat syncytiotrophoblast cell line, TR-TBT 18d-1*. Placenta, 2008. **29**(5): p. 461-7.
180. Sundaram, M., et al., *Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45270-5.

181. Bousquet, L., et al., *Combination of tenofovir and emtricitabine plus efavirenz: in vitro modulation of ABC transporter and intracellular drug accumulation*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(3): p. 896-902.
182. Svard, J., et al., *Nuclear receptor-mediated induction of CYP450 by antiretrovirals: functional consequences of NR112 (PXR) polymorphisms and differential prevalence in whites and sub-Saharan Africans*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2010. **55**(5): p. 536-49.
183. Weiss, J., et al., *Comparison of the induction of P-glycoprotein activity by nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **579**(1-3): p. 104-9.
184. Barker, D.J., et al., *Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life*. *BMJ*, 1990. **301**(6746): p. 259-62.
185. Eskild, A., C. Haavaldsen, and L.J. Vatten, *Placental weight and placental weight to birthweight ratio in relation to Apgar score at birth: a population study of 522 360 singleton pregnancies*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2014. **93**(12): p. 1302-8.
186. Hemachandra, A.H., et al., *The association between intrauterine growth restriction in the full-term infant and high blood pressure at age 7 years: results from the Collaborative Perinatal Project*. *Int J Epidemiol*, 2006. **35**(4): p. 871-7.
187. Risnes, K.R., et al., *Placental weight relative to birth weight and long-term cardiovascular mortality: findings from a cohort of 31,307 men and women*. *Am J Epidemiol*, 2009. **170**(5): p. 622-31.

9. Přílohy