

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM VLIVU SUBCHRONICKÉHO PODÁVÁNÍ ANTIRETROVIROTIKA
EMTRICITABINU NA EXPRESI EFLUXNÍCH LÉKOVÝCH TRANSPORTÉRŮ
V ORGÁNECH MATKY A PLODU**

diplomová práce

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

Hradec Králové 2014

Ivana Havlová

„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 či stejného titulu“.

V Hradci Králové 6.5.2014

Podpis:

Poděkování

Mé poděkování patří PharmDr. Lukášovi Červenému, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Ivana Havlová

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu subchronického podávání antiretrovirotika emtricitabinu na expresi efluxních lékových transportérů v orgánech matky a plodu

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv dlouhodobého podávání antiretrovirotika emtricitabinu (FTC) na expresi efluxních lékových ATP-vázajících (ABC) transportérů v placentě, orgánech matky a plodu (mozek, játra, ledviny, tenké střevo) samic potkana kmene Wistar. V práci jsme se zaměřili na dva jejich nejvýznamnější zástupce, P-glykoprotein (MDR1) a breast cancer resistance protein (BCRP). Znalost změn v expresi těchto transportérů má klíčový význam zejména při užití FTC v kombinační terapii, tzv. HAART, Highly Active Antiretroviral Therapy, kde by tyto změny mohly zásadně ovlivnit kinetiku současně podávaných léčiv. Nejdříve byla u potkanů sledována biodostupnost FTC (3,5 mg/kg) po i.m. podání, která byla vyhodnocena jako srovnatelná s biodostupností po i.v. podání. Poté byla provedena kvantitativní analýza exprese mRNA potkaních ortologů *Mdr1a*, *Mdr1b* a *Bcrp* pomocí reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Celý experiment byl prováděn na březích samicím potkana Wistar, kterým byl FTC podáván i.m po dobu 10 dní, tedy polovinu doby březosti. U žádné z testovaných tkání maternálních či fetálních a placenty nebyla pozorována signifikantní změna v expresi efluxních transportérů oproti vzorkům z kontrolní skupiny. Data získaná v této práci přispívají k rozšíření znalosti o bezpečnostním profilu FTC.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Ivana Havlová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of effects of prolonged administration of emtricitabine on expression of ABC efflux transporters in maternal and fetal organs

The aim of this thesis was to evaluate the effect of chronic administration of antiretroviral substance emtricitabine (FTC) on expression of drug efflux ABC-binding cassette (ABC) transporters in the placenta, maternal and fetal organs (brain, liver, kidney, small intestine) of pregnant rats. We focused on two most important representatives of drug efflux ABC transporters, P-glycoprotein (MDR1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Knowledge of FTC effects on gene expression of these transporters is crucial especially when using FTC in combination therapy, known as Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). Changes in MDR1/BCRP expression may lead to significantly altered pharmacokinetics of concomitantly administered drugs. First, bioavailability was analyzed. AUC of FTC (3,5 mg/kg) following i.m. administration was comparable to that one after i.v. administration allowing us to use i.m. application as a route of FTC administration to rats. Subsequently, quantitative gene expression analysis of *Mdr1a*, *Mdr1b*, and *Bcrp* was carried out using reverse transcriptase polymerase chain reaction in real time (qRT-PCR). Gene expression analysis was performed in organs isolated from Wistar pregnant rats that were administered FTC (i.m.) for 10 days, half the time of pregnancy. In none of the tested tissues, maternal or fetal organs and placentas any significant change in expression of the drug efflux transporters tested was observed. Data obtained in this study contribute to the understanding of safety profile of FTC.

Obsah

1.	Seznam zkratk.....	1
2.	Úvod.....	3
3.	Teoretická část.....	5
3.1.	HIV v těhotenství a léčba.....	5
3.2.	Změny farmakokinetiky v těhotenství.....	7
3.3.	Efluxní lékové ABC transportéry.....	9
3.3.1.	Lokalizace MDR1 a BCRP.....	9
3.3.2.	P-glykoprotein/MDR1.....	11
3.3.3.	Breast cancer resistance protein (BCRP).....	13
3.3.4.	Interakce antiretrovirálních látek s efluxními lékovými ABC transportéry.....	15
3.4.	Emtricitabin/FTC.....	16
3.4.1.	Farmakokinetika FTC.....	16
3.4.2.	Specifika užívání FTC v těhotenství.....	18
4.	Cíle práce.....	19
5.	Experimentální část.....	20
5.1.	Chemikálie a reagenty.....	20
5.2.	Metodika a materiál.....	20
5.2.1.	Laboratorní zvířata.....	20
5.2.2.	Biodostupnost po i.m. podání - metodika.....	21
5.2.3.	Izolace RNA.....	21
5.2.4.	Analýza exprese mRNA.....	22
5.3.	Analýza dat.....	23
6.	Výsledky.....	24
6.1.	Výsledky biodostupnosti po i.v. a i.m. podání.....	24

6.2.	Výsledky exprese v maternálních orgánech	26
6.2.1.	<i>Mdr1a</i>	27
6.2.2.	<i>Mdr1b</i>	28
6.2.3.	<i>Bcrp</i>	29
6.3.	Výsledky exprese ve fetálních orgánech.....	30
6.3.1.	<i>Mdr1a</i>	30
6.3.2.	<i>Mdr1b</i>	31
6.3.3.	<i>Bcrp</i>	32
7.	Diskuse.....	33
8.	Závěr	35
9.	Literatura	36

1. Seznam zkratek

3TC – lamivudin

ABC – ATP-binding cassette

ABCB1 – gen MDR1

ABCG2 – gen BCRP

ABCP – placentární ABC protein

ARV – antiretrovirový

ATP – adenosin trifosfát

AUC – plocha pod křivkou (area under the curve)

B2M – beta-2-mikroglobulin

BCRP – breast cancer resistance protein

CAR – konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor)

cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)

C_{max} – maximální koncentrace

CYP – cytochrom P450

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

FTC – emtricitabin

HAART – vysoce účinná antiretrovirová terapie (highly active antiretroviral therapy)

HBV – virus hepatitidy B

HIV – Human Immunodeficiency Virus

LS180 – buněčná linie buněk adenokarcinomu tlustého střeva

MDR1 – P-glykoprotein

MCT – vertikální přenos z matky na plod (mother-to-child transmission)

MXR – mitoxantron rezistentní protein

NBD – nukleosid/nukleotid vázajících doména

NNRTI – nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor)

NRTI – nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (nucleoside reverse transcriptase inhibitor)

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

P-gp – P-glykoprotein

PI – inhibitory proteáz (protease inhibitor)

PXR – pregnanový X receptor

qRT-PCR – reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)

SNP – jednodukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

TDF – tenofovir disoproxil fumarát

Ywhaz – tyrosin-3-monooxygenáza/tryptofan-5-monooxygenáza aktivační protein, zeta polypeptid

ZDV – zidovudin

2. Úvod

Virus HIV je RNA virus ze skupiny retrovirů. Přenos se může uskutečnit prostřednictvím tělních tekutin, např. krví, spermatem či poševním sekretem, z matky na dítě v průběhu těhotenství, při porodu nebo během kojení (Senise et al., 2011).

V roce 2010 bylo na světě přibližně 17,5 milionu žen nakažených virem HIV. Toto číslo tvoří zhruba polovinu celkového počtu nakažených lidí. V subsaharské Africe je pak poměr mírně odlišný, zde přibližně 60% nakažených tvoří ženy (Senise et al., 2011). Většina z těchto žen je v plodném věku, je sexuálně aktivní a stála by o mateřství.

Počet dětí nakažených virem HIV se celosvětově odhaduje na více než 3 miliony, až 90% z nich žije v subsaharské Africe. Nejčastější cestou nákazy (90%) je přenos z matky na plod v průběhu fetálního vývoje, při porodu nebo v období kojení (Senise et al., 2011). Tomuto tzv. vertikálnímu přenosu HIV lze předcházet díky antiretrovirální (ARV) terapii.

ARV terapie nejčastěji zahrnuje kombinační léčbu, která s sebou nese zvýšené riziko interakcí. Interakce mohou probíhat na všech úrovních farmakokinetiky, v naší práci se zaměříme na interakce na úrovni transportních systémů. Zástupci hlavních skupin užívaných antiretrovirotik jsou popsány substráty, inhibitory i induktory efluxních lékových transportérů (Kis et al., 2010), je tedy třeba hlubšího poznání o změnách ve funkci těchto transportních systémů při současném podávání antiretrovirotických aktivních látek.

Důležitou skupinou transportních systémů jsou ATP-binding cassette (ABC) efluxní transportéry. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou P-glykoprotein (MDR1) a breast cancer resistance protein (BCRP) (Schinkel & Jonker, 2003; Staud & Pavek, 2005).

Při léčbě těhotných žen musíme navíc zohlednit některé fyziologické změny, které mohou ovlivnit farmakokinetiku podávaných léčiv. Dále je třeba brát v úvahu také interakce s dalšími léky, které žena během těhotenství užívá. V USA uvedlo 64% žen, že v těhotenství užívalo jeden či více léků, které nebyly

vitamíny nebo potravní doplňky, přičemž až dvě třetiny těchto léčivých přípravků nebyly schváleny pro užívání v těhotenství (Glover et al., 2003).

Emtricitabin (FTC) má dobrý bezpečnostní profil, pro jeho širší zavedení do kombinační terapie je však třeba podrobnější popis vlivu jeho podávání na transportní systémy. Studií zabývajících se tímto tématem zatím nebylo provedeno mnoho. Studie autorů Weiss a kol. byla prováděna na buněčné linii odvozené z lidského karcinomu tlustého střeva LS 180 (Weiss et al., 2008). Tato *in vitro* studie nastínila možnost indukce exprese genu pro P-glykoprotein, která nebyla naším experimentem potvrzena.

V naší práci se zaměřujeme na studium vlivu dlouhodobého podávání FTC *in vivo*. FTC byl podáván březím samicím potkana Wistar po dobu 10 dní, tedy polovinu délky březosti. Následně byly sledovány změny v expresi genů pro efluxní lékové transportéry *Mdr1a*, *Mdr1b* a *Bcrp*.

FTC se nejčastěji podává v kombinaci s tenofovirem disoproxil fumarátem (TDF), který je popsáným substrátem MDR1 i BCRP (Neumanova et al., 2014; Tong et al., 2007). Změna exprese těchto transportérů vlivem současného podávání FTC, by tedy byla důležitým faktorem ke zvážení při této kombinační terapii.

3. Teoretická část

3.1. HIV v těhotenství a léčba

ARV terapie se primárně nasazuje těhotným ženám pro udržení virové suprese a současně také k prevenci vertikálního přenosu z matky na plod, tzv. „Mother-To-Child Transmission“ (MCT). ARV léčba v současnosti zahrnuje kombinace léků z různých skupin (Baroncelli et al., 2009); obecně je v této indikaci kombinace vždy účinnější než monoterapie (Senise et al., 2011). Kombinační ARV terapie je volena na základě znalostí předchozí léčby pacienta a jeho současného zdravotního stavu (Griner et al., 2011).

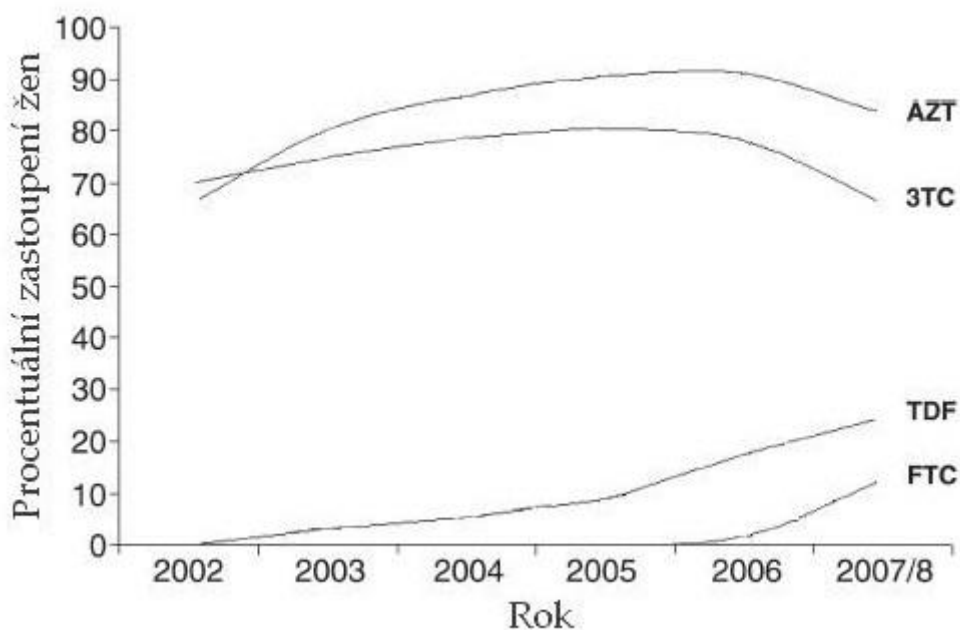
Nejčastější formou kombinační terapie užívané ke snížení virové zátěže HIV částic je tzv. vysoce účinná antiretrovirální terapie, z anglického Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) a v současnosti je volbou první linie u těhotných pacientek. HAART je definována jako kombinace nejméně dvou nukleosidových/nukleotidových inhibitorů (NRTI) v kombinaci s inhibitorem proteáz (PI) nebo nenukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy (NNRTI) (Cooper et al., 2002). Lze říci, že díky HAART je ve vyspělých zemích HIV infekce považována spíše za chronickou chorobu s významně oddáleným výskytem symptomů AIDS (Baroncelli et al., 2009). HAART je sice považována za univerzální nástroj léčby, nicméně před započítím této terapie je třeba zvažovat více faktorů, jako jsou virová koncentrace v krvi či počet CD4 buněk, které jsou virem HIV napadány přednostně. HAART je vždy aplikována u pacientů s vyšší koncentrací RNA viru v krvi a nižším počtem CD4 buněk (AIDSinfo, 2014a) a jedná se pak o celoživotní léčbu.

V těhotenství je HAART indikována k léčbě matky, pro její vlastní zdraví s cílem maximálně snížit její virovou zátěž, která obecně koreluje s pravděpodobností vertikálního přenosu viru z matky na plod. Antiretrovirální léčiva procházející přes placentu pak dále mohou plodu poskytnout tzv. „post-exposure“ profylaxi, kdy je případný HIV virus, který se dostal do krevního oběhu plodu, okamžitě eliminován (Taha et al., 2003).

Pacientky lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří těhotné ženy, kterým byla nasazena ARV léčba před těhotenstvím a druhou ty, kterým byla nasazena až po početí. Terapie u těhotných žen, u nichž nebyla terapie zahájena před početím, je na rozdíl od běžných pacientů zahájena vždy, a to v průběhu 12. -14. týdne gestace, nebo okamžitě v případě nízkých hladin CD4 buněk (<350-500 buněk/mm³) a vysoké virové zátěže (AIDSinfo; Colbers et al., 2013a). Pravděpodobnost přenosu u neléčených matek se pohybuje v rozmezí 15-40% (Harris et al., 2007). Preventivní zásah ve formě HAART snižuje pravděpodobnost MCT viru na méně než 2% (Harris et al., 2007).

Nejužívanějšími NRTI v těhotenství jsou zidovudin a lamivudin, převážně kvůli největším zkušenostem v klinickém užívání u těhotných žen (Colbers et al., 2013b). Od roku 2005 je ale sledován trend snižování četnosti jejich předepisování a zidovudin a lamivudin jsou nahrazovány TDF a FTC (Obr. 1), což je i důsledkem doporučení užívání TDF a FTC u netěhotných dospělých pacientek (AIDSinfo, 2014a). Také je třeba vzít v úvahu fakt, že zidovudin a lamivudin jsou zařazeny americkou „Food and Drug Administration“ do kategorie C, zatímco TDF a FTC do kategorie B užívání v těhotenství (Griner et al., 2011).

V 90. letech minulého století byla standardním postupem pro prevenci MCT monoterapie zidovudinem. V průběhu minulé dekády byla nahrazena HAART. Důvodem byly obavy z toxicity zidovudinu a nižší účinnost monoterapie na snížení virové zátěže matky (Senise et al., 2011). Ze skupiny NNRTI byl dále široce využíván např. nevirapin, který je stále v některých rozvojových zemích využíván zejména v podobě jednodávkového režimu před nebo v průběhu porodu s možností podání i novorozenci (McIntyre, 2005). V rozvojových zemích je oceňována zejména jednoduchost a relativní dostupnost tohoto opatření. Podezření, že se vůči nevirapinu rychle rozvíjí rezistence výrazně omezilo jeho využití ve vyspělých zemích, ačkoliv se ukazuje, že přidáním zidovudinu a lamivudinu se rozvoj rezistence výrazně sníží. Stejný efekt na rezistenci má i přidání jedné dávky TDF či FTC (Foster et al., 2009).



Obr. 1 Graf znázorňující četnost užívání vybraných zástupců ze skupiny NRTI těhotnými ženami. AZT, zidovudin; 3TC, lamivudin; TDF, tenofovir; FTC, emtricitabin. Přepracováno dle (Baroncelli et al., 2009).

Riziko vzniku resistencí je příčinou zavádění nových kombinačních terapií. S těmi je ale spojeno riziko interakcí. FTC v monoterapii má dobrý bezpečnostní profil a je velmi slibným novým léčivem (Anderson et al., 2011), ale pro další rozšíření této látky v kombinační terapii je nutné znát jeho interakce s lékovými transportéry, aby bylo možné zajistit bezpečnou a efektivní léčbu.

3.2. Změny farmakokinetiky v těhotenství

Při užití antiretrovirální terapie u těhotných žen musíme brát v úvahu fyziologické změny v průběhu těhotenství, které mohou významně ovlivnit absorpci, distribuci, metabolismus i exkreci užívaných léčiv (Isoherranen & Thummel, 2013; Pavek et al., 2009). V důsledku zvýšeného objemu plazmy může být u těhotných žen při běžném dávkovacím schématu nižší plazmatická koncentrace léčiv. Tento jev je spojen s rizikem poddávkování pacientky, které může vést ke vzniku rezistentního viru či k zvýšenému vertikálnímu přenosu

viru a tedy k selhání ARV terapie. Riziko sníženého vystavení tkání léčivu sledujeme zejména u léčiv ze skupin PI a NRTI.

Dále mohou být u těhotných žen častěji zaznamenány změny v gastrointestinálních funkcích, např. nevolnost, zvracení, což může mít za následek mimo jiné sníženou absorpci léčiva, ačkoliv čas dosažení maximální koncentrace zůstává nezměněn (Colbers et al., 2013b). V oblasti GIT je také v těhotenství popisováno zvýšené pH a snížená motilita střev v důsledku zvýšených hladin hormonu progesteronu. Je také zvýšena renální exkrece, což je následek zvýšeného toku krve ledvinami (Isoherranen & Thummel, 2013).

Změněnou funkci vykazují také enzymy podílející se na metabolismu léčiv a lékové transportéry (Isoherranen & Thummel, 2013). Zvýšenou funkci můžeme sledovat hlavně u jaterních enzymů CYP2D6, CYP3A4, naopak sníženou funkci pozorujeme u CYP1A2. V případě lékových transportérů byla pozorována změna funkce MDR1 a některých zástupců tzv. solute carrier transporters (Isoherranen & Thummel, 2013).

Důležitým faktorem ovlivňujícím farmakokinetiku v těhotenství je i přítomnost feto-placentárního kompartmentu. Placenta je orgán, který zajišťuje respirační, metabolické, exkreční a endokrinní funkce během intrauterinního vývoje plodu. Maternální krev je v přímém kontaktu s choriovými klky, ve kterých koluje fetální krev (Enders & Blankenship, 1999). Významným faktorem, který je třeba u těhotných pacientek sledovat, je tedy transplacentární přenos. Ten není ovlivněn pouze fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiv, ale je modifikován také aktivitou a expresí lékových transportérů (Staud et al., 2012).

Lékové transportéry mají obecně významný vliv na farmakologický potenciál léčiv, protože modifikují jejich absorpci ze střeva, dispozici v různých tělních kompartmentech jako jsou mozek, plod, varlata a podílí se také na jaterní a ledvinné exkreci. Interakce léčivo-léčivo na lékových transportérech může být potenciální příčinou selhání terapie (Schinkel & Jonker, 2003). Nejdůležitějšími zástupci lékových transportérů jsou efluxní ABC transportéry.

3.3. Efluxní lékové ABC transportéry

Lékové ABC transportéry jsou efluxní pumpy, které využívají energii ve formě hydrolýzy ATP k transportu léčiv, jiných xenobiotik či endogenních látek přes buněčnou membránu (Schinkel & Jonker, 2003). Transport látek významně ovlivňují dva významní zástupci ABC transportérů: **P-glykoprotein (MDR1)** a **breast cancer resistance protein (BCRP)**. Oba tyto transportéry jsou primárně lokalizovány v plazmatické membráně, kde je jejich funkcí přenos nežádoucího obsahu ven z buňky. Tento děj je dějem aktivním, může tudíž probíhat i proti koncentračnímu gradientu (Schinkel & Jonker, 2003).

3.3.1. Lokalizace MDR1 a BCRP

MDR1 a BCRP jsou lokalizovány na apikální straně membrány epitelálních a endotelových buněk mnoha biologických bariér (Schinkel & Jonker, 2003).

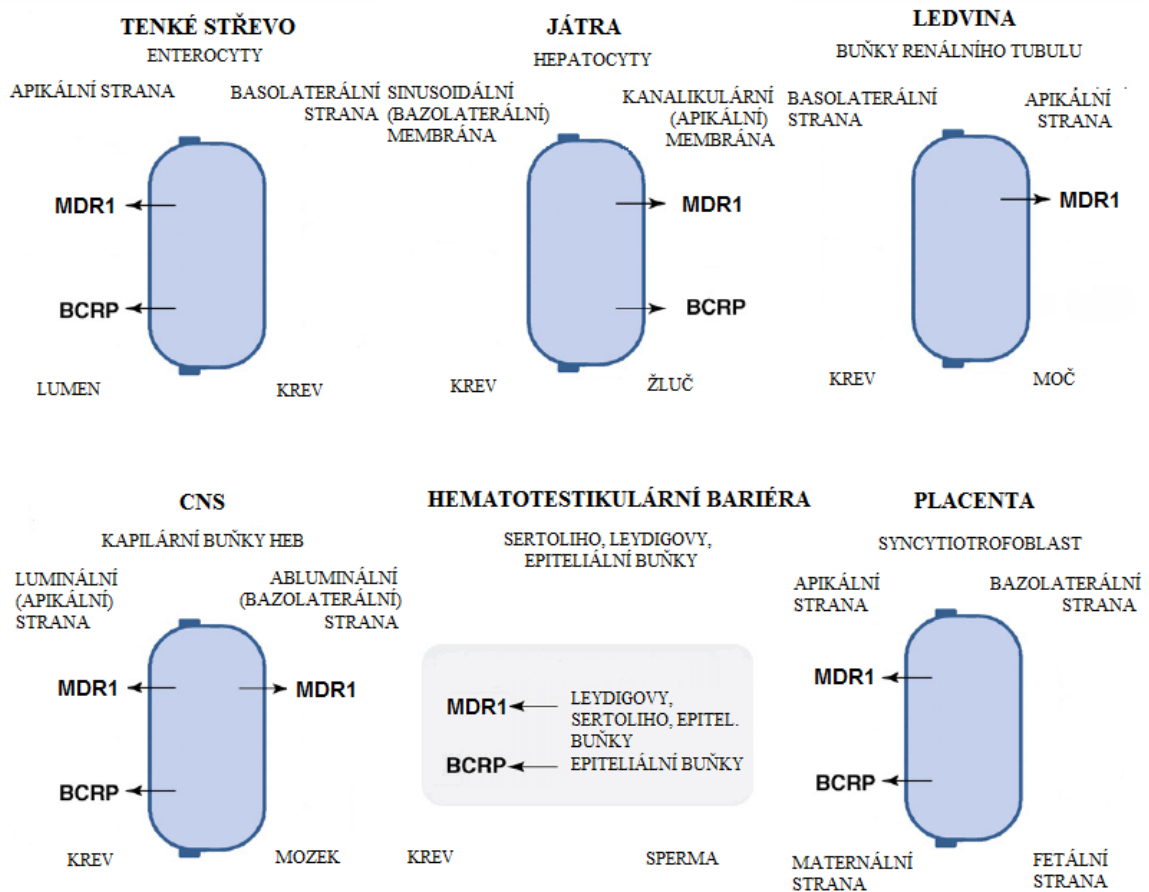
V hematoencefalické bariéře chrání mozek před nadměrnou penetrací toxických látek. Efluxní lékové transportéry zde zachytávají látky, které jsou substráty těchto transportérů a přenášejí je zpět do krve (Schinkel & Jonker, 2003). Stejně se také efluxní lékové ABC transportéry uplatňují v bariéře hematotestikulární (Cordon-Cardo, 1989; Su et al., 2011).

Na apikální straně membrány syncytiotrofoblastu placenty čelí oba transportéry maternální krvi. Syncytiotrofoblast je funkční bariéra mezi mateřským a fetálním krevním oběhem. Transportéry zde mají funkci ochrannou, brání plod před možnými nepříznivými vlivy léčiv a jiných xenobiotik z mateřské krve. Jejich změněná aktivita může velmi významně ovlivňovat materno-fetální transport látek, které jsou substráty těchto transportérů. Tím se podstatně snižuje expozice plodu těmto látkám (Staud et al., 2012)

V endoteliálních buňkách tenkého střeva ovlivňují MDR1 i BCRP biodostupnost léčiv tím, že omezují prostup svých substrátů z lumen střeva do krevního oběhu (Staud & Pavek, 2005; Thiebaut & Tsuruo, 1987). Oba transportéry jsou exprimovány v kanalikulární membráně hepatocytů, kde jsou jejich substráty vytlačovány z jaterních buněk směrem do žluči. Na apikální

straně membrány proximálních tubulů ledvin významně ovlivňují exkreci látek, které jsou vylučovány zejména močí (Staud & Pavek, 2005).

Tkáňově specifické zastoupení MDR1 a BCRP je znázorněno na obrázku 2.

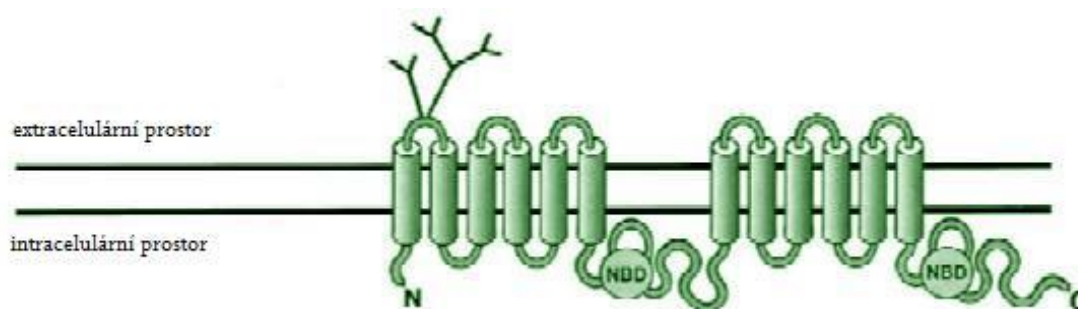


Obr. 2 Schéma zastoupení MDR1 a BCRP v různých tkáních. Přepřacováno dle (Kis et al., 2010).

Transportéry hrají zásadní roli také v rezistenci některých tumorů na chemoterapeutickou léčbu. Nádorové buňky, které mají ve své membráně exprimovány efluxní lékové transportéry, jsou schopné vytlačit chemoterapeutikum z buňky a to tak nemůže působit v místě určení (Schinkel & Jonker, 2003).

3.3.2. P-glykoprotein/MDR1

MDR1 byl prvním popsaným ABC transportérem a je proto zatím i nejlépe prozkoumaný. Struktura se skládá ze dvou transmembránových domén, každá obsahuje šest alfa-helixů a intracelulární místo pro vazbu ATP (Obr. 3). U člověka je kódován genem *ABCB1*, u hlodavců dvěma homology *Abcb1a* a *Abcb1b* (Cascorbi, 2006). Gen *ABCB1* je lokalizován na 7. chromozomu, skládá se z 29 exonů a 28 intronů. Samotný protein má molekulovou hmotnost 170 kDa a tvoří jej sekvence 1280 aminokyselin (Cascorbi, 2006).



Obr. 3 Proteinová Struktura MDR1. Přepřacováno dle (Schinkel & Jonker, 2003). NBD, nukleotid vázající doména, z angl. nukleotide binding domain.

U lidí vykazuje exprese MDR1 vysokou interindividuální variabilitu. Je popsáno množství jednonukleotidových polymorfismů (SNP) genu *ABCB1*, ovlivňujících expresi/aktivitu proteinu (Cascorbi et al., 2001).

Substrátová specifita MDR1

MDR1 má velmi širokou substrátovou specifitu (přehled vybraných látek je uveden v tabulce 1) (Schinkel & Jonker, 2003). Tato specifita je vázána na několik strukturních znaků. Substráty MDR1 vykazují následující charakteristiky: i) amfipatický charakter molekuly, ii) jedná o organické molekuly různých velikostí, pohybujících se v rozmezí 200-1900 Da a/nebo iii) se jedná se o látky hydrofobní (Schinkel & Jonker, 2003). Substráty z principu fungují

jako kompetitivní inhibitory MDR1. Inhibice může ovšem probíhat i nekompetitivně, na základě jiných mechanismů (Staud et al., 2012).

Tabulka 1: Substráty MDR1. Zpracováno dle (Schinkel & Jonker, 2003; Staud et al., 2012).

Léčiva protinádorové terapie	vinka alkaloidy (vinblastin, vinkristin) taxany (paklitaxel, docetaxel) antracykliny (doxorubicin, daunorubicin,..)
HIV proteázové inhibitory	ritonavir, lopinavir, delavirdin,..
NNRTI	efavirenz, nevirapin
NRTI	abakavir, tenofovir disoproxil fumarát
Antagonisté H ₂ recepturu	cimetidin
Blokátory kalciového kanálu	verapamil, diltiazem
Kardioglykosidy	digoxin
Imunosupresiva	cyklosporin A, takrolimus
Anthelmintika	ivermectin, abamectin
Kortikoidy	dexametason, hydrokortison, triamcinolon

Různé exogenní i endogenní látky mohou mít také funkci induktoru či inhibitoru transportérů (Schinkel & Jonker, 2003).

Regulace exprese

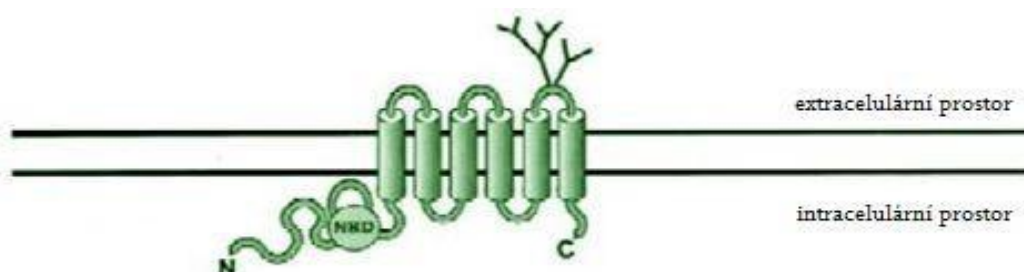
Expese MDR1 je ovlivněna zejména tzv. pregnanovým X receptorem (PXR) a konstitutivním androstanovým receptorem (Chan et al., 2013; Pavěk & Smutný, 2014). Ty jsou aktivovány navázáním různých exo i endogenních ligandů. Navázáním ligandu na nukleární receptor dojde ke konformační změně a k tvorbě komplexu, který se následně naváže na krátký úsek DNA zvaný responzivní element, který je lokalizován v promotoru cílového genu (Handschin & Meyer, 2003).

Dalším mechanismem podléjícími se na genové expresi MDR1 je epigenetická regulace (Balaguer et al., 2012; Henrique et al., 2013). Modifikace histonů genu *ABCB1* a metylace DNA byly jako jedna z cest regulace exprese MDR1 popsány v rakovinných buňkách (Henrique et al., 2013; Jin & Scotto, 1998).

3.3.3. Breast cancer resistance protein (BCRP)

Ačkoliv BCRP byl popsán nejpozději z efluxních lékových ABC transportérů, existují již mnohé doklady o jeho roli v modulaci farmakokinetických parametrů léčiv (Schinkel & Jonker, 2003). Funkce transportéru a jeho genová exprese byly poprvé popsány na buněčné linii rakovinných prsních buněk, kde jejich aktivita způsobovala rezistenci prsních buněk na chemoterapii. Odtud byl odvozen jeho název, breast cancer resistance protein. Je znám také pod názvem MXR (mitoxantrone resistance protein) či ABCP (placental ABC protein) (Schinkel & Jonker, 2003; Staud & Pavek, 2005). BCRP je kódován genem *ABCG2*, který je lokalizován na 4. chromozomu a skládá se z 16 exonů a 15 intronů. Samotný transportér je pak protein skládající se z 655 aminokyselin a má 72 kDa (Staud & Pavek, 2005).

Strukturou se mírně liší od ostatních transmembránových transportérů. Obsahuje pouze jednu transmembránovou doménu a jednu doménu vázající ATP (viz Obr. 4). Pro správnou funkci tohoto tzv. polotransportéru je nezbytná homodimerizace (Schinkel & Jonker, 2003).



Obr. 4 Struktura BCRP proteinu. Přepracováno dle (Schinkel & Jonker, 2003).

Substrátová specifita

BCRP má širokou substrátovou specifitu zahrnující pozitivně i negativně nabitě molekuly, organické anionty, sulfátové konjugáty (Staud & Pavek, 2005). Přehled substrátů BCRP viz tabulka 2.

Tabulka 2: Substráty BCRP. Zpracováno dle (Cascorbi, 2006; Staud et al., 2012).

Léčiva protinádorové terapie	doxorubicin, metotrexát, mitoxantron, topotekan
HIV proteázové inhibitory	lopinavir, ritonavir, atazanavir
NNRTI	efavirenz, delavirdin
NRTI	zidovudin, lamivudin, abakavir
Antagonisté H2 receptoru	cimetidin

Regulace exprese

Při regulaci exprese BCRP se pravděpodobně v jisté míře uplatňují nukleární receptory; aryl hydrokarbonový receptor a konstitutivní androstanový receptor (Pavek & Smutny, 2014). V buňkách s estrogenním receptorem byla pozorována indukce genu *Abcg2* v přítomnosti tohoto hormonu, důvodem je zřejmě tzv. estrogen responzivní element (Ee, 2004). Exprese BCRP může být také indukována tkáňovou hypoxií (Staud & Pavek, 2005).

Mnoho interakcí léčivo-léčivo může být vysvětleno na základě popsaných interakcí léčiv s efluxními lékovými ABC transportéry. Tento typ interakce může vést v selhání léčby, a to díky dosažení toxických, nebo na druhé straně subterapeutických plazmatických koncentrací. Mezi léčiva, která mají potenciál interagovat s lékovým ABC transportéry, včetně MDR1 a BCRP, patří i antiretrovirální látky.

3.3.4. Interakce antiretrovirálních látek s efluxními lékovými ABC transportéry

ARV terapie je založena na kombinaci léčiv z různých farmakologických skupin, což zaručuje vysokou efektivitu, zároveň však musíme počítat s možnými interakcemi, které mohou vyústit v komplikace léčby. Antiretrovirální léčiva jsou popsány jako substráty, induktory i inhibitory lékových ABC transportérů (Kis et al., 2010).

Většina léčiv ze skupiny inhibitorů HIV proteáz je popsána jako substráty MDR1 (Lee et al., 1998). Studie s myši, které měly „vypnuté“ oba homology *Mdr1a* i *Mdr1b*, popisují zvýšenou systémovou dostupnost a větší akumulaci zástupců PI v mozku (Kim et al., 1998). Většina léčiv ze skupiny PI mohou také kromě substrátů působit jako inhibitory tohoto transportéru (nelfinavir, ritonavir) a měnit tak prostupnost bariér pro další substráty MDR1 (Staud et al., 2012). Také některá léčiva ze skupiny NRTI jsou popsána jako substráty MDR1, např. TDF (Tong et al., 2007), abakavir (Shaik et al., 2007).

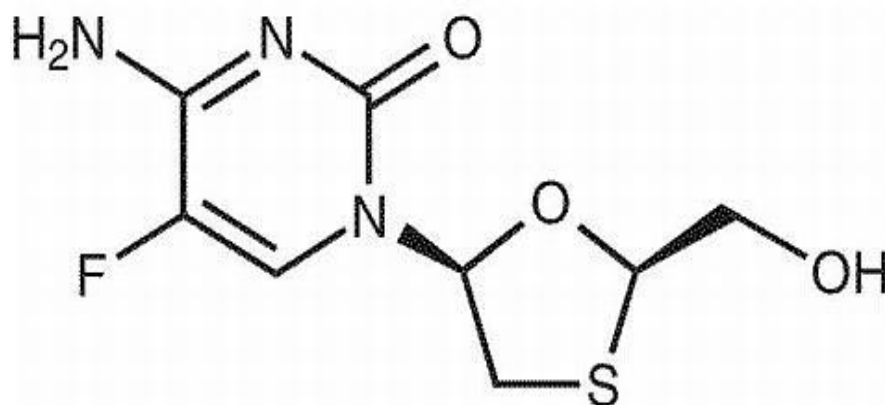
Při chronickém užívání některých antiretrovirotik, např. atazanavir, ritonavir může být navíc ovlivněna exprese a aktivita transportéru přes interakce s PXR (Dussault et al., 2001).

Neméně důležité je i poznání interakcí s BCRP. Léčiva ze skupiny PI a NNRTI jsou slabými substráty tohoto transportéru, některé mohou jeho funkci inhibovat (Weiss et al., 2007). Ve studii autorů Bierman a kol. na buněčné linii lidského karcinomu prsu (MCF-7) byl potvrzen inhibiční vliv tří zástupců ze skupiny PI, atazanaviru, ritonaviru, a lopinaviru na expresi BCRP (Bierman et al., 2010). Farmakokinetika léčiv ze skupiny NRTI jako jsou abakavir, zidovudin a TDF, které jsou považovány za substráty BCRP (Neumanova et al., 2014; Pan et al., 2007), může být touto cestou ovlivněna.

O interakcích FTC s lékovými transportéry není mnoho známo. Studie autorů Weiss a kol. z roku 2008 prováděné na buněčné linii lidského adenokarcinomu tlustého střeva (LS180) kvantifikovala expresi mRNA genu kódujícího MDR1 po dlouhodobém podávání FTC. Výsledky studie ukazují na 2,4× zvýšenou expresi tohoto genu (Weiss et al., 2008).

3.4. Emtricitabin/FTC

Emtricitabin (FTC, dříve Coviracil), chemicky 2'3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (viz Obr. 5), je nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy (NRTI). FTC se strukturně podobá lamivudinu a je léčivem užívaným v kombinační léčbě HIV. U FTC ale oproti lamivudinu sledujeme pětikrát větší *in vitro* aktivitu vůči HIV (Wang et al., 2002). Jako analog deoxycytidinu blokuje činnost reverzní transkriptázy, enzymu, který je nezbytnou součástí replikačního cyklu viru HIV. Funguje na bázi kompetice s endogenním 2-deoxynukleotidem a inkorporuje se místo něj do vznikajícího řetězce virové DNA a tím zastavuje elongaci virové DNA (Wang et al., 2002).



Obr. 5 Struktura FTC

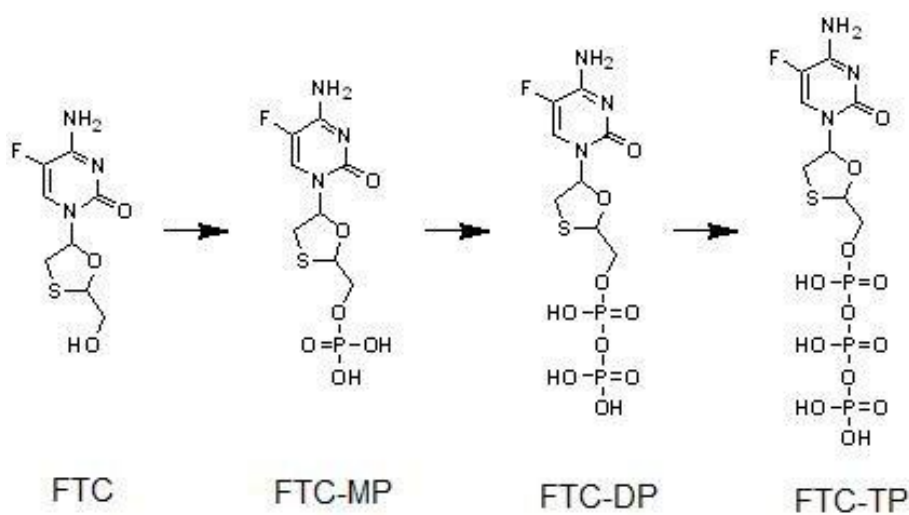
Stejně jako ostatní NRTI je i FTC v intracelulárním prostředí postupně fosforylován za vzniku monofosfátu, difosfátu a 5'-trifosfátové aktivní formy (Obr. 6). NRTI zabraňují dalšímu množení viru, snižují tedy koncentraci viru v plazmě a nepřímou tak zvyšují i počet CD4 buněk a tím i imunitní odpověď organismu.

FTC vykazuje také účinnost vůči viru hepatitidy B, používá se tedy s výhodou při infekci HIV a HBV (Wang et al., 2002).

3.4.1. Farmakokinetika FTC

FTC je po orálním podání rychle absorbován, biodostupnost činí více než 90%. Nejvyšší plazmatickou koncentraci (C_{max}) pozorujeme okolo 90. minuty

po podání. Z 65-70% je eliminace uskutečňována glomerulární filtrací a aktivní tubulární sekrecí, FTC je tedy vylučován převážně močí v nezměněném stavu a eliminační poločas je 8-10 hodin. Biotransformace je uskutečňována v menší míře (asi 13%) (Wang et al., 2002). Jeho relativně dlouhý eliminační poločas (8-10h) umožňuje podávání jedenkrát denně. Poločas aktivního metabolitu FTC-3'-3P je ještě vyšší (39h). Intracelulární ionizace FTC způsobí akumulaci v buňce, což způsobí prodloužení antivirové aktivity (Wang et al., 2002).



Obr. 6 Znárodnění intracelulárního metabolismu FTC.

Suprese viru v plazmě i intracelulární koncentrace aktivního metabolitu stoupá s dávkou, avšak dosáhne plató fáze při 200 mg. Doporučená dávka je tedy 200 mg denně, podáváno v jedné dávce vzhledem k relativně dlouhému eliminačnímu poločasu (Wang et al., 2002).

FTC je považován za bezpečné léčivo, mohou se ale v ojedinělých případech objevit nežádoucí účinky po užívání. Jsou to relativně běžné, zdraví neohrožující nežádoucí účinky jako zvracení, průjem, bolest břicha (Rousseau et al., 2001).

Mezi hlavní léčivé přípravky obsahující FTC patří Emtriva, Truvada, Atripla. Emtriva je monokomponentový léčivý přípravek obsahující pouze FTC. Truvada je kombinací dvou NRTI, FTC a TDF. Atripla obsahuje 3 účinné látky, FTC (200mg), TDF (300mg) a efavirenz (600mg).

3.4.2. Specifika užívání FTC v těhotenství

Jak již bylo uvedeno dříve, v těhotenství se mění některé biologické procesy, které mohou změnit farmakokinetiku podávaných antiretrovirotik. FTC **má relativně dobrý průchod placentou**, asi 80%. Tato hodnota byla určena na základě porovnání koncentrací FTC v maternální a umbilikální krvi. Placentární transport se pravděpodobně uskutečňuje především pasivní difuzí (Hirt et al., 2009).

Studie zkoumající změny farmakokinetiky FTC v těhotenství porovnávající hodnoty naměřené v těhotenství a hodnoty u stejných žen po porodu ukázaly na snížení hodnot AUC (o méně než 20%) a zvýšení renální clearance v těhotenství. Tyto hodnoty však nebyly natolik rozdílné od hodnot dospělých pacientů, aby bylo potřeba měnit dávkovací režim. Naopak hodnoty C_{max} a distribuční objem nevykazovaly výraznou změnu (Stek et al., 2012).

Kombinační ARV terapie založená na FTC se tedy zdá být efektivní a zároveň bezpečnou variantou pro léčbu HIV u těhotných matek a prevenci vertikálního přenosu HIV z matky na plod (Baroncelli et al., 2009; Kesho Bora Study Group, 2011). Jsou dostupné studie naznačující, že FTC zvyšuje expresi lékových ABC transportérů (Weiss et al., 2008). Interakci tohoto typu by pak bylo následně nutné zohlednit v terapii, pokud by byly aplikovány substráty daných ABC transportérů, aby byla podávána léčba racionální a bezpečná.

4. Cíle práce

Vliv dlouhodobého podávání antiretrovirotika FTC na expresi lékových efluxních transportérů v placentě a orgánech matky a plodu není popsán. Znalost této lékové interakce je přitom zásadní pro volbu racionální a bezpečné terapie u HIV pozitivních matek a novorozenců narozených HIV pozitivním matkám.

Cílem diplomové práce je tedy pomocí qRT-PCR v reálném čase kvantifikovat vliv dlouhodobého podávání FTC na genovou expresi dvou nejdůležitějších efluxních lékových ABC transportérů MDR1 a BCRP u modelového organismu březích potkanic kmene Wistar a jejich plodů; konkrétně v placentě, která tvoří aktivní bariéru mezi matkou a plodem, v eliminačních orgánech matky a plodu (játra a ledviny), v tenkém střevě a mozku.

Diplomová práce byla rozdělena do dvou částí, které byly řešeny jednotlivě:

1. Kvantifikace biodostupnosti FTC u potkaního modelu pro zvolené i.m. podání.
2. Analýza vlivu dlouhodobého i.m. podávání FTC (10 dní) na expresi *Mdr1a*, *Mdr1b* a *Bcrp* v placentě, orgánech matky a plodu u modelového organismu březího potkana kmene Wistar.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie a reagensie

TRI REAGENT® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, Ohio)

Reagensie pro qRT-PCR byly zakoupeny u firmy GENERI Biotech, Hradec Králové, Česká republika):

Voda pro injekce

Chloroform (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)

2-propranolol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)

Etanol (Merck, New Jersey, USA)

Master Mix pro reverzní transkripci (Reverse Transcription Master Mix)

2x Probe Master Mix

Assay pro referenční geny: *b2m* (rB2m_Q2), *rYwhaz* (rYwhaz_Q1)

Assay pro cílené geny: *Abcb1a* (rAbcb1a_Q1), *Abcb1b* (rAbcb1b_Q1) a *Abcg2* (rAbcg2_Q1)

FTC (Gilead Sciences, Inc.)

Pentobarbital (Nembutal; Abbott Laboratories)

5.2. Metodika a materiál

5.2.1. Laboratorní zvířata

Experiment byl prováděn na březích samicích potkana Wistar zakoupených z firmy BioTest s.r.o. (Konárovice, Česká Republika). Potkani byli chováni za standardních podmínek, krmné pelety i voda byly poskytovány *ad libitum*. Perioda světlo/tma byla nastavena 12 hodin/12 hodin. Březí samice byly náhodně rozděleny na dvě skupiny, kdy první bylo od 12. do 21. dne

březosti podáno celkem 10 dávek FTC i.m. v koncentraci 3,5 mg/kg a celkovém množství 200 μ l. Druhé skupině bylo za stejných podmínek podáváno ekvivalentní množství fyziologického roztoku. 22. den gestace byly potkaní samice uvedeny do celkové anestezie roztokem pentobarbitalu (40 mg/kg) a usmrceny roztokem chloridu draselného. Následně byly odebrány orgány matek i plodů (mozek, játra, ledviny, střevo) a placenty. Všechny orgány byly zváženy a zamraženy v tekutém dusíku a skladovány v hlubokomrazicím boxu za teploty $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby než byly použity k vlastnímu experimentu.

Všechny experimenty byly schváleny Etickou Komisí Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a byly prováděny v souladu s Průvodcem pro péči a použití laboratorních zvířat (1966) a Evropskou úmluvou o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely (Strassbourg, Francie, 1986).

5.2.2. Biodostupnost po i.m. podání - metodika

K detekci a porovnání biodostupnosti FTC po i.v. a i.m. podání jsme použili potkaní samice, které nebyly březí. Tyto samice byly uvedeny do celkové anestezie pomocí pentobarbitalu. Potkanům bylo podáno FTC v dávce 3,5 mg/kg značené $[^3\text{H}]\text{FTC}$ o výsledné aktivitě 15 $\mu\text{Ci/ml}$ v 0,9% roztoku NaCl o celkovém objemu 0,2 ml. Takto připravené roztoky byly podány samicím i.v. nebo i.m., poté byly odebírány vzorky krve (0,3 ml) přímo z jugulární žíly do heparinizovaných zkumavek v časech 2; 5; 15; 30; 60; 120 a 240 minut po aplikaci. Vzorky byly odbarveny pomocí SOLVABLE TM roztoku přesně podle návodu dodávaného výrobcem. Radioaktivita testované látky byla měřena pomocí Tri-Carb 2900 TR Perkin Elmer. Farmakokinetické parametry pro FTC (AUC) byly stanovené pomocí GraphPad Prism 6.0.

5.2.3. Izolace RNA

Orgány byly mechanicky zhomogenizovány a pro izolaci totální RNA bylo přidáno 600 μ l směsi TRI REAGENT®. Celý proces probíhal v RNase free zkumavkách za pokojové teploty. Manipulace s otevřenými zkumavkami probíhala v laminárním boxu. Izolace byla provedena dle protokolu firmy

Molecular Research Centre a pro centrifugaci byla použita stolní centrifuga Hermle Z326-K.

U takto připravené RNA byla pomocí gelové elektroforézy ověřena integrita a spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota na přístroji NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

5.2.4. Analýza exprese mRNA

Izolovaná RNA byla zředěna na koncentraci 500 ng/μl. Následně byl 1 μg RNA přepsán do cDNA pomocí reverse transcription master mix (GENERI-Biotech) dle protokolu poskytnutého firmou. Reakce probíhala v celkovém množství 20 μl při 42 °C po dobu 60 minut. Takto připravená cDNA byla 5x naředěna a uchovávána dle protokolu při -20 °C.

Kvantitativní analýza byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR), pro detekci amplikonu byly využity sondy s fluoroforem FAM.

Z potkaních orgánů jsme analyzovali geny *Abcb1a*, *Abcb1b* a *Abcg2*. Do reakce o celkovém objemu 20 μl bylo přidáno 10 μl 2x probe master mixu (HotStart Taq polymeráza, 8 mM MgCl₂ a 400 μM dNTP), 2 μl assay pro kvantifikaci zkoumaných genů (*Abcb1a*, *Abcb1b* nebo *Abcg2*), 5,5 μl vody pro injekce a 25 ng cDNA, což odpovídá 2,5 μl 5x naředěné cDNA. Jako referenční geny pro normalizaci genové exprese byly použity tzv. housekeeping geny, geny pro beta-2-mikroglobulin (*b2m*) a tyrosin-3-monooxygenáza/tryptofan-5-monooxygenáza aktivační protein, zeta polypeptid (*rYwhaz*). Oba tyto geny jsou v testovaných orgánech exprimovány konstitutivně, nezávisle na dalších podmínkách.

Řetězová polymerázová reakce byla provedena v triplicátech dle instrukcí výrobce 95 °C – 3 min; 95 - 15 s; 60 °C – 45 s; v 40 cyklech v cyklu iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pro výpočet byla použita $\Delta\Delta$ metoda s kalkulací „relativní exprese = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ “.

5.3. Analýza dat

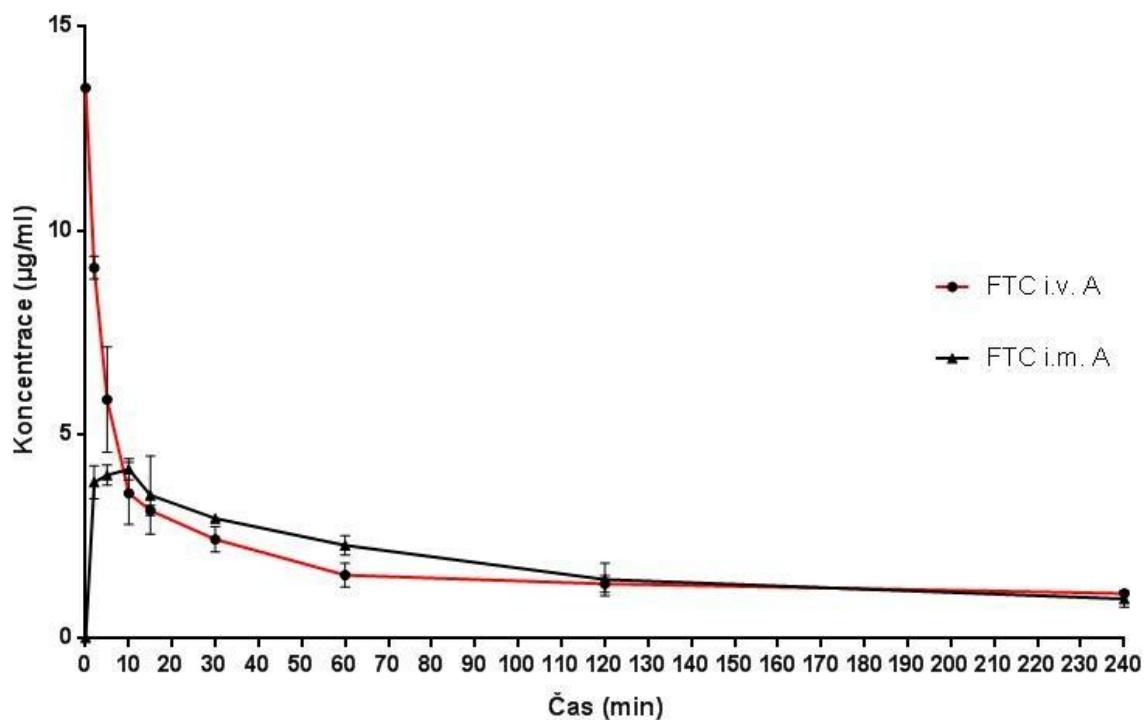
Ke statistické analýze a grafickému vyjádření výsledků byl využíván program GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Použitým testem pro porovnání biodostupnosti a analýzu exprese byl nepárový, neparametrický test Mann-whitney. Data jsou prezentována se směrodatnou odchylkou. Naměřené rozdíly jsou považovány za statisticky signifikantní, je-li $p \leq 0,05$.

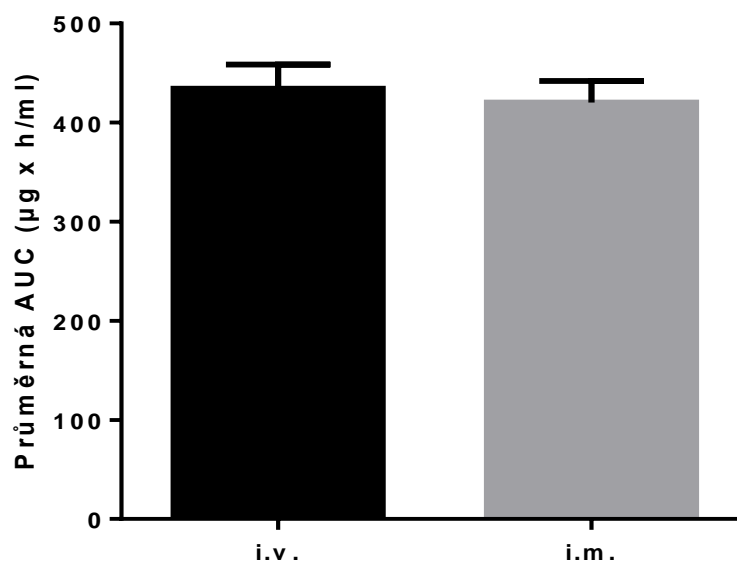
6. Výsledky

6.1. Výsledky biodostupnosti po i.v. a i.m. podání

Pro vlastní analýzu vlivu FTC na expresi MDR1 a BCRP u potkaního modelu bylo velmi důležité zvolit takovou cestu aplikace, aby zvíře dostalo požadovanou dávku, nebyl ohrožen plod a zároveň byla cesta podání co nejméně stresující vzhledem k možnému riziku abortu, či předčasného porodu. Na základě dostupných informací jsme zvolili jako nevýhodnější variantu i.m.. Vzhledem k faktu, že není známa biodostupnost FTC po i.m. podání u potkana, bylo nutné jako první krok biodostupnost ověřit. Na obrázku 7 je zobrazena koncentrační závislost FTC na čase po i.v. a i.m. podání. Plocha pod křivkou (AUC) po i.m. podání byla srovnatelná s AUC po i.v. podání (obr. 8). Tyto výsledky prokazují, že i.m. aplikace je vhodnou aplikací cestou pro náš experiment, přičemž očekávaný efekt na expresi by byl v porovnání s p.o. aplikací vzhledem k biodostupnosti FTC (90%) mírně vyšší.



Obr. 7 Grafické znázornění závislosti plazmatické koncentrace FTC na čase po i.v. a i.m. podání. Experiment byl proveden dvakrát. Prezentovány jsou výsledky z jednoho experimentu.

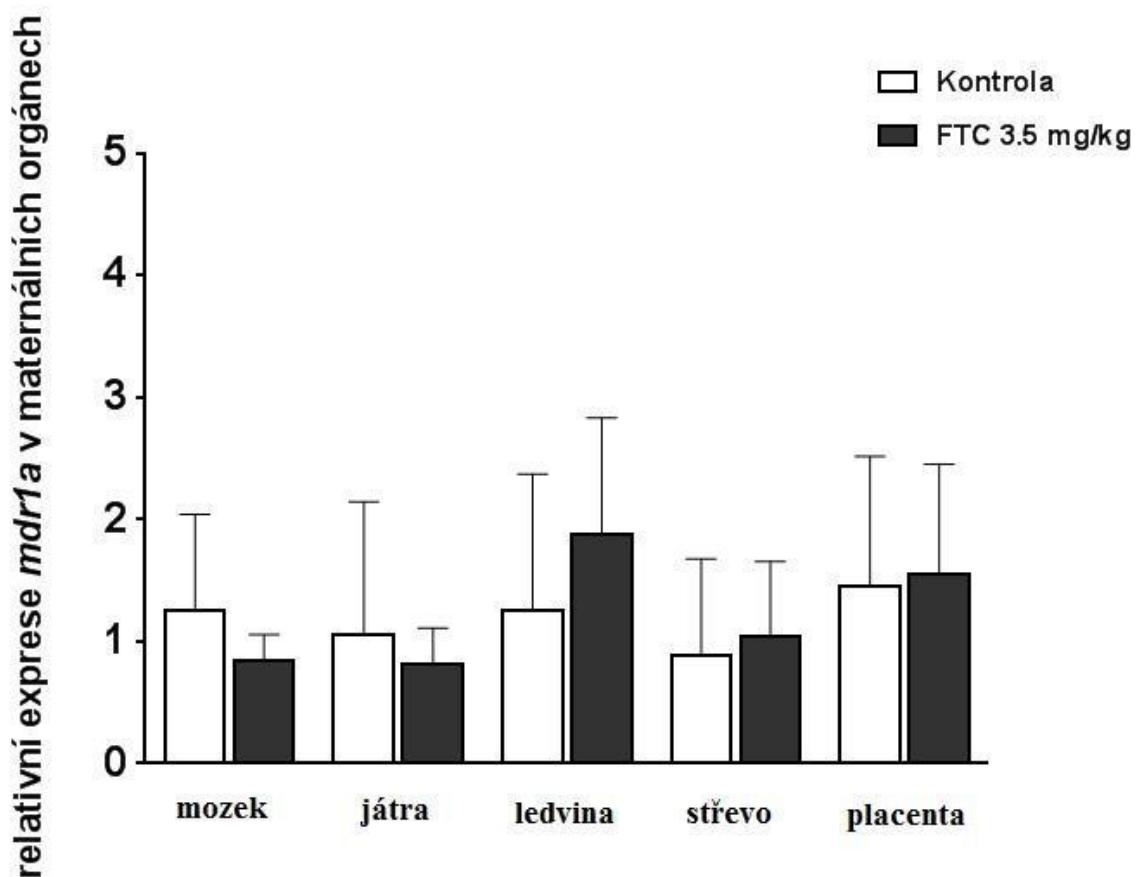


Obr. 8 Průměrná AUC (µg x h/ml) FTC = 3,5 mg/kg (nahore) po i.v. a i.m podání; n = 2.

6.2. Výsledky exprese v maternálních orgánech

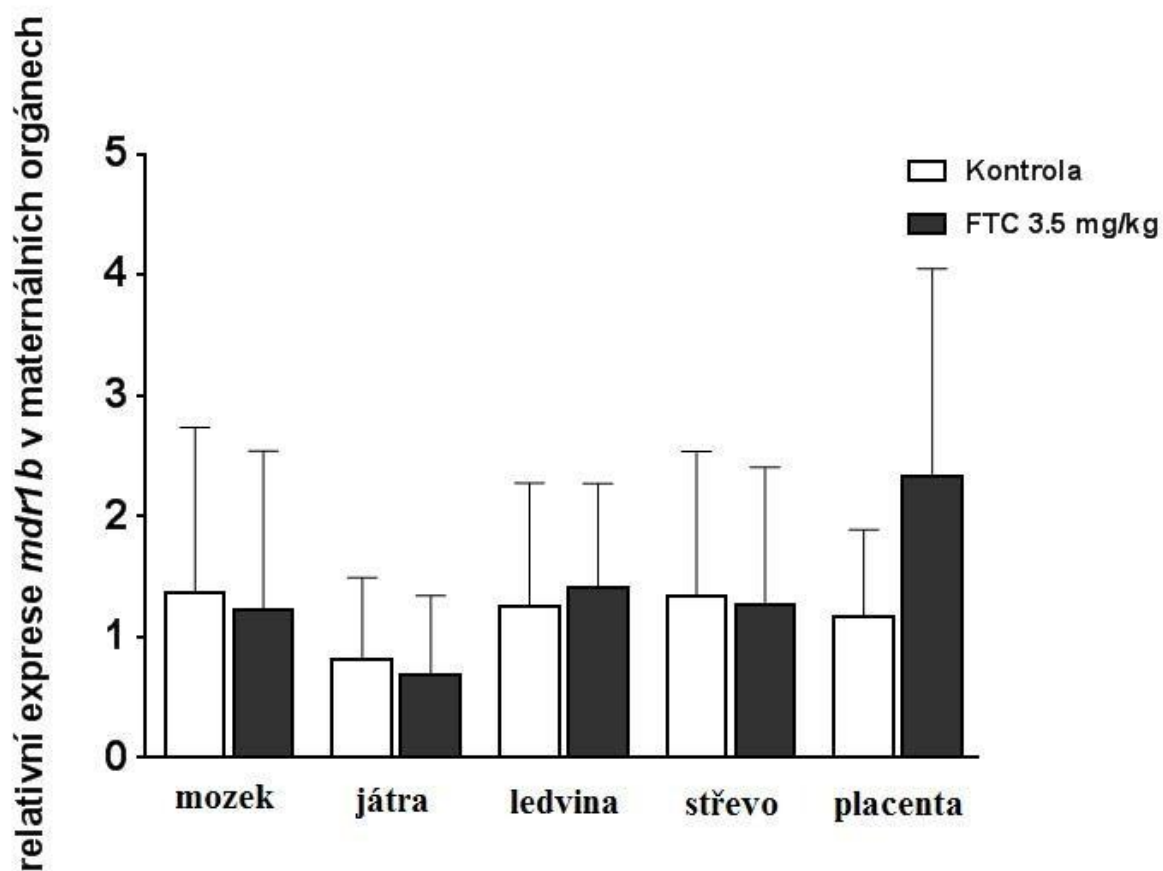
Březím potkanicím kmene Wistar byl podáván FTC v dávce 3,5 mg/kg od 12. do 21. dne březosti. Byly odebrány placenta a orgány matky (mozek, ledviny, játra a tenké střevo). Poté byla izolována totální RNA a provedena qRT-PCR analýza. Získaná data byla normalizována pomocí dvou referenčních genů s konstitutivní expresí *Ywhaz* a *B2m*. Konstitutivní nezměněná exprese referenčních genů v jednotlivých tkáních byla ověřena (data neuvádíme). U žádné testované tkáně nebyla pozorována signifikantní změna sledovaných potkaních orthologů *Mdr1a*, *MDr1b* a *Bcrp* oproti kontrolním vzorkům. Výsledky exprese v placentě a orgánech matky jsou zobrazeny v jednotlivých kapitolách v grafech (Obr. 9 - 11).

6.2.1. *Mdr1a*



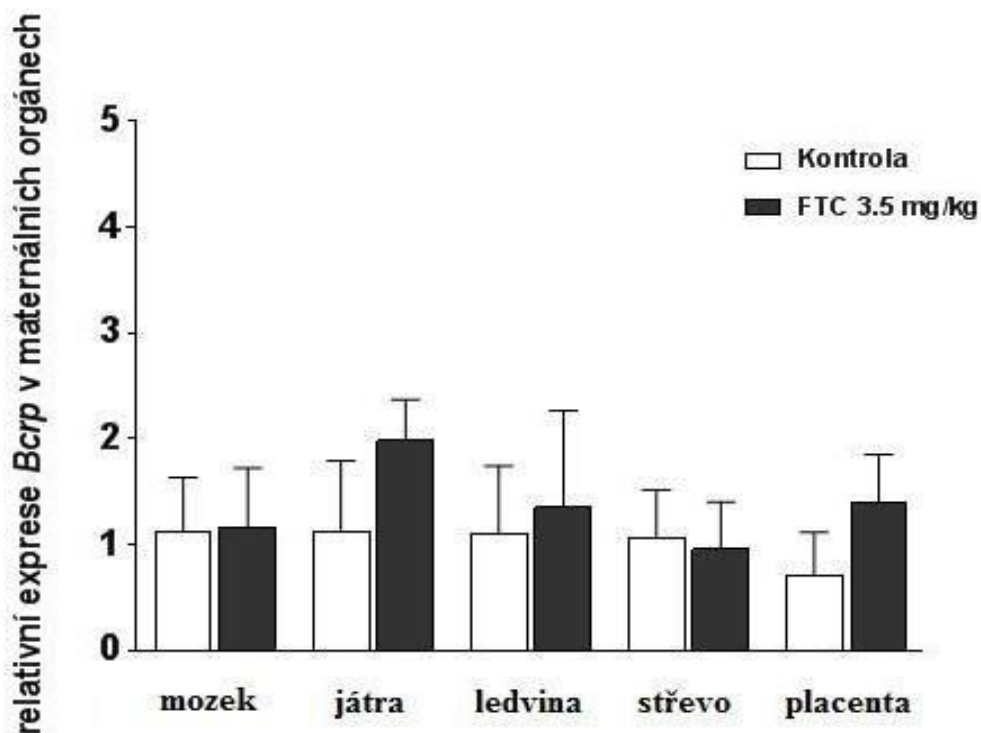
Obr. 9 Grafické znázornění exprese *Mdr1a* v maternálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo, placenta. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

6.2.2. *Mdr1b*



Obr. 10 Grafické znázornění exprese *Mdr1b* v maternálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo, placenta. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

6.2.3. *Bcrp*

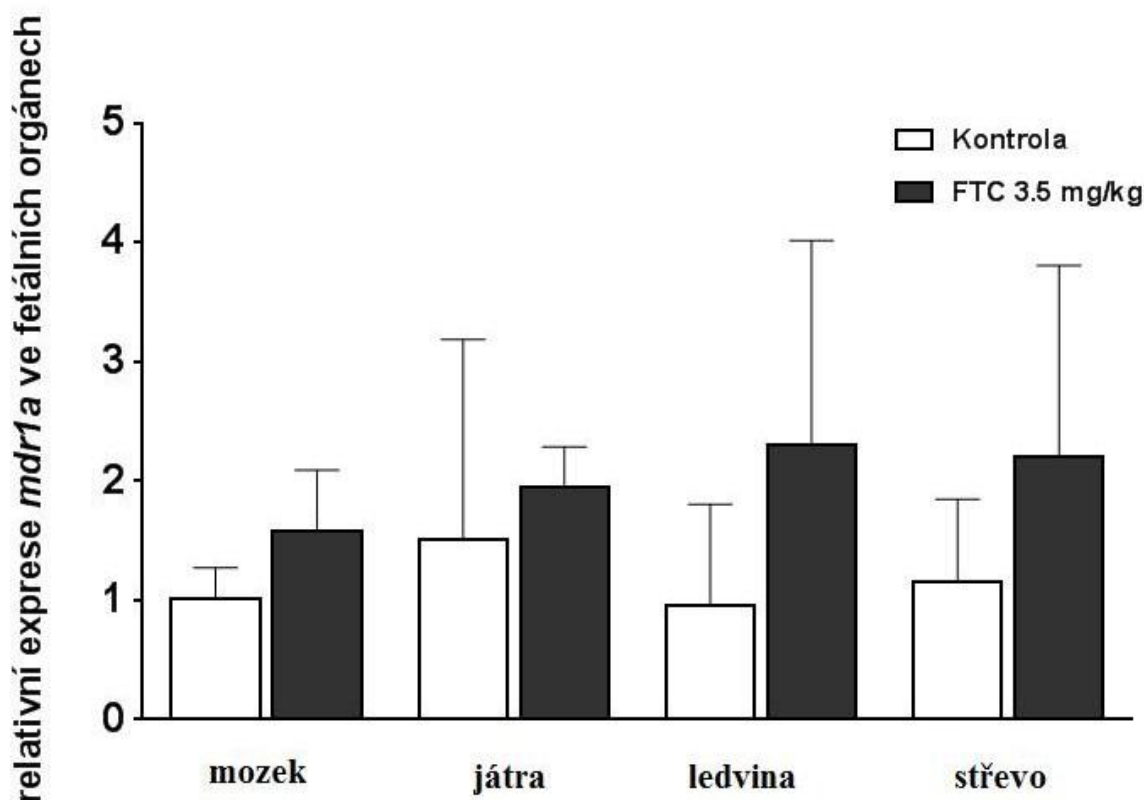


Obr. 11 Grafické znázornění exprese *Bcrp* v maternálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo, placenta. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

6.3. Výsledky exprese ve fetálních orgánech

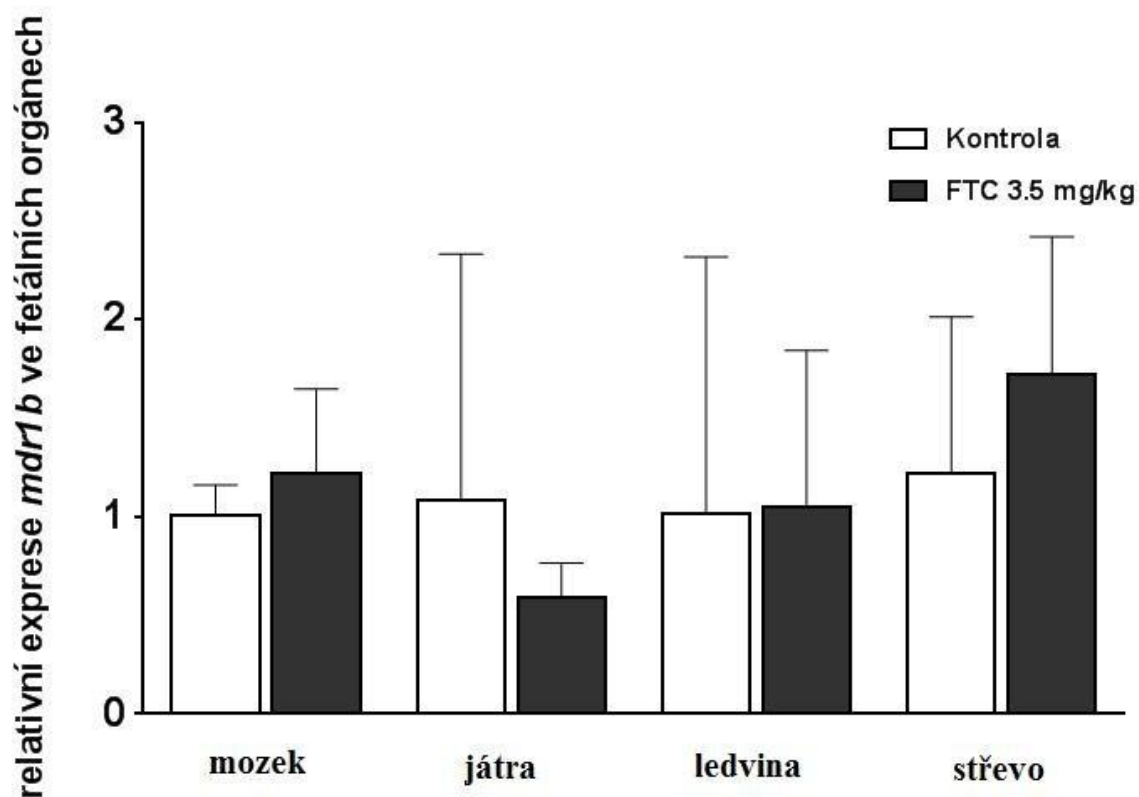
Vzorky fetálních orgánů byly odebrány plodům při odběru maternálních orgánů a placenty (jak je popsáno v kapitole 5.2 a kapitole 6.2). V expresi efluxních lékových transportérů ve sledovaných orgánech (játra, mozek, ledviny a tenké střevo) nebyla pozorována statisticky významná změna oproti vzorkům z kontrolní skupiny, jimž byl podáván fyziologický roztok (obr. 16 - 18 v příslušných kapitolách). Výsledky jsou vyjádřeny v jednotlivých podkapitolách v grafech (Obr. 12 - 14).

6.3.1. *Mdr1a*



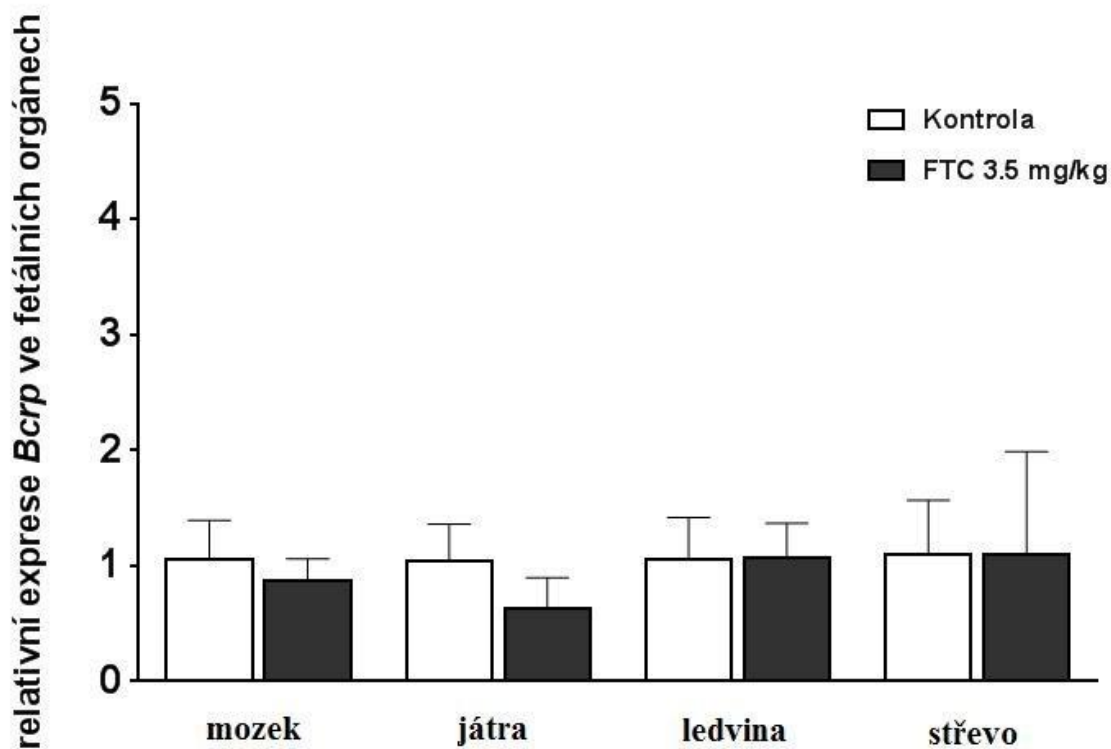
Obr. 12 Grafické znázornění exprese *Mdr1a* ve fetálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

6.3.2. *Mdr1b*



Obr. 13 Grafické znázornění exprese *Mdr1b* ve fetálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

6.3.3. *Bcrp*



Obr. 14 Grafické znázornění exprese *Bcrp* ve fetálních orgánech potkana. Pořadí orgánů zleva: mozek, játra, ledvina, střevo. Data pro kontrolní skupinu jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=5) bíle, data pro skupinu léčenou FTC (3,5 mg/kg) též vyjádřena jako \pm SD (n=5) černě.

7. Diskuse

Podle současných doporučených postupů WHO je pro léčbu HIV využívána HAART jak u dospělých pacientů, tak u těhotných pacientek. U těhotných pacientek je navíc HAART indikována pro prevenci vertikálního přenosu. Podle doporučení WHO je FTC součástí HAART, kdy je kombinace TDF, lamivudinu (nebo FTC) a efavirenz využívána jako terapie první volby (WHO guidelines, 2013). Tato doporučení se opírají především o studie popisující užití HAART u těhotných pro prevenci vertikálního přenosu, kdy se bez léčebné intervence procentuální šance přenosu pohybuje v rozmezí 15-40%, při nasazení HAART pak kolem 2% (Harris et al., 2007).

Cílem naší práce bylo zhodnotit vliv dlouhodobého podávání FTC v těhotenství na expresi efluxních lékových ABC transportérů matky i plodů. Předpokládaná změna v expresi genů ve fetálních orgánech byla založena na znalosti transplacentární kinetiky FTC. Ta vycházela ze studie, která porovnávala koncentrace FTC v umbilikální a maternální krvi krátce po porodu, ve které byl transplacentární přestup zhruba 80% (Hirt et al., 2009). Dá se tedy předpokládat vliv FTC na geny vyvíjejícího se plodu, kdy FTC bylo podáváno po dobu 10 dní, tedy polovinu doby gestace.

Výhodou uspořádání naší studie bylo užití živých zvířecích modelů, které poskytují komplexnější obraz o podmínkách v celém organismu, kdy jsou zahrnuty běžné hormonální změny během těhotenství.

Způsob podání léčiva potkanům byl zvolen na základě co nejlepší dostupnosti léčiva a zároveň minimalizace negativních zážitků z procedury pro zvíře. Zvažovanými cestami podání byly perorální, intravenózní, subkutánní a intramuskulární. Perorální podání bylo zvoleno jako nevhodné kvůli neschopnosti zajistit kompletní jednotlivou dávku léčiva potkanům při tomto podání. Nevyužili jsme ani možnost podání gastrickou sondou z obavy před vysokým rizikem ohrožení zvířat nadměrným stresem, který by u březích samic mohl vyvolat až potrat. Intravenózní podání je u osrstěných zvířat značně nepraktické, pro subkutánní podání byl celkový objem 200 μ l příliš velký (Turner et al., 2011). Bylo tedy zvoleno podání intramuskulární, tzn. odlišné od typického podání při léčbě lidí, kdy FTC je klasicky dostupný ve formě tablet.

Intramuskulární podání bylo doprovázeno sledováním biodostupnosti, při kterém jsme prokázali, že biodostupnost FTC po i.m. podání je srovnatelná s biodostupností po i.v. podání.

Velikost dávky byla odvozena od dávky podávané lidem (200 mg) a následně přepočítaná na průměrnou hmotnost potkana.

K analýze exprese mRNA byla použita vysoce citlivá metoda qRT-PCR. Pro normalizaci výsledků je důležitý výběr referenčních genů, tzv. housekeeping genů, které jsou v daných tkáních exprimovány konstitutivně, bez ohledu na další podmínky. V naší studii jsme použili 2 geny pro *b2m* a *Ywhaz*. Tyto geny jsou tradičně využívány pro normalizaci exprese v placentě (Meller et al., 2004). Navíc byla prokázána konstitutivní exprese těchto genů ve všech orgánech, které byly předmětem našeho studia (data neuvádíme).

FTC je nejčastěji užíván v kombinaci s TDF, který je popsáným substrátem MDR1 i BCRP (Tong et al., 2007; Neumanova et al., 2014). Změna v expresi těchto transportérů navozená FTC by tedy významně ovlivnila kinetiku TDF.

Studii zhodnocující vliv dlouhodobého podávání FTC na expresi lékových transportérů nebylo provedeno mnoho. Ve studii autorů Weiss a kol. (Weiss et al., 2008) prováděné na buněčné linii rakovinných buněk tlustého střeva (*LS180*) bylo pozorováno 2,4 násobné zvýšení exprese MDR1 po sedmidenním podávání FTC. To je v rozporu s našimi výsledky, které nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu exprese oproti kontrolní skupině. Odlišné výsledky mohou být způsobeny rozdílným uspořádáním studie (lidská nádorová buněčná linie vs. živý potkaní model) či volbou podávané dávky, v uváděné studii byla použita velmi vysoká klinicky nerelevantní dávka 1000 μ M.

8. Závěr

Vliv dlouhodobého podávání antiretrovirotik na expresi genů pro transportní systémy je důležitou součástí získávání poznatků o těchto léčivech. Antiretrovirotika se nejčastěji užívají v kombinacích, aby se předešlo virologickým selháním či vzniku rezistence na dané léčivo a změna exprese transportéru navozená podáváním jednoho léčiva v rámci kombinační terapie může mít za následek změnu dostupnosti léčiva druhého. Proto je důležité získávat stále nové poznatky a uzpůsobovat podle nich doporučení týkající se užívání kombinační ARV terapie.

V naší práci jsme se zaměřili na vliv dlouhodobého podávání FTC v těhotenství na expresi tří genů v orgánech matky i plodu a placentě. Geny pro transportní systém Mdr1 (*Abcb1a*, *Abcb1b*) ani pro Bcrp (*Abcg2*) nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu v expresi. Získaná data tak přispívají k rozšíření znalosti o bezpečnostním profilu FTC.

9. Literatura

- AIDSinfo (2014a). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12617573>
- AIDSinfo (2014b). Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States Preconception Counseling and Care for HIV-Infected Women of. Retrieved from <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
- Anderson, P. L., Kiser, J. J., Gardner, E. M., Rower, J. E., Meditz, A., & Grant, R. M. (2011). Pharmacological considerations for tenofovir and emtricitabine to prevent HIV infection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), 240–50. doi:10.1093/jac/dkq447
- Balaguer, T. M., Gómez-Martínez, A., García-Morales, P., Lacueva, J., Calpena, R., Reverte, L. R., ... Saceda, M. (2012). Dual regulation of P-glycoprotein expression by trichostatin A in cancer cell lines. *BMC Molecular Biology*, 13, 25. doi:10.1186/1471-2199-13-25
- Baroncelli, S., Tamburrini, E., Ravizza, M., Dalzero, S., Tibaldi, C., Ferrazzi, E., ... Florida, 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), 513–20. doi:10.1089/apc.2008.0263
- Bierman, W. F. W., Scheffer, G. L., Schoonderwoerd, A., Jansen, G., van Agtmael, M. a, Danner, S. a, & Scheper, R. J. (2010). Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1672–80. doi:10.1093/jac/dkq209
- Cascorbi, I. (2006). Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(2), 457–73. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.009
- Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., ... Roots, I. (2001). Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 169–74. doi:10.1067/mcp.2001.114164
- Colbers, A., Greupink, R., & Burger, D. (2013a). Pharmacological considerations on the use of antiretrovirals in pregnancy. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(6), 575–88. doi:10.1097/QCO.000000000000017

- Colbers, A., Hawkins, D., Gingelmaier, A., Kabeya, K., Rockstroh, J. K., Wyen, C., ... Burger, D. M. (2013b). The pharmacokinetics, safety and efficacy of tenofovir and emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women. *AIDS*, *27*(5), 739–48. doi:10.1097/QAD.0b013e32835c208b
- Cooper, E. R., Charurat, M., Mofenson, L., Hanson, I. C., Pitt, J., Diaz, C., ... Blattner, W. (2002). Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *29*(5), 484–94. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/11981365>
- Cordon-Cardo, C. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Medical Sciences*, *86*(January), 695–698. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/86/2/695.short>
- Dussault, I., Lin, M., Hollister, K., Wang, E. H., Synold, T. W., & Forman, B. M. (2001). Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(36), 33309–12. doi:10.1074/jbc.C100375200
- Ee, P. L. R. (2004). Identification of a Novel Estrogen Response Element in the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Gene. *Cancer Research*, *64*(4), 1247–1251. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3583
- Enders, A. C., & Blankenship, T. N. (1999). Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *38*(1), 3–15. doi:10.1016/S0169-409X(99)00003-4
- Foster, C., Lyall, H., Olmscheid, B., Pearce, G., Zhang, S., & Gibb, D. M. (2009). Tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy and prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: is it time to move on from zidovudine? *HIV Medicine*, *10*(7), 397–406. doi:10.1111/j.1468-1293.2009.00709.x
- Glover, D. D., Amonkar, M., Rybeck, B. F., & Tracy, T. S. (2003). Prescription, over-the-counter, and herbal medicine use in a rural, obstetric population. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *188*(4), 1039–1045. doi:10.1067/mob.2003.223
- Griner, R., Williams, P. L., Read, J. S., Seage, G. R., Crain, M., Yogev, R., ... Rich, K. (2011). In utero and postnatal exposure to antiretrovirals among HIV-exposed but uninfected children in the United States. *AIDS Patient Care and STDs*, *25*(7), 385–94. doi:10.1089/apc.2011.0068
- Handschin, C., & Meyer, U. A. (2003). Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, *55*(4), 649–73. doi:10.1124/pr.55.4.2

- Harris, N. S., Fowler, M. G., Sansom, S. L., Ruffo, N., & Lampe, M. A. (2007). Use of enhanced perinatal human immunodeficiency virus surveillance methods to assess antiretroviral use and perinatal human immunodeficiency virus transmission in the United States, 1999-2001. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *197*(3 Suppl), S33–41. doi:10.1016/j.ajog.2007.03.081
- Henrique, R., Oliveira, A. I., Costa, V. L., Baptista, T., Martins, A. T., Morais, A., ... Jerónimo, C. (2013). Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer. *BMC Genomics*, *14*, 898. doi:10.1186/1471-2164-14-898
- Hirt, D., Urien, S., Rey, E., Arrivé, E., Ekouévi, D. K., Coffié, P., ... Tréluyer, J.-M. (2009). Population pharmacokinetics of emtricitabine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their neonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(3), 1067–73. doi:10.1128/AAC.00860-08
- Chan, G. N. Y., Patel, R., Cummins, C. L., & Bendayan, R. (2013). Induction of p-glycoprotein by antiretroviral drugs in human brain microvessel endothelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(9), 4481–8. doi:10.1128/AAC.00486-13
- Isoherranen, N., & Thummel, K. E. (2013). Special Section on Pregnancy — Commentary Drug Metabolism and Transport During Pregnancy: How Does Drug Disposition Change during Pregnancy and What Are the Mechanisms that Cause Such Changes? *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, (February), 256–262.
- Jin, S., & Scotto, K. W. (1998). Transcriptional Regulation of the MDR1 Gene by Histone Acetyltransferase and Deacetylase Is Mediated by NF- κ B. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(7), 4377–4384.
- Kim, R. B., Fromm, M. F., Wandel, C., Leake, B., Wood, A. J. J., Roden, D. M., & Wilkinson, G. R. (1998). The Drug Transporter P-glycoprotein Limits Oral Absorption and Brain Entry of HIV-1 Protease Inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*, *101*(2), 289–294.
- 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. doi:10.1016/j.tips.2009.10.001
- Lee, C. G., Gottesman, M. M., Cardarelli, C. O., Ramachandra, M., Jeang, K. T., Ambudkar, S. V., ... Dey, S. (1998). HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*, *37*(11), 3594–601. doi:10.1021/bi972709x

- McIntyre, J. (2005). Preventing mother-to-child transmission of HIV: successes and challenges. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *112*(9), 1196–203. doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00716.x
- Neumanova, Z., Cerveny, L., Ceckova, 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 (London, England)*, *28*(1), 9–17. doi:10.1097/QAD.000000000000112
- Pan, G., Giri, N., & Elmquist, W. F. (2007). Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *35*(7), 1165–73. doi:10.1124/dmd.106.014274
- Pavek, P., Ceckova, M., & Staud, F. (2009). Variation of drug kinetics in pregnancy. *Current Drug Metabolism*. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2009/00000010/00000005/art00008>
- Pavek, P., & Smutny, T. (2014). Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier. *Drug Metabolism Reviews*, *46*(1), 19–32. doi:10.3109/03602532.2013.835819
- Rousseau, F. S., Kahn, J. O., Thompson, M., Mildvan, D., Shepp, D., Sommadossi, J. P., ... van der Horst, C. (2001). Prototype trial design for rapid dose selection of antiretroviral drugs: an example using emtricitabine (Coviracil). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(4), 507–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581229>
- Senise, J. F., Castelo, A., & Martínez, M. (2011). Current treatment strategies, complications and considerations for the use of HIV antiretroviral therapy during pregnancy. *AIDS Reviews*, *13*(4), 198–213.
- Shaik, N., Giri, N., Pan, G., & Elmquist, W. F. (2007). P-glycoprotein-mediated active efflux of the anti-HIV1 nucleoside abacavir limits cellular accumulation and brain distribution. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *35*(11), 2076–85. doi:10.1124/dmd.107.017723
- Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(1), 3–29.
- 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), 736–63. doi:10.3109/1061186X.2012.716847

- Staud, F., & Pavsek, P. (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 720–5. doi:10.1016/j.biocel.2004.11.004
- Stek, A. M., Best, B. M., Luo, W., Capparelli, E., Burchett, S., Hu, C., ... Mirochnick, M. (2012). Effect of pregnancy on emtricitabine pharmacokinetics. *HIV Medicine*, 13(4), 226–35. doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00965.x
- Su, L., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2011). Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *The Journal of Endocrinology*, 208(3), 207–23. doi:10.1677/JOE-10-0363
- Taha, T. E., Kumwenda, N. I., Gibbons, A., Broadhead, R. L., Fiscus, S., Lema, V., ... Hoover, D. R. (2003). Short postexposure prophylaxis in newborn babies to reduce mother-to-child transmission of HIV-1: NVAZ randomised clinical trial. *Lancet*, 362(9391), 1171–7. doi:10.1016/S0140-6736(03)14538-2
- Thiebaut, F., & Tsuruo, T. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Medical Sciences*, 84(November), 7735–7738. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/84/21/7735.short>
- 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), 3498–504. doi:10.1128/AAC.00671-07
- Turner, P. V, Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50(5), 600–13.
- Wang, L., Begley, J., Feng, J., Quinn, J., & Rousseau, F. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of emtricitabine support its once daily dosing, poster 4546. *XIV Int. AIDS Conf. Barcelona*, ..., 4546. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pharmacokinetic+and+Pharmacodynamic+Characteristics+of+Emtricitabine+Support+Its+Once+Daily+Dosing#2>
- Weiss, J., Rose, J., Storch, C. H., Ketabi-Kiyanvash, N., Sauer, A., Haefeli, W. E., & Efferth, T. (2007). Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 238–45. doi:10.1093/jac/dkl474
- Weiss, J., Weis, N., Ketabi-Kiyanvash, N., Storch, C. H., & Haefeli, W. E. (2008). Comparison of the induction of P-glycoprotein activity by

nucleotide, nucleoside, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 579(1-3), 104–9. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.007

WHO guidelines. (2013). 7.2.2 First-line ART for pregnant and breastfeeding women and ARV drugs for their infants. *Consolidated ARV Guidelines*. Retrieved from <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/art/artpregnantwomen/en/>