

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM INTERAKCÍ ANTIRETROVIRÁLNÍHO LÉČIVA TENOFOVIRU A
JEHO PROLÉČIVA TENOFOVIRU DISOPROXIL FUMARÁTU
S PLACENTÁRNÍMI NUKLEOSIDOVÝMI TRANSPORTÉRY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Anežka Lalinská

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli PharmDr. Lukášovi Červenému, Ph.D., jelikož nebýt jeho odborných rad, věnovaného času a zejména bezbřehé trpělivosti při odpovídání na mé nekonečné dotazy by tato práce vůbec nemohla vzniknout.

Mé poděkování patří také všem z Katedry farmakologie a toxikologie, zejména Ph.D. studentům Mgr. Sáře Karbanové, Mgr. Lucii Jiráskové, Mgr. Ondřejovi Martincovi a Mgr. Alešovi Šorfovi, a to nejen za cenné rady, které mi neustále poskytovali v průběhu experimentální práce a kterými často zabránili katastrofě, ale zejména za vytvoření přátelského pracovního prostředí, díky kterému se praktická část této práce stala mnohem příjemnější. Speciálně bych chtěla poděkovat Mgr. Sáře Karbanové, protože mi s ochotou poskytovala rady též při psaní diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Veronice Sommerové a Simoně Suché za psychickou i jinou podporu při sepisování této práce.

Na závěr patří obrovské poděkování mým rodičům, protože především jim vděčím za to, že jsem se na této strastiplné cestě dostala až na konec.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Anežka Lalinská

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium interakcí antiretrovirálního léčiva tenofoviru a jeho proléčiva tenofoviru disoproxil fumarátu s placentárními nukleosidovými transportéry

Tenofovir (TFV), který je podáván ve formě esterového proléčiva tenofovir disoproxil fumarátu (TDF), je významnou součástí kombinované antiretrovirální terapie. Často se používá v prevenci přenosu HIV infekce z matky na plod. Exaktní mechanismy zahrnuté v transportu TFV/TDF z matky do plodu nejsou detailně popsány. Jelikož se jedná o nukleosidová analoga, existuje možnost, že mechanismy transplacentárního přechodu mohou zahrnovat nukleosidové transportéry (NTs), ať už ekvilibrační či koncentrační (ENTs/CNTs).

Cílem předkládané práce bylo studium role placentárních NTs v membránovém přestupu TFV a TDF. K tomuto účelu byla použita *in vitro* akumulární metoda, která byla provedena s využitím buněčné linie BeWo odvozené od placentárního choriokarcinomu.

Vyhodnocením *in vitro* experimentů jsme zjistili, že TFV ani TDF pravděpodobně nejsou substráty NTs, role těchto transportérů v placentární kinetice TFV/TDF nebyla potvrzena. Z tohoto důvodu není třeba očekávat lékové interakce na NTs či výrazný vliv potenciální variabilní exprese NTs na transplacentární farmakokinetiku zmíněného léčiva a jeho proléčiva.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anežka Lalinská

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of interactions of antiretroviral drug tenofovir and its prodrug tenofovir disoproxil fumarate with placental nucleoside transporters

Tenofovir (TFV) in the form of ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is an essential part of combination antiretroviral therapy. It is often used in the prevention of perinatal HIV transmission. However, precise mechanism(s) involved in transfer of TFV/TDF from mother to fetus are not described in detail. Since these drugs are nucleoside analogues, there is a possibility that the mechanisms of their transplacental passage might include nucleoside transporters (NTs), either equilibrative or concentrative (ENTs/CNTs).

The aim of the diploma thesis was to investigate the role of placental NTs in membrane transfer of TFV and TDF. To address this issue, we performed *in vitro* accumulation in the BeWo cell line derived from placental choriocarcinoma.

By evaluating experiments, we found out that both TFV and TDF might not be substrates of NTs, thus the role of these transporters in TFV/TDF placental pharmacokinetics was not confirmed. Therefore, the drug-drug interactions on NTs are not expected as well as a significant effect of potential variable expression of NTs on transplacental pharmacokinetics of the mentioned drug and its prodrug.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. ÚVOD	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Virus HIV	12
3.1.1 Charakteristika	12
3.1.2 Struktura a replikační cyklus	13
3.1.3 Přenos a stádia HIV	14
3.2 Terapie HIV	15
3.2.1 Kombinovaná antiretrovirální terapie	16
3.2.2 Preventivní opatření přenosu HIV	18
3.2.3 Tenofovir disoproxil fumarát (TDF).....	19
3.3 Nukleosidové transportéry	23
3.3.1 Funkce.....	23
3.3.2 Obecná tkáňová distribuce NTs	25
3.3.3 Ekvilibrační nukleosidové transportéry	26
3.3.4 Koncentrační nukleosidové transportéry	29
3.4 Modely studie transplacentárního přechodu	31
3.4.1 Modely <i>ex vivo</i>	32
3.4.2 Modely <i>in situ</i> , <i>in vivo</i> a další	33
3.4.3 Modely <i>in vitro</i>	34
4. HYPOTÉZA	36
5. CÍL PRÁCE	38
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
6.1 Princip použité metody	39
6.2 Metodika	40
6.2.1 Chemikálie a reagenty	40

6.2.2 Buňky.....	40
6.2.3 Postup experimentu.....	41
6.2.4 Statistická analýza.....	41
7. VÝSLEDKY	43
7.1 Studium akumulace [³ H]-ADE (0,018 μM) v BeWo buňkách	43
7.2 Studium akumulace [³ H]-THY (0,005 μM) v BeWo buňkách	44
7.3 Studium akumulace [³ H]-TFV (0,074 μM) v BeWo buňkách.....	46
7.4 Studium akumulace [³ H]-TDF (0,261 μM) v BeWo buňkách.....	47
7.5 Studium akumulace [³ H]-TFV (0,074 μM) a [³ H]-TDF (0,261 μM) v BeWo buňkách při 4°C	48
8. DISKUZE	49
9. ZÁVĚR	54
10. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	55

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette (ATP-vázající)
AIDS	syndrom získané imunodeficiency
ART	antiretrovirální terapie
BCRP	breast cancer resistance protein
BeWo	buněčná linie
cART	kombinovaná antiretrovirální terapie
CD4	cluster of differentiation 4 (označení povrchových glykoproteinů)
CNTs	koncentrační nukleosidové transportéry
CRIs	inhibitory vstupu HIV do buňky
ENTs	ekvilibrační nukleosidové transportéry
FBS	fetální hovězí sérum
FIs	inhibitory fúze membrán
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (z ang. Food and Drug Administration)
HAART	vysoce účinná antiretrovirální terapie
HBV	virus hepatitidy B
HIV	virus lidské imunodeficiency
INSTIs	inhibitory integrázy
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
MTCT	mother-to-child transmission (přenos z matky na dítě)
NBMPR	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin
NNRTIs	ne-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NTs	nukleosidové transportéry
N(t)RTIs	nukleosidové a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy
P-gp	P-glykoprotein
P/S	penicilin/streptomycin
PIs	inhibitory proteázy
PMTCT	prevention of mother-to-child transmission (prevence MTCT)
PrEP	prevence před vystavením se HIV

PEP	prevence po vystavení se HIV
RT	reverzní transkriptáza
SLC	solute carrier transporters
TDF	tenofovir disoproxil fumarát
TFV	tenofovir
TM	transmembránový
WHO	Světová zdravotnická organizace

2. ÚVOD

Virus lidské imunodeficiency (HIV) představuje významný globální problém týkající se veřejného zdraví (AVERT, 2017a). Historie tohoto viru sahá pravděpodobně do období okolo 20. let minulého století v oblasti města Kinshasa (Demokratická republika Kongo). Mezník tvořil rok 1981, kdy Michael Gottlieb a jeho kolegové v Los Angeles (Kalifornie) zaznamenali několik případů pneumonie způsobené *Pneumocystis carinii* u mladých homosexuálních mužů. Podobné kazuistiky byly zpozorovány v komunitách gayů i jiných měst (New York), navíc spojené s výskytem vzácného tumoru – Kaposiho sarkomu. S uvědomováním si skutečnosti, že tato oportunistická onemocnění mají přímou souvislost se silným poškozením imunitního systému, bylo zahájeno vědecké bádání, vedoucí k objevení původce choroby, která dostala název syndrom získané imunodeficiency (AIDS) (AVERT 2018, Mak a Saunders 2006).

Od počátku epidemie bylo infikováno odhadem 78 milionů lidí, z toho 35 milionů zemřelo na následky AIDS. Poslední data z roku 2016 odhalují, že okolo 36,7 milionů osob je nakaženo HIV a celých 1,8 milionů z tohoto údaje tvoří děti. 30 % osob o viru ve svém těle vůbec neví. Současně s rostoucím počtem infikovaných lidí se naštěstí v posledních letech dramaticky zvýšila také dostupnost antiretrovirální terapie (ART). V roce 2016 bylo zjištěno, že více než polovina lidí s HIV (53 %) má přístup k této život zachraňující léčbě (AVERT, 2017a).

Nejběžnější způsob HIV infekce u dětí je přenos viru z matky na dítě (MTCT, mother-to-child transmission), a to v průběhu těhotenství (5-10 % případů infekce), při porodu (20-25 %) nebo během kojení (10-15 %) (Cavarelli a Scarlatti 2011, HIV.gov 2017, Panel on Treatment of Pregnant Women with HIV Infection and Prevention of Perinatal Transmission 2017). Taktéž v oblasti prevence MTCT (PMTCT) došlo v posledních letech k významnému progresu. Pro rok 2016 platí, že více než třem čtvrtinám HIV infikovaných žen (76 %) je umožněna terapie, která zabraňuje transmissi HIV na dítě, což je oproti 47 % v roce 2010 cca o čtvrtinu více (AVERT, 2017a). Společně s ostatními intervencemi snižuje antiretrovirální terapie užívaná během těhotenství až 45% riziko infekce dítěte na neuvěřitelných 1-2 % (Cavarelli a Scarlatti, 2011).

Tenofovir (TFV) patří do skupiny nukleotidových inhibitorů reverzní transkriptázy (NtRTIs) a hraje velmi významnou roli v kombinované antiretrovirální terapii (cART). Mimo to vykazuje účinnost také vůči viru hepatitidy B (HBV) a je společně s entekavirem

lékem volby chronické HBV infekce (Duarte-Rojo a Heathcote 2010, Marcellin et al. 2013). Pro zlepšení farmakokinetických vlastností je TFV podáván ve formě disoproxil fumarátu jako proléčivo. I přes fakt, že je v rámci klasifikačního systému léčiv vhodného pro zhodnocení rizika užívání medikace v těhotenství zařazen do kategorie B, WHO doporučuje tenofovir disoproxil fumarát (TDF) v recentních guidelineech pro použití v profylaxi MTCT (World Health Organization, 2010) a jeho použití v těhotenství stále narůstá (Baroncelli et al., 2009).

Infekce HIV u těhotných žen vytváří poměrně specifickou situaci, ve které jsou cílem farmakoterapie jak matka, tak plod. Klíčovou roli má placenta, dočasný orgán, jenž kromě mnoha dalších funkcí reguluje výměnu živin, odpadních produktů, ale též xenobiotik mezi matkou a plodem (Staud et al., 2012). Většina klinicky používaných léčiv se řadí mezi molekuly rozpustné v tucích, jejich placentární transport je tedy uskutečňován prostou pasivní difuzí. Do přenosu léčiv přes placentu se však zapojují i transportéry umožňující uptake či eflux xenobiotik. Tyto proteiny patří do rodin ABC a SLC transportérů. Nejlépe popsané placentární transportéry jsou P-glykoprotein a BCRP (breast cancer resistance protein) z rodiny ABC efluxních transportérů. Rodina SLC transportérů, do které se zařazují i nukleosidové transportéry důležité v kontextu s předkládanou diplomovou prací, je zatím probádána méně. Pochopení role placentárních transportérů, jejich exprese v trofoblastu a uvážení možnosti lékových interakcí na těchto proteinech je esenciální z hlediska optimalizace farmakoterapie těhotných žen (Staud et al., 2012).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Virus HIV

3.1.1 Charakteristika

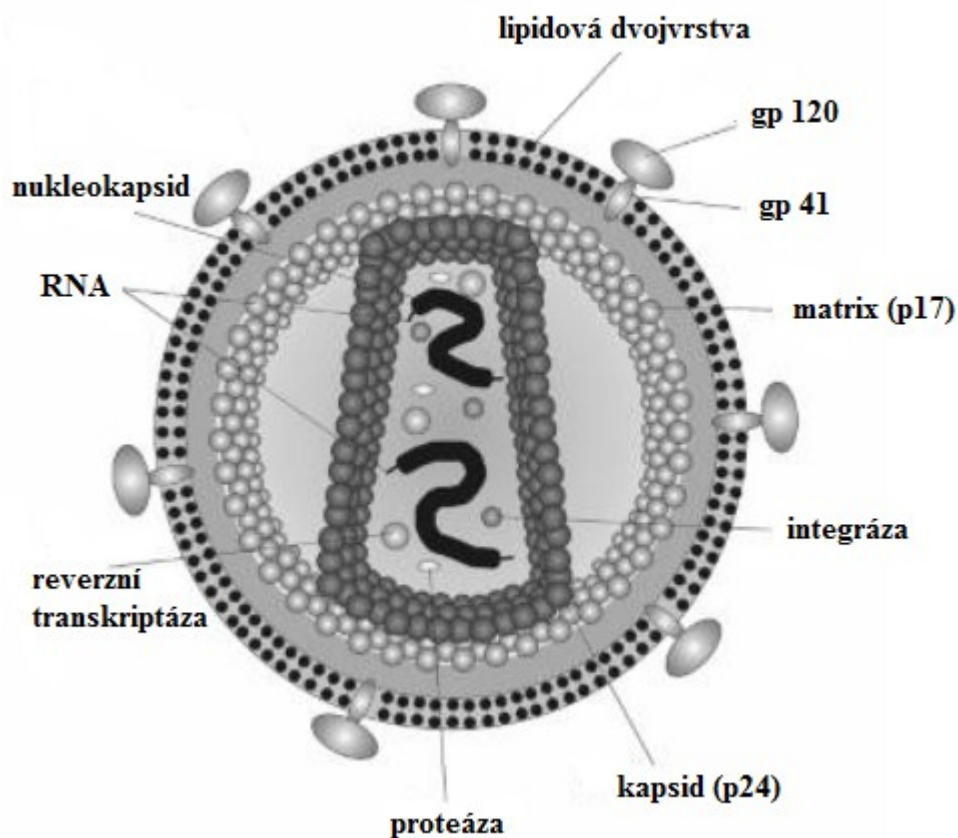
HIV (Human Immunodeficiency Virus, též virus lidské imunodeficiency) patří do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae*, rodu *Lentivirus*. Na základě genetických charakteristik a rozdílů mezi antigeny virů se HIV klasifikuje jako HIV-1 (celosvětově rozšířený, přenos probíhá snadněji a progresse je horší) a HIV-2 (zejména západní Afrika, přenos je komplikovanější a progresse pomalejší). Typ 1 má původ ve střední Africe, kde se vyskytoval převážně mezi šimpanzi, zatímco typ 2 se objevil v západní Africe u živočicha zvaného mangabej kouřový (Seitz, 2016). U obou druhů živočichů se však neobjevil přímo HIV, ale tzv. SIV (Simian Immunodeficiency Virus), jenž je viru HIV velmi blízký. Vědci předpokládají, že lidé se při lovu těchto živočichů nakazili virem SIV stykem s infikovanou krví, přičemž virus v nich poté zmutoval do podoby HIV (Center for Disease Control and Prevention, 2017).

HIV útočí na imunitní systém lidského těla. Hlavním cílem jsou CD4 buňky (CD4 T-lymfocyty), které pomáhají koordinovat imunitní odpověď tak, že stimulují ostatní buňky imunitního systému. Cílové CD4 buňky mají na svém povrchu molekulu CD4, jenž je stěžejní pro vstup viru do buňky. Tuto molekulu mají na sobě i např. mononukleární fagocyty či dendritické buňky, jsou tedy taktéž cílovou strukturou HIV (Center for Disease Control and Prevention 2017, Mariani et al. 2010).

Jestliže člověk nakažený HIV neodhalí tuto skutečnost včas a nezačne léčbu, HIV postupně snižuje počet CD4 buněk v těle a pacient je tak náchylnější vůči jiným infekcím či některým typům rakovin. Postupem času trpí nemocný čím dál víc oportunními infekcemi, které se vyskytují zejména u lidí s velice slabou funkcí imunitního systému. Toto signalizuje, že pacient dosáhl posledního stádia HIV infekce – AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome, též syndrom získané imunodeficiency) (Center for Disease Control and Prevention, 2017).

3.1.2 Struktura a replikační cyklus

Na povrchu zralého virionu je lipidová dvojvrstva. Její součástí je transmembránový glykoprotein gp 41, přes který se napojuje další glykoprotein (gp 120), jenž je exponován na povrchu virionu. Lipidová dvojvrstva též obsahuje některé proteiny z membrány hostitelské buňky, jako jsou např. HLA molekuly (human leukocyte antigens). Směrem dovnitř se dále nachází matrix (p17) a následně kapsid kónického tvaru (p24). Kapsid vytváří ochrannou strukturu pro genom viru. Ten se skládá ze dvou identických molekul jednovláknové RNA, jádro obsahuje též tři klíčové enzymy – proteáza, reverzní transkriptáza a integráza (obrázek 1) (Rubbert et al. 2011, Turner a Summers 1999).



Obrázek 1. Struktura virionu. Reverzní transkriptáza je enzym, který zajišťuje přepis virové RNA do DNA. Integráza zase umožňuje začlenění virové DNA do DNA buňky hostitelského organismu. Posledním klíčovým enzymem je proteáza, což je enzym štěpící prekurzorové polyproteiny na funkční virové polypeptidy. Gp 120 je glykoprotein, který se nachází na povrchu virionu a umožňuje tak navázání virionu na receptor CD4 cílových buněk. Jiný glykoprotein, gp 41, je přímo ukotven v lipidové dvojvrstvě a zodpovídá za fúzi obalu virionu s membránou hostitelské buňky (Turner a Summers, 1999). Převzato a upraveno z: DocCheck (2017).

Na počátku replikačního cyklu viru musí dojít k rozpoznání cílové struktury zralým virionem. HIV částice se vážou specificky na buňky, na jejichž povrchu se nachází molekula CD4. Tato vazba je zprostředkována pomocí gp 120. Interakce probíhající mezi CD4 a gp 120 jsou dostatečné pro navázání, nikoli pro infekci. K membránové fúzi může dojít až po zapojení chemokininových koreceptorů do děje – zejména CXCR4 a CCR5, s nimiž také interaguje gp 120. Nastalé konformační změny gp 120 umožní transmembránově lokalizovanému gp 41 způsobit fúzi membrány virionu a hostitelské buňky. Následně dochází v cytosolu k přepisu virové RNA do DNA pomocí reverzní transkriptázy. DNA je poté transportována do jádra hostitelské buňky a integrována do genomu hostitelské buňky. Tato reakce je katalyzována enzymem integráza (Turner a Summers, 1999). Vzniká provirová DNA, která je přepisována do mRNA a přeložena do jednotlivých polyproteinů. Ty poté štěpí enzymy zvané proteázy. Postupně vzniká zralý virion, opouští hostitelskou buňku a je schopen napadnout nové (Wilens et al., 2012).

3.1.3 Přenos a stádia HIV

Zdravý jedinec se může nakazit kontaktem s tělními tekutinami infikované osoby. Pouze určité tělní tekutiny mohou způsobit přenos infekce. Jedná se o krev, ejakulát, rektální a vaginální tekutiny a též mateřské mléko. Tyto tekutiny musejí přijít do kontaktu s mukózní membránou (např. v konečníku, ve vagíně, v ústech, na penisu) nebo s poškozenými tkáněmi, případně musejí být přímo zavedeny do krevního řečiště (nejčastěji pomocí jehly nebo stříkačky). Velmi frekventovanou příčinou nakažení zdravého jedince infekcí HIV je nechráněný pohlavní styk a sdílení jehel či injekčních stříkaček u drogově závislých (virus dokáže přežít v použité jehle až 42 dní v závislosti na teplotě a ostatních faktorech). Méně často dochází k přenosu z matky na dítě během těhotenství, porodu či v průběhu kojení (HIV.gov, 2017). Přenos z matky na dítě, tzv. MTCT (mother-to-child transmission), je nejběžnější cestou HIV infekce u dětí (Panel on Treatment of Pregnant Women with HIV Infection and Prevention of Perinatal Transmission, 2017).

Pacienti infikovaní HIV, kteří nepodstupují léčbu, typicky prochází třemi stádii infekce:

- 1) Akutní HIV infekce (primární infekce)** – nástup 2-4 týdny po nakažení, mohou se objevit příznaky podobné chřipce trvající několik týdnů. Mezi typické symptomy patří únava, lymfadenopatie, bolesti hlavy, vyrážka, bolesti kloubů, anorexie, nauzea, zvracení a průjem. Pacienti mají v této fázi obrovské množství viru v krvi a jsou velmi

infekční. Bohužel často nevědí, že u nich k infekci došlo, nemusejí totiž pociťovat žádné příznaky. Tato fáze je ohraničena momentem infekce a momentem indukce detekovatelných protilátek.

- 2) **Chronická latentní infekce (asymptomatické stádium)** – velmi individuální průběh. Jedná se řádově o jednotky až desítky let, medián se pohybuje zhruba okolo 10 let. Nejprve dochází k určité rovnováze mezi virovou replikací a imunitním systémem. Virus je stále aktivní, nicméně jeho stupeň reprodukce je velmi nízký, pacienti většinou nemají žádné symptomy. Rovnováha je však postupem času pomaleji nebo rychleji narušována. Na konci této fáze hodnota CD4 lymfocytů pozvolna klesá, naopak virová replikace pozvolna stoupá. V tuto chvíli pacient může začít pociťovat příznaky a dochází k přechodu do třetího, posledního stádia.
- 3) **Klinický AIDS (konečné stádium)** – nejvážnější stupeň HIV infekce. Počet CD4 buněk klesá pod 200 buněk/mm³ krve, což je jedno z kritérií diagnostiky AIDS. Tito pacienti mají již velmi silně poškozený imunitní systém. To má za následek stále častější nákazu oportunními infekcemi, které jsou pro AIDS typické (např. Kaposiho sarkom, kandidózy a jiná plísňová onemocnění, tuberkulóza, pneumonie vyvolaná *Pneumocystis carinii*, HIV encefalopatie apod.). Běžné symptomy potom zahrnují zimnici, horečku, pocení, oteklé lymfatické uzliny, slabost a hubnutí. Bez léčby je člověk schopen přežít zhruba 3 roky (Center for Disease Control and Prevention 2017, Salavec et al. 2011).

3.2 Terapie HIV

Antiretrovirální terapie, tzv. ART (antiretroviral therapy), je již dnes doporučována všem lidem, kteří jsou nakaženi virem HIV, a to bez ohledu na počet CD4 T-lymfocytů. Důležitým předpokladem pro efektivní terapii je začít tak brzo, jak je to jen možné. V některých situacích je brzké zahájení léčby ještě důležitější než obvykle – těhotenství, AIDS, časná HIV infekce nebo komorbidity a infekce spojené s HIV. Léky způsobují redukci replikace viru, čímž snižují celkové množství viru v organismu. Pomocí terapie nejsme schopni úplně vyléčit člověka s HIV, ale je mu umožněno žít delší a zdravější život a taktéž je sníženo riziko přenosu HIV (AIDSinfo, 2018). Počet lidí majících přístup k ART v posledních letech rapidně stoupá ve všech částech světa (WHO; UNICEF; UNAIDS, 2013). Nalezení, zavedení a následná inovace léčiv, které efektivně působí

proti viru HIV, změnilo vnímání AIDS jakožto rychle progredující choroby s fatálními následky na chronické a poměrně zvládnutelné onemocnění (Maartens et al., 2014).

3.2.1 Kombinovaná antiretrovirální terapie

Monoterapie jakýmkoli antiretrovirálním léčivem není doporučena, protože hrozí vznik rezistence viru vůči léčivu a následné selhání terapie (AIDSinfo, 2017a). Zavedení kombinované antiretrovirální terapie, tedy cART (combined antiretroviral therapy), v roce 1996 vedlo k zahájení nové éry pro pacienty s HIV infekcí. cART zvyšuje množství CD4 buněk, snižuje hladiny HIV RNA v plazmě a prodlužuje dobu přežití pacienta (M, 2010). V současné době se používají léčiva z celkem šesti hlavních farmakologických skupin: nukleosidové a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy (N(t)RTIs), ne-nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTIs), inhibitory integrázy (INSTIs), inhibitory proteázy (PIs), inhibitory vstupu HIV do buňky (CRIs) a inhibitory fúze membrán (FIs). Každá z těchto šesti tříd cílí na jinou fázi životního cyklu HIV. cART zahrnuje použití tří antiretrovirotik z alespoň dvou různých výše popsaných skupin (Alam et al., 2016). Na trhu je dnes dostupných více než 25 různých antiretrovirálních léčiv (Maartens et al., 2014).

• NUKLEOSIDOVÉ A NUKLEOTIDOVÉ INHIBITORY REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY (N(t)RTIs)

Historicky první skupina antiretrovirálních léčiv, která se dostala do klinické praxe. Jedná se o dideoxynukleosidy a můžeme je považovat za strukturní analoga přirozených substrátů enzymu reverzní transkriptázy (RT = reverse transcriptase, též HIV-1 DNA polymeráza). Stejně jako přirozené substráty podléhají v hostitelské buňce fosforylaci (proto jsou někdy označovány jako proléčiva). V této formě kompetitivně inhibují RT, přičemž dochází k zakomponování těchto nefunkčních analogů do vznikající DNA. To vede k ukončení její syntézy. Obecně vykazují N(t)RTIs vyšší specifitu vůči HIV-1 RT v porovnání s ostatními DNA polymerázami přítomnými v savčích buňkách. Aktivní jsou taktéž vůči RT jiných retrovirů, např. HIV-2, SIV a další (Broder 2010, de Béthune 2010). Patří sem zidovudin (ZDV), stavudin (d4T), lamivudin (3TC), didanosin (ddI), emtricitabin (FTC), abakavir (ABC) a tenofovir (TFV). Poslední zmíněný se podává ve formě perorálních proléčiv disoproxil fumarátu (TDF), případně alafenamidu (TAF) (Brunton et al. 2011).

- **NE-NUKLEOSIDOVÉ INHIBITORY REVERZNÍ TRANSKRIPTÁZY (NNRTIs)**

Inhibují RT navázáním se na určité místo enzymu, což vede k jeho konformačním změnám, které negativně ovlivňují katalytickou aktivitu enzymu. Na rozdíl od N(t)RTIs nevyžadují intracelulární fosforylaci, nejsou však aktivní vůči ostatním retrovirům. Zástupci jsou efavirenz (EFZ), nevirapin (NVP), delavirdin (DLV), etravirdin (ETV) a rilpivirin (RPV) (de Béthune 2010, Sluis-Cremer a Tachedjian 2008, Brunton et al. 2011).

- **INHIBITORY INTEGRÁZY (INSTIs)**

Zabraňují enzymu zakomponovat virovou DNA do DNA hostitelské buňky. Raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG) a dolutegravir (DTG) se řadí do této skupiny antiretrovirálních léčiv (Brunton et al., 2011).

- **INHIBITORY PROTEÁZY (PIs)**

Vyvolávají inhibici HIV proteázy, která je klíčová pro proteolytické zpracování prekurzorů virových proteinů na zralé virové proteiny. Jejich působení je založeno na „peptidomimetickém“ principu – ve své struktuře mají hydroxyethylenovou složku připomínající peptidovou vazbu. HIV proteáza však není schopna tuto složku štěpit. Řadíme sem saquinavir (SQV), indinavir (IDV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), amprenavir (APV), fosamprenavir (f-APV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATZ), tipranavir (TPV) a darunavir (DRV) (De Clercq 2009, Lv et al. 2015).

- **INHIBITORY VSTUPU HIV DO BUŇKY (CRIs)**

Těž CRIs (co-receptor inhibitors) neboli koreceptorové inhibitory. Interagují s CCR5 nebo CXCR4 receptory, nacházejících se na povrchu hostitelských buněk a jež jsou nezbytné pro vstup viru do buňky. Zatím jediným zástupcem této skupiny je maraviroc (MVC), který je antagonistou CCR5 (De Clercq, 2009). Existují však nová slibná léčiva, která jsou v současné době součástí klinických hodnocení. Je to fostemsavir a monoklonální protilátka ibalizumab (III. fáze) a cenicriviroc a monoklonální protilátka pro-140 (II. fáze) (Badowski et al., 2016).

- **INHIBITORY FÚZE MEMBRÁN (FIs)**

Patří sem pouze jediný zástupce – enfuvirtid (T-20). Tento polypeptid blokuje spojení viru s vnější membránou hostitelské buňky navázáním se na gp41 (De Clercq, 2009).

Standardní cART využívá kombinaci dvou léčiv ze skupiny N(t)RTIs (emtricitabin nebo lamivudin společně s abakavirem, tenofovirem nebo zidovudinem) s léčivem ze skupiny NNRTIs, PIs nebo INSTIs. Tento terapeutický režim se nazývá vysoce účinná antiretrovirální terapie (HAART). V případě, že je v HAART zakomponován jeden z PIs, se často přidává také tzv. booster (nejfrekventovaněji cobicistat nebo ritonavir), který zlepšuje farmakokinetický profil použitých PIs. Existuje však mnoho různých režimů léčby, jejichž výběr závisí na individualitě pacienta (AIDSinfo 2017b, Alam et al. 2016, Maartens et al. 2014).

Volba správné kombinace léčiv bohužel nezaručuje úspěšnost terapie. Používané léky mají obvykle mnoho nežádoucích účinků, což vede k non-adherenci pacienta, která je v terapii klíčová. Podávání více léčiv najednou také zvyšuje riziko lékových interakcí. Problémem může být i užívání léčiva v sub-optimální koncentraci. Výsledkem bývá často rezistence viru vůči léčbě (Alam et al., 2016).

3.2.2 Preventivní opatření přenosu HIV

ART je také možno považovat za nástroj prevence, sloužící k zabránění přenosu viru na zdravého člověka. Tato oblast se soustředí zejména na prevenci přenosu HIV z matky na dítě, ale též na prevenci před nebo po vystavení se možné HIV nákaze (Hammer, 2011).

- **PREVENCE PŘED VYSTAVENÍM SE HIV**

PrEP (pre-exposure prophylaxis) je doporučována WHO jako přídatná ochrana osobám se značným rizikem nákazy, současně s používáním kondomu při pohlavním styku. Léčiva mohou být podávána orálně (tenofovir + emtricitabin) nebo topicky ve formě vaginálního gelu s obsahem tenofoviru (WHO, 2017b).

- **PREVENCE PO VYSTAVENÍ SE MOŽNÉ HIV NÁKAZE**

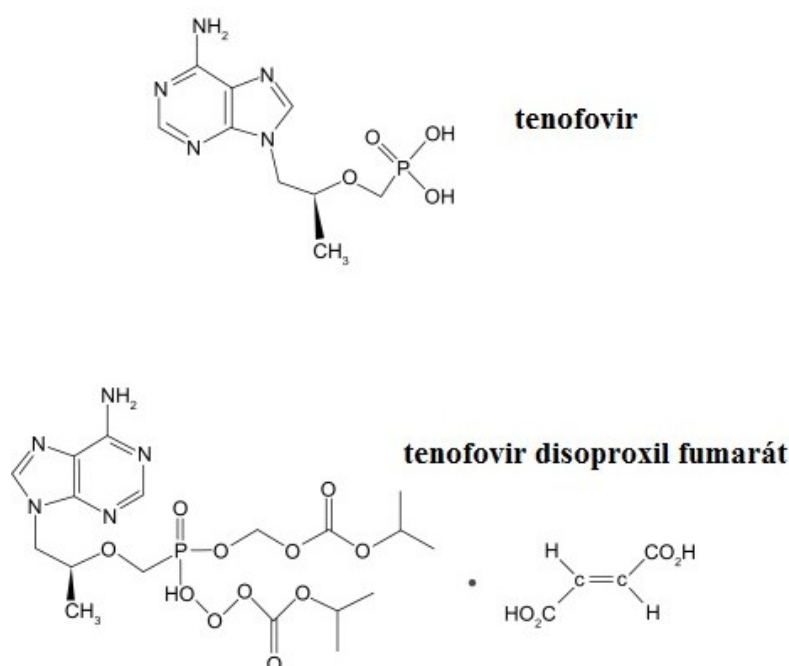
PEP (post-exposure prophylaxis) je důležitá zejména pro pracovníky ve zdravotnictví, kteří se mohou infikovat virem při manipulaci s infekčním materiálem (např. poranění jehlou). Možné je i využití této prevence po nechráněném pohlavním styku. Zahrnuje 28-denní podávání ART, začít je nutno nejlépe do 72 hod od potenciálního přenosu HIV. Pokud je toto dodrženo, riziko nákazy se může snížit až o 80 % (Parkin et al. 2000, WHO 2014).

- **PREVENCE PŘENOSU HIV Z MATKY NA DÍTĚ**

Označována zkratkou PMTCT (prevention of mother-to-child transmission). Přenos se uskutečňuje během těhotenství, porodu nebo při kojení. Bez preventivních opatření dochází k infekci dítěte v 15-45 % případů. Intervence zahrnují podávání ART matce a krátkodobě také dítěti. Dříve se využívala zejména monoterapie zidovudinem, případně kombinace zidovudin + lamivudin. Dnes je možností o něco více. Podobně jako u dospělých, adolescentů a dětí je taktéž u těhotných žen doporučována kombinovaná terapie nejméně třemi léčivy. Jejich výběr je silně individuální záležitost. Faktory, které mohou pomoci při rozhodování, jsou např. výskyt komorbidit, rezistence vůči konkrétním antiretrovirotikům apod. Pokud je těhotná žena léčena pomocí ART poprvé, režimy zahrnují 2 léčiva ze skupiny N(t)RTIs v kombinaci s léčivem ze skupiny PIs nebo INSTIs. Preferované kombinace N(t)RTIs jsou abakavir + lamivudin nebo TDF + emtricitabin (případně lamivudin), preferenční PIs jsou atazanavir či darunavir, vždy v kombinaci s ritonavirem jakožto boosterem. V případě INSTIs je preferenční raltegravir. Jestliže žena již ART podstupuje, doporučuje se při otěhotnění pokračovat v nastaveném režimu, výjimkou jsou režimy s didanosinem, stavudinem, ritonavirem (léčebná dávka, nikoli booster) a elvitegravirem/cobicistatem, které disponují vysokým rizikem toxicity. Úspěšnost terapie dokazuje fakt, že ve vyspělých zemích došlo ke snížení rizika přenosu HIV pod 2 %. Dle doporučení WHO by měly nasadit ART všechny těhotné a kojící ženy, a to nezávisle na klinickém stádiu onemocnění nebo počtu CD4 buněk (J. a V. 2009, Panel on Treatment of Pregnant Women with HIV Infection and Prevention of Perinatal Transmission 2017, Warszawski et al. 2008, WHO 2017a).

3.2.3 Tenofovir disoproxil fumarát (TDF)

TDF je diesterové proléčivo tenofoviru (TFV), patřící do skupiny nukleotidových inhibitorů RT (obrázek 2). Jedná se o první nukleotidový analog ze skupiny inhibitorů RT (NtRTIs), který byl schválen FDA pro léčbu HIV infekce. TFV, jakožto analog adenosin 5' monofosfátu, má velmi nízkou orální biodostupnost. Zlepšení absorpčního profilu a také zvýšený uptake léčiva do buňky umožnila právě syntéza proléčiva, tedy TDF (Gallant a Deresinski 2003, Chapman et al. 2003).



Obrázek 2. Vzorec TFV a jeho proléčiva. Převzato a upraveno z: Grigsby et al. (2010).

Mechanismus účinku:

Po orálním podání TDF do organismu dochází k hydrolytickému odštěpení obou esterových skupin proléčiva pomocí esteráz, které se nacházejí zejména ve střevním lumen a v plazmě. Vzniklý TFV se dostává do buněk pravděpodobně endocytózou, kde podléhá dvojité fosforylaci intracelulárními kinázami za vzniku aktivní formy TFV (TFV-DP, též tenofovir difosfát). Aktivní metabolit poté inhibuje funkci HIV RT tím, že soutěží o její vazebné místo s nativním substrátem deoxyadenosin 5'trifosfátem při začleňování do virové DNA. Po inkorporaci TFV-DP dojde k terminaci elongace DNA, poněvadž mu chybí esenciální ribózový kruh nutný pro navázání dalšího nukleotidu. Výhoda TFV jakožto nukleotidového analogu spočívá v tom, že již obsahuje jednu fosfátovou skupinu, nevyžaduje tedy iniciální fosforylační reakci, která je často limitujícím faktorem při použití nukleosidových analogů (Antoniou et al. 2003, Duwal et al. 2012, Fung et al. 2002, Chapman et al. 2003, Kearney et al. 2004). Je pouze slabým inhibitorem lidských DNA polymeráz (Tourret et al., 2013).

Farmakokinetické parametry:

Orální biodostupnost TDF při podání 300 mg dávky (doporučená denní dávka) na lačno dosahuje 25 %. Potrava s vysokým obsahem tuku zvyšuje biodostupnost až na 40 %, proto je doporučováno užívání TDF s tučným jídlem. Co se distribuce týče, vazba na

proteiny není příliš vysoká. V plazmě dosahuje hodnot 0,7 % a méně, u proteinů séra je horní hranice 7,2 %. Hlavní eliminační cesta vede přes ledviny, přičemž 80 % tvoří glomerulární filtrace a 20 % aktivní tubulární sekrece v proximálním tubulu. Právě z důvodu renální eliminace by neměl být TDF podáván pacientům s hodnotami clearance kreatininu nižšími než 60 ml/minutu. Eliminační plazmatický poločas je 17 hodin, intracelulární poločas se pohybuje v rozmezí 10 – 50 hodin (proliferující buňky 11 hodin, klidové buňky 49 hodin) (Antonioni et al. 2003, Battaglia et al. 2016, Gallant a Deresinski 2003, Chapman et al. 2003).

Nežádoucí účinky:

TDF je všeobecně dobře tolerovaným léčivem. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou asténie (tělesná slabost), bolest hlavy, průjem, flatulence, zvracení, nauzea a bolesti břicha (Chapman et al. 2003, Kearney et al. 2004). Dlouhodobé užívání N(t)RTIs obecně je spojeno s příznaky poškození mitochondrií – myopatie, periferní neuropatie, steatóza jater, lipodystrofie či laktátová acidóza. Rozsah poškození je však závislý na míře inhibice DNA polymerázy γ , tedy enzymu, který se nachází v mitochondrii a jenž je zodpovědný za replikaci mitochondriální DNA. Potenciál TFV indukovat poškození mitochondrií je v porovnání s ostatními látkami ze skupiny N(t)RTIs nízký (Birkus et al. 2002, Cihlar et al. 2002, Fung et al. 2002). Ačkoli nebyla prokázána cytotoxická aktivita TFV v epiteliálních buňkách proximálního tubulu ledvin, nefrotoxicita zahrnující zejména selhání ledvin a Fanconioho syndrom se u pacientů léčených TFV přesto objevila. Incidence tohoto nežádoucího účinku je poměrně vzácná (méně než 5 %), nicméně je doporučováno pravidelné monitorování pacienta (Fung et al. 2002, Lify et al. 2016). V proběhlých studiích se potvrdilo statisticky signifikantní zhoršení renálních funkcí spojené s užíváním TDF, klinický dopad problému nefrotoxicity však zůstává relativně nízký. Vzhledem k nejasnostem týkajících se vlivu TFV na renální funkce jsou třeba další, zejména dlouhodobé studie. Již se však ví, že riziko nefrotoxicity zvyšuje užívání dalších nefrotoxicích léčiv, současná diabetická nefropatie, arteriální hypertenze, věk nad 50 let a jaterní cirhóza (Battaglia et al. 2016, Cooper et al. 2010, Nelson et al. 2007). V toxikologických studiích bylo zjištěno, že velmi vysoké dávky TDF způsobují snížení kostní denzity, což může být teoreticky důsledek navozené renální dysfunkce (Gallant a Deresinski 2003, Grigsby et al. 2010). Co se rizika v těhotenství týče, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) zařadil TDF do kategorie B – předpokládá se bezpečnost užívání

na základě studií se zvířaty, nicméně studie s těhotnými ženami dostupné nejsou (Gallant a Deresinski, 2003).

Interakce:

TFV není substrátem, induktorem ani inhibítorem enzymového systému cytochrom P450 (CYP 450), pouze u CYP1A2 byla pozorována 6% redukce metabolismu. Z tohoto důvodu je potenciál farmakokinetických interakcí mezi TFV a léčivy metabolizovanými tímto cytochromem nízký. Klinické signifikance bylo dosaženo jen při současném podávání TDF s didanosinem (AUC didanosinu zvýšeno o 44-60 %), případně s atazanavirem (AUC atazanaviru sníženo o 25 %), což vedlo k nutnosti úpravy dávek. Léčiva snižující renální aktivitu nebo léčiva významně vylučována ledvinami mohou při současném užívání TDF v důsledku jeho hlavní eliminační cesty vést ke zvýšeným plazmatickým koncentracím, ať už TDF či spolu podávaných léčiv (Gallant a Deresinski 2003, Chapman et al. 2003, Kearney et al. 2004).

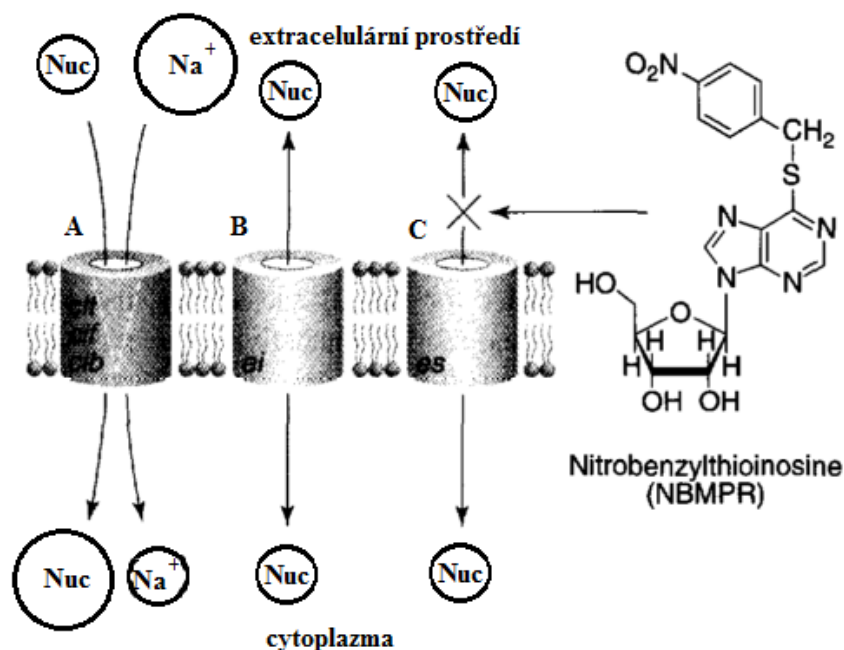
Indikace, použití:

FDA povolila TDF pro užívání u dětí od 2 let a starších HIV-infikovaných pacientů. Světová zdravotnická organizace (WHO) jej doporučuje jako léčivo první volby ze skupiny N(t)RTIs pro dospělé a děti starší 10 let. Doporučení WHO podávat TDF pacientům starších 10 let vychází částečně z možného nežádoucího účinku na vyvíjející se kosti. Výhodami TDF jsou jednoduché dávkování (300 mg denně v jedné dávce), málo nežádoucích účinků a účinnost nejen vůči HIV-1, ale také proti hepatitidě typu B. Fixní kombinace TDF s ostatními antiretrovirotiky v jedné tabletě jsou dnes široce dostupné zejména pro dospělé a adolescenty (Aurpibul a Puthanakit, 2015). TDF se používá společně s ostatními antiretrovirotiky pro léčbu HIV, ale schválen je též pro léčbu chronických HBV (virus hepatitidy B) infekcí u pacientů 12 let a více (Marcellin et al., 2013). Proto je vhodné jeho podávání pacientům, kteří trpí HIV a zároveň i HBV (Antoniou et al., 2003). Off label použití zahrnuje všechny tři preventivní režimy ART – PrEP, PEP a v kontextu s celou diplomovou prací pro nás nejdůležitější PMTCT (Drugs.com 2018, Gallant a Deresinski 2003, Krakower et al. 2012).

3.3 Nukleosidové transportéry

3.3.1 Funkce

Nukleosidové transportéry (NTs) jsou přítomny ve většině buněk lidského těla a zprostředkovávají transmembránový přenos purinových a pyrimidinových nukleosidů, které jsou důležité pro biosyntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Nejdetailněji je popsána role NTs v regulaci fyziologických účinků adenosinu jako je neurotransmise, vaskulární tonus či jeho významný vliv na kardiovaskulární aktivitu (Baldwin et al. 1999, Cass et al. 1999, Jennings et al. 2001). Na základě mechanismu transportu se NTs rozdělují do dvou skupin; a to ENTs (ekvilibrační nukleosidové transportéry) a CNTs (koncentrační nukleosidové transportéry). ENT je membránový protein, který realizuje membránový transport hydrofilních molekul nukleosidů mechanismem usnadněné difúze, přičemž směr difúze je určován směrem koncentračního gradientu těchto nukleosidů. CNT naopak umožňuje transport nukleosidů proti jejich koncentračnímu gradientu a využívá k tomu elektrochemický gradient sodných kationtů. Skupiny se významně liší též citlivostí vůči inhibitoru nitrobenzylthioinosinu (NBMPR). Ten ovlivňuje zejména ENTs, které se na základě senzitivity vůči NBMPR mohou dále dělit na senzitivní (*es*, equilibrative-sensitive, ENT1) a insenzitivní (*ei*, equilibrative-insensitive, ENT2) transportéry. Senzitivní typy transportérů jsou inhibovány NBMPR, vážou tento inhibitor s vysokou afinitou ($K_i < 10 \text{ nM}$), kdežto insenzitivní jsou inhibovány koncentracemi $> 10 \text{ }\mu\text{M}$. CNTs ve většině případů nejsou citlivé vůči tomuto inhibitoru (obrázek 3) (Baldwin et al. 1999, Kong et al. 2004, Mani et al. 1998).



Obrázek 3. Rozdělení NTs. CNTs (A) můžeme nazvat jako ko-transportéry, jenž řídí transport nukleosidů proti jejich koncentračnímu gradientu za využití sodných kationtů, jedná se tedy o aktivní transportéry. ENTs (B, C) zprostředkovávají pasivní transport, usnadňují pohyb nukleosidů ve směru jejich koncentračního gradientu. V závislosti na míře inhibice pomocí NBMPR dělíme ENT na insenzitivní (B) a senzitivní (C) transportéry. Velikost symbolů označujících nukleosidy (Nuc) a Na⁺ poukazuje na rozdíly v jejich relativních koncentracích na obou stranách buněčné membrány, kterých může být transportem dosaženo (Baldwin et al. 1999, Bicket a Coe 2016). Převzato a upraveno z: Baldwin et al. (1999).

CNTs a ENTs umožňují transport mnoha endogenních substrátů, mezi které patří např. adenosin, thymidin, cytidin, guanosin, uridin, inosin či hypoxantin. Existují však různé druhy těchto transportérů a s nimi spojená různá, ačkoli poměrně často se překrývající substrátová specifita. Relativně úzkou selektivitu a vysokou afinitu pro své přirozené substráty vykazují CNTs. Pyrimidinové nukleosidy preferenčně přenášejí CNT1 (*cit*), zatímco CNT2 (*cif*) jsou preferenční pro nukleosidy purinové. CNT3 (*cib*) zajišťují transport obou typů nukleosidů. ENTs, zahrnující dobře prozkoumané ENT1 a ENT2, jsou typické nízkou selektivitou, přenášejí pyrimidinové i purinové nukleosidy, ovšem s nižší afinitou vůči svým substrátům. ENT2 je unikátní díky jeho vysoké schopnosti přenášet nukleové báze, jako je např. adenin (Damaraju et al. 2003, Lu et al. 2004, Mani et al. 1998). V různé míře přenášejí i analoga endogenních substrátů (Errasti-Murugarren a Pastor-Anglada, 2010).

Léčiva s antineoplastickým či antivirotickým účinkem mají často strukturu nukleosidových analogů. Cíl jejich působení je lokalizován intracelulárně, transport přes plazmatickou membránu tak vytváří podmínku farmakologického účinku, což může být vzhledem k jejich hydrofilitě problém. Existuje mnoho důkazů, že právě NTs hrají významnou roli v intracelulární distribuci nukleosidů a nukleosidových analogů léčiv (Pastor-Anglada a Pérez-Torras, 2015).

3.3.2 Obecná tkáňová distribuce NTs

Savčí buňky exprimují více než pouze jeden typ NTs. Velice často se v rámci určitého typu buňky jedná o kombinaci zástupců z obou hlavních skupin – CNT a ENT. Důvod této ko-exprese je v mnoha případech zatím stále neznámý. Výzkum určitých epiteliálních buněk, a to konkrétně buněk intestinálního traktu a ledvinových tubulů, však umožnil krok vpřed k pochopení účelu asymetrického zastoupení CNT a ENT na apikální i bazolaterální membráně. Specifické rozložení NTs v těchto tkáních umožňuje vektoriální tok nukleosidů přes epiteliální bariéry z lumen do intersticiálního prostoru. Dá se proto říci, že rozmístění NTs hraje klíčovou roli v absorpčních a reabsorpčních procesech, realizovaných ve výše zmíněných tkáních. CNTs jsou umístěny na apikální membráně polarizovaných epiteliálních buněk. U druhého typu transportérů se zdá být situace složitější. Lokalizace ENT2 je poměrně striktně určena pro bazolaterální membránu, zatímco ENT1 je možno sledovat na obou stranách (Molina-Arcas et al., 2009). Jiný případ tvoří epiteliální tkáň lidské placenty – syncytiotrofoblast. Errastimurugarren et al. (2011) zjistili, že v lidské placentě je detekovatelná mRNA genů kódujících CNT1, CNT2, CNT3, ENT1 a ENT2. Existuje hypotéza, že na apikální straně, jenž je v kontaktu s maternální cirkulací, se nachází CNT1, ENT1 a ENT2, přičemž transportéry CNT1 a ENT2 prokázaly svou funkci také na straně bazolaterální, která je v kontaktu s cirkulací fetální. Tento případ poměrně unikátní distribuce CNTs vzbudil domněnku, že apikální a současně bazolaterální umístění CNT1 je klíčové pro zásobování placenty pyrimidinovými nukleosidy jak z maternální, tak z fetální cirkulace, a tedy nezbytné pro placentární růst.

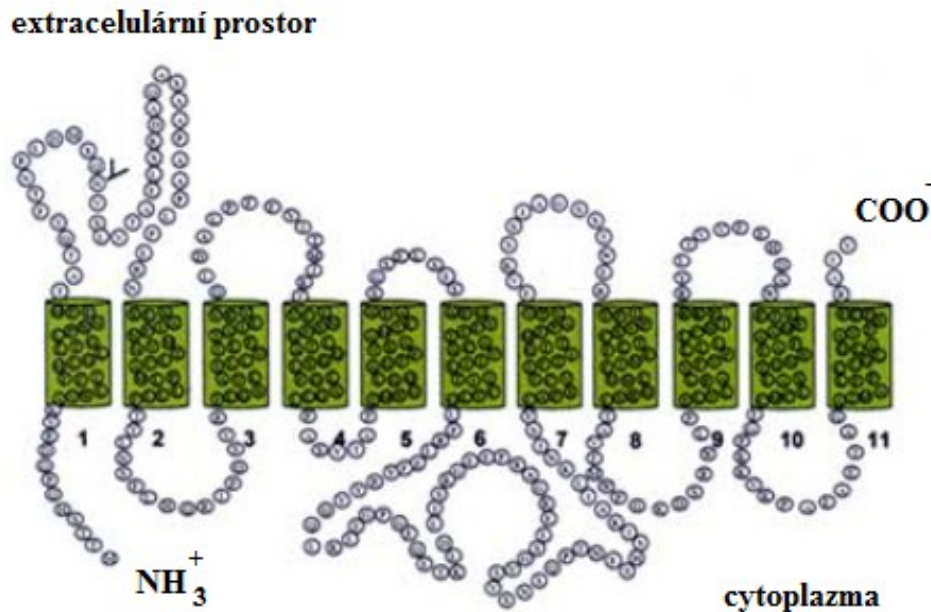
Vzhledem k široké distribuci NTs můžeme předpokládat klíčovou roli těchto membránových proteinů v regulaci nukleosidové homeostáze celého těla a pravděpodobně i ve farmakokinetice léčiv odvozených od nukleosidů, zahrnujících antineoplastika či antiretrovirotika. Distribuce NTs společně s jejich specifickou

tkáňovou regulací může mít z tohoto důvodu výrazný vliv v oblasti farmakologie (Molina-Arcas et al., 2009).

3.3.3 Ekvilibrační nukleosidové transportéry

ENTs jsou v organismu kódovány genem *SLC29A*. Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o proteiny, které umožňují pasivní transport substrátů prostřednictvím usnadněné difúze, přičemž přenos může probíhat oběma směry. V současnosti rozeznáváme čtyři druhy ENTs – ENT1-4. Nejlépe prozkoumané jsou transportéry ENT1 a ENT2. Stojí za zmínku, že tyto dvě struktury jsou cílem pro dipyridamol, dilazep nebo draflazin, léčivé látky vyvolávající vazodilataci (Molina-Arcas et al., 2009). ENTs jsou typické svou širokou substrátovou specifiitou. Všechny přenášejí adenosin, v rámci skupiny se mezi sebou liší ve schopnosti transportu jiných nukleosidů, případně nukleobází (Beal et al., 2004).

Struktura všech ENTs je tvořena 11 transmembránovými (TM) doménami, ve kterých se amino zakončení (N-konec) nachází v cytoplazmě, zatímco karboxy zakončení (C-konec) je lokalizováno extracelulárně (obrázek 4). Velká extracelulární smyčka spojující domény 1 a 2 je místem N-glykosylace transportéru. U hENT1 tato reakce probíhá pouze v jednom místě, kdežto hENT2 má N-glykosylační místa dvě (Beal et al., 2004). V případě hENT1 bylo potvrzeno, že N-glykosylace je esenciální pro správnou lokalizaci a funkci proteinu (Bicket a Coe, 2016). hENT3 podléhá N-glykosylaci taktéž ve smyčce mezi doménou 1 a 2, hENT4 má glykosylační místo blízko C-konci, jejich glykosylační status však zůstává neznámý (Beal et al., 2004).



Obrázek 4. Předpokládaná sekundární struktura hENT1. TM α -helixy jsou označeny čísly, místo N-glykosylace je označeno symbolem „Y“. Oblast mezi TM doménami 3 a 6 je zodpovědná za senzitivitu nebo rezistenci vůči NBMPR a koronárním vazodilatancím. U hENT2 umožňují TM domény 1 a 6 transport deoxynukleosidů, zatímco 5 a 6 se podílejí na rozpoznávání nukleových bází (Molina-Arcas et al., 2009). Převzato a upraveno z: Kong et al. (2004).

Z důvodu obousměrného působení mohou zprostředkovávat nejen uptake, ale i eflux svých substrátů. Tato skutečnost má význam mimo jiné právě tehdy, je-li substrátem terapeuticky využívaný analog nukleosidů. Selektivní inhibice ENTs může být tak jedním ze způsobů, jak dosáhnout vyšší účinnosti nukleosidových analogů, používaných zejména v protinádorové nebo antiretrovirální terapii, zvláště u těch, jenž jsou substráty CNTs (Beal et al. 2004, Molina-Arcas et al. 2009).

- **hENT1**

Lidský ENT1 (hENT1, SLC29A1) se skládá z celkem 456 proteinů. Dá se říci, že ve tkáních je téměř všudypřítomný, ačkoli jeho množství se liší v závislosti na typu tkáně. Vysoké množství je exprimováno např. v erythrocytech, placentě, srdci, játrech, plicích či tlustém střevě (Beal et al. 2004, Kong et al., 2004). Expresi hENT1 v lidském mozku popisuje Jennings et al. (2001). S využitím hENT1 polyklonálních protilátek zjistil, že přítomnost tohoto transportéru je typická zejména pro frontální a parietální lalok. Navíc je zde zajímavá ko-exprese s adenosinovými A₁ receptory, která naznačuje důležitou roli hENT1 při regulaci neuromodulační aktivity adenosinu v lidském mozku.

Substráty tvoří rozsáhlou skupinu purinových (adenosin, guanosin, inosin) a pyrimidinových (uridin, cytidin, thymidin) nukleosidů, přičemž hodnota K_m se pohybuje od 50 μM (adenosin) ke 680 μM (cytidin). Uracil, jakožto pyrimidinová báze, není substrátem hENT1. Co se nukleosidových analogů týče, významnými substráty hENT1 jsou zejména analogy využívané v protinádorové terapii – kladribin, gemcitabin, fludarabin, merkaptopurin či cytarabin. Nukleosidy používané v antiretrovirální terapii, jako je např. didanosin, zalcitabin či zidovudin jsou přenášeny jen velmi slabě. Tento fakt naznačuje, že v rozpoznání substrátu hraje velmi důležitou roli 3'OH skupina v molekule. Koronární vazodilatační látky (dipyridamol a další) patří mezi potenciální inhibitory hENT1 – vážou se na tento protein, avšak nejsou transportovány do buněk (Beal et al. 2004, Kong et al. 2004, Pastor-Anglada a Pérez-Torras 2015).

- **hENT2**

ENT2, nacházející se v lidském organismu (hENT2, SLC29A2) je tvořen 456 proteiny. Sekvence aminokyselin je ze 46 % identická se sekvencí v hENT1. Je exprimován v široké škále tkání, zahrnujících mozek, srdce, plíce, thymus, prostatu, slinivku, placentu i ledviny. Nejvíce se však nachází v kosterním svalstvu, což naznačuje, že hENT2 hraje velkou roli jako transportér kosterního svalstva (Beal et al. 2004, Crawford et al. 1998, Damaraju et al. 2003). V mozku je lokalizován v jiných oblastech než hENT1, a to zejména v mozečku a okolí mozkového kmene (Jennings et al., 2001).

Stejně jako hENT1 přenáší širokou škálu purinových a pyrimidinových nukleosidů. Afinitu ke svým substrátům však vykazuje v některých případech až 19,3x nižší. Výjimku tvoří inosin, u kterého se afinita uvádí 4x vyšší. Schopnost transportovat i purinové a pyrimidinové nukleobáze významně odlišuje hENT2 od předchozí skupiny transportérů. Hodnota K_m pro báze se pohybuje v rozmezí 0,7-2,6 mM. Rozdílná je též lepší schopnost přenášet dideoxynukleosidy zidovudin, zalcitabin i didanosin, díky které se stává hENT2 důležitým transportérem pro celulární uptake těchto klinicky významných léčiv užívaných v ART. Jako další substrát hENT2 byl prokázán i gemcitabin. Vzhledem k těmto skutečnostem lze obecně říct, že hENT2 je ohledně rekognice substrátu ve srovnání s hENT1 více promiskuitní (Beal et al. 2004, Kong et al. 2004).

- **hENT3 a hENT4**

Třetí člen skupiny ENTs, hENT3 (SLC29A3), je tvořen 475 proteiny. Velmi dlouhá hydrofilní N-terminální oblast před TM doménou 1 jej odlišuje od předchozích dvou

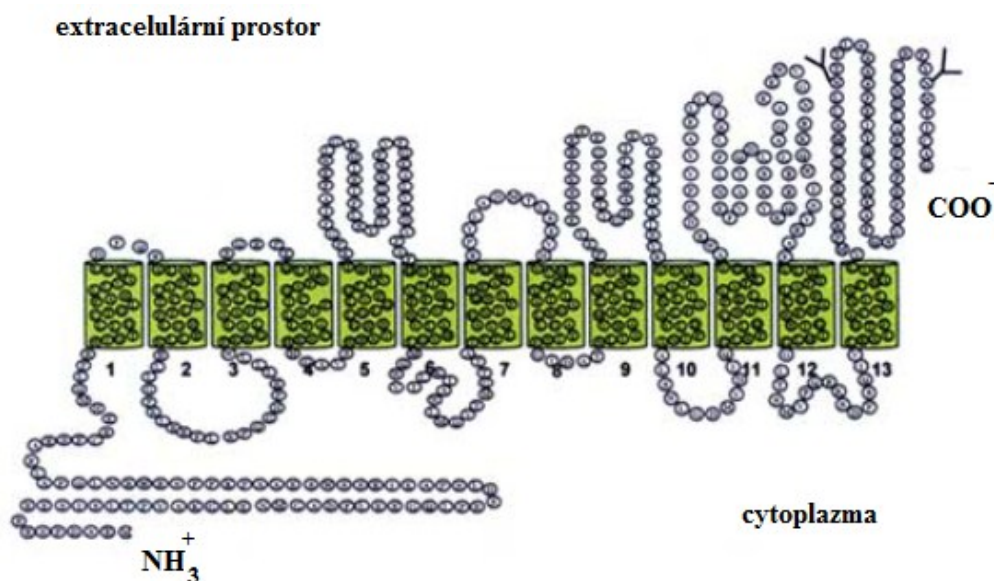
zástupců. Je široce exprimován v různých lidských tkáních, zejména je však zastoupen v placentě (Beal et al., 2004). Jedná se o pH-dependentní intracelulární transportér. Optimální hodnota pH 5,5 je pravděpodobně odrazem umístění proteinu v kyselém intracelulárním kompartmentu. Vykazuje širokou substrátovou specifitu, umožňuje i transport nukleové báze adeninu. Je relativně insenzitivní vůči klasickým ENT inhibitorům (NBMPR, dilazep nebo dipyridamol) (Molina-Arcas et al., 2009).

Posledním transportérem ze skupiny ENTs je hENT4 (SL29A4), složený z 530 proteinů. Je rozšířen ve všech lidských tkáních (Beal et al., 2004). Co se jeho funkce týče, poměrně se liší od ostatních zástupců ENTs. Původně byl popsán jako monoaminový/organický transportér (PMAT), ukazuje se však, že má v kyselém pH schopnost přenášet adenosin. Klasickými inhibitory ENTs je ovlivněn jen slabě (Molina-Arcas et al., 2009). K pochopení funkce hENT4 jsou třeba další studie (Kong et al., 2004).

3.3.4 Koncentrační nukleosidové transportéry

Gen kódující CNTs v lidském organismu je *SLC28A*. Tyto transportéry zprostředkovávají aktivní jednosměrný přenos nukleosidů a jejich analogů do buňky. Ke své funkci využívají TM gradient sodných kationtů, jejichž přítomnost je tedy pro tyto proteiny esenciální. Existují tři nejznámější subtypy CNTs – CNT1-3. Ve srovnání s ENTs vykazují obecně vyšší selektivitu vůči svým substrátům, která je spojena s vysokou afinitou – většinou v rozsahu 10 – 100 μ M. Společným substrátem pro všechny CNTs je uridin, v závislosti na selektivitě vůči ostatním substrátům se mezi sebou liší ve svých funkcích. Stechiometrie translokačního procesu zprostředkovaném CNTs může ovlivnit intracelulární koncentraci nukleosidů. Zatímco hCNT1 a hCNT2 vykazují stechiometrii 1:1 (nukleosid:sodík), pro hCNT3 je typická výměna jednoho nukleosidu za dva sodíky (1:2) (Gray et al. 2004, Molina-Arcas et al. 2009).

Topologický model hCNT proteinů se skládá z 13 TM helixů s N-koncem umístěným v cytoplazmě a C-koncem hydrofilní povahy v extracelulárním prostoru (obrázek 5). Právě C-zakončení je místem glykosylace transportéru (Podgorska et al., 2005).



Obrázek 5. Předpokládaná sekundární struktura hCNT1. TM α -helixy jsou označeny čísly, místo N-glykosylace je označeno symbolem „Y“. Studie na krysích CNT1 a CNT2 dokazují, že hlavními místy důležitými pro rozpoznání specifického substrátu jsou TM domény 7-8. Substrátová selektivita CNTs je tedy určena několika klíčovými aminokyselinami, lokalizovanými na těchto doménách (Kong et al., 2004). Převzato a upraveno z: Kong et al. (2004).

- **CNT1**

Výskyt CNT1 (SLC28A1) je typický zejména pro epitelální tkáň, jako jsou ledviny, játra a tenké střevo. Preferenčně přenáší pyrimidinové nukleosidy, silným substrátem je např. thymidin. CNT1 umožňují přenos i některých nukleosidových analogů užívaných v terapii HIV. Patří sem zidovudin, lamivudin a zalcitabin. Přenáší též cytarabin a gemcitabin, analoga určená pro léčbu širokého spektra nádorů (Gray et al. 2004, Kong et al. 2004, Molina-Arcas et al. 2009).

- **CNT2**

Ve srovnání s CNT1 mají CNT2 (SLC28A2) širší tkáňovou distribuci. Můžeme je najít kupříkladu v ledvinách, játrech, srdci, mozku, placentě, pankreatu, kosterním svalstvu nebo duodenu. Jsou ubikvitárně rozšířeny v buňkách imunitního systému, exprese je však velmi variabilní. Zprostředkovávají transport purinových nukleosidů a také uridinu. Uridin je považován za univerzální substrát pro všechny NTs (Damaraju et al., 2003). Na rozdíl od CNT1 nepřenáší zidovudin ani zalcitabin. Mezi substráty však patří didanosin, používaný v léčbě HIV, a ribavirin, určený pro léčbu hepatitidy C. Žádná známá

nukleosidová analoga s využitím v protinádorové terapii nejsou transportována pomocí CNT2 (Gray et al. 2004, Kong et al. 2004, Molina-Arcas et al. 2009).

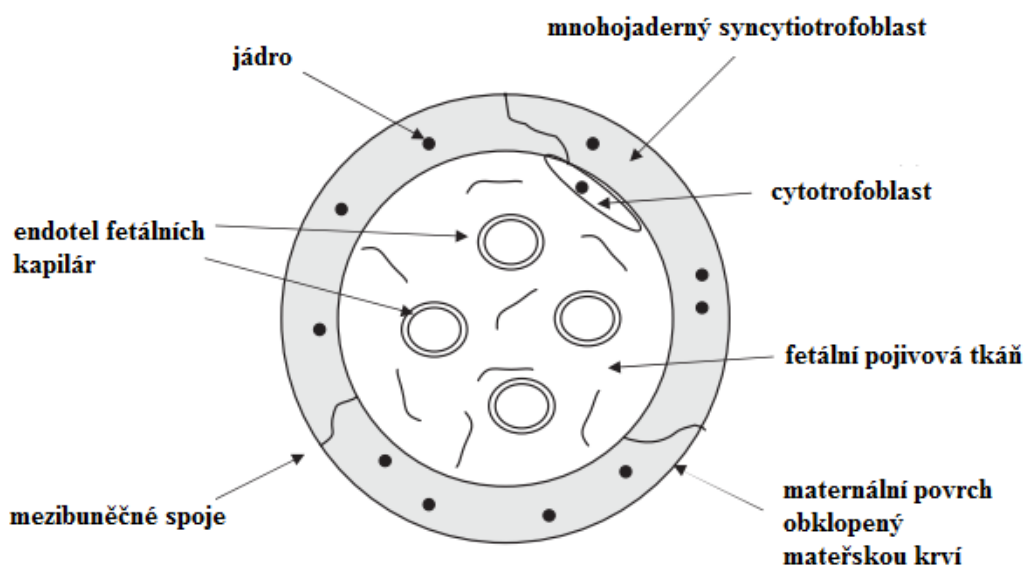
- **CNT3**

Největší množství CNT3 (SLC28A3) se nachází ve slinivce, průdušnici, kostní dřeni a mléčných žlázách, v menším množství je nalezneme i v dalších tkáních. Poslední skupina CNTs vykazuje nejširší substrátovou selektivitu, přenáší purinové i pyrimidinové nukleosidy. Jsou důležité zejména pro protinádorovou léčbu, poněvadž umožňují influx mnoha cytotoxických analogů, zahrnujících kladribin, gemcitabin, fludarabin či zebularin. Mezi substráty můžeme zařadit též zidovudin, zalcitabin a didanosin, přenos je však nižší (Gray et al., 2004).

3.4 Modely studie transplacentárního přechodu

Pochopení placentárního transportu látek, se kterými se těhotné ženy mohou běžně setkat, je důležité k redukci potenciálních rizik plynoucích z vystavení plodu těmto látkám. Jedná se např. o medikaci matky, zdrojem škodlivých substancí však může být i samotný životní styl (kouření, konzumace alkoholu, produkty denní péče) nebo expozice škodlivin z životního či pracovního prostředí. Placenta poskytuje významné spojení mezi matkou a plodem, zajišťuje přísun kyslíku a živin do plodu. Plní také funkci bariéry, která však není absolutní. Jedná se o membránovou strukturu oddělující mateřskou a fetální krevní cirkulaci, umožňující výměnu látek v obou směrech – transport z mateřské do fetální cirkulace a naopak. Krevní cévy plodu uložené v pupečnickové šňůře se v místech zvaných placentární laloky nebo též kotyledony větví a tvoří tzv. vilový strom, který je omýván mateřskou krví. Ve zralé placentě rozlišujeme tři vrstvy, jež od sebe oddělují mateřský a fetální krevní oběh: syncytiotrofoblast, tenká vrstva pojivové tkáně a endotel fetálních kapilár (obrázek 6) (Poulsen et al. 2009, Sastry 1999).

Mnoho cizích látek se přes placentu v určitém rozsahu dostává a může negativně ovlivnit růst plodu a vývoj jeho orgánů. Na důležitost ochrany vyvíjejícího se plodu vůči možným nežádoucím účinkům cizích látek upozornila zejména 60. léta 20. století, známá tzv. thalidomidovou aférou (Myren et al. 2007, Poulsen et al. 2009). Aby bylo možné zajistit efektivní a bezpečnou terapii matky, plodu nebo obou, je důležité znát toxicitu užívané látky vůči vyvíjejícímu se plodu a mechanismy ovlivňující placentární farmakokinetiku.



Obrázek 6. Průřez větve vilového stromu. Syncytiotrofoblast je tvořen mnohojadernými buňkami, které vznikají spojením prekurzorových jednojaderných buněk cytotrofoblastu. Právě tato struktura hraje významnou roli v regulaci transportu živin, eliminace odpadních látek plodu a ostatních procesů spojených s udržováním těhotenství (Poulsen et al., 2009). Převzato a upraveno z: Mitra Pallabi (2008).

Ze zřejmých etických důvodů a také kvůli technickým omezením není *in vivo* studium transportu léčiv přes lidskou placentu ve velkém měřítku možné. Proto bylo vyvinuto několik alternativních *ex vivo*, *in vivo/in situ* a *in vitro* experimentálních metod, které napodobují plnou funkci vrstvy syncytiotrofoblastu *in vivo* (Staud a Ceckova 2015, Vähäkangas a Myllynen 2006).

3.4.1 Modely *ex vivo*

Do této skupiny modelů patří *ex vivo* placentární perfuze, též zvaná technika perfuze kotyledonu. Metoda poskytuje unikátní možnost provádět cenný výzkum na lidské placentě bez etických problémů vzhledem k neinvazivní povaze experimentu (Poulsen et al., 2009). Jedná se o jediný příklad studia transplacentární farmakokinetiky v organizované placentární tkáni lidského původu. Obrovskou výhodou této techniky je možnost sledovat transport látek v obou směrech, tedy maternální-fetální i fetální-maternální. Při zkoumání funkce transportních proteinů v placentární bariéře touto metodou se využívají specifické substráty a inhibitory a provádějí se na koncentracích závislé experimenty. Díky poporodní životaschopnosti placenty, která je zachována až 48 hodin po porodu, je umožněno nejen studium transportu léčiv, ale též placentárního

metabolismu, produkce a uvolňování hormonů a enzymů nebo transportu živin a odpadních produktů (Myllynen et al. 2005, Staud et al. 2012). Limitace metody spočívá v nutnosti provádění pokusu na zralé placentě z období třetího trimestru, model tedy nereflektuje situaci v nezralém orgánu (Staud a Ceckova, 2015).

Kultivace explantátů placentární tkáně nebo placentární vilové fragmenty představují další možnosti *ex vivo* studií. Hlavní výhodou je zachování struktury tkáně, zachován je také vliv regulačních faktorů uvolňovaných extratrofoblastovými buňkami. Studium exprese, funkce a regulace placentárních transportérů je navíc možné ve všech stádiích těhotenství. Nevýhodou může být heterogenní kompozice fragmentů, nepřítomnost fetální cirkulace a poměrně omezená životaschopnost (Staud a Ceckova 2015, Staud et al. 2012).

3.4.2 Modely *in situ*, *in vivo* a další

Široce využívaným modelem je *in situ* perfuze placenty různých živočišných druhů (myš, potkan, ovce, makak). Zejména duální perfuze potkaní placenty je dobře zavedený model, který byl úspěšně použit ke zkoumání placentární fyziologie a farmakologie. Výhoda této metody spočívá v zabezpečení kompletního fyziologického systému. Navíc se nabízí možnost podat před experimentem těhotným samičkám látky ovlivňující lékové transportéry či enzymy (induktory apod.). Problém nastává s uvědoměním si skutečnosti, že placenta disponuje více než kterýkoli jiný orgán obrovskými mezidruhovými rozdíly. Odlišnosti v morfologii placenty a též v délce gestace mezi různými živočišnými druhy tvoří velkou překážku při extrapolaci dat získaných během těchto experimentů na lidský organismus. Nevýhodou je také stejně jako u výše zmíněné *ex vivo* perfuze lidské placenty technická náročnost metody (Poulsen et al. 2009, Staud et al. 2006, Staud a Ceckova 2015, Vähäkangas a Myllynen 2006).

Velmi hodnotným *in vivo* modelem je tzv. knock-outovaná myš. Tato myš postrádá zkoumaný transportér buď z důvodu přirozené deficiencie nebo díky cílenému knock-outu genu/ů kódujících tento transportér. Spárování samičky a samečka o určitém genotypu pak vede ke vzniku tří různých genotypů. Role placentárního transportéru potom může být vyhodnocena porovnáním míry penetrace léčiva přes placentu v souvislosti s nulovou, střední nebo vysokou expresí transportéru (Staud et al., 2012). Up-regulace ostatních transportérů, která se může u těchto myší objevit, bývá příčinou ovlivnění

výsledků, což se společně s mezidruhovými rozdíly považuje za nevýhodu metody (Staud a Ceckova, 2015).

Za zmínku stojí též metoda měření koncentrace látky v krvi matky a plodu a určení poměru těchto koncentrací, což umožňuje kvantifikaci rovnovážné (steady-state) koncentrace léčiva podaného matce a odhad expozice plodu této látce *in vivo*. Využití této metody je možné jen pro steady-state podmínky, vzorky se navíc odebírají pouze při porodu, získání hodnot je tedy omezeno pouze pro plně zralou placentu. Role placentárních transportérů a informace ohledně kinetiky přechodu zůstávají neobjasněny. Možná je také určitá zvířecí modifikace této metody, při které se prostřednictvím infuze podává těhotným samičkám léčivo, k nevýhodám se však přidává obtížná extrapolace dat na člověka z důvodu mezidruhových rozdílů (Staud a Ceckova, 2015). V současnosti se rozvíjí moderní *in silico* modely (Panitchob et al., 2015).

3.4.3 Modely *in vitro*

V průběhu posledních dekád bylo vyvinuto pro studii placentárního přenosu hned několik *in vitro* metod. Ve srovnání s předchozími modely jsou nejjednodušší na provedení, poměrně levné, reprodukovatelné a materiál je relativně lehce dostupný (Myllynen et al., 2005). Jak již bylo zmíněno výše, nejdůležitější typ buněk pro placentární transport představují trofoblasty, diferencující se v syncytiotrofoblast. Jedním z *in vitro* modelů jsou právě lidské primární trofoblastové buňky umožňující studium exprese a genové regulace různých transportérů ve všech stádiích těhotenství. Jedná se však o velmi těžko kultivovatelný materiál z důvodu nízké životaschopnosti buněk, problémem je též kontaminace jinými buněčnými typy. Primární trofoblasty navíc nedisponují schopností růstu v konfluentní monovrstvě, což znemožňuje provedení transportních studií na semipermeabilních membránách (Staud a Ceckova 2015, Vähäkangas a Myllynen 2006).

Lepší alternativu představují tzv. nesmrtelné buněčné linie placentárního původu. Obecně existují celkem tři hlavní typy buněčných linií odvozených z lidské placenty, které se liší způsobem vzniku. Nejvýznamnější skupinu z nich tvoří právě buňky odvozené z choriokarcinomu. Ačkoli se nejedná o fyziologickou buněčnou linii, což je považováno za jednu z nevýhod modelu, morfologicky jsou velmi podobné fyziologickým trofoblastům a také exprimují podobné biochemické markery. Rozlišujeme tři nejdůležitější choriokarcinomové lidské buněčné linie – BeWo, Jar a JEG-3, sdílejících mnoho stejných vlastností, avšak v určitých charakteristikách od sebe odlišné. Nejvíce

jsou v toxikologických *in vitro* studiích transplacentárního přenosu a metabolismu používány BeWo buňky. Tato buněčná linie maligního lidského choriokarcinomu, získaná z tumoru rezistentního vůči methotrexátu (Friedman a Skehan, 1979), je pro účely studia zvláště atraktivní, protože vykazuje dobrou stabilitu, je relativně nenáročná a dorůstá do konfluentní monovrstvy (v případě klonu BeWo b30) (Liu et al. 1997, Myren et al. 2007, Staud a Ceckova 2015, Vähäkangas a Myllynen 2006). *In vitro* experimenty s BeWo buněčnou linií mají jednoduché provedení, nejsou náročné na čas a umožňují za krátký časový interval získat celou škálu různých výsledků (Poulsen et al., 2009). Za nevýhody tohoto modelu se považuje jeho již zmíněný nefyziologický původ a s tím spojený fakt, že exprese a regulace transportérů nereflektuje situaci týkající se fyziologického trofoblastu. Exprese transportérů se navíc liší mezi jednotlivými klony BeWo buněk (Staud a Ceckova, 2015).

Ke zkoumání placentárních transportních funkcí na *in vitro* úrovni mohou být použity též membránové vezikuly, získané z trofoblastových buněk izolovaných z lidské nebo zvířecí placenty. Membránové vezikuly lze využít ke studiu lékových interakcí vyplývajících ze vzájemného působení léčiv na transportérech, a to v různých stádiích těhotenství. Extrapolace pro *in vivo* situaci je však náročná (Staud a Ceckova 2015, Staud et al. 2012).

Všechny výše zmíněné metody mají určité výhody i nevýhody. Žádná z nich však nedokáže uspokojivě odpovědět na všechny otázky týkající se exprese a funkce placentárních transportérů nebo jejich vlivu na transplacentární farmakokinetiku. Proto je obecně doporučeno využití více typů modelů a získané výsledky pak zhodnotit jako celek (Staud et al., 2012).

4. HYPOTÉZA

TFV ve formě proléčiva TDF nachází v současné době významné využití jako součást cART v PMTCT HIV. Znalost farmakokinetiky TFV/TDF u těhotných žen s důrazem na transplacentární přenos do plodu je nezbytná pro zabezpečení adekvátní a dobře tolerované medikace těhotné ženy a jejího dítěte (Flynn et al., 2011).

Transportérů, u kterých byla potvrzena jejich interakce s TFV nebo TDF, je dnes již několik. Existují dvě skupiny transportních proteinů, ABC (ATP-binding cassette) efluxní transportéry a SLC (solute carrier) transportéry zajišťující buněčný uptake (Kis et al., 2010).

Mezi jedny z nejvýznamnějších transportních proteinů náležících do rodiny ABC transportérů patří P-glykoprotein (P-gp, ABCB1/MDR1), BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2) a multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2, ABCC2). Tyto transportéry jsou exprimovány v různých tkáních lidského těla, mezi něž patří také placentární syncytiotrofoblast. Umožňují eflux potenciálně škodlivých substrátů ze syncytiotrofoblastu zpět do maternálního oběhu, čímž zajišťují ochranu plodu (Staud et al., 2012). Neumanova et al. (2014) ve své studii prokázali, že TDF je substrátem P-gp a BCRP, TFV však nikoliv. Názory na interakci TFV s MRP2 jakožto třetím nejdůležitějším zástupcem ABC proteinů exprimovaných ve vysoké míře v placentě (Staud et al., 2012) se neshodují. Zatímco Ray et al. (2006) ve svém článku prokázali, že TFV je substrát MRP2, Neumanova et al. (2014) toto nepotvrdili pro TFV ani TDF.

Ze skupiny SLC transportérů je poměrně detailně popsána interakce TFV s transportéry pro organické anionty 1 a 3 (OAT1 a OAT3) (Ray et al. 2006, Uwai et al. 2007). Exprese těchto proteinů je typická hlavně pro ledviny, v placentě se nenacházejí. OAT1 a OAT3 jsou lokalizovány v bazolaterální membráně renálních epiteliálních buněk a podílejí se na vektoriálním transportu TFV v renálních proximálních tubulech (Kis et al. 2010, Nabekura et al. 2015). TDF pak inhibuje transportéry pro organické kationty, OCT1, OCT2 a OCT3 (Minuesa et al., 2009).

NTs hrají důležitou roli ve farmakokinetice většiny léčiv odvozených od nukleosidů, které se často užívají v protinádorové a protivirové terapii (Molina-Arcas et al. 2009, Pastor-Anglada a Pérez-Torras 2015) a proto lze předpokládat, že NTs budou ovlivňovat i placentární transfer tohoto typu léčiv. Tuto domněnku potvrzuje např. studie provedená s didanosinem, v níž byl prokázán uptake didanosinu pomocí placentárního ENT2 (Sato

et al., 2009). Lze tedy předpokládat, že placentární transport TFV/TDF je vzhledem k nukleosidovému původu zprostředkováván ENTs a/nebo CNTs.

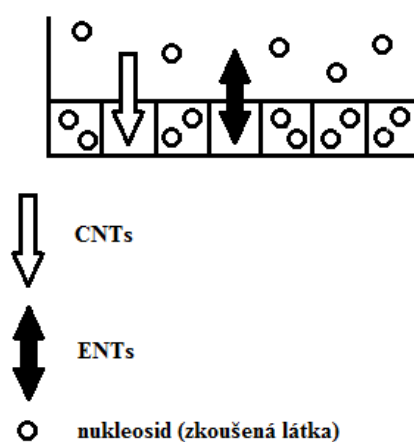
5. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je studovat roli placentárních NTs v membránovém přestupu TFV a TDF pomocí akumulčních experimentů na buněčné linii BeWo odvozené od placentárního choriokarcinomu.

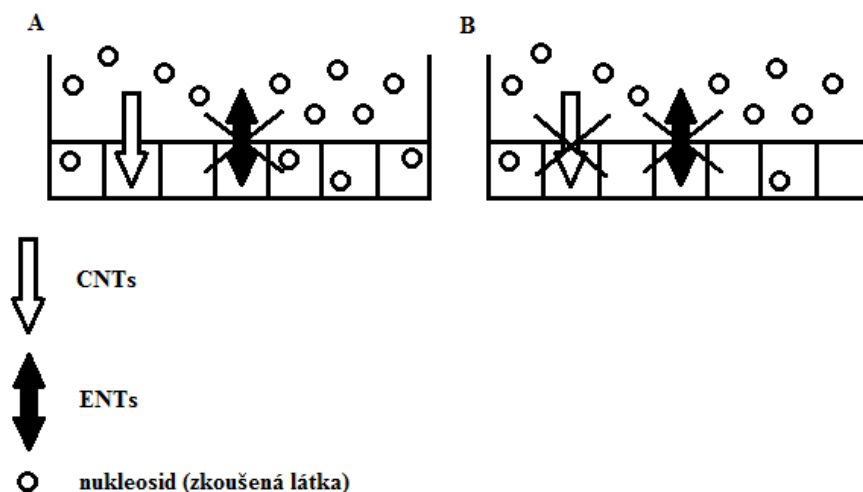
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Princip použité metody

Ke zjišťování interakcí zkoušených nukleosidů s NTs BeWo buněk byla použita akumulční metoda, která je založena na aplikaci zkoušené látky na apikální stranu polarizované monovrstvy buněk a následném měření množství látky, jenž se vchytilo v buňkách. Jestliže je léčivo substrátem NTs, můžeme sledovat sníženou akumulaci v přítomnosti specifických inhibitorů (obrázek 7, 8).



Obrázek 7. Modelový příklad látky, jejíž transport přes plazmatickou membránu BeWo buněk je ovlivňován prostřednictvím NTs.



Obrázek 8. Snížení akumulace zkoušené látky v případě použití inhibitoru ENTs (NBMPR) (A) nebo všech NTs (uridinu) (B) napovídá, že zkoušená látka je substrátem NTs.

6.2 Metodika

6.2.1 Chemikálie a reagensie

- [³H]-Adenosin = [³H]-ADE (Moravek Biochemicals; California, USA)
- [³H]-Thymidin = [³H]-THY (Moravek Biochemicals; California, USA)
- [adenin-8-³H]-TDF = [³H]-TDF (Moravek Biochemicals; California, USA)
- [adenin-2,8-³H]-TFV = [³H]-TFV (Moravek Biochemicals; California, USA)
- Bicinchoninic acid assay kit (ThermoFisher Scientific; Rockford, USA)
- DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- FBS – fetální hovězí sérum (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- HAM's F-12 Nutrient Mixture (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Na⁺ pufr – složení dle Yamamoto et al. (2007): 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM glukózy a 25 mM Tris, pH upraveno na 7,4 pomocí HEPES
- Na⁺ free pufr – složení dle Yamamoto et al. (2007): 140 mM NMDG, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM glukózy a 25 mM Tris, pH upraveno na 7,4 pomocí HEPES
- NBMPR – S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- P/S – Penicilin/Streptomycin
- PBS – fosfátový tlumivý roztok (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- SDS – sodium dodecyl sulfate (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Uridin (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)

6.2.2 Buňky

BeWo buněčná linie byla získána z institutu ECACC (European Cell Culture Collection) se sídlem v Salisbury (Wiltshire, UK). Kultivace probíhala v médiu HAM's F-12 (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA), které obsahuje D-glukózu v koncentraci 10 mM, obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra (FBS) společně s přísadkou antibiotik P/S (1 %), a to v 5% atmosféře CO₂ při teplotě 37°C. Výměna média (HAM's F-12 s 10 % FBS a 1 % P/S) probíhala ve dvoudenním intervalu, buňky byly kultivovány do plné konfluency (cca kolem 4-5 dní). Buňky byly dále vysety na 24-jamkovou kultivační destičku v hustotě 3,0 x 10⁵/jamka.

6.2.3 Postup experimentu

Experiment byl navržen dle publikace Yamamoto et al. (2007) s mírnými modifikacemi. Akumulační studie byla provedena při teplotě 37°C v CO₂ inkubátoru nebo na ledu při 4°C. Nejprve byla mikroskopicky zkontrolována integrita buněk, případné problémy byly označeny, a poté bylo odsáto kultivační médium. Dále byly buňky omyty transportním Na⁺ pufr (140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM glukózy a 25 mM Tris, pH upraveno na 7,4 pomocí HEPES) (0,5 ml). Následovala pre-inkubace (10 min) v předpřipraveném transportním pufru (0,25 ml) s/bez inhibitorů – NBMPR (0,1 μM a 100 μM) nebo uridin (5 mM). V další fázi experimentu byl pre-inkubační roztok odsát a nahrazen inkubačním roztokem s/bez inhibitorů (0,25 ml), který obsahoval navíc radioaktivně značenou testovanou látku. Celková aktivita modelových substrátů byla 0,4 μCi/ml, což odpovídalo koncentracím [³H]-ADE (0,018 μM) a [³H]-THY (0,005 μM). Celková použitá aktivita u testovaných látek byla vyšší, a to 1 μCi/ml, což odpovídalo následujícím koncentracím [³H]-TFV (0,074 μM) či [³H]-TDF (0,261 μM). Inkubace probíhala v časovém intervalu 5 min. Poté akumulace ukončena odsátím inkubačního roztoku a rychlým omytím transportním Na⁺ pufr (0,5 ml), který byl vychlazen na teplotu 4°C. Nakonec byla provedena lýza buněk pomocí 0,02% SDS. Koncentrace radioizotopů byla měřena metodou LSC (liquid scintillation counting) přístrojem Tri-Carb 2009 TR Perkin Elmer. Získané hodnoty byly vztaženy na koncentraci proteinu, který byl stanoven pomocí bicinchoninic acid assay kit (ThermoFisher Scientific; Rockford, USA), a jsou uváděny v jednotkách pmol/mg proteinu.

Výše popsáný experiment byl proveden také v jiné modifikaci, a to konkrétně za použití transportního pufru bez Na⁺ (Na⁺ free pufr, ve kterém byl NaCl nahrazen za N-methyl-D-glukamin, NMDG). Jako kontrola byl opět použit Na⁺ pufr, prostředí pro inhibitor NBMPR však tvořil Na⁺ free pufr. Uridin jakožto inhibitor nebyl v tomto případě použit.

6.2.4 Statistická analýza

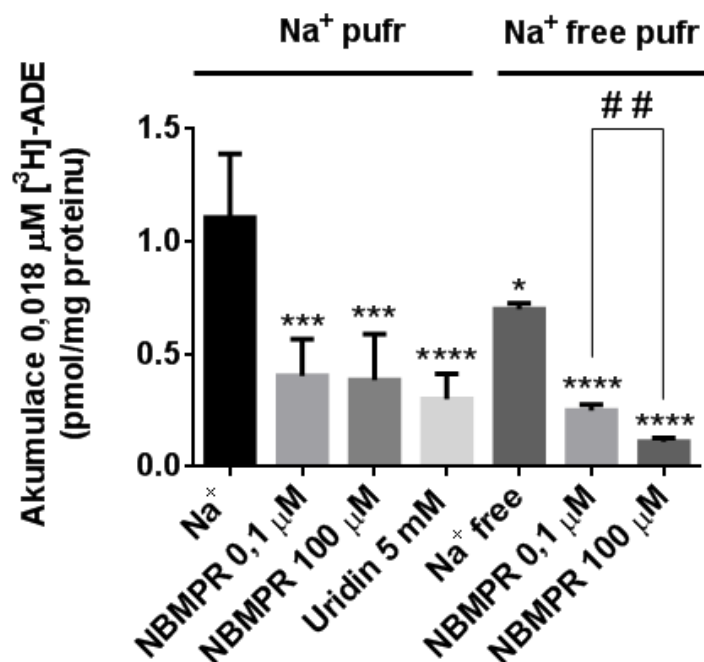
K vyhodnocení statistické analýzy a grafickému zpracování výsledků byl použit program GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc; San Diego, California, USA). Výsledky experimentů jsou prezentovány jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Počet měření n = 3. Statistická významnost akumulace testovaných látek byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu *s post hoc* Dunettovým testem, případně s využitím parametrického two-tailed Student's *t*-testu. Za statisticky signifikantní se považují

takové hodnoty, u nichž $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).
V případě $p \geq 0,05$ (ns) se jedná o statisticky nevýznamný rozdíl.

7. VÝSLEDKY

7.1 Studium akumulace [³H]-ADE (0,018 μM) v BeWo buňkách

Adenosin jsme využili jako modelový substrát, který vykazuje afinitu ke všem NTs kromě CNT1. Byla provedena pětiminutová akumulace [³H]-ADE (0,018 μM; 0,4 μCi/ml) v BeWo buňkách v prostředí Na⁺ pufru nebo Na⁺ free pufru bez/s inhibitorem NBMPR (100 μM či 0,1 μM), případně uridinem (5 mM) při 37°C, které předcházelo 10 minut pre-inkubace v příslušném mediu s/bez inhibitoru (37°C). V případě použití NBMPR 0,1 μM v prostředí Na⁺ pufru došlo ke snížení intracelulární koncentrace [³H]-ADE o 63 %, což naznačuje významné zapojení ENT1 v transportu adenosinu do buněk. NBMPR 100 μM nezpůsobil další statisticky signifikantní pokles akumulace [³H]-ADE, což poukazuje na dominantní transport [³H]-ADE pomocí ENT1. Na⁺ free prostředí snížilo akumulaci substrátu o 37 %, což značí, že určitou roli mají CNTs, a to pravděpodobně CNT2 a CNT3, které jsou exprimovány v buněčné linii BeWo. Uridin vykazoval vysoký efekt, když snížil koncentraci o 73 %. Obdobný fenomén jsme pozorovali i u NBMPR (0,1 μM; 100 μM) v prostředí Na⁺ free. Použitím modelového substrátu adenosinu jsme potvrdili funkci ENT1, CNT2/CNT3 v BeWo buňkách (obrázek 9).

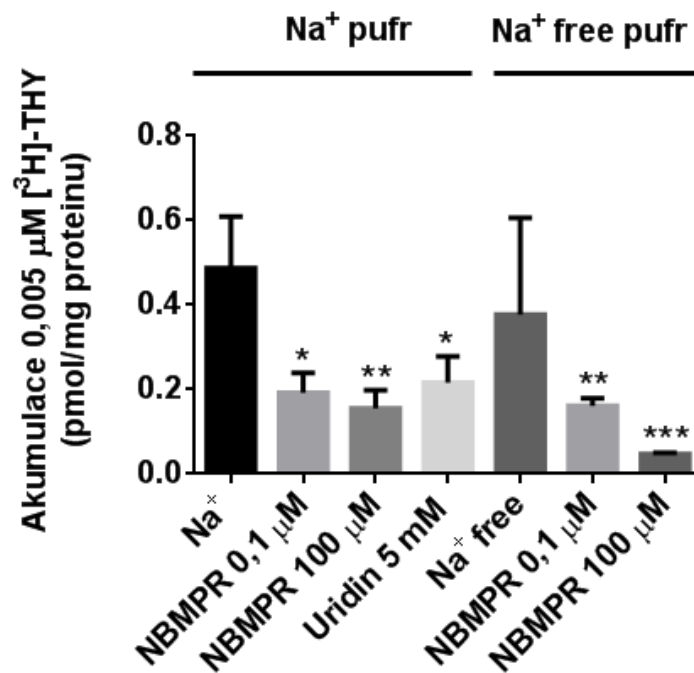


Obrázek 9. Grafické zpracování akumulace modelového substrátu [³H]-ADE (0,018 μM) v BeWo buňkách s/bez inhibitorů v prostředí Na⁺ pufrru či Na⁺ free pufrru. Zpozorovali jsme, že NBMPR (0,1 μM) snížil uptake [³H]-ADE o 63 %, vyšší koncentrace NBMPR (100 μM) nevyvolala další signifikantní snížení akumulace. Použití uridinu (5 mM) vyvolalo statisticky větší efekt, uptake byl snížen o 73 %. V prostředí Na⁺ free pufrru došlo ke snížení akumulace o 37 %, zatímco po přidání NBMPR (0,1 μM a 100 μM) byl uptake snížen srovnatelně s uridinem. S využitím modelového substrátu jsme potvrdili funkční expresi ENT1 i CNTs (CNT2/CNT3) v BeWo buňkách. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot (n = 3) akumulace vyjádřená v pmol/mg proteinu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu s post hoc Dunnettovým testem. Za statisticky signifikantní se považují takové hodnoty, u nichž p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**), p ≤ 0,001 (***), p ≤ 0,0001 (****). Pro další porovnání efektu NBMPR 0,1 a 100 μM v Na⁺ free pufrru byl následně využit parametrický two-tailed Student's t-test (##; p ≤ 0,01).

7.2 Studium akumulace [³H]-THY (0,005 μM) v BeWo buňkách

Jako druhý modelový substrát jsme zvolili thymidin. Jedná se o nukleosid, který je substrátem ENT1 a ENT2, ale na rozdíl od adenosinu je také velmi silným substrátem CNT1. Kromě opětovného potvrzení funkce ENTs v BeWo buňkách jsme tak měli možnost ověřit potenciální roli CNT1 v transportu nukleosidů do BeWo buněk. Akumulace [³H]-THY (0,005 μM; 0,4 μCi/ml) v BeWo buňkách byla sledována za stejných podmínek jako v předcházejícím experimentu. V případě použití inhibitoru NBMPR (0,1 μM) došlo ke snížení intracelulární koncentrace o 60 %. 100μM NBMPR

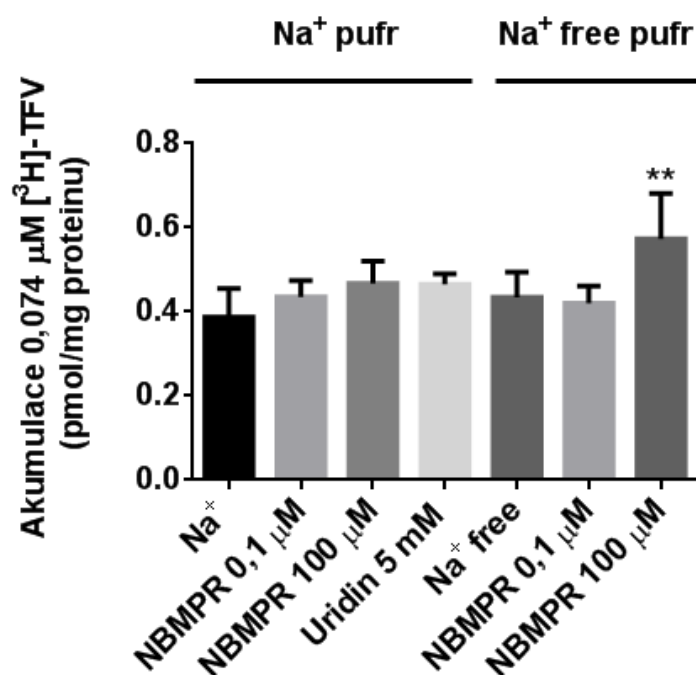
způsobilo další statisticky signifikantní pokles, což poukazuje na zapojení jak ENT1 tak i ENT2 v transportu [³H]-THY. Uridin (5 mM) vyvolal inhibici srovnatelnou s 0,1 μM NBMPR. Použití Na⁺ free pufru nezpůsobilo signifikantní snížení intracelulární koncentrace [³H]-THY. Ačkoli je thymidin silným substrátem CNT1 a jeho akumulace by tedy měla být v Na⁺ free prostředí signifikantně snížená, nastala situace se dá vysvětlit nepřítomností CNT1 v BeWo buňkách. Přidáním NBMPR 0,1 μM byl uptake redukován o 67 % a 100 μM NBMPR vyvolalo další snížení na úroveň 10 % kontroly. Vyšší efekt kombinace NBMPR a deplece Na⁺ lze vysvětlit částečným zapojením CNT3 do transportu [³H]-THY. Těmito výsledky jsme potvrdili funkční stav transportérů ENT1, ENT2 a potenciálně CNT3, ale vyloučili jsme expresi CNT1 v BeWo buňkách a tudíž zapojení tohoto transportéru do transportního procesu (obrázek 10).



Obrázek 10. Grafické zpracování akumulace modelového substrátu [³H]-THY (0,005 μM) v BeWo buňkách s/bez inhibitorů v prostředí Na⁺ pufru či Na⁺ free pufru. Z grafu jsme zjistili, že NBMPR (0,1 μM) snížil uptake o 60 %, zatímco NBMPR (100 μM) vyvolal ještě více vyjádřený pokles akumulace sledovaného substrátu (o 68 %). Tyto hodnoty naznačují, že na transportu [³H]-THY do BeWo buněk se podílí ENT1 i ENT2. Použití uridinu (5 mM) vedlo k inhibici srovnatelné s účinkem 0,1 μM NBMPR. Akumulace [³H]-THY v prostředí Na⁺ free pufru nebyla signifikantně snížena. Přidáním NBMPR (0,1 μM) se intracelulární koncentrace [³H]-THY snížila o 67 %, vyšší koncentrace NBMPR (100 μM) vyvolala pokles až o 90 %. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot (n = 3) akumulace vyjádřená v pmol/mg proteinu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu s post hoc Dunnettovým testem. Za statisticky signifikantní se považují takové hodnoty, u nichž p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,01 (**), p ≤ 0,001 (***), p ≤ 0,0001 (****).

7.3 Studium akumulace [³H]-TFV (0,074 μM) v BeWo buňkách

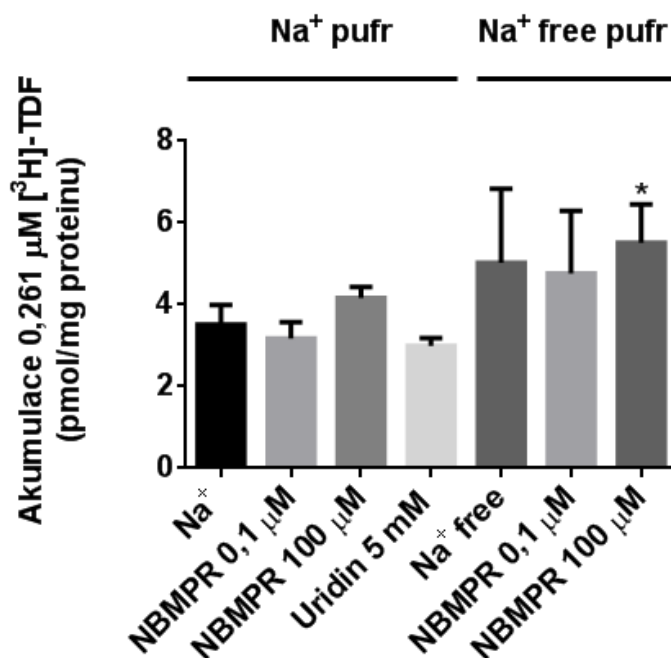
Akumulaci zkoumaného substrátu [³H]-TFV (0,074 μM; 1 μCi/ml) jsme hodnotili stejně jako předchozí dva experimenty po 5 minutách inkubace (37°C), které předcházela 10 minutová pre-inkubace (37°C). Opět jsme použili Na⁺ pufr s/bez inhibitorů (0,1 μM NBMPR, 100 μM NBMPR nebo 5 mM uridin) a Na⁺ free pufr s/bez inhibitorů (0,1 μM NBMPR nebo 100 μM NBMPR) pro vyhodnocení funkce NTs v transportu [³H]-TFV do BeWo buněk. Role NTs v přenosu [³H]-TFV v tomto experimentu nebyla prokázána. Jediný statisticky významný rozdíl, a to na hladině významnosti $p \leq 0,01$, byl zaznamenán v přestupu [³H]-TFV za použití NBMPR 100 μM v prostředí Na⁺ free pufru. Vzhledem k tomu, že akumulace byla však v případě této statistické signifikance zvýšená, z principu metody nelze předpokládat zapojení NTs v tomto procesu a za zvýšený uptake, případně snížený eflux, budou s velkou pravděpodobností zodpovědné jiné typy transportérů přítomné v BeWo buňkách (obrázek 11).



Obrázek 11. Grafické zpracování akumulace zkoumaného substrátu [³H]-TFV (0,074 μM) v BeWo buňkách s/bez inhibitorů v prostředí Na⁺ pufru či Na⁺ free pufru. Z grafu je patrné, že NTs nehrají roli v přenosu [³H]-TFV. Statisticky signifikantní, nicméně zvýšená akumulace při použití NBMPR 100 μM v prostředí Na⁺ free pufru napovídá, že na transportu [³H]-TFV se podílejí jiné dosud nespécifikované transportní mechanismy. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot ($n = 3$) akumulace vyjádřené v pmol/mg proteinu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu s post hoc Dunnettovým testem. Za statisticky signifikantní se považují takové hodnoty, u nichž $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

7.4 Studium akumulace [³H]-TDF (0,261 μM) v BeWo buňkách

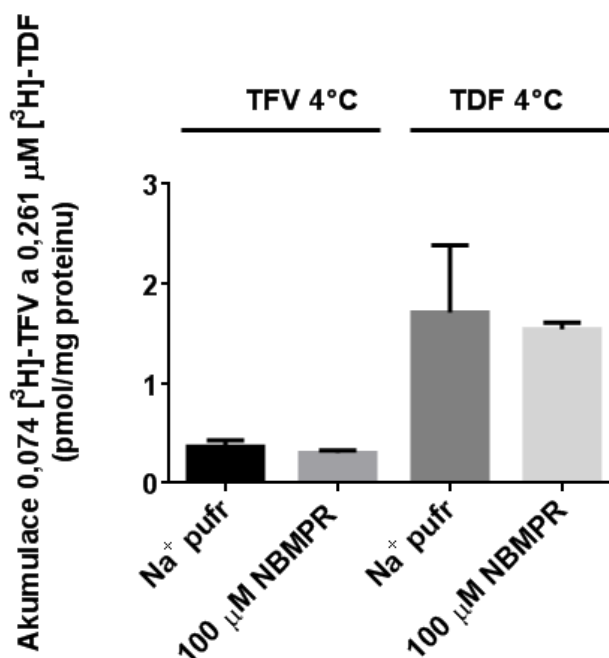
Druhou zkoumanou látkou byl [³H]-TDF (0,261 μM; 1 μCi/ml). Podmínky a průběh experimentu byly totožné s podmínkami a průběhem předchozích experimentů. Ani v případě [³H]-TDF nebyla zaznamenána statisticky signifikantní snížená akumulace substrátu. Lze tedy předpokládat, že NTs se nepodílejí na přenosu této látky do BeWo buněk. Stejně však jako v případě [³H]-TFV jsme zjistili zvýšenou akumulaci při použití NBMPR 100 μM v prostředí Na⁺ free pufru (hladina významnosti $p \leq 0,05$), což by mohlo být, podobně jako v případě [³H]-TFV, způsobeno zvýšeným uptake nebo spíše inhibicí efluxních transportérů vyskytujících se v BeWo buňkách (obrázek 12).



Obrázek 12. Grafické zpracování akumulace zkoumaného substrátu [³H]-TDF (0,261 μM) v BeWo buňkách s/bez inhibitorů v prostředí Na⁺ pufru či Na⁺ free pufru. Role NTs v transportu [³H]-TDF se nepotvrdila, neobjevilo se žádné statisticky signifikantní snížení akumulace. Statisticky signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p \leq 0,05$ (*) při použití NBMPR 100 μM v prostředí Na⁺ free pufru, kdy byla pozorována zvýšená akumulace látky, což naznačuje zapojení jiných dosud nespécifikovaných transportérů. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot ($n = 3$) akumulace vyjádřené v pmol/mg proteinu byla hodnocena pomocí one-way ANOVA testu s post hoc Dunnettovým testem. Za statisticky signifikantní se považují takové hodnoty, u nichž $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

7.5 Studium akumulace [³H]-TFV (0,074 μM) a [³H]-TDF (0,261 μM) v BeWo buňkách při 4°C

Experiment na ledu (4°C) jsme se rozhodli provést z důvodu vysvětlení statisticky signifikantního zvýšení akumulace [³H]-TFV ($p \leq 0,01$ (**)) a [³H]-TDF ($p \leq 0,05$ (**)) při použití NBMPR (100 μM) v prostředí Na⁺ free pufru. Předpokládali jsme, že v případě TFV/TDF došlo použitím vysoké koncentrace NBMPR k nespecifické inhibici ATP-dependentních efluxních transportérů v BeWo buňkách. Proto jsme využili teploty 4°C, při které dochází k inhibici veškerého aktivního transportu v buňkách (včetně CNTs). Přidání 100 μM NBMPR nemělo žádný signifikantní vliv na akumulaci [³H]-TFV a [³H]-TDF (obrázek 13).



Obrázek 13. Grafické zpracování akumulace zkoumaných substrátů [³H]-TFV (0,074 μM) a [³H]-TDF (0,261 μM) v prostředí Na⁺ pufru a za použití 100 μM NBMPR při teplotě 4°C. Z grafu je patrné, že po přidání 100 μM NBMPR nedošlo při 4°C k nárůstu akumulace. Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot ($n = 3$) akumulace vyjádřená v pmol/mg proteinu byla hodnocena pomocí parametrického two-tailed Student's *t*-testu.

8. DISKUZE

TDF je orálně podávaným proléčivem TFV, jenž má antivirotickou aktivitu vůči HIV, ale také HBV (Duarte-Rojo a Heathcote, 2010). Z tohoto důvodu patří mezi jeho indikace i léčba HBV infekce (Marcellin et al., 2013). Z pohledu této diplomové práce je však důležitější jeho nezastupitelná role v prevenci vertikálního přenosu HIV z matky na plod. TDF je v současné době schválen pro léčbu HIV infekce jako součást cART, a to v dávce 300 mg jednou denně, je taktéž k dispozici v pevné kombinaci s emtricitabinem (TDF-FTC). Navíc WHO zakomponovala TDF do současných doporučení týkajících se PMTCT (World Health Organization, 2010) a jeho použití v těhotenství stále narůstá (Baroncelli et al., 2009). Důležitost tohoto léčiva potvrzuje také fakt, že WHO řadí TDF mezi tzv. esenciální léčiva (World Health Organisation, 2017). Pochopení farmakokinetiky této látky u těhotných žen a zejména jejího transportu do plodu je esenciálním krokem pro určení role TDF v PMTCT a k zajištění garance adekvátní a dobře tolerované medikace těhotné ženy a jejího dítěte (Flynn et al. 2011, Staud et al. 2012).

Po podání TDF dochází k jeho absorpci z gastrointestinálního traktu do systémové cirkulace, ačkoli tento krok může být v určité míře limitován přítomností vysoce funkčních nesespecifických esteráz ve střevním lumen, katalyzujících hydrolýzu proléčiva na hůře vstřebatelný TFV. Absorbované množství TDF je dále v systémové cirkulaci štěpeno na TFV prostřednictvím esteráz nacházejících se v krvi a játrech. Proto je v krevním oběhu zastoupen zejména TFV. Nicméně, Van Gelder et al. (2002) a Tong et al. (2007) ve svých studiích zjistili, že degradace TDF pomocí esteráz může být inhibována některými současně podávanými léčivy (např. PIs), ale též látkami běžně se vyskytujícími ve stravě. Typickým příkladem jsou estery obsažené v jahodovém extraktu. Z tohoto důvodu se předpokládá, že TDF alespoň v malém množství koluje v maternální krvi a dostává se k placentární bariéře (Neumanova et al., 2014), měl by být tedy také předmětem studia interakcí s placentárními transportéry.

Interakce TFV/TDF s různými transportéry exprimovanými v placentě tvoří střed zájmu mnoha publikovaných studií. Jako příklad lze uvést studii Neumanova et al. (2014), ve které bylo potvrzeno, že TDF je substrátem P-gp (ABCB1/MDR1) i BCRP (ABCG2), TFV však nikoli. Interakce TFV/TDF s NTs (ENTs či CNTs) podle dostupných informací

zkoumána nebyla. Vzhledem k nukleosidovému původu zmíněných antiretrovirotik existuje předpoklad, že by se NTs mohly podílet na transportu TFV/TDF přes placentu.

Pro potvrzení či naopak vyvrácení této hypotézy jsme využili *in vitro* metodu akumulace v BeWo buňkách, která nám umožnila studium interakcí TFV/TDF s NTs exprimovanými ve zmíněné buněčné linii. BeWo buněčná linie představuje velmi vhodný *in vitro* model placentární bariéry, který svou funkčnost prokázal ve studiích vyhodnocujících interakce s placentárním BCRP, P-gp, OAT4 a ENTs/CNTs transportéry (Ceckova-Novotna et al. 2006, Utoguchi et al. 2000, Yamamoto et al. 2007). Cervený et al. a Jirasková et al. (články v revizním řízení) provedli analýzu NTs v BeWo buňkách a zjistili, že buňky exprimují mRNA genů kódujících ENT1, ENT2, CNT2 a CNT3, přičemž nejvíce zastoupeným subtypem NTs je ENT1 a CNT2. Na expresi ENT1 i ENT2 poukazují též další studie, které potvrdily, že ve srovnání s jinými buňkami (např. HeLa, S49 a CHO buňky) byla v BeWo prokázána vysoká aktivita NBMPR-senzitivního transportu (Boumah et al. 1992, Mani et al. 1998). S využitím modelových substrátů ($[^3\text{H}]$ -ADE a $[^3\text{H}]$ -THY) v prostředí Na^+ pufru či Na^+ free pufru a za přítomnosti inhibitorů (NBMPR 0,1 μM a 100 μM , uridin 5 mM) jsme si ověřili funkční expresi ENT1, ENT2 a CNT2/CNT3 v BeWo buňkách, funkční exprese CNT1 potvrzena nebyla (obrázek 9 a 10). Poté jsme provedli experiment v tentýž uspořádání se zkoumanými substráty, a to $[^3\text{H}]$ -TFV a $[^3\text{H}]$ -TDF (obrázek 11 a 12). Při statistické analýze jsme zjistili, že NBMPR (0,1 μM a 100 μM), uridin (5 mM) ani Na^+ free prostředí nezpůsobují statisticky signifikantní pokles akumulace $[^3\text{H}]$ -TFV a $[^3\text{H}]$ -TDF, dá se tedy předpokládat, že TFV ani TDF významně neinteragují s ENTs nebo CNTs nebo je jejich aktivita maskována současně probíhajícím dosud nespecifikovaným efluxním mechanismem. Při volbě doby trvání akumulace (5 min) jsme vycházeli z publikace Yamamoto et al. (2007). Čas akumulace jsme ve všech experimentech nechali stejný.

Nízké koncentrace, jež jsme použili u modelových či testovaných substrátů, byly zvoleny z důvodu prevence saturace transportérů, ke které při vyšších koncentracích může docházet. Hodnoty radioaktivity byly vybrány s ohledem na citlivost metody, zvolena byla nejnižší možná detekovatelná radioaktivita. V případě radioaktivně značeného $[^3\text{H}]$ -ADE se jednalo o koncentraci 0,018 μM (Nagy et al. 1990, Ward et al. 2000) a pro $[^3\text{H}]$ -THY 0,005 μM (Karbanova et al. 2017), což odpovídá hodnotě radioaktivity 0,4 $\mu\text{Ci/ml}$. Testované substráty $[^3\text{H}]$ -TFV (0,074 μM) a $[^3\text{H}]$ -TDF (0,261 μM) vykazovaly radioaktivitu 1 $\mu\text{Ci/ml}$ (Neumanova et al. 2014, Tong et al. 2007, Van Gelder

et al. 2002). Koncentrace radioizotopů byla následně měřena metodou LSC přístrojem Tri-Carb 2009 TR Perkin Elmer. Koncentrace testovaných radioizotopů byla vztažena na obsah proteinu, a to v jednotkách pmol/mg proteinu.

Přestože *in vitro* experimenty prováděné na BeWo buněčné linii jsou relativně jednoduché na provedení, nejsou časově náročné, umožňují za krátký časový interval získat mnoho různých výsledků a jsou levné, mají svá omezení. Nepřítomnost pojivové tkáně a fetálního endotelu, které reprezentují přídatné komponenty placentární bariéry, znemožňuje komplexní studium role NTs v transportu látek přes placentární bariéru (Poulsen et al., 2009). Velkou limitací modelu je také v určité míře odlišná exprese a regulace transportérů ve srovnání s fyziologickým trofoblastem z důvodu nefyziologického původu modelu (Staud a Ceckova, 2015). Analýza celkové lidské placentární mRNA prezentovaná ve studii Yamamoto et al. (2007) ukázala přítomnost mRNA genů kódujících hCNT1, hCNT2, hCNT3, hENT1 a hENT2. Výsledky real-time PCR naznačují, že mRNA genu kódujícího hENT1 je exprimována v největším množství v porovnání s ostatními mRNA genů kódujících NTs v placentě (Alcorn et al., 2002), což platí i pro analýzu stejného typu v BeWo buňkách (Cervený et al., článek v revizním řízení). Ačkoli jsou však BeWo buňky odvozeny z placenty, mRNA genů kódujících CNT1 nebyla detekována (Jiraskova et al., článek v revizním řízení). Navíc existují studie, které upozorňují na možné ovlivnění exprese ENTs použitím vysokých koncentrací D-glukózy. Tyto případy byly zaznamenány v lidských buňkách artérií hladkého svalstva a též v buňkách endotelu lidské umbilikální žíly, kde v porovnání s kontrolním vzorkem (5 mM D-glukózy) došlo při použití vyšší koncentrace D-glukózy (25 mM) ke změnám exprese ENTs (Aguayo et al. 2005, Leung 2005). Z tohoto důvodu nemůžeme vyloučit možný efekt 10 mM D-glukózy přítomné v médiu F-12, které jsme použili při akumulačních studiích v BeWo buňkách (Karbanova et al., 2017).

Dalším faktorem, jenž by teoreticky mohl ovlivnit výsledky našich experimentů, je metabolizace TDF či TFV v BeWo buňkách za vzniku metabolitů parentních sloučenin. Podle našich dostupných zdrojů nejsou k dispozici data týkající se metabolizace TDF/TFV v BeWo buňkách. Je však známo, že v buněčné linii MDCKII-MDR1 byla prokázána minimální konverze (< 5 %) parentních sloučenin (Tong et al., 2007). Náš předpoklad, že metabolizace by neměla signifikantně ovlivnit výsledky, vychází též ze způsobu eliminace TFV z organismu. Prostřednictvím glomerulární filtrace a tubulární

resorpce je vylučováno 70-80 % TFV močí, a to v nezměněné formě (Gallant a Deresinski, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, výsledky naší studie nenaznačují zapojení NTs do transplacentárního přenosu TFV ani TDF, jelikož nebyl zpozorován statisticky signifikantní pokles akumulace zkoumaných substrátů. Zajímavé však bylo zjištění, že při použití NBMPR (100 μ M) v prostředí Na^+ free pufru došlo k signifikantnímu nárůstu akumulace [^3H]-TFV ($p \leq 0,01$ (**)) a [^3H]-TDF ($p \leq 0,05$ (**)) (obrázek 11 a 12). Domníváme se, že zvýšená akumulace [^3H]-TDF by mohla být způsobena kombinací inhibice aktivního efluxu zprostředkovaného BCRP (Ceckova-Novotna et al. 2006, Karbanova et al. - nepublikovaná data, Neumanova et al. 2014, Utoguchi et al. 2000) společně s dosud nespecifikovaným aktivním Na^+ dependentním efluxním mechanismem. Pro potvrzení této domněnky jsme provedli dodatečný experiment na ledu (4°C). Nízká teplota inhibuje veškerý aktivní transport probíhající v BeWo buňkách a přidání 100 μ M NBMPR by v případě platnosti hypotézy nemělo zvýšit akumulaci substrátu, což se potvrdilo (obrázek 13). TFV substrátem BCRP není (Neumanova et al., 2014), to však neznamená, že do děje nemohou být zapojeny i jiné dosud nespecifikované aktivní Na^+ dependentní efluxní transportéry exprimované v BeWo buňkách.

N(t)RTIs, kam řadíme i TFV a jeho proléčivo TDF, se obecně vyznačují vysokým transplacentárním přenosem (Syme et al., 2004). Množství TFV/TDF prošlé přes placentu je nicméně omezené. Farmakokinetické studie prováděné u HIV-pozitivních těhotných žen potvrdily, že TFV přechází přes placentární bariéru z 60 % (Hirt et al., 2009). V této diplomové práci jsme se zabývali studiem role placentárních NTs v přestupu TFV/TDF přes placentu s využitím *in vitro* modelu BeWo buněčné linie. Vzhledem k tomu, že použití NBMPR (0,1 μ M a 100 μ M), uridinu (5 mM) ani Na^+ free prostředí nevyvolalo signifikantní pokles akumulace [^3H]-TFV ani [^3H]-TDF, nepředpokládáme esenciální roli ENTs nebo CNTs v transplacentárním přenosu TFV/TDF. Nelze však vyloučit možnost, že uptake zprostředkovaný NTs může být maskován opačně působícími aktivními Na^+ dependentními efluxními transportéry a/nebo BCRP efluxním transportérem, které jsou exprimovány v BeWo buňkách. Nicméně lze předpokládat, že při současném podání TFV/TDF s jinými antiretrovirovými nebude docházet k lékovým interakcím na NTs. Také inter- či intraindividuální variabilita v expresi NTs by neměla ovlivnit transplacentární farmakokinetiku TFV/TDF. Pro získání více detailů ohledně interakcí TFV/TDF s placentárními NTs by však bylo vhodné provést další studie, využívající zejména

komplexnější modely, kterým je např. *ex vivo* perfuze lidské placenty, a ještě více tak rozšířit evidenci o bezpečnostním profilu TFV/TDF.

9. ZÁVĚR

Předkládaná práce shrnuje aktuální informace o HIV a cART užívané v léčbě HIV se zaměřením na TFV podávaný ve formě TDF a poskytuje základní informace o lokalizaci a funkci NTs. Také uvádí stručný přehled modelů studia transplacentárního přechodu. Experimentální část je posléze věnována zkoumání interakcí TFV a TDF s NTs prostřednictvím *in vitro* akumulací metody s využitím BeWo buněčné linie.

Z výsledků prezentovaných v experimentální části diplomové práce vyplývá, že ENTs ani CNTs se nepodílejí na placentární farmakokinetice TFV/TDF, ačkoli nelze s jistotou vyloučit maskování jejich role v akumulaci TFV/TDF v BeWo buněčné linii opačně působícími efluxními transportéry. Jelikož jsme nezaznamenali statisticky významné interakce TFV/TDF s NTs, nepředpokládáme lékové interakce na NTs ani výrazný vliv možné variabilní exprese NTs na transplacentární farmakokinetiku zmíněného léčiva či jeho proléčiva. Studium interakcí TFV/TDF s placentárními NTs se podle našich dostupných zdrojů zatím nikdo nezabýval, výsledky této studie proto nelze porovnat s jinými daty. Pro získání detailnějších informací týkajících se role NTs v transplacentárním přenosu TFV/TDF je třeba provést řadu dalších studií, využívajících nejen jednoduché *in vitro* modely, ale také komplexnější *in situ/ex vivo* či *in vivo* modely, a přispět tak ke zvýšení bezpečnosti a optimalizaci terapie těhotných HIV-pozitivních žen zahrnující TFV/TDF.

10. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Aguayo, C., Casado, J., González, M., Pearson, J. D., San Martín, R., Casanello, P., ... Sobrevia, L. (2005).** Equilibrative nucleoside transporter 2 is expressed in human umbilical vein endothelium, but is not involved in the inhibition of adenosine transport induced by hyperglycaemia. *Placenta*, 26(8–9), 641–653. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.006>
- AIDSinfo. (2017a).** What's New in the Guidelines? Retrieved February 16, 2018, from <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/0>
- AIDSinfo. (2017b).** What to Start: Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient. Retrieved February 17, 2018, from <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv/11/what-to-start>
- AIDSinfo. (2018).** HIV Treatment: The Basic. Retrieved February 16, 2018, from <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/51/hiv-treatment--the-basics>
- Alam, C., Whyte-Allman, S. K., Omeragic, A., & Bendayan, R. (2016).** Role and modulation of drug transporters in HIV-1 therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103, 121–143. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.001>
- Alcorn, J., Lu, X., Moscow, J. a, & McNamara, P. J. (2002).** Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2), 487–496. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.038315>
- Antoniou, T., Park-Wyllie, L. Y., & Tseng, A. L. (2003).** Tenofovir: A nucleotide analog for the management of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*, 23(1), 29–43. <https://doi.org/10.1592/phco.23.1.29.31915>
- Aurpibul, L., & Puthanakit, T. (2015).** Review of tenofovir use in HIV-infected children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(4), 383–391. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000571>
- AVERT. (2017a).** Global HIV and AIDS statistics. Retrieved March 15, 2018, from <https://www.avert.org/global-hiv-and-aids-statistics>
- AVERT. (2017b).** Origin of HIV & AIDS. Retrieved February 12, 2018, from <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/origin>

- AVERT. (2018).** History of HIV and AIDS overview. Retrieved March 15, 2018, from <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview>
- Badowski, M. E., Pérez, S. E., Biagi, M., & Littler, J. A. (2016).** New Antiretroviral Treatment for HIV. *Infectious Diseases and Therapy*, 5(3), 329–352. <https://doi.org/10.1007/s40121-016-0126-x>
- Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E., & Young, J. D. (1999).** Nucleoside transporters: Molecular biology and implications for therapeutic development. *Molecular Medicine Today*, 5(5), 216–224. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01459-8](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01459-8)
- Baroncelli, S., Tamburrini, E., Ravizza, M., Dalzero, S., Tibaldi, C., Ferrazzi, E., ... Floridia, M. (2009).** Antiretroviral Treatment in Pregnancy: A Six-Year Perspective on Recent Trends in Prescription Patterns, Viral Load Suppression, and Pregnancy Outcomes. *AIDS Patient Care and STDs*, 23(7), 513–520. <https://doi.org/10.1089/apc.2008.0263>
- Battaglia, Y., Cojocaru, E., Forcellini, S., Russo, L., & Russo, D. (2016).** Tenofovir and kidney transplantation: case report. *Clinical Nephrology – Case Studies*, 4, 18–23. <https://doi.org/10.5414/CNCS108929>
- Beal, P. R., Yao, S. Y. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., King, A. E., & Cass, C. E. (2004).** The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 735–743. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1103-2>
- Bicket, A., & Coe, I. R. (2016).** N-linked glycosylation of N48 is required for equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) function. *Bioscience Reports*, 36(4), e00376–e00376. <https://doi.org/10.1042/BSR20160063>
- Birkus, G., Hitchcock, M., & Cihlar, T. (2002).** Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(3), 716–723. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.716>
- Boumah, C. E., Hogue, D. L., & Cass, C. E. (1992).** Expression of high levels of nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transport in cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells. *Biochemistry Journal*, 288(Pt 3), 987–996.
- Broder, S. (2010).** The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Research*, 85(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.002>

- Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.** 12th ed. [CD-ROM] New York: McGraw-Hill Companies, **2011**.
- Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A., Cabrita, M. A., Graham, K. A., Mark, G., ... Yao, S. Y. M. (1999).** Nucleoside Transporters of Mammalian Cells. *Pharmaceutical Biotechnology*, 313–352.
- Cavarelli, M., & Scarlatti, G. (2011).** Human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission and prevention: Successes and controversies. *Journal of Internal Medicine*, 270(6), 561–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02458.x>
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., & Staud, F. (2006).** P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology*, 22, 400–410.
- Center for Disease Control and Prevention. (2017).** About HIV/AIDS. Retrieved February 12, 2018, from <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>
- Cervený, L., Ptáková, Z., Ceckova, M., Jirasková, L., Karbanová, S., Karahoda, R., ... Staud, F. (článek v revizním řízení).** Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) facilitates transfer of the antiretroviral drug abacavir across the placenta.
- Cihlar, T., Birkus, G., Greenwalt, D. E., & Hitchcock, M. J. M. (2002).** Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: Comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Research*, 54(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00210-8](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00210-8)
- Cooper, R. D., Wiebe, N., Smith, N., Keiser, P., Naicker, S., & Tonelli, M. (2010).** Systematic Review and Meta-analysis: Renal Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate in HIV-Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 496–505. <https://doi.org/10.1086/655681>
- Crawford, C. R., Patel, D. H., Naeve, C., & Belt, J. A. (1998).** Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 5288–5293. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5288>
- Damaraju, V. L., Damaraju, S., Young, J. D., Baldwin, S. A., Mackey, J., Sawyer, M. B., & Cass, C. E. (2003).** Nucleoside anticancer drugs: The role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*, 22(47 REV. ISS. 6), 7524–7536. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206952>

- de Béthune, M. P. (2010).** Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Research*, 85(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.09.008>
- De Clercq, E. (2009).** Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 307–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010>
- DocCheck. (2017).** DocCheck Pictures, Multiplication du VIH. Retrieved April 26, 2018, from <http://pictures.doccheck.com/fr/photo/15051-multiplication-du-vih>
- Drugs.com. (2018).** Tenofovir Disoproxil Fumarate. Retrieved February 22, 2018, from <https://www.drugs.com/ppa/tenofovir-disoproxil-fumarate.html>
- Duarte-Rojo, A., & Heathcote, E. J. (2010).** Efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate in patients with chronic hepatitis B. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 3(2), 107–119. <https://doi.org/10.1177/1756283X09354562>
- Duwal, S., Schütte, C., & von Kleist, M. (2012).** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the reverse transcriptase inhibitor tenofovir and prophylactic efficacy against HIV-1 infection. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040382>
- Errasti-Murugarren, Ekaitz; Pastor-Anglada, M. (2010).** Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside based therapies. *Pharmacogenomics*, 11, 809–841.
- Errasti-murugarren, E., Díaz, P., Godoy, V., & Riquelme, G. (2011).** Expression and Distribution of Nucleoside Transporter Proteins in the Human Syncytiotrophoblast. *Molecular Pharmacology*, 80(5), 809–817. <https://doi.org/10.1124/mol.111.071837>
- Flynn, P. M., Mirochnick, M., Shapiro, D. E., Bardeguet, A., Rodman, J., Robbins, B., ... Purswani, M. (2011).** Pharmacokinetics and safety of single-dose tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women and their infants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5914–5922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00544-11>
- Friedman, S. J., & Skehan, P. (1979).** Morphological differentiation of human choriocarcinoma cells induced by methotrexate. *Cancer Research*, 39(6 Pt 1), 1960–7. Retrieved April 26, 2018, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/571758>

- Fung, H. B., Stone, E. A., & Piacenti, F. J. (2002).** Tenofovir disoproxil fumarate: A nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical Therapeutics*, 24(10), 1515–1548. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(02\)80058-3](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(02)80058-3)
- Gallant, J. E., & Deresinski, S. (2003).** Tenofovir Disoproxil Fumarate, 21287(February), 944–950.
- Gray, J. H., Owen, R. P., & Giacomini, K. M. (2004).** The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 728–734. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1107-y>
- Grigsby, I. F., Pham, L., Mansky, L. M., Gopalakrishnan, R., & Mansky, K. C. (2010).** Tenofovir-associated bone density loss. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 6(1), 41–47. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S8836>
- Hammer, S. M. (2011).** Antiretroviral Treatment as Prevention. *The New England Journal of Medicine*, 1–2. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105243.6>.
- Hirt, D., Urien, S., Ekouevi, E. K., Rey, E., Arrive, E., & Blanche, S. (2009).** Population pharmacokinetics of tenofovir in HIV-1-infected pregnant women and their neonates (ANRS 12109). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 85, 182–189.
- HIV.gov. (2017).** How Is HIV Transmitted? Retrieved February 15, 2018, from <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/how-is-hiv-transmitted>
- Chapman, T. M., McGavin, J. K., & Noble, S. (2003).** Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs*, 63(15), 1597–1608.
- J., M., & V., S. (2009).** Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Medicina Clinica*, 132(13), 505–506. Retrieved April 26, 2018, from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L50473556%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2008.12.021%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00257753&id=doi:10.1016%2Fj.medcli.2008.12.021&atitle=Mother-to-child+>

- Jennings, L. L., Hao, C., Cabrita, M. a, Vickers, M. F., Baldwin, S. a, Young, J. D., & Cass, C. E. (2001).** Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology*, *40*(5), 722–31. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00207-0)
- Jiraskova, L., Cervený, L., Karbanova, S., Ptackova, Z., & Staud, F. (článek v revizním řízení).** Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta; Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-affecting Agents.
- Karbanova, S., Cervený, L., Ceckova, M., Ptackova, Z., Jiraskova, L., Greenwood, S., & Staud, F. (2017).** Role of nucleoside transporters in transplacental pharmacokinetics of nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine and emtricitabine. *Placenta*, *60*, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.10.011>
- Kearney, B. P., Flaherty, J. F., & Shah, J. (2004).** Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, *43*(9), 595–612. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443090-00003>
- Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N. Y., & Bendayan, R. (2010).** The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, *31*(1), 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.10.001>
- Kong, W., Engel, K., & Wang, J. (2004).** Mammalian nucleoside transporters. *Current Drug Metabolism*, *5*(1), 63–84. <https://doi.org/10.2174/1389200043489162>
- Krakower, D. S., Mimiaga, M. J., Rosenberger, J. G., Novak, D. S., Mitty, J. A., White, J. M., & Mayer, K. H. (2012).** Limited awareness and low immediate uptake of pre-exposure prophylaxis among men who have sex with men using an internet social networking site. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033119>
- Leung, G. P. H. (2005).** D-Glucose upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, *288*(6), H2756–H2762. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00921.2004>
- Lify, B., Dabo, G., Nascimento, O., Iraqui, S., Elkhayat, S., Zamd, M., ... El FilaliMarhoum, K. (2016).** Fanconi syndrome induced by tenofovir: A case report. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, *27*(4), 808. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.185269>

- Liu, F., Soares, M. J., & Audus, K. L. (1997).** Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *The American Journal of Physiology*, 273(19), C1596–C1604.
- Lu, H., Chen, C., & Klaassen, C. (2004).** Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1455–1461. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001123>
- Lv, Z., Chu, Y., & Wang, Y. (2015).** HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)*, 7, 95–104. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956>
- M, T. H. C. (2010).** The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals. *Aids*, 24(1), 123–137. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283324283>
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014).** HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)
- Mak, T. W., & Saunders, M. E. (2006).** Ch 25 HIV and Acquired Immunodeficiency Syndrome. *The Immune Response*, 785–823. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012088451-3.50027-2>
- Mani, R. S., Hammond, J. R., Marjan, J. M. J., Graham, K. A., Young, J. D., Baldwin, S. A., & Cass, C. E. (1998).** Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30818–30825. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30818>
- Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I. M., ... Heathcote, E. J. (2013).** Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: A 5-year open-label follow-up study. *The Lancet*, 381(9865), 468–475. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61425-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61425-1)
- Mariani, S. A., Vicenzi, E., & Poli, G. (2010).** Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4 + T lymphocytes, 9(Suppl 1), 1–9.

- Minuesa, G., Volk, C., Molina-arcas, M., Gorboulev, V., Erkizia, I., Arndt, P., ... Martinez-picado, J. (2009).** Transport of Lamivudine [(X) - \square - L -2 J , 3 J - Dideoxy-3 J -thiacytidine] and High-Affinity Interaction of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Human Organic Cation Transporters 1 , 2 , and 3 \square . *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329, 252–261. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146225>.
- Mitra Pallabi, A. K. L. (2008).** In Vitro Models and Multidrug Resistance Mechanisms of the Placental Barrier. *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, VII*, 368–396. Retrieved March 28, 2018, from https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-0-387-74901-3_16.pdf
- Molina-Arcas, M., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2009).** Nucleoside transporter proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), 426–434. <https://doi.org/10.2174/157016109789043892>
- Myllynen, P., Pienimäki, P., & Vähäkangas, K. (2005).** Human placental perfusion method in the assessment of transplacental passage of antiepileptic drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 SUPPL.), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.042>
- Myren, M., Mose, T., Mathiesen, L., & Knudsen, L. E. (2007).** The human placenta - An alternative for studying foetal exposure. *Toxicology in Vitro*, 21(7), 1332–1340. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.011>
- Nabekura, T., Kawasaki, T., Kamiya, Y., & Uwai, Y. (2015).** Effects of Antiviral Drugs on Organic Anion Transport in Human Placental BeWo Cells, 59(12), 7666–7670. <https://doi.org/10.1128/AAC.01634-15.Address>
- Nagy, L. E., Diamondqllii, I., & Cassos, J. (1990).** Ethanol Increases Extracellular Adenosine by Inhibiting Uptake via the Nucleoside Transporter. *Biochemistry*, 265(4), 1946–1951.
- Nelson, M. R., Katlama, C., Montaner, J. S., Cooper, D. A., Gazzard, B., Clotet, B., ... Rooney, J. F. (2007).** The Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate for the Treatment of HIV Infection in Adults: The first 4 years. *Aids*, 21(10), 1273–1281. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3280b07b33>

- Neumanova, Z., Cervený, L., Cecková, M., & Staud, F. (2014).** Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; Role in transport across the placenta. *Aids*, 28(1), 9–17. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000112>
- Panel on Treatment of Pregnant Women with HIV Infection and Prevention of Perinatal Transmission. (2017).** Recommendations for the Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant Women with HIV Infection and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. Retrieved February 12, 2018, from <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/>
- Panitchob, N., Widdows, K. L., Crocker, I. P., Hanson, M. A., Johnstone, E. D., Please, C. P., ... Sengers, B. G. (2015).** Computational modelling of amino acid exchange and facilitated transport in placental membrane vesicles. *Journal of Theoretical Biology*, 365, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.10.042>
- Parkin, J. M., Murphy, M., Anderson, J., & Forster, G. (2000).** Tolerability and side-effects of post-exposure prophylaxis for HIV infection Paediatric living related intestinal transplantation between two monozygotic twins : a 1-year, 355(January 1988).
- Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2015).** Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Frontiers in Pharmacology*, 6(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00013>
- Podgórska, M., Kocbuch, K., & Pawelczyk, T. (2005).** Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochimica Polonica*, 52(4), 749–758.
- Poulsen, M. S., Rytting, E., Mose, T., & Knudsen, L. E. (2009).** Modeling placental transport: Correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicology in Vitro*, 23(7), 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.028>
- Ray, A. S., Cihlar, T., Robinson, K. L., Tong, L., Vela, J. E., Fuller, M. D., ... Rhodes, G. R. (2006).** Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(10), 3297–3304. <https://doi.org/10.1128/AAC.00251-06>
- Rubbert, A., Behrens, G., & Ostrowski, M. (2011).** The structure of HIV-1. Retrieved February 12, 2018, from <https://hivbook.com/tag/structure-of-hiv-1/>

- Salavec, M., Bo, V., & Bo, P. (2011).** HIV infekce - historie, patogeneze, klinické manifestace. *Česko-Slovenská Dermatologie*, (2), 67–81.
- Sastry, B. V. R. (1999).** Techniques to study human placental transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(1), 17–39. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00004-6)
- Sato, K., Sai, Y., Nishimura, T., Chishu, T., Shimpō, S., Kose, N., & Nakashima, E. (2009).** Influx Mechanism of 2',3'-Dideoxyinosine and Uridine at the Blood–Placenta Barrier. *Placenta*, 30(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.11.022>
- Seitz, R. (2016).** Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Sluis-Cremer, N., & Tachedjian, G. (2008).** Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Research*, 134(1–2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.01.002>
- Staud, F., & Ceckova, M. (2015).** Regulation of drug transporter expression and function in the placenta. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(4), 533–555. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1005073>
- Staud, F., Cerveny, L., & Ceckova, M. (2012).** Pharmacotherapy in pregnancy; Effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), 736–763. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>
- Staud, F., Vackova, Z., Pospechova, K., Pavek, P., Ceckova, M., Libra, A., ... Fendrich, Z. (2006).** Expression and Transport Activity of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp / Abcg2) in Dually Perfused Rat Placenta and HRP-1 Cell Line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(1), 53–62. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.105023.trophoblast>
- Syme, M. R., Paxton, J. W., & Keelan, J. a. (2004).** Human Placenta. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(8), 487–514. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000119191.33112.9c>
- Tong, L., Phan, T. K., Robinson, K. L., Babusis, D., Strab, R., Bhoopathy, S., ... Ray, A. S. (2007).** Effects of human immunodeficiency virus protease inhibitors on the intestinal absorption of tenofovir disoproxil fumarate in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3498–3504. <https://doi.org/10.1128/AAC.00671-07>

- Touret, J., Deray, G., & Isnard-Bagnis, C. (2013).** Tenofovir Effect on the Kidneys of HIV-Infected Patients: A Double-Edged Sword? *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(10), 1519–1527. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012080857>
- Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999).** Structural biology of HIV [Review]. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 1–32.
- Utoguchi, N., Chandorkar, G. A., Avery, M., & Audus, K. L. (2000).** Functional expression of P-glycoprotein in primary cultures of human cytotrophoblasts and BeWo cells. *Reproductive Toxicology*, 14(3), 217–224.
- Uwai, Y., Ida, H., Tsuji, Y., Katsura, T., & Inui, K. I. (2007).** Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharmaceutical Research*, 24(4), 811–815. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9196-x>
- Vähäkangas, K., & Myllynen, P. (2006).** Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 608(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.014>
- Van Gelder, J., Deferme, S., Naesens, L., De Clercq, E., Van Den Mooter, G., Kinget, R., & Augustijns, P. (2002).** Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(8), 924–930. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.8.924>
- Ward, J. L., Sherali, A., Mo, Z. P., & Tse, C. M. (2000).** Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for i. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8375–8381. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8375>
- Warszawski, J., Tubiana, R., Le Chenadec, J., Blanche, S., Teglas, J. P., Dollfus, C., ... Mandelbrot, L. (2008).** Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *Aids*, 22(2), 289–299. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f3d63c>
- WHO. (2014).** Post-exposure prophylaxis to prevent HIV infection. Retrieved February 18, 2018, from <http://www.who.int/hiv/topics/prophylaxis/info/en/>
- WHO. (2017a).** Mother-to-child transmission of HIV. Retrieved February 18, 2018, from <http://www.who.int/hiv/topics/mtct/en/>

- WHO. (2017b).** Pre-exposure prophylaxis. Retrieved February 18, 2018, from <http://www.who.int/hiv/topics/prep/en/>
- WHO; UNICEF; UNAIDS. (2013).** Global Update on HIV Treatment 2013 : Results, Impact and Opportunities, (June), 126. Retrieved April 12, 2018, from <http://www.who.int/hiv/pub/progressreports/update2013/en/>
- Wilens, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012).** Molecular Mechanisms of HIV Entry. *Viral Molecular Machines, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 726.
- World Health Organisation. (2017).** Report of the 21st WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines Annex 1: 20 th WHO Model List of Essential Medicines 2017 Annex 2: 6 th WHO Model List of Essential Medicines for Children 2017 Executive summary, (March). Retrieved April 13, 2018, from http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2017_ExecutiveSummary.pdf?ua=1
- World Health Organization. (2010).** Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants. *Geneva: WHO*, (April), 1–117. <https://doi.org/WHO/HIV/2012.6>
- Yamamoto, T., Kuniki, K., Takekuma, Y., Hirano, T., Iseki, K., & Sugawara, M. (2007).** Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *European Journal of Pharmacology*, 557(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.10.062>