

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmakologie a toxikologie



**Studium role nukleosidových transportéru v intestinální  
absorpci s využitím *in vitro* transportního modelu založeném  
na buněčné linii Caco-2**

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

konzultant rigorózní práce: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Mgr. Markéta Ďurišová

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma Studium role nukleosidových transportérů v intestinální absorpci s využitím *in vitro* transportního modelu založeném na buněčné linii Caco-2 vypracovala samostatně, pod vedením konzultanta rigorózní práce, za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato rigorózní práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum:

.....

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala konzultantovi rigorózní práce PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a především čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala i Mgr. Ondřeji Martincovi za cenné rady a pomoc s experimentální částí práce. Za příjemnou atmosféru při vypracovávání rigorózní práce bych ráda poděkovala celému kolektivu katedry farmakologie a toxikologie.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Mgr. Markéta Ďurišová

Konzultant: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium role nukleosidových transportéru v intestinální absorpci s využitím *in vitro* transportního modelu založeném na buněčné linii Caco-2.

Primárním místem absorpce je u perorálně podávaných léčiv tenké střevo. Enterocyty, tvořící střevní bariéru, exprimují značné množství transportérů, a to zástupce jak ATP-vázajících (ABC) tak i „solute carrier“ (SLC) transportérů, které mohou významně ovlivnit farmakokinetiku léčiv, které jsou jimi přenášeny. I z toho důvodu je v současnosti FDA a EMA kladen důraz na studium těchto interakcí a jejich vlivu na permeabilitu léčiv.

Cílem předkládané práce bylo studium, zda se ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs), patřící mezi SLC transportéry, podílejí na absorpci nukleosidů (adenosinu a thymidinu) a následně i nukleosidového antiretrovirotika abakaviru (ABC). K experimentu byla využita *in vitro* transportní metoda, která byla provedena na monovrstvě polarizovaných Caco-2 buněk, jež byly kultivovány na mikroporózních membránových filtrech.

Statistickou analýzou námi naměřených hodnot bylo zjištěno, že ačkoliv exprese ENTs byla na apikální straně membrány Caco-2 buněk potvrzena, transport nukleosidů [<sup>3</sup>H]ADE a [<sup>3</sup>H]THY probíhal bez jejich účasti. Statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán ani při porovnání *in vitro* hodnot zkoušeného léčiva abakaviru. Funkční aktivita ENT transportérů tedy nebyla potvrzena.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Markéta Ďurišová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of rigorosum thesis: Study of the role of nucleoside transporters in intestinal absorption with the use of *in vitro* transport method based on the Caco-2 cell line.

Perorally used drugs are primarily absorbed in the small intestine. Enterocytes, forming the intestinal barrier, express a large number of transporters, representing both ATP-binding (ABC) and "solute carrier" (SLC) transporters, which can significantly affect the pharmacokinetics of the drugs transmitted by them. For this reason, FDA and EMA are currently focusing on studying these interactions and their effects on drug permeability.

The aim of this thesis was to investigate whether the equilibrative nucleoside transporters (ENTs), belonging to the SLC transporters, are involved in the absorption of nucleosides (adenosine and thymidine) and subsequently abacavir, the nucleoside antiretroviral. The *in vitro* transport method was performed on polarized, Caco-2 cell monolayer.

By the statistical analysis of acquired data was found, that although the expression of ENTs was confirmed on the apical side of the Caco-2 cell membrane, the transport of nucleosides [3H]ADE and [3H]THY proceeded without their participation. A statistically significant difference was not observed even when comparing the transport data of abacavir. Therefore, the ENTs carrier activity has not been confirmed.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Intestinální bariéra.....</b>	<b>11</b>
3.1.1	Anatomická struktura intestinální bariéry.....	11
<b>3.2</b>	<b>Mechanismy přestupu přes intestinální bariéru .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Role intestinální bariéry v absorpci léčiv .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Lékové transportéry ve střevě.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5</b>	<b>Nukleosidové transportéry – funkce a lokalizace v organismu .....</b>	<b>14</b>
3.5.1	Funkce.....	14
3.5.2	Obecná tkáňová distribuce NTs .....	15
<b>3.6</b>	<b>Koncentrační a ekvilibrační nukleosidové transportéry .....</b>	<b>15</b>
3.6.1	Struktura a lokalizace hCNT.....	16
3.6.2	Struktura a lokalizace hENT .....	17
<b>3.7</b>	<b>Abakavir.....</b>	<b>19</b>
3.7.1	Farmakokinetické vlastnosti .....	19
3.7.2	Abakavir a lékové transportéry .....	20
<b>3.8</b>	<b>Možnosti studia intestinální absorpce a zapojení transportérů v tomto ději</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>HYPOTÉZA .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>Princip užití metody .....</b>	<b>25</b>
<b>6.2</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>26</b>
6.2.1	Kultivační média a chemikálie .....	26
6.2.2	Buňky.....	26
6.2.3	Postup experimentu.....	27

6.2.4	Statistická analýza.....	28
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>29</b>
7.1	<b>Studium permeability ADE (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C .....</b>	<b>29</b>
7.2	<b>Studium permeability ADE (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu .....</b>	<b>30</b>
7.3	<b>Studium permeability THY (2nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C .....</b>	<b>31</b>
7.4	<b>Studium transportu THY (5,4nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu .....</b>	<b>32</b>
7.5	<b>Studium permeability abakaviru (4000 nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C .....</b>	<b>33</b>
7.6	<b>Studium transportu abakaviru (4000 nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu.....</b>	<b>34</b>
7.7	<b>Měření akumulace radioaktivity v membráně monovrstvy Caco-2 buněk – abakavir (4000nM), THY (5,4nM) .....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>36</b>
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>40</b>

# 1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette (ATP-vázající)
ABCB1	P-glykoprotein (P-gp, MDR1)
ABCC2	multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)
ABCG2	breast cancer resistance protein (BCRP)
ADE	adenosin
AZT	zidovudin
Caco-2	human colon adenocarcinoma cell line
CBV-TP	carbovir triphosphate
CNT	concentrative nucleoside transporters (koncentrační nukleosidové transportéry)
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DDIs	drug-drug interactions (lékové interakce)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ENT	ekvilibrační nukleosidové transportéry
FBS	fetální bovinní serum
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
ITC	International Transporter Consortium
MDCKII	Madin Darby Canine Kidney Cells II
NTs	nukleosidové transportéry
OATP	organic anion-transporting polypeptide
$P_{app}$	apparent permeability coefficient



PBS	phosphate buffer saline
PCIS	precision cut intestinal slices
SD	standard deviation
SLC	solute carrier transporters
TEER	transendothelial electrical resistance
THY	thymidin
TJs	tight junctions

## 2 ÚVOD

Perorální podání je v dnešní době dominantním způsobem podání léčiv, ať už z důvodu poměrně snadné technologické formulace či díky pohodlnosti, kterou poskytuje pacientovi (Shekhawat, a další, 2016). Po perorální aplikaci je léčivo v žaludku či tenkém střevě uvolněno a dochází k jeho prostupu do systémové cirkulace. V této fázi, kdy zpravidla dochází k přestupu léčiva přes fyziologické membrány, jsou rozhodujícím faktorem absorpce jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a zároveň i jeho specifická interakce s aktivními transportéry (Muheem, a další, 2014). V naší práci se zaměřujeme především na roli nukleosidových transportérů v intestinální absorpci a na možnosti studia těchto interakcí.

Nukleosidové transportéry jsou i přes intenzivní zkoumání stále jednou z méně probádaných kapitol intestinální absorpce. Ačkoliv jejich funkce byla prokázána například při přestupu látek přes hematoencefalickou bariéru, v případě střeva jsou studie, objasňující jak funkci, tak i lokalizaci NTs, často nedostatečné a jejich výsledky se liší (Baldwin, a další, 1999). Jejich role ve farmakokinetice léčiv a případných lékových interakcí je však v současnosti již nepopiratelná.

V předkládané práci využíváme *in vitro* model založený na buněčné linii Caco-2 buněk pro studium role ENTs (equilibrative nucleoside transporters) v absorpci nukleosidů a nukleosidového antiretrovirotika abakaviru. Statistická analýza dat byla provedena na základě procentuálního transportu zkoušené látky v čase a hodnot permeabilních koeficientů.

## **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1 Intestinální bariéra**

Intestinální bariéra pokrývá v lidském těle povrch o ploše asi 400 m<sup>2</sup> a spotřebuje pro svou správnou funkci přibližně 40 % celkové tělesné energie (Bishoff, 2014). Jedná se o epitelální bariéru tvořenou pevnou lipidovou vrstvou kartáčového lemu enterocytů. Jako většina buněčných membrán, je tato struktura poměrně dobře propustná pro lipofilní látky, zatímco pro látky hydrofilního charakteru tvoří pevnou bariéru (Arrieta, a další, 2006). Díky těmto vlastnostem zabráňuje nechtěné ztrátě vody a elektrolytů, prostupu antigenů a mikroorganismů do těla a to při současné výměně potřebných molekul z vnitřního i vnějšího prostředí. Intestinální bariéra je tedy komplexní vícevrstevný systém zahrnující vnější „fyzickou“ bariéru a vnitřní „funkční“ imunologickou bariéru. Interakcí těchto dvou částí je přirozenou propustností udržován rovnovážný stav (Bishoff, 2014).

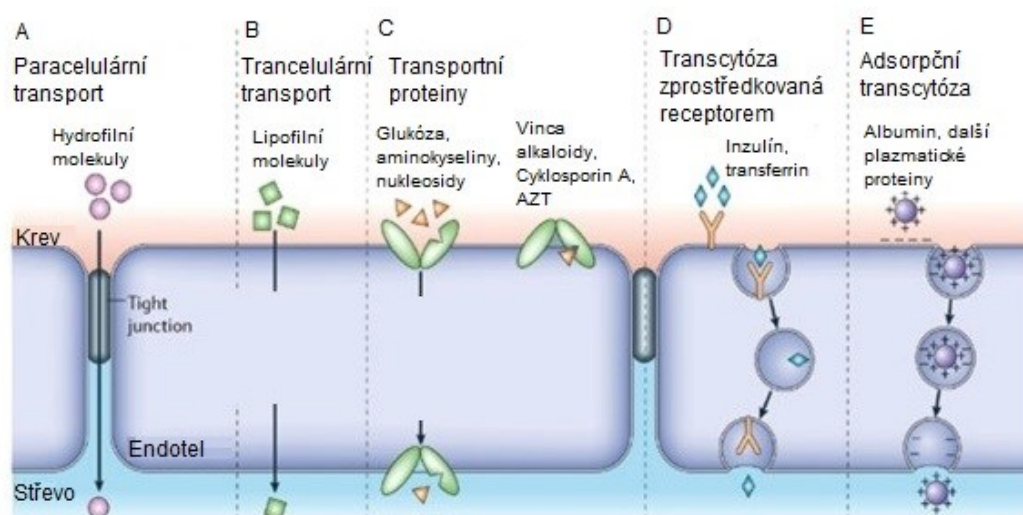
#### **3.1.1 Anatomická struktura intestinální bariéry**

Anatomický podklad bariéry je tvořen čtyřmi vrstvami. Jsou to mukózní a submukózní vrstva, které jsou vzájemně oddělené vrstvou hladké svaloviny (muscularis) a vrstva serózy (Bishoff, 2014). Pro integritu intestinálního epitelu jsou však důležitá především pevná spojení sousedících epitelálních buněk, zabráňující vstupu nechtěných exogenních molekul paracelulární cestou. Nejvýznamnější vliv je přikládán těsným spojením – tight junctions. Tight junctions (TJs) jsou dynamické, polyproteinové struktury nacházející se nejbližší k apikální straně laterální membrány, které regulují paracelulární permeabilitu. Dalšími mezibuněčnými komplexy přispívající k zachování integrity jsou například adherentní spojení, desmozomy či mezerové spoje (Niessen, 2007; Arrieta, a další, 2006).

### **3.2 Mechanismy přestupu přes intestinální bariéru**

Absorpce léčiva je komplexním transportním procesem, skládajícím se z velkého počtu různých mechanismů přestupu (Ferrec, a další, 2001). Tento přestup může probíhat jak cestou paracelulární, především pro malé (MW <100), hydrosolubilní molekuly, tak cestou transcelulární. Transcelulární permeace se zakládá na třech hlavních

způsobech, kterými jsou pasivní difúze, transcytóza a transport zprostředkovaný nosičem. Základní vlastností nutnou pro transcelulární pasivní difúzi léčiva je jeho lipofilita (Muheem, a další, 2014), která je dána rozdělovacím koeficientem oktanol/voda a určuje, jak snadno se molekula pohybuje mezi vodným a lipidovým prostředím (Katzung, 2006). Molekuly s  $\log P < 0$  jsou označovány jako látky s velmi nízkou až žádnou lipofilitou a jejich pasivní přestup je nemožný (Muheem, a další, 2014). Dalšími faktory rozhodujícími o možném mechanismu transportu jsou například hodnota  $pK_a$ , rozpustnost, stabilita, počet volných vodíků i velikost a krystalická struktura molekuly. Vliv na vstřebání léčiv má však i pH střeva, jehož hodnota se v lidském těle pohybuje v průměru od pH 5,6 do pH 8,0. Výsledná absorpce je ovlivněna i krevním průtokem, peristaltikou či přítomností potravy (Ferrec, a další, 2001). Mechanismy transportu jsou znázorněny na Obr.1.



Obr. 1: Mechanismy transportu přes intestinální bariéru. (Převzato a upraveno z publikace (Robinson, a další, 2015)).

### 3.3 Role intestinální bariéry v absorpci léčiv

Rozhodujícím faktorem každé terapeutické intervence je i správné zvolení cesty podání v závislosti na farmakokinetických vlastnostech léčiva (Muheem, a další, 2014). Dominantní zastoupení má v dnešní době podání perorální, a to především díky jeho zřejmým benefitům, jimiž jsou snadné podání pacientovi s minimem dyskomfortu, což

přispívá ke značnému zvýšení adherence pacienta k léčbě, i poměrně snadná, a tedy finančně nenáročná výroba (Shekhawat, a další, 2016).

Pro mnoho orálně podávaných léčiv je tenké střevo primárním místem absorpce (Okayama, a další, 2012). Možnosti permeace hydrofilních léčiv přes intestinální membránu jsou však v současné době stále limitované. Určitého úspěchu bylo dosaženo díky zavedení proléčiv zvyšujících lipofilitu dané molekuly a tím umožňující prostup jejich derivátů přes membránu. Jako slibný přístup se zároveň jeví snaha o navržení proléčiva, které by cílilo na specifické transportéry exprimované epiteliálními buňkami tenkého střeva jako jsou například peptidové transportéry, transportéry aminokyselin či polypeptidové transportéry organických anionů a další. Takováto proléčiva musí být navržena tak, aby kopírovala klíčové struktury známých endogenních substrátů a využila tak zprostředkovaný transport skrze membránu, čímž dochází ke značnému zvýšení jejich absorpce (Yang, a další, 2013; Okayama, a další, 2012).

### **3.4 Lékové transportéry ve střevě**

Pro látky důležité pro funkci buněk (např. aminokyseliny, bílkoviny, glukóza), které jsou natolik velké nebo natolik málo lipofilní, že nedifundují pasivně přes membrány, jsou v enterocytech exprimovány membránové přenašeče. Tyto transportní proteiny se podílejí na absorpci zmíněných esenciálních látek. Zároveň zde existují aktivní transportéry omezující absorpci, které se podílejí na ochraně organismu před nepříznivým vlivem xenobiotik. Na rozdíl od pasivní difúze je transportérem-řízená permeace střeva dějem satureovatelným a inhibovatelným. Všechny transportéry zároveň vykazují určitou míru substrátové specifity (Katzung, 2006).

V současnosti rozlišujeme dvě rozsáhlé, klinicky významné nadrodiny transportérů, a to ABC transportéry (drug efflux ATP-binding cassette transporters) a SLC transportéry (solute carrier transporters) (Koepsell, a další, 2004). V luminální membráně střeva je vysoká exprese především tří zástupců ABC transportérů, a to P-glykoproteinu (P-gp, ABCB1), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2, ABCC2) a BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2). Jejich funkce ve střevě spočívá v presystémové eliminaci léčiv, kdy dochází k “vypumpování“ (effluxu) jejich specifických substrátů z enterocytu zpět do intestinálního lumen. SLC transportéry zahrnují velké množství různých přenašečů, zásadně ovlivňujících farmakokinetiku léčiv. Do dnešního dne je

známo celkem 386 členů SLC transportérů, které se odlišují svojí strukturou, sekvencí a funkcí. Jedná se o například o peptidové přenašeče, dále transportéry organických kationtů a aniontů či nukleosidové transportéry (NTs). Právě NTs jsou v současnosti zajímavou oblastí výzkumu a jejich role v absorpci léčiv je stále nedostatečně objasněna (Estudante, a další, 2013; Koepsell, a další, 2004).

## **3.5 Nukleosidové transportéry – funkce a lokalizace v organismu**

### **3.5.1 Funkce**

Nukleosidové transportéry zastávají v lidském těle významnou fyziologickou roli, kdy umožňují buněčný uptake/eflux nukleosidů potřebných pro biosyntézu nukleových kyselin a nukleotidů. Ovlivněním endogenních koncentrací signálních molekul, jako je například adenosin, mohou regulovat i buněčnou neurotransmisi (Jennings, a další, 2001). V závislosti na mechanismu transportu je obvykle dělíme do dvou skupin, a to ENT (ekvilibrační nukleosidové transportéry) a CNT (koncentrační nukleosidové transportéry) (Estudante, a další, 2013; Koepsell, a další, 2004). ENT pasivně usnadňují pohyb nukleosidů ve směru jejich koncentračního gradientu, zatímco CNT je možné označit jako ko-transportéry, které řídí transport nukleosidů proti jejich koncentračnímu gradientu za využití sodných kationtů (Bicket, a další, 2016). Významným rozdílem těchto dvou skupin je i jejich citlivost vůči inhibitoru nitrobenzylthioinosinu (NBMPR). V případě CNT mluvíme o inhibici velmi slabé a bez klinického významu. Pro ENT je však potenciální citlivost kritériem pro další dělení transportérů, kdy rozlišujeme transportéry typu ENT1, které mohou být inhibovány NBMPR ( $K_i$  0,1-10nM) a ENT2, které jsou při koncentracích NBMPR  $<1\mu\text{M}$  ovlivněny pouze minimálně (Baldwin, a další, 1999).

Jak již bylo zmíněno, CNTs a ENTs přenášejí endogenní substráty, jako jsou adenosin (ADE), thymidin (THY), cytidin, guanosin, uridin, inosin a hypoxantin (Lu, a další, 2004) a v různé míře i jejich analoga. Ačkoliv se substrátová specifita jednotlivých transportérů často liší, není výjimečné ani její překrytí. Obecně lze říci, že CNT upřednostňují své přirozené substráty, v případě CNT1 je preferenční přenos pyrimidinových nukleosidů, v případě CNT2 nukleosidů purinových. ENT1 a ENT2 zprostředkovávají transport obou typů bází, avšak s nižší afinitou (Lu, a další, 2004).

Role NTs v absorpci nukleosidů byla sledována u několika léčiv ze skupiny cytostatik či antiretrovirov (Clarke, a další, 2006; Endres, a další, 2009; Molina-Arcas, a další, 2009) a v současnosti je možné NTs označit za jeden z limitujících faktorů pro vstřebání p.o. podaných léčiv (Govindarajan, a další, 2007).

### **3.5.2 Obecná tkáňová distribuce NTs**

Tkáňová distribuce NTs dokazuje, že savčí buňky obecně exprimují více než jeden typ NTs, a to většinou v kombinaci CNT i ENT v jednom typu buňky. V některých tkáních je fyziologický význam této ko-exprese stále oblastí dalšího zkoumání avšak v určitých tkáních, kde jsou CNT (SL28A) a ENT (SL29A) asymetricky zastoupeny jak na apikální tak bazolaterální straně membrány epitelálních buněk, je díky této ko-expresi zajištěna vektoriální (re)absorpce nukleotidů přes epitel. Tuto domněnku potvrzuje i lokalizace NTs po obou stranách intestinálního traktu a renálního tubulu. Studie využívající fluorescenční značení transportérů ukazují, že exprese CNT je omezena pouze na apikální membránu polarizovaných buněk. V případě ENT je však tvrzení, že jejich exprese je vázána pouze na stranu bazolaterální poměrně kontroverzní. Zatímco hENT2 je dle dostupných zdrojů lokalizován striktně na straně bazolaterální, přítomnost hENT1 je možné sledovat na obou stranách polarizované membrány (Molina-Arcas, a další, 2009).

Díky široké distribuci NTs se předpokládá zásadní role těchto membránových proteinů v regulaci nukleosidové homeostázi, a tím pádem i farmakokinetiky většiny od nich odvozených léčiv včetně antiretrovirov. Distribuce těchto transportérů spolu s jejich specifickou tkáňovou regulací může mít proto zásadní vliv v oblasti farmakologie (Pastor-Anglada, a další, 2015; Molina-Arcas, a další, 2009).

## **3.6 Koncentrační a ekvilibrační nukleosidové transportéry**

NTs v lidském těle jsou kódovány dvěma hlavními typy genů, a to *SLC28A* (CNT) a *SLC29A* (ENT) (Bicket, a další, 2016). *SLC29A* skupina transportních proteinů má čtyři členy a je určena vlastnostmi především jejího prvního objeveného člena, hENT1. Substrátová specifita je zde společná především pro dva zatím nejlépe charakterizované transportéry – hENT1 a hENT2 a zahrnuje facilitovanou difuzi purinových a pyrimidinových nukleosidů. Transport adenosinu je obecně společný pro všechny

členy skupiny, avšak ve schopnosti přenášet ostatní nukleosidy a nukleobaze se jednotlivé transportéry liší (Baldwin, a další, 2004).

Protože ENTs fungují obousměrně, mohou zprostředkovávat nejen uptake, ale i efflux terapeutických analogů nukleosidů. Selektivní inhibice těchto transportérů proto může představovat významné zlepšení efektivity například protinádorové či antivirové terapie (Baldwin, a další, 2004).

Obě skupiny transportérů vykazují určitou strukturální podobnost, ale až tvar a fyzikálně-chemické vlastnosti vazebného místa na transportéru určují, jaká molekula se na něj bude vázat a zda jím bude transportována. Interagující molekuly lze pak dělit na inhibitory, substráty a současně inhibitory/substráty (Abramson, a další, 2009).

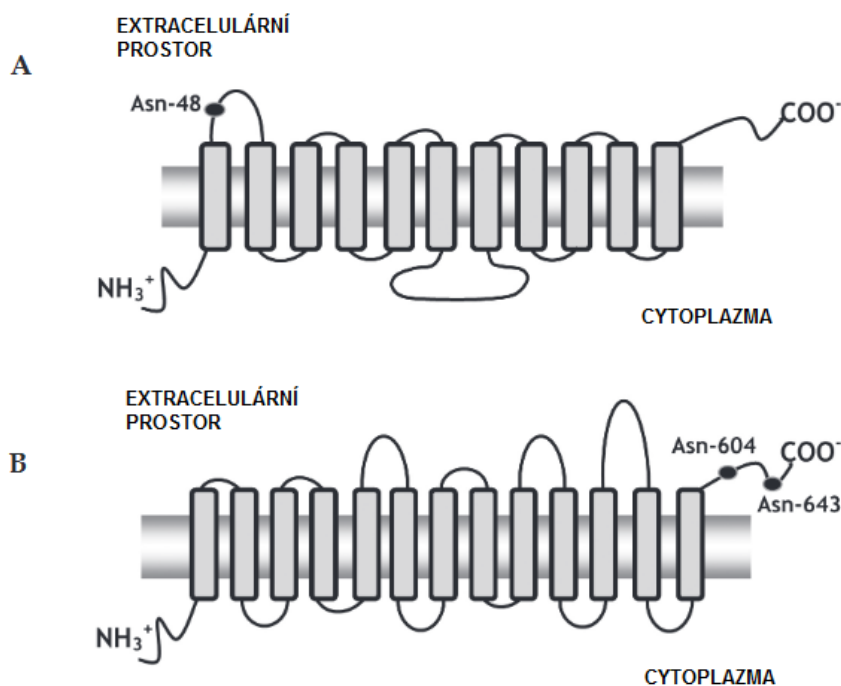
### **3.6.1 Struktura a lokalizace hCNT**

Koncentrační nukleosidové transportéry vykazují o něco méně rozšířenou distribuci oproti ENTs a nacházejí se převážně ve specializovaných buňkách střeva, renálního tubulu či jater. Jako další oblasti, kde byla demonstrována přítomnost CNTs je možné zmínit i mozek, placentu, srdce, kosterní svalstvo či slinivku (Gray, a další, 2004).

Topologický model proteinů hCNT je složen z 13 transmembránových (TM) helixů s N-koncem lokalizovaným v cytoplasmě (Obr2-B.). Místem glykosylace je zde hydrofilní C-konec v extracelulárním prostoru. Experimenty na potkaních CNT1 a CNT2 naznačují, že za substrátovou specifitu je odpovědný především 7 a 9 TM protein a jeho nahrazení může způsobit významné změny v afinitě transportéru (Podgorska, a další, 2005).

Mezi potvrzené substráty hCNT1 patří například několik antivirálně účinných látek jako zidovudin, lamivudin či zalcitabin i látky s cytotoxickým efektem jako cytarabin a gemcitabin. Substráty transportéru hCNT2 nejsou tak hojné, z antivirotik můžeme uvést didanosin a ribavirin, protinádorová léčiva dle dosavadních studií nejsou hCNT2 přenášeny (Gray, a další, 2004).





**Obr. 2: Topologický model hENT1 (A) a hCNT1 (B).** Šedé obdélníky značí transmembránové  $\alpha$ -helixy. Černá kolečka znázorňují glykosylační místa transportéru hENT1 a hCNT1. (Převzato a upraveno publikace (Podgorska, a další, 2005)).

### 3.6.2 Struktura a lokalizace hENT

ENT transportéry sdílí společnou strukturu skládající se z 11 transmembránových domén, s amino zakončením v cytoplasmě a s extracelulárním karboxy koncem (Obr.2-A). hENT1 je schopen N-glykosylace pouze v jedné části, a to mezi doménami 1 a 2, na rozdíl od hENT2, který má v této oblasti N-glykosylační místa dvě.

#### 3.6.2.1 hENT1 – lokalizace a funkce

Lidský ENT1 (hENT1) je složen ze 456 proteinů a zprostředkovává přenos široké škály purinových a pyrimidinových nukleosidů s hodnotami  $K_m$  od 50  $\mu\text{M}$  (adenosin) do 680  $\mu\text{M}$  (cytidin), avšak není schopný přenášet pyrimidinovou bázi uracil (Baldwin, a další, 2004).

hENT 1 je široce distribuován a můžeme ho nalézt v naprosté většině lidských tkání. Studie dokazují, že ačkoli jeho množství v různých tkáních se liší, může být obecně označován jako všudypřítomný (Baldwin, a další, 2004). Jako příklad je možné uvést lidský mozek, kde se tento transportér vyskytuje nejhojněji v čelním a parietálním

laloku (Jennings, a další, 2001), dále je exprimován epiteliálními buňkami střeva či ledvin (Podgorska, a další, 2005). Obecně lze říci, že jeho expresi můžeme sledovat jak na straně bazolaterální, tak na straně apikální, v některých buňkách je však jeho lokalizace striktní. Imunocytochemické studie, prováděné na kůře ledvin krysy, ukazují, že ENT1 je lokalizován výhradně na bazolaterální straně epiteliálních buněk ledvinných tubulů, a to na rozdíl od transportérů CNT, které můžeme nalézt na straně apikální (Hamilton, a další, 2001). Odhaduje se, že díky tomu dokáže ENT1 tandemovým působením s CNT vyvolávat proměnlivé transepiteliální proudění (Baldwin, a další, 2004). V případě enterocytů je přítomnost ENT1 prokázána i na straně apikální (Govindarajan, a další, 2007). Mezi nejvýznamnější dosud známé substráty hENT1 patří především nukleosidové analogy využívané v protinádorové terapii (cytarabin, gemcitabin, merkaptopurin, fludarabin a další). Pro látky z kategorie antivirálních léčiv je transportní kapacita hENT1 značně slabší, můžeme uvést například ribavirin a v malém množství i dideoxyinosin (Pastor-Anglada, a další, 2015).

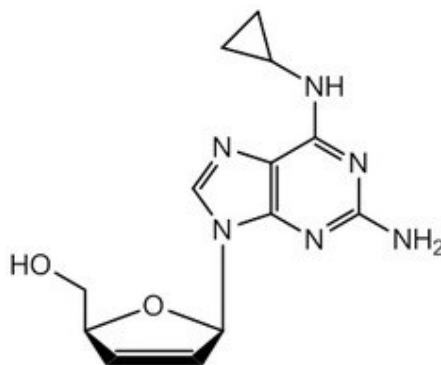
### **3.6.2.2 hENT2 – lokalizace a funkce**

Lidský transportér ENT2 (hENT2) se skládá ze 456 proteinových zbytků a jeho sekvence aminokyselin je asi z 46% identická s hENT1 a je lokalizován v široké škále lidských tkání včetně mozku, srdce, placenty, prostaty či ledvin, avšak nejhojněji se objevuje v kosterním svalstvu (Baldwin, a další, 2004; Griffiths, a další, 1997).

hENT2 přenáší velké množství purinových a pyrimidinových nukleosidů ačkoliv s o něco nižší afinitou než je tomu u hENT1, a to s výjimkou inosinu (Griffiths, a další, 1997). Od hENT1 se významně liší také ve schopnosti přenášet purinové a pyrimidinové báze, které hENT2 transportuje všechny kromě cytosinu (Baldwin, a další, 2004). Dalším klíčovým rozdílem je schopnost hENT2 transportovat Zidovudin (AZT) i vyšší kapacita pro transport ddI (dideoxyinosinu) a ddC (dideoxycytidin), což napovídá, že by mohl ENT2 hrát důležitou roli pro buněčný uptake některých klinických látek používaných právě v terapii HIV (Yao, a další, 2001).

## 3.7 Abakavir

Abakavir je vysoce účinným antiretrovirotikem ze skupiny inhibitorů reverzní transkriptázy, používaným již od roku 1998 a to v dávce 600 mg 1x denně nebo 300 mg 2x denně. Strukturou se jedná o karbocyklický nukleosid 2'-deoxyguanosin, viz Obr. 3, který je v intracelulárním prostředí hostitelské, virem infikované buňky konvertován na aktivní metabolit carbovir trifosfát (CBV-TP), který kompetuje s endogenními nukleotidy a po jeho začlenění do řetězce nukleové kyseliny dochází k předčasné terminaci DNA řetězce (Yuen, a další, 2008).



Obr. 3: Chemická struktura abakaviru. (Převzato a upraveno z publikace (Dolin, a další, 2007)).

### 3.7.1 Farmakokinetické vlastnosti

Abakavir se po perorálním podání velmi rychle vstřebává a vrcholových hodnot koncentrace dosahuje do jedné hodiny po podání. Jeho celková biodostupnost po p.o. podání je asi 83% a není ovlivněna přítomností potravy. Je výrazně metabolizován játry – primárně vlivem alkohol dehydrogenázy, glukuronyl transferázy a karboxylací a udává se, že méně než 2% jsou vyloučena v nezměněné formě močí. Krátký poločas eliminace abakaviru, méně než dvě hodiny, není pro jeho antivirotickou aktivitu omezující, a to z důvodu zmíněného metabolitu CBV-TP, který se vyznačuje poločasem eliminace delším než 20 hodin. Abakavir s největší pravděpodobností není metabolizován jaterním cytochromem P450 (CYP) a není tedy ovlivněn farmakokinetickými interakcemi s léčivy podléhajícími metabolizaci CYP (Yuen, a další, 2008).

### 3.7.2 Abakavir a lékové transportéry

Abakavir je častou součástí kombinované antiretrovirální terapie a je proto nezbytné, abychom znali interakce s lékovými transportéry, které jsou schopné ovlivňovat jeho koncentraci v těle. Je prokázáno, že abakavir je substrátem několika různých transportérů včetně ABCB1 a ABCG2, což může být limitující pro vstup abakaviru přes placentu či hematoencefalickou bariéru (Neumanova, a další, 2015; Giri, a další, 2008). Tuto informaci potvrzují i další studie, které uvádí, že přestup abakaviru přes membrány je ovlivněn i transportéry MRP1, MRP2 a MRP3, i když v menší míře (Weiss, a další, 2007). Další studie dokládají, že transport abakaviru není ovlivňován transportéry pro organické kationty OCT1 ani OCT2 (Jung, a další, 2008), informace o afinitě abakaviru k transportérům pro organické anionty (OATs) dosud nejsou jednotné, obecně se však shodují, že jejich vliv na prostupnost ABC není příliš vysoký a projevuje se především ve spolupráci s ABCB1 (Kis, a další, 2009). Jako nukleosidový analog může být abakavir pravděpodobně ovlivňován i NTs. Dle zatím nepublikovaných studií Červený et al. lze předpokládat, že by abakavir mohl být substrátem ENT1.

## 3.8 Možnosti studia intestinální absorpce a zapojení transportérů v tomto ději

Znalost substrátové specifity a potenciálních inhibitorů lékových transportérů je nutným základem pro určení možných lékových interakcí. Z toho důvodu je i ze strany EMA (European Medicine Agency), FDA (Food and Drug Administration) a ITC (International Transporter Consortium) kladen důraz na studium lékových interakcí na lékových transportérech jak u léčiv v preklinické fázi, tak u léčiv již používaných, u kterých dosud nebyl jejich vliv zkoumán (International Transporter Consortium, 2010; EMA, 2012).

Předpověď prostupu léčiva přes intestinální bariéru je tedy nezbytnou součástí klinického výzkumu nových léčiv. Pro určení těchto hodnot je v současnosti využíváno různých experimentálních postupů, zahrnujících metody *in vivo*, *in situ*, *in vitro* a *ex vivo* (Vastag, a další, 2009).

Využitím *in vivo* modelů je možné dosáhnout integrace dynamických komponent krevní cirkulace i mukózní vrstvy a faktorů ovlivňujících disoluci látky. Díky tomu zde však

současně dochází ke značné variabilitě výsledků, což spolu s časovou náročností a nutností provedení experimentů na relativně velkém počtu zvířat omezuje praktické využití této metody. Nejčastěji využívaným zvířecím modelem jsou potkani, často po genetické modifikaci, kdy je exprese lékového transportéru potlačena (tzv. knock-outs) (Ferrec, a další, 2001).

*In situ* postup, založen na odkrytí břišní dutiny modelu v kompletní anestezii, umožňuje zachování cévní perfuze tenkého střeva při současném zamezení například nechtěného vlivu acidického prostředí žaludku. *In situ* model zároveň umožňuje stanovení hodnot sekrece léčiva po intravenózním podání, stejně tak jako studium zprostředkovaného transportu xenobiotik do lumen střeva vlivem některých transportérů (Ferrec, a další, 2001). Metoda je však značně finančně náročná a klade důraz i na vhodné zvolení anestetika, které může v důsledku ovlivnit i intestinální absorpci (Yuasa, a další, 1993).

Jedním z novějších přístupů jsou metody *ex vivo*, které kombinují výhody *in vivo* experimentů se stabilními *in vitro* postupy (Vastag, a další, 2009). Jedná se zejména o metodu založenou na tenkých potkaních/lidských intestinálních řezech (PCIS - precision cut intestinal slices), techniku „evertovaného“ střeva či tzv. intestinální perfúzi. V současnosti se čím dál častěji setkáváme s využitím PCIS, který představuje mini-model lidského střeva a obsahuje všechny buňky a tkáně přirozeného prostředí, čímž jsou zachovány i intracelulární interakce. Takto izolované fragmenty střeva si zachovávají fyziologické funkce enzymů a exprimovaných transportérů a jeví se tedy jako ideální model pro studium lékových interakcí. Metoda je do jisté míry limitována omezenou životaschopností buněk tkáně i finanční náročností metody (Li, a další, 2016).

Studium mechanismu absorpce lze nejjednodušeji provést na modelu složeném pouze z enterocytů. V současnosti je kladen důraz především na *in vitro* využití epiteliálních buněčných linií, a to především buněk MDCK (Madine-Darby Canine Kidney) a Caco-2 buněk. Caco-2 buňky představují buněčnou linii odvozenou z lidského kolorektálního adenokarcinomu a jsou široce využívány pro studium transportu (Ferrec, a další, 2001). Důvodem pro jejich časté využití je poměrně snadná kultivace na semipermeabilní membráně, která trvá přibližně 21 dnů, při níž dochází ke spontánní diferenciaci a vytvoření polarizované monovrstvy střevních buněk s apikálním kartáčovým lemem i TJs. Caco-2 buňky exprimují i charakteristické

hydrolázy a typické mikrovilární transportéry, díky kterým jsou vhodným modelem pro studium aktivního transportu, facilitované difúze i efluxních systémů (Vastag, a další, 2009). Díky studiím genové exprese je prokázáno, že Caco-2 buňky ve srovnání s buňkami lidského střeva exprimují všech pět hlavních NTs, jejich množství se však může výrazně lišit. Například pro ENT1 je exprese v Caco-2 buňkách asi 25 krát vyšší než je tomu v lidském duodenu, zatímco pro CNT2 je exprese asi stonásobně nižší (Sun, a další, 2002; (Ward, a další, 1999). Nevýhodou Caco-2 buněk je kromě omezené životnosti hlavně snížená exprese CYP3A4, který je v lidském těle přítomen téměř ve všech střevních buňkách (Vastag, a další, 2009; Ferrec, a další, 2001). Na základě *in vitro* modelu založeném na Caco-2 buňkách byla role NTs v absorpci nukleosidů sledována u několika léčiv, a to převážně ze skupiny antivirotik (např. ribavirin), či ze skupiny cytostatik (např. gemcitabin, citarabin či cladribin) (Clarke, a další, 2006; Endres, a další, 2009; Molina-Arcas, a další, 2009). I díky nim je v současnosti možné NTs označit za jeden z limitujících faktorů pro vstřebání p.o. podaných léčiv. Jedna z novějších studií dále s jistotou uvádí expresi ENT1/ENT2 v Caco-2 buňkách a to jak na straně apikální tak i bazolaterální. Přesná lokalizace jednotlivých ENTs však nebyla potvrzena (Senyavina, a další, 2016). což zdůrazňuje nutnost dalších experimentů.

## 4 HYPOTÉZA

Role nukleosidových transportérů, konkrétně ENTs, ve střevní bariéře se zdá být významnou, avšak dosud nepříliš objasněnou oblastí absorpce léčiv. I přes intenzivní zkoumání není doposud jednoznačně určeno v jakém rozsahu ENTs do absorpce zasahují. Některé studie potvrzují kritickou roli ENT1 pro uptake nukleosidových protinádorových léčiv (Clarke et al 2002) jiné naznačují především vliv ENT2 pro vstřebání antivirotik (Yao et al 2001), podrobnější informace dokumentující funkci ENTs v intestinální absorpci však chybí.

## **5 CÍL PRÁCE**

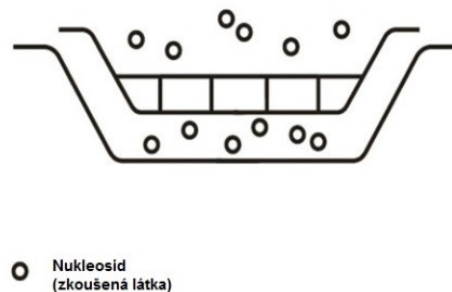
Cílem předkládané práce je pomocí modelových substrátů NTs studovat roli ENTs v přestupu nukleosidů přes monovrstvu tvořenou buněčnou linií Caco-2 a ověřit jejich zapojení v intestinálním membránovém transferu antiretrovirálního léčiva abakaviru.



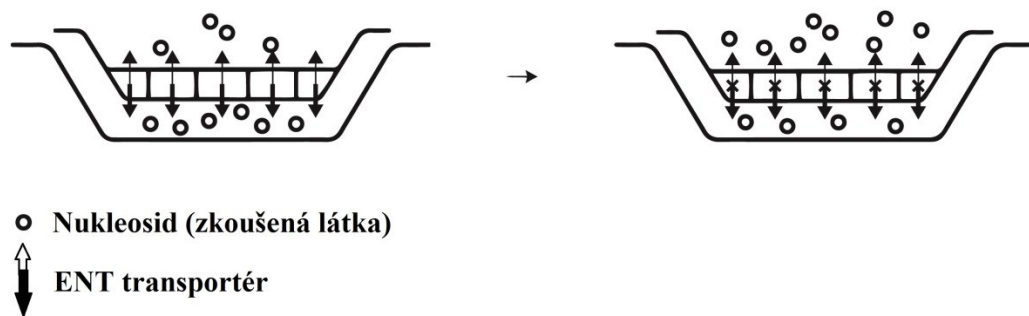
## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Princip užití metody

Pro určení permeability zde byla použita transportní metoda, založená na aplikaci zkoušené látky na apikální stranu monovrstvy polarizovaných epiteliálních buněk a následném měření transportu léčiva přes tuto monovrstvu. Pokud je léčivo substrátem NTs, je možné sledovat jeho sníženou prostupnost v přítomnosti specifického inhibitoru.



Obr. 4: Modelový příklad látky, jejíž transport přes monovrstvu Caco-2 buněk není ovlivňován aktivními transportními mechanismy.



Obr. 5: Modelový příklad látky, jejíž transport přes monovrstvu Caco-2 buněk je ovlivněn transportérem ENT. Znázornění vlivu specifického inhibitoru na transport takové látky.

Pro porovnání transportu zkoušené látky v čase bylo množství látky vyjádřeno buď v procentech, tedy jako poměr naměřené koncentrace k výchozí koncentraci zásobního

roztoku x 100 nebo byly porovnány hodnoty permeabilních koeficientů ( $P_{app}$ ). Hodnoty  $P_{app}$  jsou určeny množstvím transportované látky v čase a jsou zpravidla stanoveny následujícím vztahem (Volpe, 2011):

$$P_{app} (\text{cm s}^{-1}) = \frac{dQ}{dt} \frac{V_r}{A \times C_0}$$

Kde  $dQ/dt$  je poměr procentuálního prostupu látky v čase,  $A$  označuje plochu membránového filtru ( $\text{cm}^2$ ),  $C_0$  je počáteční koncentrace a  $V_r$  je objem akceptorového kompartmentu.

## 6.2 Metodika

### 6.2.1 Kultivační média a chemikálie

- [ $^3\text{H}$ ]Abakavir (Moravek Biochemicals)
- [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (Moravek Biochemicals)
- [ $^3\text{H}$ ]Adenosin (Moravek Biochemicals)
- DMSO (Sigma Aldrich)
- HBSS (Sigma Aldrich)
- DMEM (Sigma Aldrich)
- FBS (Sigma Aldrich)
- Albumin (Sigma Aldrich)
- PBS
- Trypsin (Sigma Aldrich)
- NBMPR (Sigma Aldrich)

### 6.2.2 Buňky

Caco-2 buněčná linie byla získána z institutu ATCC (American Tissue Culture Collection) se sídlem v USA a buňky byly dále kultivovány v DMEM, kompletním mediu s vysokým obsahem glukózy, které bylo obohaceno NEAA (výsledná koncentrace byla 1 % ) a 10 % FBS. Kultivace probíhala v atmosféře 5%  $\text{CO}_2$  při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Buňky byly vysety v hustotě 300 000 buněk na membránu (Transwell® Permeable Support, Corning Incorporated; Cat. No. 3401; plocha

membrány 1,12 cm<sup>2</sup>, velikost pórů 0,4 μm, průměr Snapwell<sup>TM</sup> insertu 12 mm) a kultivovány po dobu 21 dní do plné konfluence. Výměna média (DMEM s 1 % NEAA, 10 % FBS a 1 % P/S) probíhala ve dvoudenním intervalu a zároveň byla kontrolována intercelulární integrita buněk pomocí měření hodnot transendoteliální elektrické rezistence (TEER). Před začátkem experimentu byly buňky omyty fosfátovým pufrům (PBS) (37°C).

Hodnoty TEER monovrstvy byly v den měření v rozsahu 1085-1906 Ω\*cm<sup>2</sup>, integrita buněčné monovrstvy tedy dle dostupných studií nebyla narušena (Rubas, a další, 1995; Hidalgo, a další, 1989).

### 6.2.3 Postup experimentu

Na začátku experimentu byly u buněk změřeny hodnoty TEER a po následném odsátí kultivačního média byly buňky omyty předehřátým fyziologickým roztokem s obsahem fosfátového pufru (PBS, 37 °C). V další fázi experimentu byla provedena pre-inkubace (30 min) v mediu HBSS s/bez inhibitoru NBMPR (0,1 μM a 100 μM); pH media pro apikální kompartment bylo upraveno na hodnotu pH=6,5 a pro kompartment basolaterální pH=7,4. Následně byl pre-inkubační roztok apikálního kompartmentu nahrazen inkubačním roztokem (pH=6,5) obsahující radioaktivně značenou testovanou látku (6,5nM ADE při radioaktivitě 0,15 μCi/ml, 2nM THY při radioaktivitě 0,15 μCi/ml a 5,4nM THY při 0,4 μCi/ml, abakavir byl použit v koncentraci 4000nM pro radioaktivitu 0,4 μCi/ml). Testované koncentrace byly nízké (nesaturační) ENTs a jsou vhodné i vzhledem k citlivosti zvolené metody. Akceptorový kompartment obsahoval po nahrazení roztok HBSS obohacený o 1 % albuminu, pH=7,4. Buňky byly dále inkubovány buď při teplotě 37°C nebo na ledu, kdy dochází k inhibici aktivního transportu. V čase 30 a 60 min od začátku experimentu byly odebrány vzorky o objemu 50 μl z akceptorového kompartmentu. Po odebrání všech vzorků byla vyříznuta monovrstva buněk společně s membránovým filtrem, omyta roztokem PBS s NBMPR a následně byla hodnocena pro možnost akumulace radioaktivity. Pokud nebyla membrána vyříznuta, byla potvrzena integrita monovrstvy pomocí FITC dextranu (akceptovaný transport byl 1% za hodinu). Radioaktivita byla měřena pomocí metody LSC (liquid scintillation counting) přístrojem Tri-Carb 2009 TR Perkin Elmer.

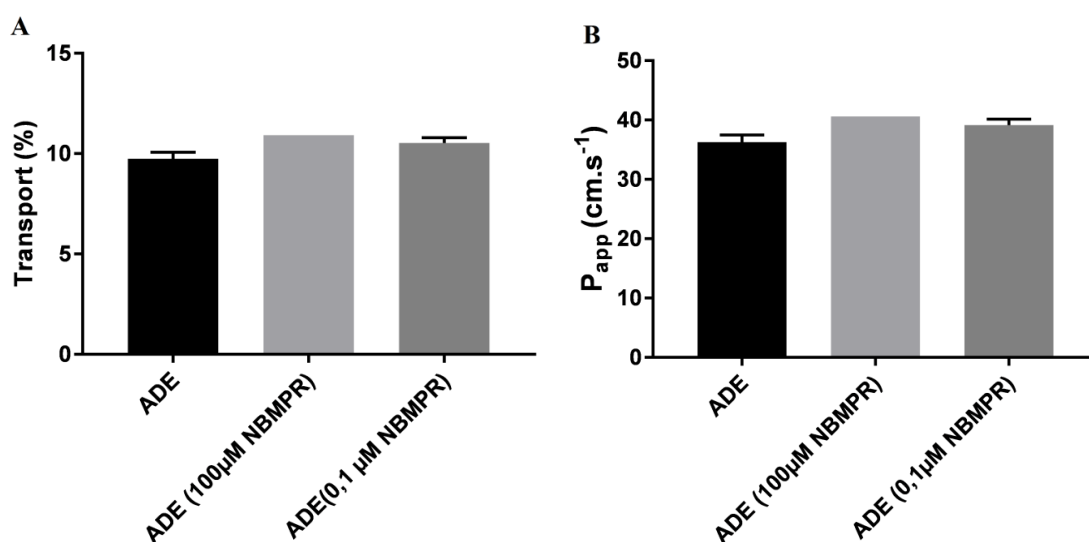
#### 6.2.4 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD), u všech experimentů je  $n=3$ . Procentuální průstup testovaných látek a jejich permeabilní koeficient byl hodnocen pomocí parametrického two-tailed Student's *t*-testu nebo one-way ANOVA testu s *post hoc* Dunnettovým testem. Statistická významnost na hladině významnosti  $p < 0,05$  je označena \*, statistická významnost na hladině významnosti  $p < 0,01$  je označena \*\* a statistická významnost na hladině významnosti  $p < 0,001$  je označena \*\*\*.

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Studium permeability ADE (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C

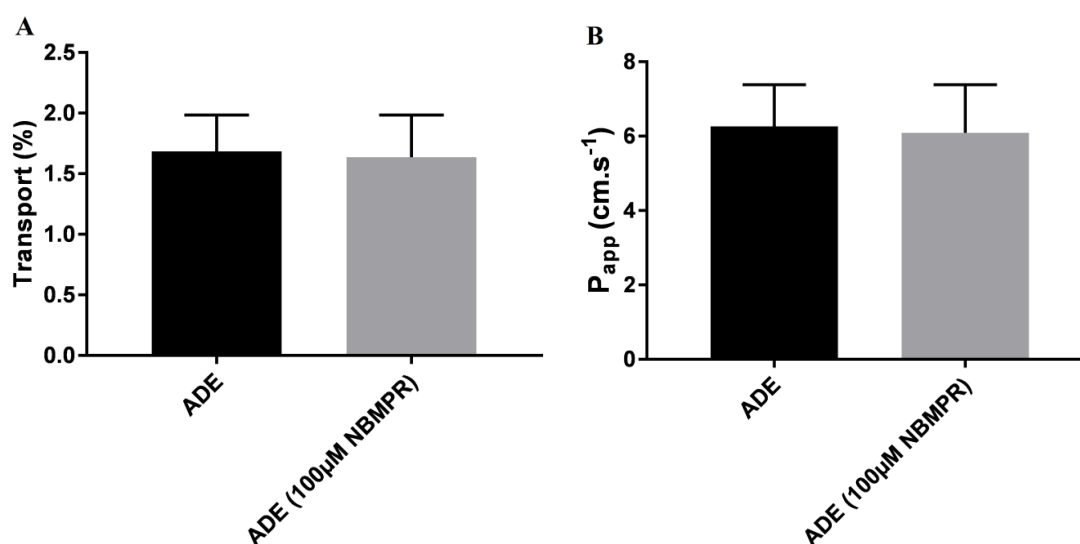
Transport [ $^3\text{H}$ ]ADE (6,5nM; 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$ ) přes monovrstvu Caco-2 buněk bez/s inhibitorem NBMPR, v koncentracích 100  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ , ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) byl sledován po dobu 60 minut inkubace (37°C). Hodnoty získané v 60. minutě byly následně použity pro výpočet procentuálního transportu a  $P_{\text{app}}$ . Statisticky významný rozdíl v přestupu [ $^3\text{H}$ ]ADE (6,5nM) bez/s NBMPR nebyl zaznamenán (Graf 1).



**Graf 1: Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů [ $^3\text{H}$ ]ADE (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk po 60 minutách inkubace.** Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě hodnot koncentrací v 60. min inkubace nebo jsou porovnány hodnoty  $P_{\text{app}}$  (B). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot ( $n=3$ ) procentuálně vyjádřeného transportu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významný rozdíl hodnot nebyl zaznamenán.

## 7.2 Studium permeability ADE (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu

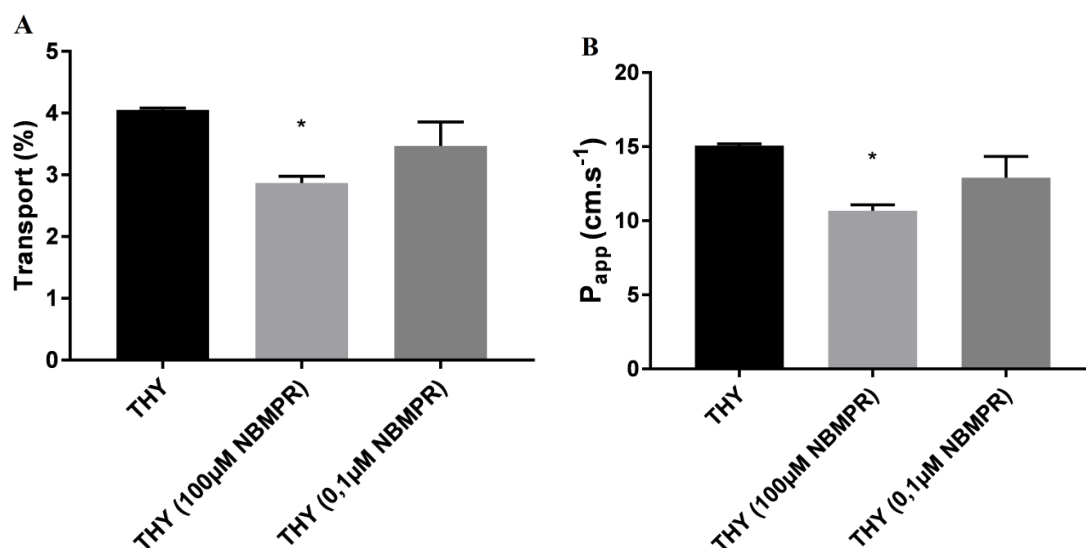
V pilotních experimentech byl zaznamenán pouze malý přínos ENTs pro transfer  $[^3\text{H}]\text{ADE}$ , což mohlo být způsobeno například zapojením dosud nespecifikovaných transportérů. S cílem eliminovat zapojení těchto aktivních transportérů do transferu nukleosidů byl následně sledován transport 6,5 nM  $[^3\text{H}]\text{ADE}$  (0,15  $\mu\text{Ci/ml}$ ) přes monovrstvu Caco-2 buněk bez/s NBMPR (100  $\mu\text{M}$ ) ve směru A-B po dobu 60 minut inkubace na ledu. Hodnoty transportu (%) byly následně použity pro výpočet permeabilních koeficientů. Ani v jednom případě však nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (Graf 2).



**Graf 2: Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů  $[^3\text{H}]\text{ADE}$  (6,5nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk po 60min inkubace na ledu.** Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě koncentrací v 60. min inkubace na ledu, nebo jako  $P_{app}$  (B). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot ( $n=3$ ) procentuálně vyjádřeného transportu a permeabilních koeficientů byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významný rozdíl hodnot nebyl zaznamenán.

### 7.3 Studium permeability THY (2nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C

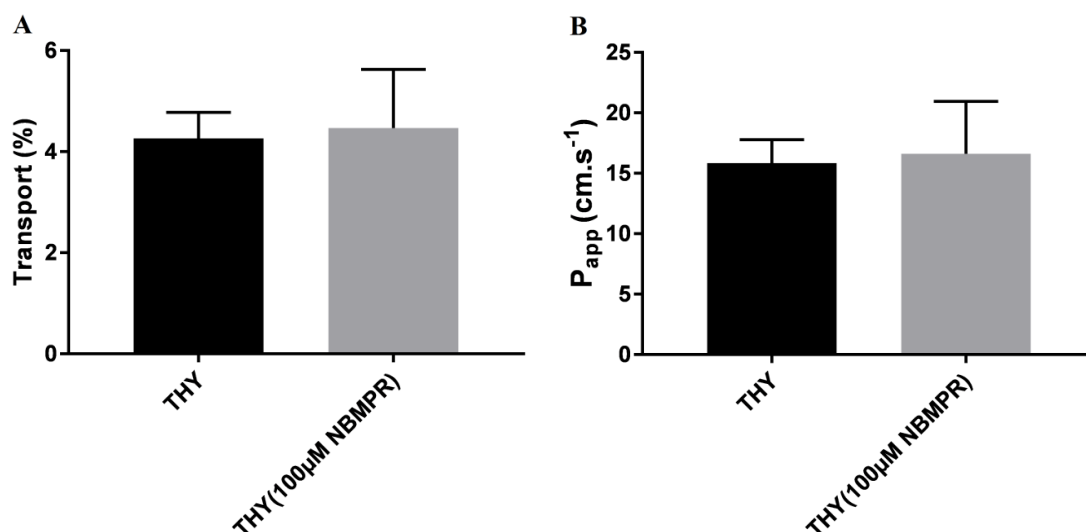
Přestup [<sup>3</sup>H]THY (0,15 μCi/ml) v 2nM koncentraci přes monovrstvu Caco-2 buněk bez/s inhibitorem NBMPR, v koncentracích 100 μM a 0,1 μM, ve směru apikálně-basolaterálním (A-B) byl sledován po dobu 60 minut inkubace (37°C). Hodnoty získané v 60. minutě byly následně použity pro výpočet procentuálního transportu a  $P_{app}$ . Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti  $p < 0,05$  byl zaznamenán v přestupu [<sup>3</sup>H]THY s 100 μM NBMPR (Graf 3).



**Graf 3:** Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů [<sup>3</sup>H]THY (2nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk po 60min inkubace. Transport byl sledován ve směru apikálně-basolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě koncentrací v 60. min inkubace nebo jsou porovnány hodnoty  $P_{app}$  (B). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot ( $n=3$ ) procentuálně vyjádřeného transportu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statistická významnost na hladině  $p < 0,05$  je označena \*.

## 7.4 Studium transportu THY (5,4nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu

Pro ověření výsledků získaných z měření v kapitole 7.3 byla následně zvolena vyšší koncentrace radioaktivity [<sup>3</sup>H]THY (0,4 μCi/ml), aby výsledek nemohl být ovlivněn nízkými hodnotami radioaktivity v akceptorovém kompartmentu a pro eliminaci aktivních transportérů byl experiment s přidáním 100 μM NBMPR prováděn na ledu. Z hodnot naměřených v 60. minutě byl následně vypočten procentuální přestup a  $P_{app}$ . Statisticky významný rozdíl v transportu [<sup>3</sup>H]THY však již nebyl zaznamenán (Graf 4).

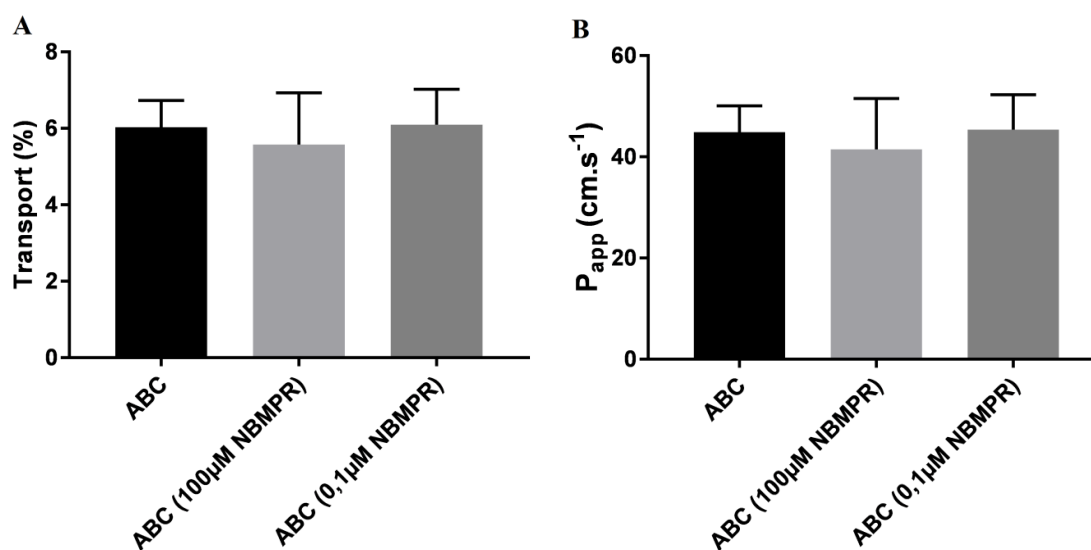


**Graf 4: Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů [<sup>3</sup>H]THY (5,4nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk po 60min inkubace.** Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě koncentrací v 60. min inkubace nebo jsou porovnány hodnoty  $P_{app}$  (B). Experiment s přidáním 100 μM NBMPR byl proveden na ledu. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot ( $n=3$ ) procentuálně vyjádřeného transportu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významný rozdíl hodnot nebyl zaznamenán.



## 7.5 Studium permeability abakaviru (4000 nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při teplotě 37°C

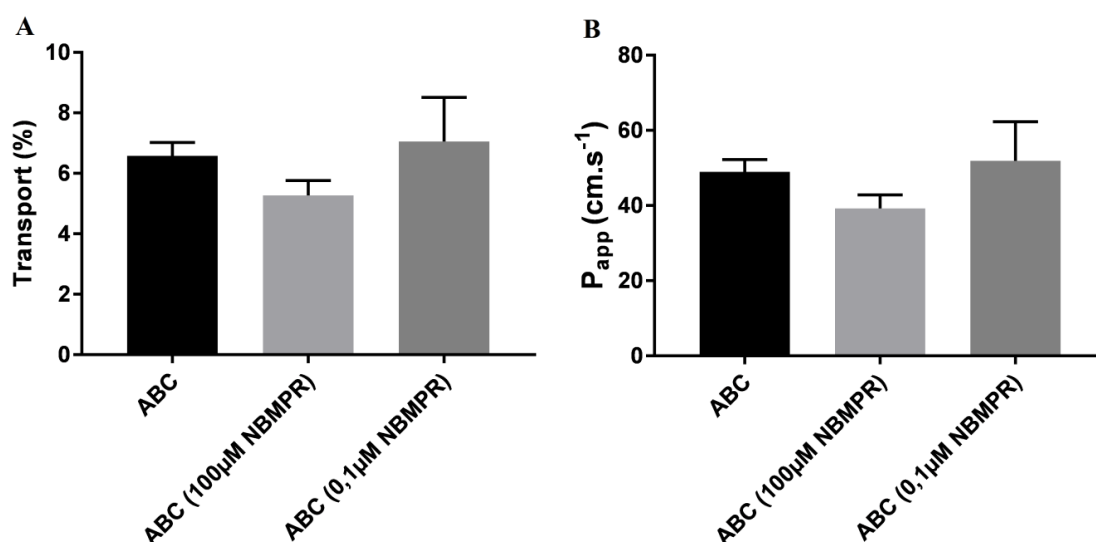
Je známo, že za fyziologických podmínek podléhají nukleosidy v těle poměrně rychle enzymatické biodegradaci. Jejich metabolity pak mohou být do určité míry aktivně přenášeny membránovými transportéry či nikoliv (Möhlmann, a další, 2010). Pro ověření tohoto předpokladu bylo v dalším experimentu použito nukleosidové antiretrovirotikum [<sup>3</sup>H]abakavir, o kterém díky dosud nepublikovaným studiím víme, že je pravděpodobně transportován ENT1. V prvním případě byl jeho přestup přes monovrstvu Caco-2 buněk sledován ve směru A-B za použití koncentrace radioaktivity 0,4 μCi/ml bez nebo s NBMPR (100 μM a 0,1 μM), při teplotě 37°C. Vzorky byly odebírány po 30 minutách inkubace a následně byl na jejich základě vypočítán procentuální prostup [<sup>3</sup>H]abakaviru a jeho P<sub>app</sub>. Přestože byl velmi dobře měřitelný a hodnoty P<sub>app</sub> byly vysoké, nebyl zde zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi naměřenými hodnotami (Graf 5).



**Graf 5:** Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů [<sup>3</sup>H]abakaviru (ABC), (4000nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk. Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě koncentrací v 30. min, nebo jsou porovnány hodnoty P<sub>app</sub> (B). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot (n=3) procentuálně vyjádřeného transportu a permeabilních koeficientů byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán.

## 7.6 Studium transportu abakaviru (4000 nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu

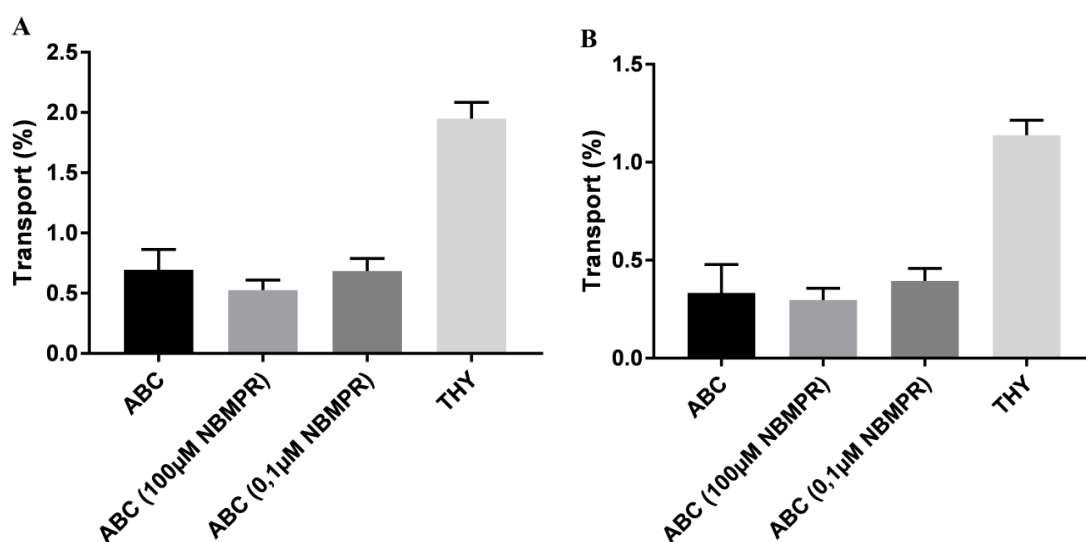
V následujícím experimentu byl transport [<sup>3</sup>H]abakaviru (4000nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk měřen ve směru A-B po dobu 30 minut inkubace na ledu, čímž byl eliminován vliv ostatních aktivních transportérů a to bez/s NBMPR (100 μM a 0,1 μM). Ani při použití radioaktivity 0,4 μCi/ml však nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v hodnotách procentuálního transportu či P<sub>app</sub> (Graf 6). Hodnoty P<sub>app</sub> byly z důvodu velmi vysokého procentuálního transportu (> 10 %) vypočteny na základě hodnot získaných po 30 ti minutách inkubace.



**Graf 6: Statistická analýza transportu a permeabilních koeficientů [<sup>3</sup>H]ABC (4000nM) přes monovrstvu Caco-2 buněk při inkubaci na ledu.** Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (AB). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace léčiva aplikovaného do donorového kompartmentu (A), vypočteno na základě koncentrací v 30. min, nebo jsou porovnány hodnoty P<sub>app</sub> (B). Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost rozdílů průměrných hodnot (n=3) procentuálně vyjádřeného transportu a permeabilních koeficientů byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu. Statisticky významný rozdíl nebyl zaznamenán.

## 7.7 Měření akumulace radioaktivity v membráně monovrstvy Caco-2 buněk – abakavir (4000nM), THY (5.4nM)

Vzhledem k překvapivým výsledkům 7.5 a 7.6, kdy bylo předpokládáno, že abakavir je substrátem ENT1 a jeho transport tedy bude ovlivňován přítomností NBMPR, jsme následně změřili intracelulární akumulaci [<sup>3</sup>H]abakaviru v monovrstvě Caco-2 buněk. Hodnoty ve všech případech však nepřesahovaly 1% a není tedy pravděpodobné, že by mohla akumulace abakaviru ovlivnit jeho přestup přes monovrstvu. Akumulace [<sup>3</sup>H]THY bez inhibitoru NBMPR byla oproti abakaviru více než dvojnásobná, avšak i přesto nepřesahovala 1,5% a nepředpokládá se tedy, že by mohla výrazně ovlivňovat transport THY (Graf 7).



**Graf 7: Grafické znázornění akumulace radioaktivity v monovrstvě Caco-2 buněk.** Akumulace [<sup>3</sup>H]ABC (4000nM) a [<sup>3</sup>H]THY (5,4nM) v monovrstvě byla hodnocena pomocí výpočtu hodnot procentuálního transportu při inkubaci na ledu (A) nebo při inkubaci při 37°C (B). Membrány byly vyříznuty a měřeny na závěr experimentu ve 120. min inkubace. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Intracelulární akumulace ABC ani THY v žádném případě nepřesahovala 1-2% a její významnost pro transfer zkoušených látek je tedy pravděpodobně zanedbatelná.

## 8 DISKUZE

Intestinální bariéra je vícevrstevný systém tvořený enterocyty, který při zachování vlastní integrity zabraňuje nadměrným ztrátám vody a elektrolytů a zároveň i prostupu xenobiotik do těla. Při průchodu střevní bariérou může docházet k interakci léčiva s četným množstvím transportérů exprimovaných na apikální, či bazolaterální straně enterocyty. Naším hlavním zaměřením bylo studovat roli NTs, především ENTs, ve střevní absorpci.

Názory na lokalizaci a expresi ENTs v enterocytech se v současnosti různí. Jedna ze studií uvádí, že ačkoliv transportér ENT2 je lokalizován striktně na straně bazolaterální, ENT1 můžeme nalézt na obou stranách polarizované membrány enterocyty (Molina-Arcas, a další, 2009). S tímto názorem do jisté míry nesouhlasí studie (Morote-Garcia, a další, 2009), která potvrzuje predominantní expresi ENT2 na apikální straně enterocyty. Novější imunocytochemické studie zaměřené na testování transportu purinové báze hypoxantinu uvádějí, že ačkoliv vyšší koncentrace ENTs byla zaznamenána na bazolaterální straně, jejich funkční aktivitu je možné sledovat i na straně apikální, a to přednostně u transportéru ENT1 (Senyavina, a další, 2016).

Pro studium přestupu zkoušených látek přes intestinální membránu bylo využito *in vitro* transportní metody na monovrstvě Caco-2 buněk. Caco-2 buněčná linie je díky expresi většiny fyziologicky důležitých endogenních transportérů, včetně NTs, zprostředkovávající jak uptake tak i efflux xenobiotik, ideálním *in vitro* modelem střevního epitelu (Hubatsch, a další, 2007). Dostupné studie založené na transportu hypoxantinu přes monovrstvu Caco-2 buněk dokazují expresi jak ENT1 tak i ENT2 (Senyavina, a další, 2015; Sun, a další, 2002). Limitujícím faktorem pro správnou interpretaci výsledků je zde pravděpodobně endogenní metabolizace testovaných nukleosidů a jejich současná akumulace v monovrstvě. Dosavadní studie ukazují, že nukleosidy jsou transportovány přes buňky epitelia, avšak v částečně metabolizované formě, což znemožňuje jejich přesnou detekci. Purinové nukleosidy se nejčastěji vyskytují ve formě nukleobází, kyseliny močové, hypoxantinu, xantinu či guaninu a stejně tak i pyrimidinové báze zpravidla přestupují membránu jako samotné nukleobáze (He, a další, 1994; Sanderson, a další, 1994; Errasti-Murugarren, a další, 2007). Tento prostup může probíhat jednak pasivní difúzí nebo jsou nukleobáze přenášeny svými specifickými transportéry (Yamamoto, a další, 2009). Tyto metabolity

jsou pravděpodobně zachyceny v enterocytech a v čase potřeby jsou využity pro další biochemické procesy. Kapacita enterocytů je tedy do jisté míry i faktorem, určujícím stupeň závislosti na endogenním přísunu nukleosidů (He, a další, 1994).

Funkce ENTs v Caco-2 buněčné linii byla v našem experimentu hodnocena na základě hodnot procentuálního transportu přes monovrstvu Caco-2 buněk v čase a zároveň dle hodnot  $P_{app}$  modelových substrátů ADE, THY a antiretrovirotika abakaviru. Pro správný výpočet  $P_{app}$  je zásadní zachování podmínek prostupu, kdy koncentrace v akceptorovém kompartmentu nesmí přesáhnout 10 % koncentrace kompartmentu donorového (Hubatsch, a další, 2007). V kapitole 7.6 bylo z toho důvodu počítáno s hodnotami získanými po 30 minutách inkubace.

Vzorky byly odebírány v čase 5,10,30 a 60 minut. Transfer zkoušené látky byl nejlépe znázorněn pomocí hodnot získaných mezi 30 a 60 minutou a tyto hodnoty byly tedy použity i pro prezentaci naměřených výsledků. Nízká radioaktivita a nízké koncentrace testovaných látek 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$  (6,5nM ADE, 2nM THY) a 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$  (5,4nM THY, 4000nM abakavir) byly použity s ohledem na saturabilitu transportérů ENT a citlivost metody. Koncentrace radioaktivity pak byla měřena pomocí metody LSC (Hubatsch, a další, 2007). Dalším proměnným faktorem byla v naší studii teplota při inkubaci, kdy byla použita buď fyziologická teplota 37°C nebo inkubace probíhala na ledu, čímž došlo k inhibici aktivních transportérů včetně možného influxu zprostředkovaného transportéry CNTs (Sugiyama, a další, 2013).

Ze statistické analýzy námi naměřených hodnot vyplývá, že se ani ENT1 ani ENT2 nepodílí na epiteliálním transportu ve směru apikálně bazolaterálním. Ačkoliv výsledky v kapitole 7.3 poukázovaly na možnou interakci THY s ENT2, kdy byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v hodnotách  $P_{app}$  i procentuálního transportu bez inhibitoru a s 100 $\mu\text{M}$  NBMPR, jednalo se pravděpodobně o falešně pozitivní výsledek způsobený nízkými hodnotami naměřené radioaktivity. Transport [ $^3\text{H}$ ]THY byl studován například (Hu, 1993), kdy byl potvrzen jeho uptake buňkami Caco-2, a tedy i zapojení NTs v jeho absorpci. V našich dalších experimentech však byly oba použité modelové substráty (ADE, THY) transportovány přes monovrstvu bez účasti ENTs a následně, dle očekávání, nebyl statisticky významný rozdíl zaznamenán ani při přestupu zkoušeného léčiva abakaviru. Přikláníme se tedy k názoru, že ENTs mají pouze malou, či žádnou, roli v buněčné linii Caco-2 při transportu těchto nukleosidů v AB směru.

Možným důvodem negativních výsledků může být i použitá metoda analýzy, která dostatečně nezohledňuje rychlou intracelulární metabolizaci nukleosidů, kdy je přes monovrstvu přenášen pouze určitý jeho metabolit. Pro ověření této domněnky byla měřena akumulace abakaviru a THY v membránovém filtru, ta však nepřesahovala 1-2% a ani zde nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hodnotách s přidaným NBMPR. V případě ADE nebylo měření akumulace v membráně z časových důvodů provedeno a její vliv tedy není možné vyloučit. Pro potvrzení tohoto výsledku je však potřeba dalších studií.

## 9 ZÁVĚR

Předkládaná práce shrnuje aktuální informace o intestinální bariéře, lokalizaci a funkci NTs a zároveň uvádí základní poznatky o vlastnostech abakaviru, u kterého je posléze studována interakce s ENTs.

Z experimentální části práce vyplývá, že ačkoliv je možné na základě dostupných studií předpokládat jak bazolaterální tak i apikální lokalizaci ENTs, porovnáním námi získaných *in vitro* dat nebyla jejich funkční aktivita potvrzena. Možným důvodem tohoto výsledku je jednak rychlá intracelulární metabolizace nukleosidů, kdy zvolená metoda analýzy nezohledňuje rozdílnou afinitu jednotlivých metabolitů k transportéru, popřípadě i nedostatečná exprese ENTs na apikální straně monovrstvy. Hodnoty intracelulární radioaktivity THY a ABC sice nenaznačují, že by byly výsledky akumulací metabolitů v monovrstvě zatíženy. V případě ADE nebyla měření z časových důvodů provedena a vliv intracelulární akumulace tedy nelze vyloučit.

## 10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

**Abramson, Jeff a Wright, Ernest M. 2009.** Structure and Function of Na<sup>+</sup>-Symporters with Inverted Repeats. *Curr Opin Struct Biol.* 19(4). 2009, stránky 425-432.

**Arrieta, M.C., Bistriz, L. a Meddings, J.B. 2006.** Alterations in intestinal permeability. *Gut* (55). 2006, stránky 1512-1520.

**Baldwin, Stephen A., a další. 2004.** The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Eur J Physiol* (447). 2004, stránky 735-743.

**Baldwin, Stephen, a další. 1999.** Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Molecular Medicine Today* (5). 1999, stránky 216-224.

**Bicket, Aex a Coe, Imogen R. 2016.** N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Biosci. Rep.* (36). 2016, stránky 1-8.

**Bishoff, et al. 2014.** Intestinal permeability - new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology* (14). 2014, str. 189.

**Clarke, Marilyn, a další. 2006.** The Role of Human Nucleoside Transporters in Cellular Uptake of 4'-Thio- $\beta$ -d-arabinofuranosylcytosine and  $\beta$ -d-Arabinosylcytosine. *Molecular Pharmacology* (70). 2006, stránky 303-310.

**Cogburn, Nita, Donovan, Matthew a Schasteen, Charles. 1991.** A Model of Human Small Intestinal Absorptive Cells. 1. Transport Barrier. *Pharm Res* (8). 1991, stránky 210-216.

**Dean, M a Annilo, T. 2005.** Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* (6). 2005, stránky 123-142.

**Dolin, Raphael, Masur, Henry a Saag, Michael S. 2007.** AIDS Therapy. Livingstone : Elsevier Health Sciences (3rd edition), 2007, stránky 77-78.

**EMA. 2012.** Guideline on the investigation of drug interactions. *EMA* . 21. Jun 2012, stránky 1-59.



- Endres, Christopher, a další. 2009.** 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* (329). 2009, stránky 387-398.
- Errasti-Murugarren, Ekaitz, Pastor-Anglada, Marcal a Casado, Javier F. 2007.** Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *J Physiol* (582.3). 2007, stránky 1249-1260.
- Estudante, M, a další. 2013.** Intestinal drug transporters: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (65). 2013, stránky 1340-1356.
- Ferrec, Eric Le, a další. 2001.** In Vitro Models of the Intestinal Barrier. *ATLA* (29). 2001, stránky 649-668.
- Giri, Nagdeep, a další. 2008.** Investigation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) on Pharmacokinetics and Central Nervous System Penetration of Abacavir and Zidovudine in the Mouse. *Drug Metabolism and Disposition* (36). 2008, stránky 1476-1484.
- Govindarajan, Rajgopal, a další. 2007.** 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* (293). 2007, stránky 1809-1822.
- Gray, Jennifer H., Owen, Ryan a Giacomini, Kathleen. 2004.** The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Eur J Physiol* (447). 2004, stránky 728-734.
- Griffiths, M, a další. 1997.** Molecular Cloning and characterization of nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei)equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* (328). 1997, stránky 739-743.
- Hamilton, SR, a další. 2001.** Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na<sup>+</sup> nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem* (276). 2001, stránky 27981-27988.

**He, Y, Sanderson, I.R. a Walker, W.A. 1994.** Uptake, transport and metabolism of exogenous nucleosides in intestinal epithelial cell cultures. *Journal of Nutrition* (124). 1994, stránky 1942-1949.

**Hidalgo, Ismael J., Raub, Thomas J. a Borchardt, Ronald T. 1989.** Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. *Gastroenterology* (96). 1989, stránky 739-749.

**Hubatsch, Ina, Ragnarsson, Eva a Artursson, Per. 2007.** Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* (2). 2007, stránky 2111-2119.

**International Transporter Consortium. 2010.** Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* (9). 2010, stránky 215-236.

**Jennings, LL, a další. 2001.** Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology* (40). 2001, stránky 722-731.

**Jung, Norma, a další. 2008.** Relevance of the Organic Cation Transporters 1 and 2 for Antiretroviral Drug Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Drug Metabolism and Disposition* (36). 2008, stránky 1616-1623.

**Katzung, Bertram G. 2006.** *Základní a klinická farmakologie (8.vydání)*. Jinočany : HH Vyšehradská, s.r.o., 2006.

**Kis, Olena, a další. 2009.** The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences* (31). 2009, stránky 22-35.

**Koepsell, H a Endou, H. 2004.** The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* (447). 2004, stránky 666-676.

**Li, Ming, de Graaf, Inge A.M. a Groothuis, Geny M.M. 2016.** Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (5255). 2016, stránky 1-16.

**Lu, Hong, Chen, Chuan a Klaassen, Curtis. 2004.** TISSUE DISTRIBUTION OF CONCENTRATIVE AND EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

IN MALE AND FEMALE RATS AND MICE. *Drug Metab Dispos* (32). 2004, stránky 1455-1461.

**Möhlmann, T, a další. 2010.** Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biol (Stuttg) (1)*. 2010, stránky 26-34.

**Molina-Arcas, Miriam, Casado, F.Javier a Pastor-Anglada, Marcal. 2009.** Nucleoside Transporter Proteins. *Curr Vasc Pharmacol* (9). 2009, stránky 426-434.

**Morote-Garcia, JC, a další. 2009.** Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia. *Gastroenterology* (136). 2009, stránky 607-618.

**Muheem, Abdul, a další. 2014.** A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharm J*. 2014, stránky 414-425.

**Neumanova, Zuzana, a další. 2015.** Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir. *Reprod Toxicol* (57). 2015, stránky 176-182.

**Neumanova, Zuzana, a další. 2014.** Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS*, 28. 2014, stránky 9-17.

**Niessen, C.M. 2007.** Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127(11). 2007, stránky 2525-2532.

**Okayama, Takashige, a další. 2012.** Involvement of Concentrative Nucleoside Transporter 1 in Intestinal Absorption of Trifluorothymidin, a Novel Antitumor Nucleoside, in Rats. *J Pharmacol Exp Ther - JPET* (340). 2012, stránky 457-462.

**Pastor-Anglada, Marcal a Pérez-Torras, Sandra. 2015.** Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *F Phar.* (6). 10. 2 2015, str. 13.

**Podgorska, Marzen, Kocbuch, Katarzyna a Pawelczyk, Tadeusz. 2005.** Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochimica Polonica* (52). 2005, stránky 749-758.

- Robinson, Morgan, Lee, Brenda Yasia a Leonenko, Zoya. 2015.** Drugs and drug delivery systems targeting amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *AIMS Molecular Science* (2). 2015, stránky 332-358.
- Rubas, W., a další. 1995.** Flux Measurements across Caco-2 Monolayers May Predict Transport in Human Large Intestinal Tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (85). 1995, stránky 165-169.
- Sanderson, Ian R. a He, Youping. 1994.** Nucleotide Uptake and Metabolism by Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition* (124). 1994, stránky 131-137.
- Senyavina, N.V., a další. 2016.** Localization and Expression of Nucleoside Transporters ENT1 and ENT2 in Polar Cells of Intestinal Epithelium. *Experimental Biology and Medicine* (160). 2016, stránky 734-738.
- Shekhawat, Prachi a Pokharkar, Varsha. 2016.** Understanding peroral absorption: Regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles. *Acta Pharm Sin B*. 2016.
- Sugiyama, Yuchi a Steffansen, Bente. 2013.** *Transporters in Drug Development: Discovery, Optimization, Clinical Study and Regulation*. New York : Springer Science & Business Media, 2013. str. 136. 1461482291.
- Sun, Duxin, a další. 2002.** Comparison of Human Duodenum and Caco-2 Gene Expression Profiles for 12,000 Gene Sequences Tags and Correlation with Permeability of 26 Drugs. *Pharmaceutical Research* (19). 2002, stránky 1400-1416.
- Vastag, Monika a Keserü, György. 2009.** Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration:A practica view. *Curr Opin Drug Discov Devel* (12). 2009, stránky 115-124.
- Volpe, Donna. 2011.** Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med. Chem.* 2011, stránky 2063-2077.
- Ward, L Jeffrey a Tse, C. Ming. 1999.** Nucleoside transport in human colonic epithelial cell lines: evidence for two Na<sup>+</sup>-independent transport systems in T84 and Caco-2 cells. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)*. 1999, stránky 15-22.

**Weiss, J., a další. 2007.** Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* (35). 2007, stránky 340-344.

**Yang, Bei a Smith, E., David. 2013.** Significance of Peptide Transporter 1 in the Intestinal Permeability of Valacyclovir in Wild-Type and PepT1 Knockout Mice. *Drug Metab Dispos* (41). 2013, stránky 608-614.

**Yao, SY, a další. 2001.** Transport of antiviral 3-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol* (18). 2001, stránky 161-167.

**Yuasa, H., Matsuda, K. a Watanabe, J. 1993.** Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. . *Pharmaceutical Research* (10). 1993, stránky 884-888.

**Yuen, Geoffrey, Weller, Steve a Pakes, Gary. 2008.** A Review of the Pharmacokinetics of Abacavir. *Clinical Pharmacokinetic* (6). 2008, stránky 351-371.