

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM VLIVU ANTIRETROVIRÁLNÍCH LÉČIV NA  
TRANSMEMBRÁNOVÝ TRANSPORT TENOFOVIRU DISOPROXIL  
FUMARÁTU PŘES MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 BUNĚK**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Beáta Repeřová

**Prehlásenie:**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu“.

V Hradci Králové

Podpis:

.....

### **Pod'akovanie:**

Pod'akovanie patrí hlavne môjmu školiteľovi PharmDr. Lukášovi Červenému, Ph.D., za umožnenie možnosti byť súčasťou jeho tímu na Katedre farmakológie a toxikológie, za jeho trpezlivosť, ochotu, rady, profesionálny a zároveň priateľský prístup.

Taktiež ďakujem všetkým osobám z tejto katedry, ktorí mi pomáhali svojimi radami pri experimentálnej práci a za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Ďalej by som chcela poďakovať Andrei Dolákovej, za siahodlhé konzultácie a psychickú podporu pri písaní práce. V neposlednom rade vyjadrujem vďaku mojim blízkym priateľom a rodine, ktorí pri mne stáli, znášali moju osobnosť a podržali ma počas celého štúdia.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Beáta Repeřová

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Studium vlivu antiretrovirálních léčiv na transmembránový transport tenofoviru disoproxil fumarátu přes monovrstvu MDCKII - ABCB1 buněk

Tenofovir disoproxil fumarát (TDF), esterové proliečivo tenofoviru (TFV), sa radí medzi najvyužívanejšie komponenty kombinovanej antiretrovirusovej terapie. Typické je jeho široké uplatnenie a dobrá tolerovateľnosť pacientmi. Medzi faktory obmedzujúce biodostupnosť po orálnom podaní a distribúciu TDF, patrí liekový efluxný transportér P-glykoproteín (P-gp), ktorého je substrátom. Množstvo antiretrovirusových liečiv je známymi substrátmi, či inhibítormi P-gp, z čoho sa dá predpokladať vznik liekových interakcií na úrovni transmembránového transportu.

Cieľom tejto práce bolo popísať vplyv súčasne podaných antiretrovirusových látok na transmembránový transport TDF cez monovrstvu buniek MDCKII pomocou obojsmerného transportu a koncentračného ekvilibria.

Vyhodnotením experimentov sme potvrdili, že TDF je substrátom P-gp. Po celú dobu trvania experimentov sme zaznamenávali vysoké hodnoty efluxného pomeru vyjadrujúceho transmembránový transport TDF cez monovrstvu parentných buniek, čo naznačovalo zapojenie psích endogénnych transportérov prítomných v MDCKII bunkách. Pozorovali sme zrovnateľný efekt transportu testovaných antiretrovirov - TDF, abakavir, indinavir a saquinavir, cez oba typy monovrstvy, čo značne skomplikovalo interpretáciu výsledkov. MDCKII bunková línia sa nejaví ako vhodný model pre štúdium liekových interakcií TDF vyvolaných P-gp a zrejme ani inými transportérmi. Výsledky transportných experimentov nepriniesli jasné informácie na utváranie definitívnych záverov.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Beáta Repel'ová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of effects of antiretroviral drugs on transmembrane transport of tenofovir disoproxil fumarate across MDCKII - ABCB1 cell monolayer

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) - ester prodrug of tenofovir (TFV) is considered as one of the most frequently used component of combination antiretroviral therapy. Several ways of application and good patients' tolerability is typical for this compound. TDF is a substrate of drug transporter such as P-glycoprotein (P-gp) therefore its efflux activity may limit the bioavailability after oral administration and distribution of TDF. As many of antiretroviral drugs are also substrates or inhibitors of P-gp, drug - drug interactions with TDF at the level of transmembrane transport could be expected.

The aim of the diploma thesis was to describe effects of co-administered antiretroviral drugs on transfer of TDF across MDCKII cell monolayer by using bidirectional transport and concentration equilibrium setups.

The results of experiments confirmed that TDF is a substrate of P-gp. High values of efflux ratio describing transmembrane transport of TDF across parental cells have been observed. This indicates the participation of canine endogenous transporters expressed by MDCKII cells. The similar effects of tested antiretroviral drugs - TDF, abacavir, indinavir and saquinavir across both of monolayers have been observed. This caused complication in the interpretation of the results. MDCKII cell line does not seem to be appropriate for determination drug - drug interactions of TDF caused on P-gp and potentially on other transporters either and the data collected from transport experiments have not provided proper information draw definite conclusions.

# OBSAH

1. ZOZNAM SKRATIEK.....	1
2. ÚVOD.....	2
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	4
3.1 Vírus HIV.....	4
3.1.1 Charakteristika, štruktúra a replikačný cyklus.....	4
3.1.2 Prenos a štádiá HIV.....	6
3.2 Terapia HIV.....	7
3.2.1 Kombinovaná ART.....	7
3.2.2 Tenofovir disoproxil fumarát.....	9
3.3 Efluxné liekové ABC transportéry.....	12
3.3.1 ABCB1 transportér (P-gp; MDR1).....	13
3.3.2 Substráty a inhibítory ABCB1 transportéra.....	14
3.4 Liekové interakcie.....	15
3.5 Štúdium črevnej absorpcie.....	16
3.5.1 <i>In vitro</i> modely bunkových monovrstiev.....	16
4. HYPOTÉZA.....	18
5. CIEĽ PRÁCE.....	18
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	19
6.1 Chemikálie a reagensy.....	19
6.2 Bunky.....	20
6.3 <i>In vitro</i> metódy transmembránového transportu cez monovrstvu tvorenú MDCKII - ABCB1.....	20
6.3.1 Obojsmerný transport.....	20
6.3.2 Koncentračné ekvilibrium.....	22
6.4 Štatistické spracovanie.....	24
7. VÝSLEDKY.....	26

7.1 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	26
7.2 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	27
7.3 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) + LY 335979 (1μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	28
7.4 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) + TDF (100μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	29
7.5 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1 μM) + TDF (200μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	30
7.6 Obojsmerný transport [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) + ABC (100μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	31
7.7 Koncentračné ekvilibrium [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	32
7.8 Koncentračné ekvilibrium [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) + IDV (20μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	33
7.9 Koncentračné ekvilibrium [ <sup>3</sup> H]TDF (33,3nM) + Ko 143 (1μM) + SQV (20μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek .....	34
8. DISKUSIA .....	35
9. ZÁVER .....	39
10. LITERÁRNE ZDROJE .....	40

# 1. ZOZNAM SKRATIEK

ABC	abakavir
AIDS	syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti
ART	antiretrovírusová terapia
BCRP	liekový efluxný transportér
Caco-2	bunková línia
cART	kombinovaná antiretrovírusová terapia
CD4	označenie skupiny povrchových glykoproteínov
CYP 450	system metabolických enzýmov
DDIs	liekové interakcie
EMA	Európska lieková agentúra
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
HBV	žltáčka typu B
HIV	vírus ľudskej imunodeficiencie
IDV	indinavir
MDCKII	bunková línia
NRTIs	nukleotidové a nukleosidové inhibítory reverznej transkriptázy
P-gp	P-glykoproteín, ABCB1, MDR1
PIs	inhibítory proteázy
SQV	saquinavir
TDF	tenofovir disoprofil fumarát
TFV	tenofovir
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia



## 2. ÚVOD

Prvé zmienky o syndróme získanej imunitnej nedostatočnosti (AIDS) pochádzajú z obdobia začiatku osemdesiatych rokov minulého storočia. V oblasti San Francisca, New Yorku a Los Angeles bol spozorovaný rapidný nárast Karposiho sarkómu, oportúnnych infekcií a vzácnych malignít, šíriacich sa medzi mladými homosexuálnymi mužmi. Následne bol identifikovaný retrovírus, dnes pomenovaný ako vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), ktorý je príčinou jedného z najviac devastujúcich, súčasných infekčných ochorení ľudstva (Sharp a Hahn 2011, Hunt 2016a).

Od začiatku epidémie bolo infikovaných viac ako 70 miliónov ľudí. Z toho, okolo 35 miliónov osôb zomrelo na následky AIDS (WHO 2017a). Podľa posledných dát tvoril počet nakazených ku koncu roka 2015 36,7 milióna. Napriek tomu, že má tendenciu stále rásť, vďaka zvýšenej dostupnosti a účinnosti terapie sa počet liečiacich sa ľudí v posledných dvoch rokoch zvýšil zhruba o jednu tretinu a úmrtnosť v najviac postihnutých regiónoch Afriky klesla od roku 2010 o 36% (UNAIDS 2016).

Aj keď zavedenie a zdokonaľovanie antiretrovírusovej terapie (ART) znižuje úmrtnosť na ochorenia spojené s AIDS, stále sa vyskytuje vo vyššej miere ako u neinfikovaných ľudí (Deeks a Phillips 2009). Liečba je celoživotná a navrátenie úplného zdravia stále nie je možné (Passaes a Saez - Cirion 2014).

Kombinovaná antiretrovírusová terapia (cART) zahŕňa minimálne tri liečivá vybrané z viacerých skupín s odlišným mechanizmom účinku. Vykazuje zložitý farmakokinetický profil týkajúci sa rozsiahleho metabolizmu a transportu komplexom membránových prenášačov. Často vzniknuté interakcie medzi jednotlivými liečivami (DDIs) môžu viesť buď k zlyhaniu terapie, alebo k liekom indukovanvej toxicite (Ye et al. 2014). Liekové interakcie vyvolané transportérmi sú dôležitým hodnotiacim faktorom, ktorý by mal byť braný na zreteľ pri rozvoji terapie (Liu et al. 2015).

P-glykoproteín (P-gp) je široko zastúpený liekový efluxný transportér patriaci do rodiny ABC transportérov. Pumpuje liečivá, toxíny a produkty metabolizmu z vnútorného prostredia bunky do extracelulárneho priestoru, čím môže významne ovplyvňovať dispozíciu antiretrovírusových liečiv. Mnohé z nich sú substráty, inhibítory, či induktory ABC transportérov (Kis et al. 2010).

Tenofovir disoproxil fumarát (TDF) je liečivo patriace do skupiny nukleotidových inhibítorov reverznej transkriptázy (NRTIs). Pôsobí proti HIV, ale aj vírusu hepatitídy typu B (HBV). Spolu s abakavirom (ABC) patriacim do rovnakej skupiny sa efektívne využíva v liečbe aj prevencii prenosu HIV. Častou kombináciou sú aj liečivá zo skupiny inhibítorov proteáz (PIs). Vykazuje dobrú účinnosť i toleranciu pacientov. Jeho biodostupnosť po orálnom podaní je 25%. Zistilo sa, že je substrátom pre P-gp, ktorý ho môže v tomto smere limitovať (Gallant a Deresinski 2003, Chapman et al. 2003, AIDSinfo 2017b).

## **3. TEORETICKÁ ČASŤ**

### **3.1 Vírus HIV**

#### **3.1.1 Charakteristika**

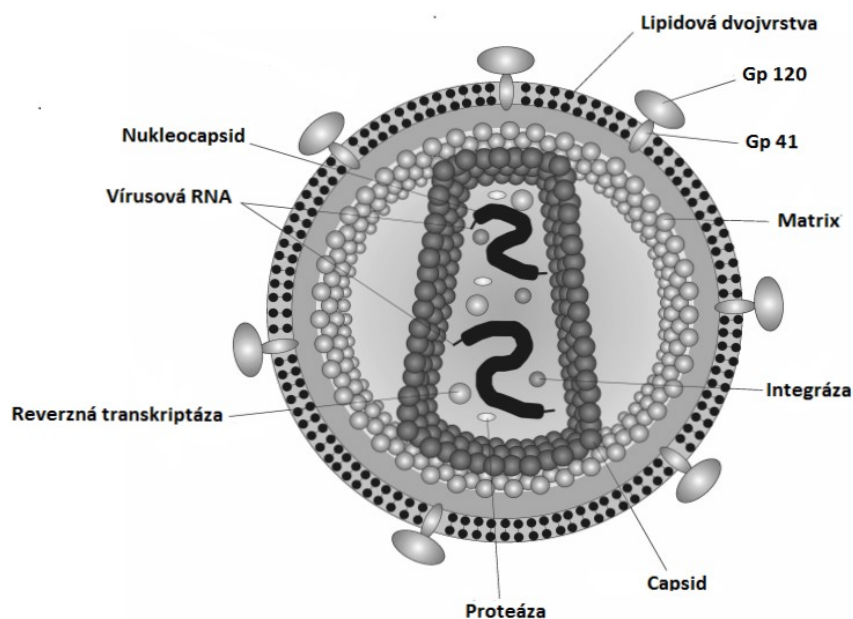
HIV patrí do skupiny RNA retrovírusov, podskupiny lentivírusy. Sú známe dva základné typy. Prvý, prevládajúci, označovaný ako HIV-1 je celosvetovo rozšírený, pokým druhý, HIV-2 je typicky lokalizovaný prevažne pre oblasť západnej Afriky. Oba spôsobujú AIDS (Hunt 2016b).

Vírus napáda a postupne ničí bunky imunitného systému prispievajúce k ochrane ľudského jedinca pred infekciami. Hlavným cieľom sú pomocné CD4 - T lymfocyty (označenie skupiny povrchových glykoproteínov CD4), ale aj iné štruktúry nesúce CD4 receptor na povrchu ako monocyty, makrofágy, či dendritické bunky. Postupné zníženie ich množstva oslabuje obranyschopnosť organizmu a zvyšuje jeho náchylnosť k chorobám. Bez liečby sa časom zjavia oportúnne infekcie a malignity ako signál prechodu do konečného štádia HIV, AIDS (Mariani et al. 2011, AIDSinfo 2017a).

#### **Štruktúra a replikačný cyklus**

V jadre sú uložené dve identické molekuly jednovláknovej RNA spolu s tromi kľúčovými enzýmami. Reverzná transkriptáza, integráza a proteáza. Okolie týchto štruktúr je ohraničené proteínmi (p24) vytvárajúcimi obdĺžnikovitý obal, kapsid. Vonkajšou bariérou obklopujúcou jadro je lipidová dvojvrstva, v ktorej sú na povrchu usadené špecifické glykoproteíny gp 120 a gp 41 (obrázok 1) (Levinson 2010).

Iniciálnym krokom v replikácii HIV je naviazanie sa gp 120 na CD4 receptor povrchu napadnutej bunky. Gp 120 ďalej interaguje s druhotnými chemokininovými receptormi CXCR, alebo CCR5 lokalizovanými väčšinou v blízkosti CD4 receptora. Nastane spojenie obalu vírusovej častice s membránou hostiteľskej bunky a vniknutie viriónu dovnútra sprostredkované Gp 41. V cytoplazme dochádza za pomoci reverznej transkriptázy k prepisu vírusovej RNA do dvojvláknovej kópie DNA, ktorá migruje do jadra a je začlenená prostredníctvom integrázy do DNA hostiteľskej bunky. Vzniká prevírusová DNA, ktorá je prepisovaná do mRNA a prekladaná do jednotlivých polyproteínov štiepených proteázami. Postupne sa utvorený zrelý virión opúšťa hostiteľskú bunku aby mohol nakaziť ďalšie (Wilén et al. 2012).



**Obrázok 1** Štruktúra viriónu. Hlavnou úlohou reverznej transkriptázy je prepis vírusovej RNA do DNA. Integráza sprostredkováva začlenenie vírusovej DNA do DNA bunky hostiteľa. Proteáza štiepi prekursorové polyproteíny na funkčné vírusové polypeptidy. Gp 120 vyčnieva z povrchu membrány bunky a zaisťuje naviazanie sa vírusu na receptor CD4. Gp 41 je ukotvený v membráne a zodpovedá za spojenie fúziu vírusového obalu s membránou hostiteľskej bunky v čase infekcie (Levinson 2010). Prevzaté a upravené z: DocCeck (2017).

Pochopenie replikačného cyklu, ovládanie patofyziológie ochorenia a mechanizmu účinku liečiv bolo kľúčovým bodom pre vytváranie a modulovanie racionálnej antiretrovirálnej terapie. Súčasná liečba predpokladá, že všetky aspekty choroby sú odvodené z bezprostredného pôsobenia HIV v hostiteľskej bunke, hlavne CD<sup>+</sup> lymfocytov (Brunton et al. 2011).

### 3.1.2 Prenos a štádiá HIV

Vírus sa šíri kontaktom zdravého jedinca s telovými tekutinami infikovanej osoby. Krvou, ejakulátom, materským mliekom, análnymi a vaginálnymi tekutinami. Musia prísť do spojenia s mukóznou membránou, poškodeným tkanivom, alebo byť priamo zavedené do krvného riečiska. Za primárnu príčinu sa pokladá nechránený sexuálny styk. Hlavným rizikom prenosu krvnou cestou je vzájomné vymieňanie ihliel u drogovovo závislých. Riziko tvoria aj HIV pozitívne matky. Dieťa sa môže nakaziť prechodom vírusu cez placentu, pri pôrode, alebo kojení (AIDS.gov 2016).

Neliečený HIV prechádza tromi stupňami vývoja:

- Akútne štádium:  
Prejavuje sa 2-4 týždne po infikovaní. Typické sú príznaky chrípky ako horúčka, únava, bolesť hrdla, opuch lymfatických uzlín. Vírus je ťažko detekovateľný a jedinec je vysoko nákazlivý. Počet CD4 lymfocytov je zvyčajne v norme, prudko stúpa množstvo virulentných častíc. Obvykle sa známky vytratia do 2 týždňov.
- Latentné (asymptomatické) štádium:  
Môže sa líšiť u jednotlivcov. Charakteristické je rôzne dlho trvajúce bezpríznakové obdobie. Vírus je stále aktívny s nižšou mierou reprodukcie. U neliečených pacientov trvá zhruba 10 rokov. Na konci dochádza k zvýšeniu množstva viriónov a zníženiu počtu CD4+ lymfocytov. Pacient prechádza do posledného štádia.
- Konečné štádium, AIDS:  
Kritická fáza. Úroveň CD4+ lymfocytov klesá pod hladinu 200 buniek/mm<sup>3</sup>. Imunitný systém jedinca je príliš oslabený aby sa dokázal brániť a postupne sa dostavujú oportúnne infekcie a malignity charakterizujúce AIDS. Napríklad zápal pľúc vyvolaný baktériou *Pneumocystis carinii*, Karposiho sarkóm, plesňové ochorenia, tuberkulóza, či neurologické problémy. Bez liečby je doba prežitia okolo 3 rokov (Weiss et al. 2004, CDC.gov 2017).

## 3.2 Terapia HIV

Vynájdenie, zavedenie a následná inovácia liečiv schopných pôsobiť na HIV, zmenilo jeho štatút z rýchlo progredujúcej choroby s fatálnymi následkami na chronické, zvládnuteľné ochorenie (Maartens et al. 2014). Užívaním liečby podľa protokolu je potlačená replikácia HIV a jeho prítomnosť v plazme sa znižuje na nedetekovateľné hodnoty. Pacientove predpoklady na prežitie sa výrazne predlžia. Liečba je celoživotná a komplexná. Vírus nie je z tela úplne odstránený, ale pretrváva v latentnej forme pripravený opäť prepuknúť, ak nie je dodržaná kontinuita liečebného režimu (Rang et al. 2007).

### 3.2.1 Kombinovaná ART

Úvodné nasadenie terapie iba s jedným liečivom vyvoláva vznik odolnosti vírusu voči liekom. V niektorých prípadoch stačí pár týždňov. Porovnávajúce štúdie ukázali, že použitie dvoj kombinácie liečiv bolo efektívnejšie ako monoterapia, avšak nasadenie troj kombinácie malo výrazne lepšie výsledky. Potvrdilo sa, že nasadenie minimálne troch liečiv, je nevyhnutné na zaručenie dlhodobého potlačenia množenia HIV bez vzniku rezistencie na liečbu. V súčasnosti je dostupných viac ako 25 liečiv rozdelených do piatich skupín podľa mechanizmu účinku (AIDSinfo 2016).

#### Nukleosidové a nukleotidové inhibítory reverznej transkriptázy (NRTIs):

NRTIs sú nukleosidové analógy, ktoré po vstupe do bunky podstúpia fosforyláciu. Vo forme trifosfátu slúžia ako falošné stavebné kamene zabudované do rodiacej sa provírusovej DNA. Patria sem zidovudín (ZDV), stavudín (d4T), lamivudín (3TC), didanosín (ddI), emtricitabín (FTC), abakavir (ABC) a tenofovir (TFV) podávaný vo forme perorálnych proliečiv disoproxil fumarátu (TDF), alebo alafenamidu (TAF) (Brunton et al 2011).

### Ne-nukleosidové inhibítory reverznej transkriptázy (NNRTIs):

Vyvolávajú štruktúrne zmeny enzýmu vedúce k zníženiu jeho aktivity. Na rozdiel od NRTIs nevyžadujú intracelulárnu fosforyláciu. Patria sem efavirenz (EFZ), nevirapin (NVP), delavirdin (DLV), etravirdin (ETV) a rilpivirin (RPV).

### Inhibítory HIV proteázy (PIs):

Liečivá peptidovej štruktúry potláčajúce funkciu vírusovej proteázy. Vysoká rôznorodosť v ich farmakokinetike je vysvetľovaná aj rozličným metabolickým spracovávaním systémom cytochrómov P450 (CYP 450). Viaceré z nich pôsobia ako inhibítory CYP3A4 a tiež ABC efluxných transportérov, vrátane P-gp (Sankatsing et al. 2004). Patria sem saquinavir (SQV), indinavir (IDV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), fosamprenavir (f-APV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATZ), darunavir (DRV) tipranavir (TPV).

### Inhibítory vstupu HIV do bunky:

Maravirok (MVC) je antagonist chemokínového ko-receptoru CCR5. Zabráni naviazaniu viriónu na hositeľskú bunku.

Enfuvirtid (T-20) zastavuje spojenie vírusovej a bunkovej membrány.

### Inhibítory integrázy (INSTIs):

Bránia enzýmu zabudovať vírusovú DNA do DNA hositeľskej bunky. Patria sem raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG) dolutegravir (DTG) (Brunton et al 2011).

Základnú kostru cART tvorí kombinácia dvoch liečiv zo skupiny NRTIs (zvyčajne ACC/3TC;TAF/FTC;TDF/FTC) spolu s liečivom zo skupiny NNRTIs, alebo PIs. Takýto terapeutický režim sa nazýva vysoko účinná antiretrovírusová terapia (HAART). Výber vhodného režimu závisí od konkrétneho pacienta, jeho celkového stavu, výsledkov testov a možných nežiaducich účinkov (AIDSinfo 2016).

Súčasťou terapie HIV sú tiež preventívne opatrenia na zabránenie prenosu vírusu pred/po vystavení sa nožnej infekcie, takisto ako aj zabránenie prenosu z matky na dieťa (MTCT) (AIDSinfo 2016).

1) Prevenia pred vystavením sa HIV (PrEP)

Zahŕňa orálne a vaginálne používanie ART, ako doplnkovú ochranu osôb, ktoré podliehajú zvýšenému riziku nákazy (WHO 2017b).

2) Prevenia po vystavení sa nožnej HIV nákaze (PEP)

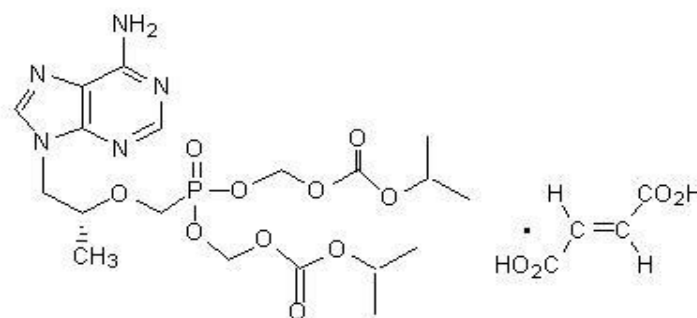
Predstavuje krátkodobé, dvadsaťosem denné podávanie ART na zníženie pravdepodobnosti prenosu vírusu. Pokiaľ je nasadená dostatočne rýchlo, ideálne do sedemdesiatich dvoch hodín, riziko nákazy sa môže znížiť až o 80% (WHO 2014).

3) Prevenia prenosu HIV z matky na dieťa (PMTCT)

Môže k nemu dôjsť v tehotenstve, pri pôrode a pri kojení. Podaním ART matke a v krátkom časovom úseku aj narodenému dieťaťu, je možné znížiť riziko prestupu HIV pod hranicu menšiu ako jedno percento (WHO 2017c).

### 3.2.2 Tenofovir disoproxil fumarát (TDF)

TDF (obrázok 2) patrí do skupiny nukleotidových inhibítorov reverznej transkriptázy. Predstavuje diesterové proliečivo tenofoviru, derivátu adenosin 5' monofosfátu, s kompletne chýbajúcim ribózovým kruhom. Vytvorenie proliečiva výrazne zvýšilo absorpciu a penetráciu parentnej zlúčeniny do bunky (Chapman et al. 2003).



9-[(R)-2-[[bis[[[(isopropoxycarbonyl)oxy]methoxy]phosphinyl]methoxy]propyl]adenin fumarat (1:1)

**Obrázok 2** Vzorec TDF. Prevzaté a upravené z: AIDSinfo (2017b).



### **Mechanizmus účinku:**

TDF je konvertovaný dvojitou hydrolýzou esterázami črevného epitelu a plazmatickými esterázami na tenofovir, ktorý je následne premieňaný dvojitou fosforyláciou intracelulárnymi kinázami na farmakologicky účinný metabolit, tenofovir difosfát. Aktívna molekula súťaží s natívnym substrátom, dideoxyadenosin trifosfátom, o väzbové miesto na reverznej transkriptáze. Inkorporáciou do vírusovej DNA dôjde k ukončeniu jej syntézy kvôli chýbajúcej cukornej štruktúre tenofovirusu (Michaud et al. 2012, Fung et al. 2002). Napriek tomu, že vykazuje široké spektrum aktivity voči vírusovým DNA polymerázam, má nízku afinitu k ľudským DNA polymerázam, z čoho vyplýva selektívnosť jeho pôsobenia (Brunton et al. 2011).

### **Absorpcia, distribúcia, eliminácia:**

Orálna biodostupnosť TDF je 25%. Podanie spolu s vysoko tučným jedlom ju zvyšujú až na 40%, no môže byť podávaný bez ohľadu na požitie jedla. Nie je významne viazaný na plazmatické proteíny (7%). Eliminačný plazmatický polčas je 17 hodín, intracelulárny polčas je viac ako 60 hodín v neproliferujúcich bunkách, čo je nápomocné pri eradikácii vírusu v organizme. Vylučuje sa obličkami, glomerulárnou filtráciou a aktívnou tubulárnou sekréciou (Antoniou et al. 2003, Smith et al. 2004, Kearney et al. 2004). Preto je opodstatnené pravidelné monitorovanie obličkových funkcií u vysokorizikových pacientov, vrátane osôb s nefrotoxickými liekmi (Aurpibul a Puthanakit 2015).

### **Nežiaduce účinky:**

Tenofovir je vo všeobecnosti dobre tolerované liečivo. Prejavy ako bolesť hlavy, závrat či únava, sú mierne a prechodné (Coleman et al. 2015). Napriek tomu, že TFV vykazuje najnižšiu cytotoxicitu zo skupiny NRTIs, bolo spozorovaných aj zopár nežiaducich účinkov spájaných s mitochondriálnou dysfunkciou. Laktátová acidóza, periférne neuropatie, steatóza pečene a lipodystrofia (Fung et al. 2002, Cihlar et al. 2002). Tenofovir nie je toxický pre tubulárne bunky obličiek, no boli evidované zriedkavé prípady akútneho obličkového zlyhania a Falconiho syndrómu (Brunton et al. 2011). Aj keď bolo používanie TDF spájané so štatisticky významným znížením renálnych funkcií, klinický význam tohto problému je relatívne nízky. Nutnosťou je ale pravidelné monitorovanie (Cooper et al. 2011). V toxikologických štúdiách bolo zistené, že vysoké

dávky TDF spôsobujú zníženie kostnej denzity (Gallant a Deresinski 2003). Pacientom s vysokým rizikom lámavosti kostí, by mala byť odporúčaná ART nezahrňujúca TDF (Grant a Cotter 2016).

### **Interakcie:**

Nie je vo významnej miere metabolizovaný CYP 450 a nie je známe ani jeho inhibičné/indukčné pôsobenie. Vzhľadom na jeho renálnu elimináciu, môže dôjsť k zvýšeniu plazmatických hladín pri použití liečiv znižujúcich renálnu aktivitu (Gallant a Deresinski 2003). Prejavuje synergistické pôsobenie s didanosinom, zmenou jeho farmakokinetiky. 300mg TDF zvýši koncentráciu didanosinu o 44-60%. Pravdepodobne by sa tieto dva nemali kombinovať, ale ak je podanie nevyhnutné, mala by sa znížiť dávka didanosinu zo 400mg na 250mg/deň. Aj keď nie je známe, že by indukoval CYP 450, pri spoločnom podaní boli hlásené znížené hladiny atazanaviru o cca 26%. Ale atazanavir zvýšil hladinu TDF o 25%. Malé dávky ritonaviru (100mg/2krát denne) zvýšia TDF koncentráciu o 34%. Lopinavir/ritonavir ju zvýšia o 32%. Toto vzájomné ovplyvňovanie je pravdepodobne sprostredkované interakciami tenofoviru s transportnými proteínmi (Brunton et al. 2011). Nedávno bolo dokázané, že TDF je substrátom pre liekový efluxný transportér „breast cancer resistance protein“ (BCRP) a tiež P-gp, patriacich do nadrodiny ABC efluxných transportérov (Neumanova et al. 2014).

### **Použitie:**

TDF je povolený americkým Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) na používanie u detí od 2 a viac roka a je odporúčaný Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) ako liečivo prvej voľby zo skupiny NRTIs pre dospelých a deti staršie 10 rokov. Bežne dostupné sú fixné kombinácie TDF s ostatnými ATR pre dospelých a adolescentov (TDF+3TC/FTC+EFV). Jednoduchosť dávkovania raz za deň (300mg), málo nežiaducich účinkov, dobrá tolerovateľnosť a účinnosť proti hepatitíde typu B robia z TDF široko použiteľné liečivo (Aurpibul a Puthanakit 2015). TDF je výhodná voľba pri HIV pozitívnych pacientoch trpiacich zároveň aj HBV (Antonioni et al. 2003, Ristig et al. 2002). Uplatnenie nachádza tiež vo všetkých troch preventívnych režimoch ART (Gallant a Deresinski 2003, Drugs 2017a, AIDSinfo 2017b).

### 3.3 Efluxné liekové ABC transportéry

ABC efluxné transportéry sú štruktúrne podobné transmembránové proteíny lokalizované v plazmatických membránach buniek. Hlavnou úlohou je transport látok z vnútorného prostredia bunky do extracelulárneho priestoru, čím ju zbavujú toxických látok a nepotrebných produktov metabolizmu. Fungujú na princípe primárneho aktívneho transportu. Hydrolýzou molekuly adenosintrifosfátu (ATP) dôjde k uvoľneniu energie, ktorú následne využijú na pumpovanie substrátov cez membránu bunky. Aktívnym transportom proti koncentračnému gradientu obmedzujú taktiež prístup látok z krvi do citlivého tkaniva. Spektrum prenášaných látok je veľmi široké. Od malých molekúl až po veľké organické zlúčeniny (Linton 2007).

Známych je 48 génov kódujúcich ABC proteíny, ktoré sú delené do 7 podskupín. ABC A - ABC G. Medzi najvýznamnejšie liekové efluxné transportéry patrí ABCB1 (P-gp, MDR1), ABCC (MRP) a ABCG2 (BCRP) (Rang et al. 2007, Brunton et al. 2011).

V organizme nájdeme ABC efluxné transportéry hlavne v orgánoch spájaných s trávením a exkréciou (črevá, pečeň, obličky) ako mechanizmus eliminujúci škodliviny a v biologických bariérach chrániacich citlivé orgány. Hematoencefalická, hematotestikulárna, či placentárna bariéra (Linton a Higgins 2007, Montanari a Ecker 2015).

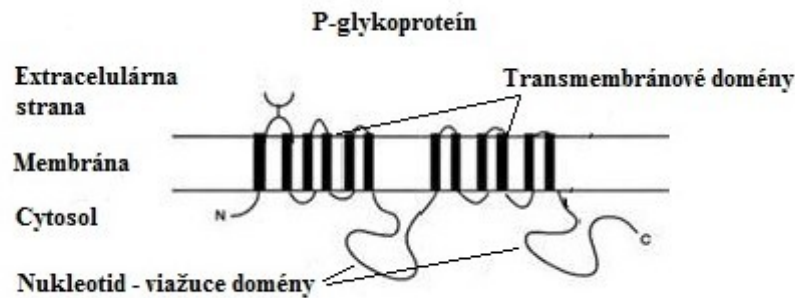
ABC transportéry sú dôležité štruktúry v procesoch ochrany organizmu, no na druhej strane môžu byť príčinou zlyhávania terapie (Theodoulou a Kerr 2015).

S fenoménom liekovej rezistencie sa v dnešnej dobe stretávame pomerne často. Primárne sa spája s protinádorovou terapiou a jej zníženou efektivitou. Aj keď môže byť podnietená viacerými faktormi, jeden z nich sú práve ABC efluxné transportéry. Jedná sa o zvýšenú expresiu hlavne P-gp a BCRP na nádorových bunkách. Prenášač, ako efluxná pumpa vypudí podávané liečivo von z bunky a znižuje tak jeho dostupnosť (Chen et al. 2016).

S podobným problémom sa stretávame aj u HIV. Zvýšená expresia efluxných transportérov na membránach, ktoré je nutné prekonať aby sa ART dostala na miesta potrebné k eliminácii vírusu (CNS, lymfocyty, urogenitálny systém, či placentárna bariéra), môže viesť k zníženej účinnosti terapie (Kis et al. 2010).

### 3.3.1 ABCB1 transportér (P-gp / MDR1)

Patrí medzi najviac preštudované ABC transportné proteíny (Troost et al. 2004, Beis 2015). Skladá sa z dvoch transmembránových domén (TMD), kde dochádza k rozoznávaniu substrátu a dvoch nukleotid - viažucich domén (NBD) (obrázok 3), ktoré dodávajú energiu nutnú na aktiváciu transportu (Linton a Higgins 2007).



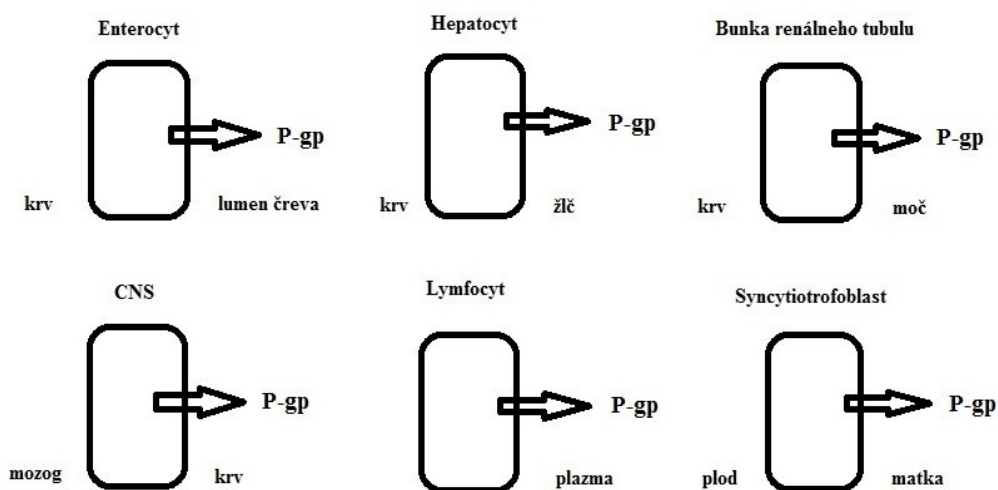
*Obrázok 3 Štruktúra P-gp. Prevzaté a upravené z: Gohel (2011).*

Nachádza sa vo viacerých štruktúrach ľudského tela ako tenké črevo, pečeň, obličky a bunky imunitného systému. Rovnako je súčasťou hematoencefalickej a hemototestikulárnej bariéry, prípadne syncytiotrofoblastu placenty (obrázok 4). Ovplyvňujú absorpciu, distribúciu a elimináciu látok v organizme (Konig et al. 2013, Feng et al. 2007).

P-gp nájdeme na apikálnej (luminálnej) strane membrány celých čriev, od dvanástnika až po konečník. Takto vytvorená bariéra znižuje prístup liečiv, ktoré sú substrátmi pre tento transportér do organizmu (Konig et al. 2013). V hepatocytoch pečene je lokalizovaný na apikálnej strane membrány žlčových kanálikov. Aktívne pumpuje substráty do žlče a očisťuje organizmus. V obličkách sa vyskytuje na apikálnej strane epitelových buniek proximálneho tubulu. Podieľa na efluxe látok do moču, aby boli vylúčené preč z tela (Sankatsing et al. 2004). P-gp je významným faktorom ovplyvňujúcim farmakokinetiku liečiva v organizme (Estudante et al. 2013).

V hematoencefalickej membráne oddeľujúcej mozgové tkanivo od krvi, sú P-gp situované na apikálnej strane endotelových buniek malých krvných kapilár (Sankatsing et al. 2004). Pravdepodobne je P-gp najvýznamnejší z transportérov brániacich prístup látok do centrálného nervového systému (Konig et al. 2013). Pre hematotestikulárnu

bariéru chrániacu semenníky platí to isté ako pre hematoencefalickú. V placentárnej bariére oddeľujúcej materskú a fetálnu krv sa P-gp nachádza na apikálnej strane syncytiotrofoblastu, čím pomáhajú chrániť citlivý plod pred prestupom nežiaducich látok z krvi matky. Toto zabezpečenie je vysoko potrebné, no v terapii HIV a s ňou spojenou prevenciu pred prenosom vírusu z matky na dieťa je značne nevýhodné (Sankatsing et al. 2004). Expresia P-gp na lymfocytoch zohráva hlavnú úlohu v limitoch intracelulárnej koncentrácie ART v týchto bunkách a tým pádom aj jej účinnosti (Kis et al. 2010).



**Obrázok 4** Schematické zobrazenie výskytu P-gp v organizme s naznačeným smerom efluxu. Prevzaté a upravené z: Kis et al. (2010).

### 3.3.2 Substráty a inhibítory P-gp

Spektrum substrátov viažucich sa na P-gp je veľmi široké. Väčšinou sa jedná o hydrofóbne molekuly rôznej veľkosti, prechádzajúce v rozumnej miere pasívnou difúziou cez biologické membrány (Sankatsing et al. 2004). Patria sem mnohé liečivá (PIs, antineoplastiká, blokátory vápnikových kanálov a pod.) - jeden z najznámejších je napríklad digoxín (Chen et al. 2016). Medzi najvýznamnejšie inhibítory P-gp spomedzi liečiv sa radí napríklad cyklosporín A, verapamil, či amiodaron. Substráty, rovnako aj inhibítory P-gp sú predmetom mnohých farmakokinetických štúdií (Balayssac et al. 2005).

### 3.4 Liekové interakcie

Ak človek prijme viac ako jedno liečivo, môže dôjsť k zníženiu efektivity liečby, zhoršeniu aktuálneho zdravotného stavu, či zvýšeniu rizika nežiaducich účinkov. Napriek tomu, nie všetky liekové interakcie vedú iba k negatívnym výsledkom. Existujú aj interakcie podporujúce účinnosť terapie (Balayssac et al. 2005).

Podľa mechanizmu vzniku rozlišujeme:

Farmakokinetické interakcie. Liečivo A vedie k zmene plazmatickej koncentrácie liečiva B, pôsobením premien na úrovni jeho absorpcie, distribúcie, metabolizmu, či exkrécie. Zmenou koncentrácie liečiva B sa zmení miera jeho farmakologického efektu. Môže to byť benefit - pozitívum (podpora terapeutického účinku), alebo potenciálna hrozba - negatívum (vznik nežiaducich účinkov).

Farmakodynamické interakcie. Jedná sa o pôsobenie dvoch liečiv na rovnakú cieľovú štruktúru, pričom môže dochádzať k synergistickému, alebo antagonistickému efektu (Balayssac et al. 2005, Aszalos 2007, Dickinson 2010, Drugs 2017b).

Regulačné authority (FDA) a Európska lieková agentúra (EMA), vytvárajú smernice určené pre farmaceutický výskum, ktoré slúžia ako vodidlo pre lepšie pochopenie liekových interakcií. Napriek tomu, že medzi liečivami môže dochádzať k farmakokinetickým, farmakodynamickým alebo obojm interakciám, odporúčenia sú zamerané hlavne na farmakokinetické interakcie postavené na *in vitro* a následne *in vivo* štúdiách liekových transportérov a enzýmov (Prueksaritanont 2013).

Pozitívnym príkladom farmakokinetickej liekovej interakcie sprostredkovej P-gp je inhibičné pôsobenie verapamilu (blokátor vápnikových kanálov), ktoré zabráni efluxu furosemidu (diuretikum) späť na mukóznú stranu čreva, čím sa zvýši jeho absorpcia a biodostupnosť (Hoosain et al. 2015).

Negatívnym príkladom farmakokinetickej liekovej interakcie sprostredkovej P-gp je inhibičné pôsobenie verapamilu vedúce k zvýšeniu plazmatickej koncentrácie digoxínu (kardiotonikum s úzkym terapeutickým oknom), pôsobiacej toxicky (Ledwitch et al. 2016).

### 3.5 ŠTÚDIUM ČREVNEJ ABSORPCIE

Predikcia absorpcie látok v ľudskom čreve je hlavným cieľom v navrhovaní, optimalizácii a selekcii liečiv určených na orálne použitie. V súčasnosti existujú rôzne techniky na vyhodnotenie absorpcie liečiv v rôznych fázach vývoja a výskumu. Medzi predklinické metodológie patria testy *in silico* (počítačové a matematické modely založené na fyzikálno - chemických vlastnostiach molekuly), *in vitro* (modely kultivovaných bunkových línií), *in situ* (perfúzia roztoku liečiva izolovanými črevnými segmentami hlodavcov), *ex vivo* (zvieracie, alebo ľudské časti tkanív), *in vivo* (zvieracie modely). Každá má svoje výhody a nevýhody, je preto potrebné ich kombinovať na docielenie komplexného a dôkladného pohľadu na intestinálnu absorpciu liečiv (Antunes et al. 2013).

Použitie farmakokinetických modelov na odhadnutie intestinálnej absorpcie liečiv, ako jedného z viacerých faktorov rozhodujúceho o jeho farmakokinetike, úspešnosti, bezpečnosti, či toxicite, je v pred klinickým výskume sľubným priblížením sa k lepšiemu pochopeniu tejto problematiky. Pomocou *in vitro* a *in vivo* analýzy je možné aplikovať tieto poznatky v humánnom použití (Danhof et al. 2008).

#### 3.5.1 *In vitro* modely bunkových monovrstiev

Jedná sa o modely bunkových línií napodobňujúce črevný epitel ľudského organizmu na odhadnutie intestinálnej absorpcie liečiv. Boli vyvinuté na predikciu transportu liečiva z intestinálneho lumen do krvného riečiska. Bunky rýchlo rastú na semipermeabilnej membráne do vytvorenia konfluentnej monovrstvy, ktorá následne podlieha spontánnej diferenciacii. Tým sa vytvorí systém vhodný pre transportné štúdie. *In vitro* bunkové modely sú široko využívané v skorších štádiách výskumu (Antunes et al. 2013, Volpe et al. 2008).

#### **Caco-2 bunková línia**

Pôvodne izolovaná z ľudského kolorektálneho adenokarcinómu. Po vytvorení konfluentnej monovrstvy (zhruba 21 dní), sa Caco-2 bunky diferencujú štruktúrne, aj funkčne na bunky pripomínajúce vyzreté enterocyty. Bunky exprimujú viaceré transportné systémy, vrátane P-gp, hydroláz a enzýmov prvej a druhej fázy

metabolizmu. Permeabilita hydrofilných látok paracelulárnym transportom je nízka kvôli užším medzibunkovým spojom v porovnaní s ľudským, alebo zvieracím epitelom tenkého čreva. Tento model pracuje v rámci určitých limitov. Nedokáže predpokladať rozdielnosť medzi bunkovým transportom a intestinálnym metabolizmom (Liu et al. 2016).

### **MDCK bunková línia**

Model izolovaný pôvodne zo psích obličkových buniek bol predstavený ako sľubná alternatíva ku Caco-2 bunkovej línii na posúdenie membránovej permeability potenciálnych liečiv. Ak sú MDCK bunky kultivované podľa štandardných podmienok, rýchlo vytvoria konfluentnú monovrstvu polarizovaných buniek s tenkými spojmi za 3 - 5 dní (Antunes et al. 2013, Cyprotex 2017a). MDCK bunky stabilne transdukované ABCB1, BCRP, alebo MRP2, sú často navrhnuté ako druhá možnosť ku Caco-2 bunkám pri štúdiu obojsmerného transportu liečiv. MDCK - ABCB1 permeabilné štúdie sú cenným nástrojom na identifikáciu a charakteristiku P-gp substrátov a inhibítorov (Cyprotex 2017b). Najbežnejšie používaný model v transportných štúdiách je MDCKII bunková línia izolovaná z vyšších pasáží parentnej bunkovej línie označovanej aj MDCK (NBL-2) (Dukes et al. 2011).



## 4. HYPOTÉZA

TDF patrí medzi základné stavebné kamene kombinovanej antiretrovírusovej terapie. Vykazuje relatívne nízku biodostupnosť po orálnom užití. Môže to byť spôsobené liekovými efluxnými transportérmi, pretože je dokázané, že TDF je substrátom P-gp, aj BCRP. Tento fakt môže viesť ku vzniku potenciálnych liekových interakcií. Z tohto dôvodu je potrebné neustále skúmať vzájomné pôsobenie medzi TDF a inými, súčasne podávanými liečivami používanými v cART dôkladnejšie.

## 5. CIEĽ PRÁCE

Otestovať možnosť využitia *in vitro* metód obojsmerného transportu a koncentračného ekvilibria cez monovrstvu buniek MDCKII exprimujúcu ľudský P-gp pre sledovanie liekových interakcií TDF s popísanými substrátmi/inhibítormi zo skupiny antiretrovirotik (ABC, IDV, SQV, vrátane TDF).

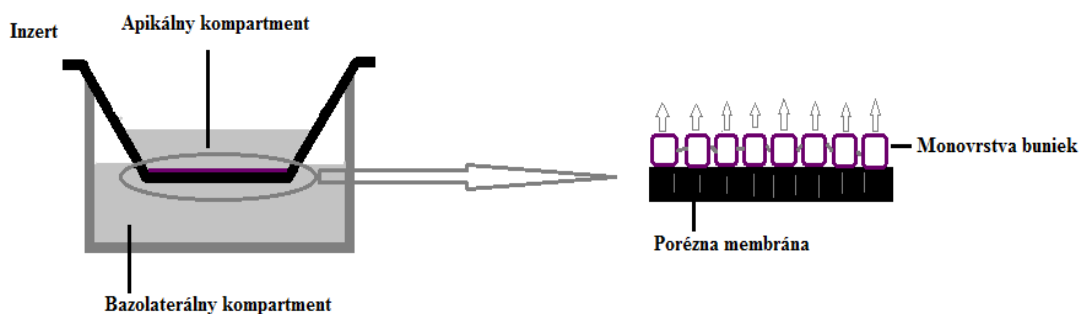
## 6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 6.1 Chemikálie a reagensie

- Antiretrovirotiká:
  - ABC (NIH AIDS Reagent Program; Germantown, Maryland, USA)
  - IDV (NIH AIDS Reagent Program)
  - SQV (NIH AIDS Reagent Program)
  - TDF (NIH AIDS Reagent Program)
  - [adenin-8-<sup>3</sup>H]TDF = [<sup>3</sup>H]TDF (Moravek Biochemicals; California, USA)
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- DMSO - dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- FBS - fetálne hovädzie sérum (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- Ko 143 (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- LY 335979 (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- Opti-MEM® (Lonza; Bazilej, Švajčiarsko)
- P/S (Penicilín/Streptomycín)
- PBS - fosfátový tlmivý roztok (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)
- Ultima Gold-LSC Coctail (Sigma Aldrich; St.Luis, Missouri,USA)

## 6.2 Bunky

MDCKII parentná bunková línia a bunky transdukované cDNA ľudského P-gp (MDCKII - ABCB1), boli získané z ústavu „Netherland Cancer Institut“ v Amsterdame; (Holandsko). Kultivácia prebiehala v médiu DMEM s vysokým obsahom glukózy a L - glutamínu, doplnené o fetálne hovädzie sérum (10%) a prídavok antibiotík P/S (1%). Následne boli bunky nasadené (obrázok 5) v množstve  $2,0 \times 10^6$  na inzerty s mikroporéznu polykarbonátovou membránou (Transwell 3414; veľkosť pórov  $3,0\mu\text{m}$ ; priemer inzertu 24mm; Corning® Transwell®; NY, USA). Integrita monovrstvy bola meraná vždy na konci experimentov pomocou analýzy prieniku FITC - dextránu. Akceptovateľný prechod bol do jedného percenta za hodinu. Koncentrácia (objem/objem) použitého rozpúšťadla DMSO bola vo všetkých experimentoch rovnaká 0,1 %.



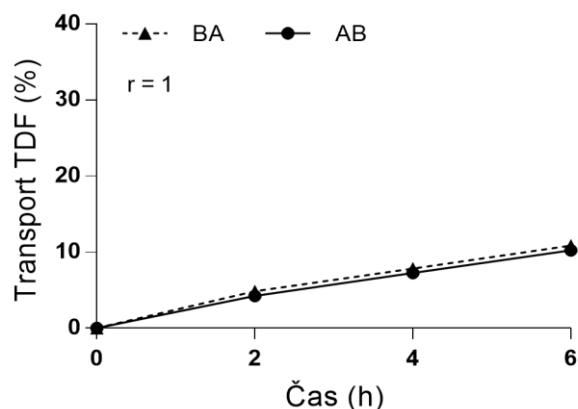
**Obrázok 5** Schematické zobrazenie línie polarizovaných buniek MDCKII - ABCB1 nasadených na inzerty, vytvárajúcich konfluentnú monovrstvu na polykarbonátovej mikroporéznej membráne s naznačeným smerom efluxu. Prevzaté a upravené z: Solvobiotech (2017).

## 6.3 *In vitro* metódy transmembránového transportu cez monovrstvu tvorenú MDCKII - ABCB1

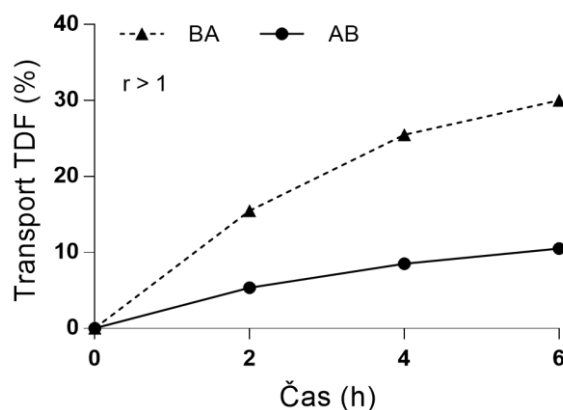
### 6.3.1 Obojsmerný transport

Metóda je založená na aplikácii liečiva o určitej koncentrácii do jedného z dvoch kompartmentov (apikálny, alebo bazolaterálny). Označuje sa ako donorový a určuje smer transportu liečiva. Prechod nastáva v smere z bazolaterálnej strany na apikálnu

(BA), alebo naopak, z apikálnej strany na bazolaterálnu (AB). Ak je liečivo substrátom P-gp, bude dochádzať k zvyšovaniu jeho koncentrácie v smere BA v porovnaní s AB prechodom (obrázok 7). Prestup liečiva môže byť ovplyvnený prítomnosťou iného substrátu, alebo inhibítora daného transportéra (obrázok 6).



**Obrázok 6** Schematické zobrazenie grafu popisujúceho metódu obojsmerného transportu TDF na parentnej línii buniek, kde nedochádza k aktívnemu efluxu testovanej látky a efluxný pomer koncentrácií transportu v smere BA/AB v šiestej hodine ( $r$ ) je teda rovný jednej. Takáto situácia môže nastať aj v prípade použitia inhibítora transportéra na modeli buniek exprimujúcom efluxný transportér, alebo ak skúšané liečivo nie je jeho substrátom.

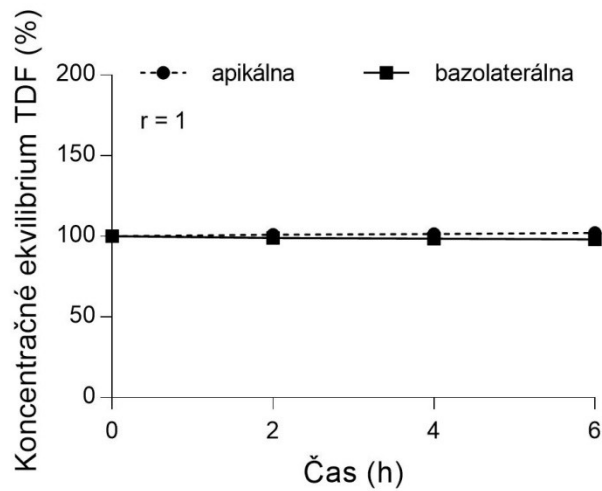


**Obrázok 7** Schematické zobrazenie grafu popisujúceho metódu obojsmerného transportu TDF na bunkách exprimujúcich liekový efluxný transportér. Dochádza k aktívnemu efluxu testovanej látky do akceptorového kompartmentu, a teda efluxný pomer testovanej látky v smere transportu BA/AB v šiestej hodine ( $r$ ) je väčší ako jedna.

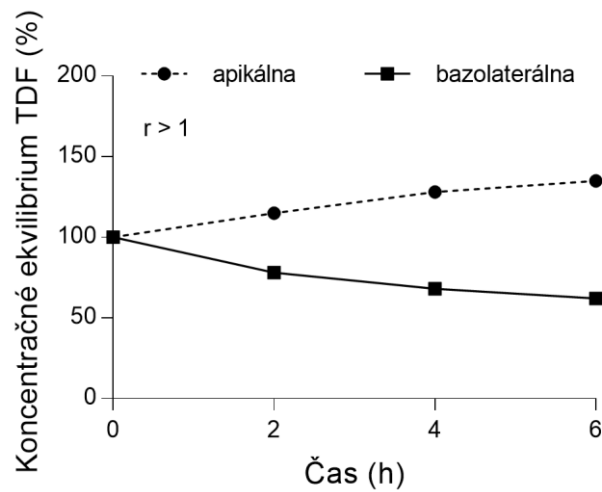
Bunky nasadené na inzerty ( $2,0 \times 10^6$  /jamka) sa nechali rásť do konfluentnej vrstvy po dobu štyroch dní. Každý deň bolo vymenené médium. Hodinu pred začiatkom experimentu boli bunky obmyté pomocou PBS (37°C) a preinkubované v 2ml média Opti-MEM (37°C) s pridaním testovaných látok, alebo bez nich. Transportný experiment bol zahájený výmenou média v apikálnom, alebo bazolaterálnom kompartmente za čerstvé médium Opti-MEM (37°C) s pridaním rádioaktívne značeného [ $^3\text{H}$ ]TDF (33,3nM) (finálna aktivita 0,04  $\mu\text{Ci/ml}$ ) a príslušnou testovanou látkou, alebo bez. Pre zistenie časového priebehu transportu boli po dvoch, štyroch a šiestich hodinách odoberané vzorky z akceptorových oddielov v objeme 50  $\mu\text{l}$ . Po pridaní scintilačného roztoku bola rádioaktivita meraná pomocou prístroja Tri-Carb 2009 TR Perkin Elmer. Koncentrácia [ $^3\text{H}$ ]TDF v akceptorovom kompartmente so zadaným časovým intervalom bola vypočítaná ako pomer ku koncentrácii [ $^3\text{H}$ ]TDF v čase  $T = 0$ . Efluxné pomery ( $r$ ) boli vypočítané ako pomer koncentrácie transportu [ $^3\text{H}$ ]TDF v smere BA/AB po šiestich hodinách inkubácie.

### **6.3.2 Koncentračné ekvilibrium**

Metóda je založená na aplikácii liečiva v rovnakej počiatočnej koncentrácii na obidve strany bunkovej monovrstvy (apikálna aj bazolaterálna). Koncentračný gradient je vyrovnaný, liečivo neprestupuje cez membránu pasívnou difúziou (obrázok 8), čím sa vytvoria podmienky vhodné na identifikáciu prítomného aktívneho transportu. Ak je liečivo substrátom pre liekový efluxný transportér vyskytujúci sa na apikálnej strane bunkovej membrány, dochádza k prečerpávaniu liečiva z bazolaterálnej strany a zvýšeniu jeho koncentrácie na apikálnej strane (obrázok 9) (Luna - Tortos et al. 2008). Prestup liečiva môže byť ovplyvnený prítomnosťou iného substrátu, alebo inhibítora daného transportéra.



**Obrázok 8** Schematické zobrazenie grafu popisujúceho metódu koncentračného ekvilibria TDF na parentnej línii MDCKII buniek, kde nedochádza k aktívnemu efluxu testovanej látky a pomer koncentrácií transportu apikálna/bazolaterálna strana, nameraných po šiestich hodinách inkubácie ( $r$ ), je teda rovný jednej. Takáto situácia môže nastať aj v prípade použitia inhibítora transportéra na modeli buniek exprimujúcom efluxný transportér, alebo ak skúšané liečivo nie jeho substrátom.



**Obrázok 9** Schematické zobrazenie grafu popisujúceho metódu koncentračného ekvilibria na bunkách exprimujúcich liekový efluxný transportér. Testovaná látka je substrátom a dochádza k aktívnemu transportu z bazolaterálnej strany kompartmentu na apikálnu stranu kompartmentu. Efluxný pomer koncentrácií transportu apikálna/bazolaterálna strana ( $r$ ), získaných po šiestich hodinách inkubácie je teda väčší ako jedna.

Bunky nasadené na inzerty ( $2,0 \times 10^6$  /jamka) sa nechali rásť do konfluentnej vrstvy po dobu štyroch dní . Každý deň bolo vymenené médium. Hodinu pred začiatkom experimentu boli bunky obmyté pomocou PBS (37°C) a preinkubované v 2ml Opti-MEM s pridaním testovaných látok, alebo bez nich. Transportný experiment bol zahájený pridaním rádioaktívne značeného [ $^3\text{H}$ ]TDF (33,3nM) (finálna aktivita 0,04  $\mu\text{Ci/ml}$ ) samostatne, alebo v kombinácii s príslušnou látkou v rovnakej počiatočnej koncentrácii do oboch kompartmentov. Pre zistenie časového priebehu transportu boli po dvoch, štyroch a šiestich hodinách odoberané vzorky zo všetkých oddielov v objeme 50  $\mu\text{l}$ . Po pridaní scintilačného roztoku bola meraná rádioaktivita prístrojom Tri-Carb 2009 TR Perkin Elmer. Koncentrácia [ $^3\text{H}$ ]TDF v oboch kompartmentoch zadaných časových intervaloch bola vypočítaná ako pomer zmeraných koncentrácií ku koncentrácii [ $^3\text{H}$ ]TDF v čase  $T = 0$ . Efluxné pomery koncentrácií [ $^3\text{H}$ ]TDF v apikálnom/bazolaterálnom kompartmente (r) boli vypočítané z percentuálnych hodnôt získaných po šiestich hodinách.

## 6.4 Štatistické spracovanie

K vyhodnoteniu štatistickej analýzy a grafickému spracovaniu výsledkov bol použitý program GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.; San Diego, California, USA).

Dáta sú prezentované ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka. Počet meraní  $n=3$ . Štatistická významnosť rozdielov hodnôt percentuálne vyjadreného transportu v zadaných časových intervaloch a porovnanie hodnôt pomerov (r) získaných po šiestich hodinách u MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek bola hodnotená parametrickým dvoj výberovým Študentovým t- testom.

Pre porovnanie štatistickej významnosti pomerov (r) obojsmerného transportu, aj koncentračných ekvilibrií testovaných kombinácií u MDCKII - ABCB1 buniek a MDCKII - parentných buniek bol použitý dvojstupňový ANOVA test s *post hoc* Dunnett testom.

Za štatisticky signifikantné sa považujú namerané rozdiely ak sú hodnoty  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) ;  $p > 0,05$  (ns) - štatisticky nevýznamný rozdiel.

Z výsledkov vyplýva, že všetky experimenty vykonané na bunkách MDCKII - ABCB1 boli urobené za rovnakých podmienok na MDCKII - parentnej bunkovej línii neexprimujúcej P-gp, s cieľom porovnania výsledkov.

V experimentoch robených metódou obojsmerného transportu bol sledovaný transport [<sup>3</sup>H]TDF v oboch smeroch. Z bazolaterálneho kompartmentu do apikálneho (BA), ako aj z apikálneho kompartmentu do bazolaterálneho (AB). Prestup [<sup>3</sup>H]TDF cez monovrstvu buniek je vyjadrený ako percento koncentrácie liečiva aplikovaného do donorového kompartmentu. Efluxný pomer koncentrácie [<sup>3</sup>H]TDF v smere transportu BA/AB (r), bol vypočítaný na základe hodnôt získaných po šiestich hodinách inkubácie.

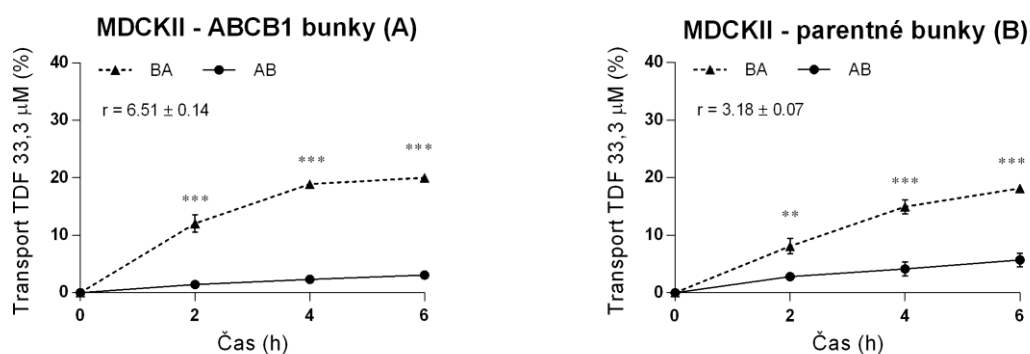
V experimentoch robených metódou koncentračného ekvilibria bol sledovaný transport [<sup>3</sup>H]TDF ako v apikálnej, tak aj v bazolaterálnej strane kompartmentu. Prestup [<sup>3</sup>H]TDF cez monovrstvu buniek je vyjadrený ako percento koncentrácie liečiva pridaného do oboch kompartmentov na začiatku experimentu. Efluxný pomer koncentrácií transportu [<sup>3</sup>H]TDF apikálna/bazolaterálna strana (r), bol vypočítaný na základe hodnôt získaných po šiestich hodinách inkubácie.



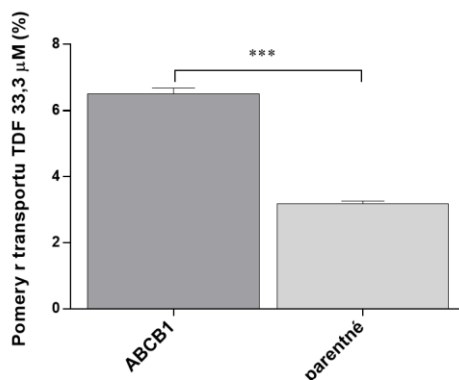
## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Na začiatok sme testovali transport  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v koncentrácii 33,3 nM cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 pre potvrdenie interakcie s P-gp a zistenie miery transportu cez monovrstvu parentných buniek. Ukázalo sa, že v oboch prípadoch je možné sledovať štatisticky významný rozdiel transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA a AB, vo všetkých meraných časových intervaloch (obrázok 10). Efluxný pomer  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  BA/AB ( $r$ ) v šiestej hodine bol u MDCKII - ABCB1  $6,51 \pm 0,14$  a u MDCKII - parentných buniek  $r = 3,18 \pm 0,07$ . Vypočítaním tzv. „net“ efluxu (podiel efluxného pomeru  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  BA/AB ( $r$ ) MDCKII - ABCB1 a MDCKII - parentných buniek), sme potvrdili, že TDF je substrátom P-gp. FDA a EMA udáva hodnotu 2, čo v našom prípade bolo splnené (2,05) (obrázok 11).



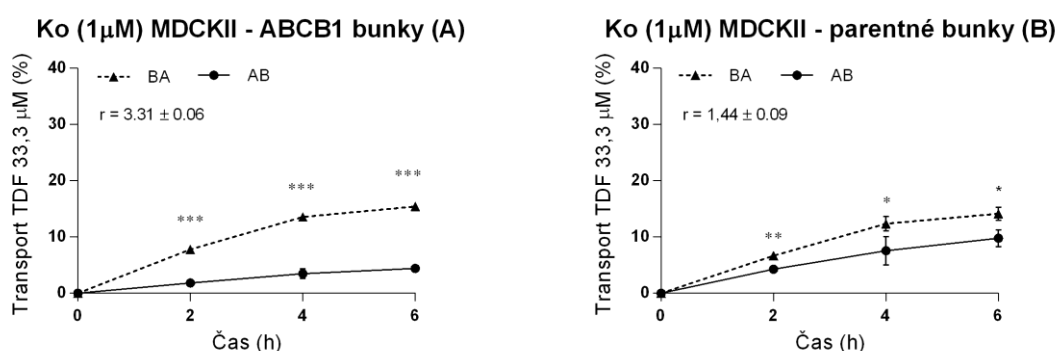
**Obrázok 10** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). V oboch prípadoch bol efluxný pomer koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere transportu BA/AB ( $r$ ) získaný po šiestich hodinách, značne väčší ako jedna.



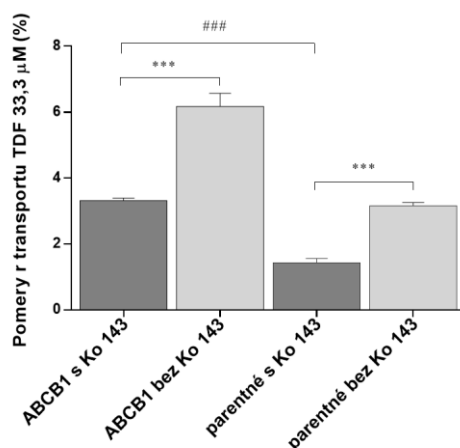
**Obrázok 11** Grafické zobrazenie porovnania efluxných pomerov koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere transportu BA/AB ( $r$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek a MDCKII - parentných buniek. Bol zistený štatisticky významný (\*\*\*) rozdiel pomerov ( $r$ ), získaných z nameraných hodnôt po šiestich hodinách.

## 7.2 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Kvôli vysokým hodnotám pomerov koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA/AB (r) hlavne u MDCKII - parentných buniek a podozreniu na prítomnosť endogénnych efluxných transportérov ovplyvňujúcich prestup a tým aj koncentráciu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$ , sme v druhom experimente pridali špecifický inhibítor BCRP - Ko 143 v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ . Po šiestich hodinách získané efluxné pomery koncentrácií transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA/AB (r), boli u MDCKII - ABCB1  $13,31 \pm 0,06$  a u MDCKII - parentných buniek  $r = 1,44 \pm 0,09$  (obrázok 12). Došlo ku zníženiu efluxného pomeru zhruba na polovicu v porovnaní s transportmi bez Ko 143 (obrázok 13).



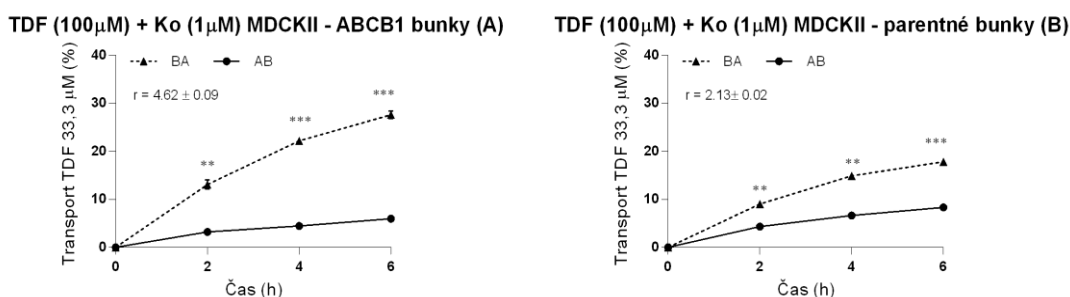
**Obrázok 12** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  s pridaním inhibítora Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu buniek MDCKII – ABCB1 (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Efluxné pomery koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  transportu v smere BA/AB (r), získaných po šiestich hodinách inkubácie sú vyššie ako jedna. Vo všetkých meraných časových intervaloch vykazuje transport  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA aj AB štatisticky významný rozdiel.



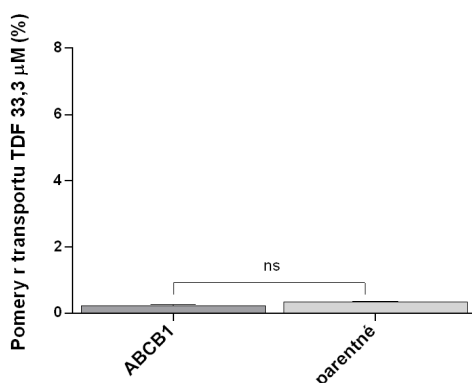
**Obrázok 13** Grafické zobrazenie porovnania efluxných pomerov koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere transportu BA/AB (r) získaných po šiestich hodinách inkubácie s/bez prídania inhibítora Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek a MDCKII - parentných buniek. Výsledok ukazuje štatisticky signifikantné (\*\*\*) zníženie pomerov (r) u oboch línii po prídanií Ko 143(1 $\mu\text{M}$ ), pričom pomer (r) u MDCKII - ABCB1 bol signifikantne vyšší (###) ako pri MDCKII - parentných bunkách aj v prítomnosti Ko 143.

### 7.3 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + LY 335979 (1 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Aby sme zistili, čo sa stane pokiaľ budeme inhibovať aj P-gp, otestovali sme kombináciu špecifického inhibítora P-gp LY 335979 v koncentrácii 1  $\mu\text{M}$  a Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ). Efluxné pomery koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  transportu v smere BA/AB ( $r$ ), získané z hodnôt nameraných po šiestich hodinách inkubácie boli v oboch prípadoch jednoznačne znížené (obrázok 14). Dokonca došlo k tomu, že rýchlosť BA transportu bola menšia než AB transportu, čo naznačuje možné zapojenie ďalšieho aktívneho transportéra do transferu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$ . U MDCKII - ABCB1 bol  $r = 0,71 \pm 0,02$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 0,48 \pm 0,01$ . Pre zistenie miery inhibície efluxu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + LY (1 $\mu\text{M}$ ) vydelený efluxným pomerom ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) ako u transdukovanej, tak aj parentnej línie (obrázok 15). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



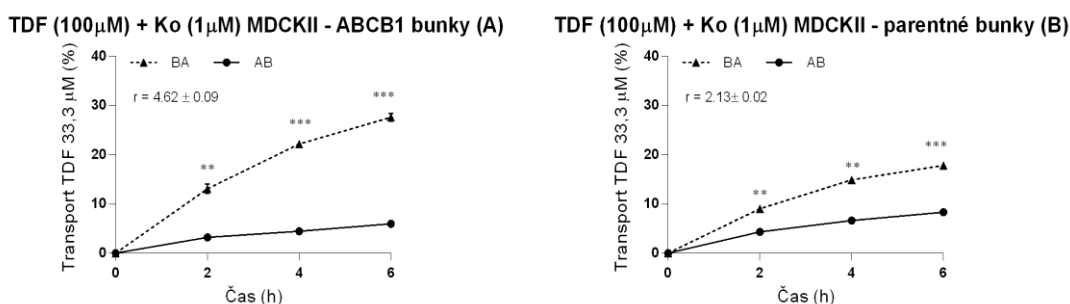
**Obrázok 14** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) a inhibítora LY 335979 (1 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Efluxné pomery ( $r$ ) vykazujú hodnotu nižšiu ako jedna. Štatisticky významný rozdiel transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA aj AB vo všetkých meraných časových intervaloch pozorujeme iba u MDCKII - ABCB1 buniek.



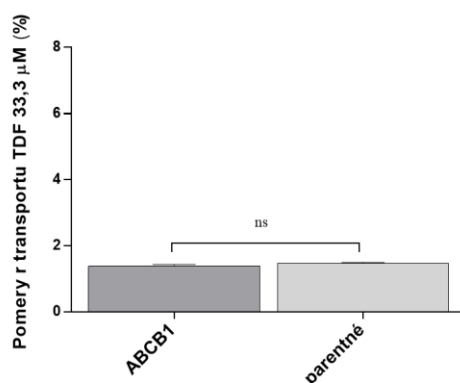
**Obrázok 15** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + LY (1 $\mu\text{M}$ ), vypočítaných z podielu efluxného pomeru ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + LY (1 $\mu\text{M}$ ) a efluxného pomeru ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek. Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu. Nebol zistený štatisticky signifikantný rozdiel.

## 7.4 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (100 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Po experimentoch s inhibítormi sme vyskúšali zvýšiť saturáciu transportéra použitím TDF v 100  $\mu\text{M}$  koncentrácii v kombinácii s Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ). U MDCKII - ABCB1 bol efluxný pomer koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  transportu v smere BA/AB  $r = 4,62 \pm 0,09$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 2,13 \pm 0,02$  (obrázok 16). Pre zistenie miery inhibície efluxu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (100 $\mu\text{M}$ ) vydelený efluxným pomerom ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u transdukovanej, aj parentnej línie (obrázok 17). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



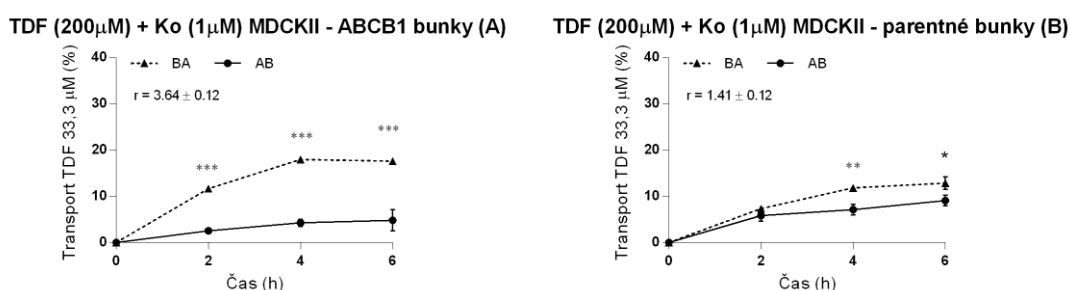
**Obrázok 16** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  s pridaním Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) a TDF (100 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Vo všetkých meraných časových intervaloch vykazuje transport  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  v smere BA aj AB štatisticky významný rozdiel.



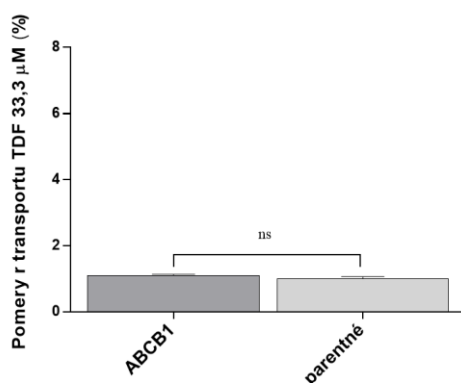
**Obrázok 17** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (100 $\mu\text{M}$ ), vypočítaných z podielu efluxného pomeru ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (100 $\mu\text{M}$ ) a ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek (1,39). Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu (1,44). Nebol zistený štatisticky významný rozdiel.

## 7.5 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (200 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Ďalej bola skúšaná koncentrácia TDF (200 $\mu\text{M}$ ) spolu s Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ). Vypočítaný pomer koncentrácií v smere BA/AB po šiestich hodinách inkubácie bol u MDCKII – ABCB1  $3,64 \pm 0,12$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 1,41 \pm 0,12$  (obrázok 18). Pre zistenie miery inhibície efluxu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (200 $\mu\text{M}$ ) vydelený efluxným pomerom ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) ako u transdukovanej, tak aj parentnej línie (obrázok 19). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



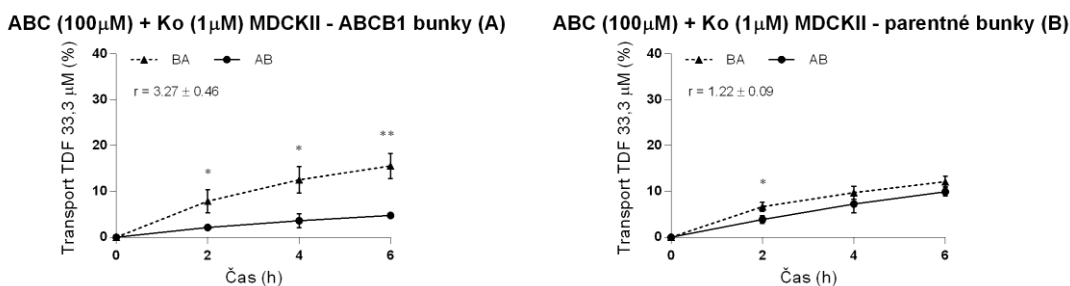
**Obrázok 18** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  s pridaním Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) a TDF (200 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B).



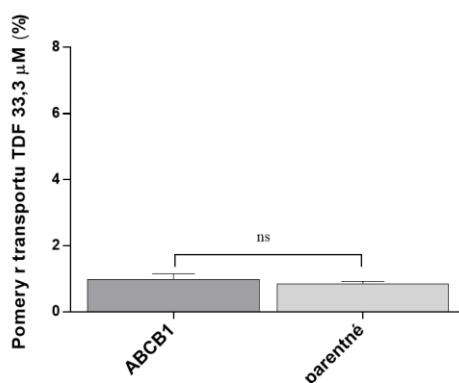
**Obrázok 19** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (200 $\mu\text{M}$ ), vypočítaných z podielu efluxného pomeru ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143(1 $\mu\text{M}$ ) + TDF (200 $\mu\text{M}$ ) a efluxného pomeru ( $r$ )  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek. Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu. Nebol zistený štatisticky signifikantný rozdiel.

## 7.6 OBOJSMERNÝ TRANSPORT $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + ABC (100 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Po experimentoch s Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) s rôznymi koncentraciami TDF (33,3 nM; 100  $\mu\text{M}$ ; 200  $\mu\text{M}$ ) sme vyskúšali pridať ABC o koncentrácii 100  $\mu\text{M}$ . Hodnoty pomerov koncentrácií BA/AB (r) získaných po šiestich hodinách inkubácie boli u MDCKII - ABCB1  $3,27 \pm 0,46$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 1,22 \pm 0,09$  (obrázok 20). Pre zistenie miery inhibície efluxu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + ABC (100 $\mu\text{M}$ ) vydelený efluxným pomerom (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) ako u transdukovanej, tak aj parentnej línie (obrázok 21). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



**Obrázok 20** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) a ABC (100 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Štatisticky významný rozdiel v transporte vo všetkých zadávaných časových intervaloch bol zistený iba u MDCKII - ABCB1 buniek.

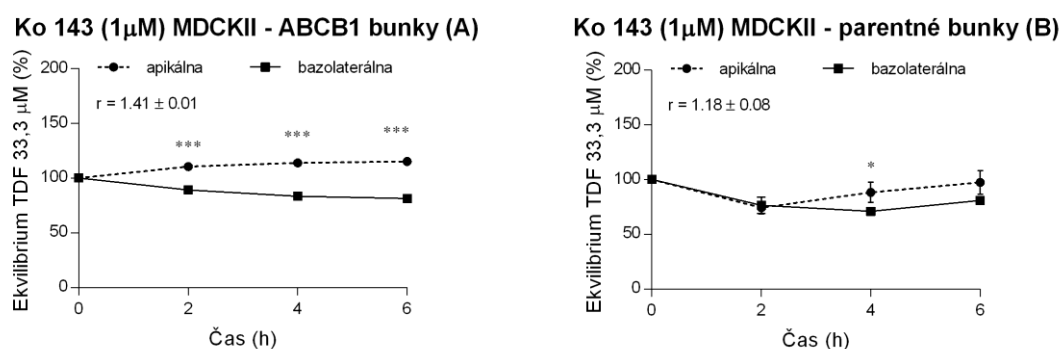


**Obrázok 21** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + ABC (100 $\mu\text{M}$ ), vypočítaných z podielu efluxného pomeru (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + ABC (100 $\mu\text{M}$ ) a efluxného pomeru (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek. Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu. Nebol zistený štatisticky významný rozdiel.

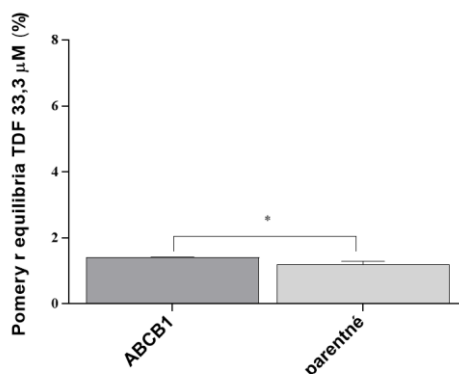
## 7.7 KONCENTRAČNÉ EKVILIBRIUM $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Vzhľadom k tomu, že štúdiá robené metódou obojsmerného transportu moc nefungovali a neprinesli využiteľné výsledky, skúsili sme ešte experimenty pomocou metódy koncentračného ekvilibria s použitím dvoch liečiv (IDV, SQV) zo skupiny inhibítorov proteáz, ktoré sú všeobecne známe inhibičným pôsobením na ABC transportéry (Sankatsing et al. 2004).

Prvý experiment koncentračného ekvilibria sme spravili s  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ), ktorý slúžil na porovnanie s ďalšími nasledujúcimi pokusmi. Výsledné pomery koncentrácie  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  apikálna/bazolaterálna strana ( $r$ ), sú vypočítané po šiestich hodinách inkubácie (obrázok 22) a porovnané v grafickom zobrazení (obrázok 23). U MDCKII - ABCB1 bol pomer  $r = 1,41 \pm 0,01$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 1,18 \pm 0,08$ .



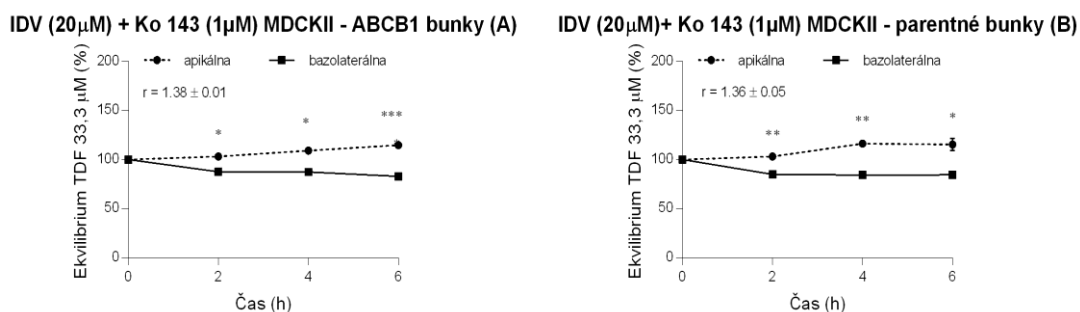
**Obrázok 22** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  s Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Transport  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  u parentných buniek nevykazoval vo všetkých meraných časových intervaloch štatisticky významný rozdiel, pričom u MDCKII - ABCB1 buniek bol vo všetkých časových intervaloch signifikantný (\*\*\*)



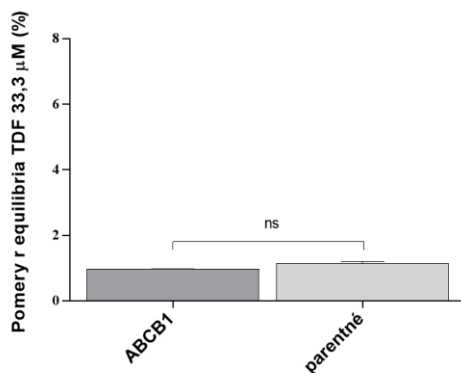
**Obrázok 23** Grafické zobrazenie porovnania efluxných pomerov koncentrácií transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  apikálna/bazolaterálna strana ( $r$ ) s Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) po šiestich hodinách inkubácie u MDCKII - ABCB1 buniek a MDCKII - parentných buniek. Štatistickou analýzou bol zistený signifikantný rozdiel (\*).

## 7.8 KONCENTRAČNÉ EQUILIBRIUM [<sup>3</sup>H]TDF (33,3nM) + IDV (20μM) + Ko 143 (1μM) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

V druhom experimente sme použili IDV v 20 μM koncentrácii. Pomery koncentrácií transportu [<sup>3</sup>H]TDF apikálna/bazolaterálna (r) boli veľmi podobné, prakticky rovnaké (obrázok 24). U MDCKII - ABCB1 bol  $r = 1,38 \pm 0,01$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 1,36 \pm 0,05$ . Pre zistenie miery inhibície efluxu [<sup>3</sup>H]TDF bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer (r) [<sup>3</sup>H]TDF + Ko 143 (1μM) + IDV (20μM) vydelený efluxným pomerom (r) [<sup>3</sup>H]TDF + Ko 143 (1μM) ako u transdukovanej, tak aj parentnej línie (obrázok 25). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



**Obrázok 24** Grafické zobrazenie transportu [<sup>3</sup>H]TDF s pridaným IDV (20μM) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Vo všetkých nameraných časových intervaloch bol pozorovaný štatisticky významný rozdiel transportu [<sup>3</sup>H]TDF.

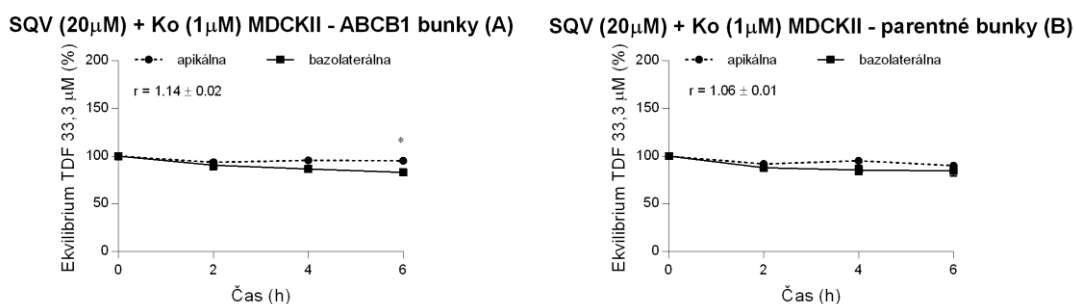


**Obrázok 25** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu [<sup>3</sup>H]TDF + Ko 143 (1μM) + IDV (20μM), vypočítaných z podielu efluxného pomeru (r) [<sup>3</sup>H]TDF + Ko 143(1μM) + IDV (20μM) a efluxného pomeru (r) [<sup>3</sup>H]TDF + Ko 143 (1μM) u MDCKII - ABCB1 buniek. Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu. Nebol zistený štatisticky významný rozdiel.

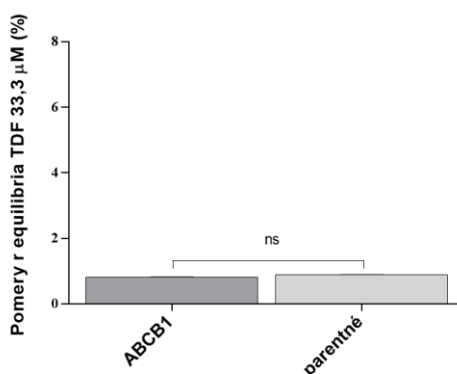


## 7.9 KONCENTRAČNÉ EKVILIBRIUM $[^3\text{H}]\text{TDF}$ (33,3nM) + SQV (20 $\mu\text{M}$ ) + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) CEZ MONOVRSTVU MDCKII - ABCB1 a MDCKII - PARENTNÝCH BUNIEK

Ako posledný experiment s PI sme vyskúšali SQV v 20  $\mu\text{M}$  koncentrácii. Výsledné pomery transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  apikálna/bazolaterálna (r) po šiestich hodinách inkubácie ukazovali nízke, podobné hodnoty blízke jednej (obrázok 26). U MDCKII - ABCB1 bol pomer  $r = 1,14 \pm 0,02$  a u MDCKII - parentných buniek bol  $r = 1,06 \pm 0,01$ . Pre zistenie miery inhibície efluxu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  bola spravená normalizácia pomerov ku kontrole, tzn. efluxný pomer (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + SQV (20 $\mu\text{M}$ ) vydelený efluxným pomerom (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) ako u transdukovanej, tak aj parentnej línie (obrázok 27). Nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel, takže nepredpokladáme, že bola pozorovaná inhibícia ľudského P-gp.



**Obrázok 26** Grafické zobrazenie transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143(1 $\mu\text{M}$ ) s pridaným SQV (20 $\mu\text{M}$ ) cez monovrstvu MDCKII - ABCB1 buniek (A) a MDCKII - parentných buniek (B). Pomery koncentrácií  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  apikálna/bazolaterálna strana (r) v oboch prípadoch ukazujú hodnoty blízke jednej. Transport  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  vo všetkých meraných časových intervaloch nevykazoval štatisticky významný rozdiel.



**Obrázok 27** Grafické zobrazenie porovnania normalizovaných pomerov transportu  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) + SQV (20 $\mu\text{M}$ ), vypočítaných z podielu efluxného pomeru (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143(1 $\mu\text{M}$ ) + SQV (20 $\mu\text{M}$ ) a efluxného pomeru (r)  $[^3\text{H}]\text{TDF}$  + Ko 143 (1 $\mu\text{M}$ ) u MDCKII - ABCB1 buniek. Rovnaký postup platí aj pre MDCKII - parentnú líniu. Nebol zistený štatisticky signifikantný rozdiel.

## 8. DISKUSIA

Antiretrovirotikum TDF patriace do skupiny NRTIs je súčasťou mnohých liečebných režimov terapie HIV (AIDSinfo 2016). Súčasná liečba HIV infekcie je založená na kombinácii liečiv z viacerých skupín (Balano 2014). Je to bežne robený postup na zosilnenie efektivity terapie a zníženie pravdepodobnosti vzniku rezistencie (Jonker et al. 2005).

TDF, ABC, aj PIs použité v tejto práci (IDV, SQV), sú podľa viacerých štúdií substrátom pre liekový efluxný transportér P-gp (Neumanova et al. 2014, Namanja et al. 2013, Shaik et al. 2007). Zároveň sa často používajú spoločne v cART (AIDSinfo 2016). Tento fakt môže viesť k ich vzájomnému ovplyvňovaniu sa a k vzniku potenciálnych liekových interakcií, ktoré by mohli znižovať efektívnosť terapie, alebo naopak, prispieť k jej zvýšeniu. Všeobecným príkladom môžu byť už spomínané, farmakokinetické interakcie verapamilu s furosemidom, či digoxínom, alebo vzťahované na cART - interakcie TDF s didanosinom, či atazanavirom (Hoosain et al. 2015, Ledwich et al. 2016, Aidsmap 2017). Z tohto dôvodu je kladený dôraz na podrobné preskúmanie problematiky liekových interakcií sprostredkovaných liekovými efluxnými transportérmi (Feng et al. 2008). *In vitro* testovanie by mohlo prispieť k vysvetleniu molekulárnej podstaty týchto klinicky pozorovaných interakcií (Zhang et al. 2011). Interakcie TDF s PIs boli celkom extenzívne študované na Caco-2 bunkovom modeli Tong et al. (2007), ale jeho interakcie s NRTIs takto študované neboli.

Cieľom tejto práce bolo teda vyskúšať *in vitro* metódy obojsmerného transportu a koncentračného ekvilibria pre sledovanie interakcií TDF s antiretrovirotikami na bunkovom modeli MDCKII exprimujúcom P-gp.

Bunkový model Caco-2 má síce všetky predpoklady (morfologické a biochemické znaky črevného epitelu) na odhadnutie intestinálnej absorpcie a biodostupnosti po orálnom podaní, no aplikácia tohto modelu na predikciu prenášačom sprostredkovaného transportu môže byť zavádzajúca, vzhľadom na prítomnosť viacerých transportných systémov a intestinálneho metabolizmu (Antunes et al. 2013).

Zatiaľ čo Caco-2 bunky sú odvodené z ľudského kolorektálneho karcinómu, MDCKII bunky sú odvodené z epitelu distálneho tubulu obličiek kokršpaniela, a preto je úroveň expresie niektorých transportérov medzi týmito dvoma modelmi odlišná. MDCKII

bunky vykazujú nižšiu úroveň expície transdukovaných transportných proteínov a nižšiu metabolickú aktivitu ako Caco-2 bunky (Antunes et al. 2013).

Sú dokázané rozdiely kinetiky a afinity substrátov u MDCKII - ABCB1 a Caco-2 bunkových modelov, zapríčinené vyššou úrovňou expície P-gp transportéra v MDCKII - ABCB1 bunkovej línii. Hlavnou výhodou MDCKII oproti Caco-2 je skrátenie doby kultivácie z 21 dní, na 3-5 dní (Antunes et al. 2013, Cyprotex 2017a). Aj z týchto dôvodov sme využili bunkový model MDCKII transdukovaný ľudským P-gp.

Štúdie sme zahájili pomocou *in vitro* metódy obojsmerného transportu (obrázok 6, 7), založenej na vytvorení počiatočného koncentračného gradientu liečiva medzi dvoma kompartmentami a následnom sledovaní jeho prestupu monovrstvou buniek v závislosti na čase (Neumanova et al. 2014).

Vychádzajúc z publikácie Neumanova et al. (2014), sme vo všetkých experimentoch obojsmerného transportu aj koncentračného ekvilibria, použili rádioaktívne značený [<sup>3</sup>H]TDF (33,3 nM), čo odpovedá hodnote najnižšej možnej rádioaktivity [0,04 μCi/ml] potrebnej na odmeranie a vyhodnotenie výsledkov. Jedná sa o nízku, nesaturujúcu koncentráciu. Aj keď je absorpcia TDF redukovaná efluxným transportom P-gp a štiepením esterázami, je známe, že u MDCKII bunkového modelu nedochádza ku konverziám [<sup>3</sup>H]TDF v takej miere, ktorá by ovplyvnila detekciu rádioizotopu a tým aj naše výstupy (Tong et al. 2007).

Ako prvé sme chceli overiť aktívny eflux [<sup>3</sup>H]TDF (obrázok 10). Podľa očakávaní sa potvrdil - štatistickou analýzou bol preukázaný signifikantný rozdiel efluxných pomerov koncentrácií [<sup>3</sup>H]TDF v smere BA/AB (r), nameraných po šiestich hodinách inkubácie medzi transfekovanými a parentnými bunkami - líšiaci sa zhruba o dvojnásobok (obrázok 11), čo odpovedá tvrdeniu, že TDF je substrátom P-gp (Neumanova et al. 2014).

Hodnoty efluxného pomeru koncentrácií [<sup>3</sup>H]TDF v smere BA/AB (r) u parentných buniek boli značne vysoké (obrázok 10). Podobné problémy už boli v minulosti popísané (Neumanova et al. 2014). Dá sa preto predpokladať, že podľa Di et al. (2011), to bolo spôsobené pravdepodobne vplyvom psích endogénnych transportérov, vyskytujúcich sa na bunkovom modeli MDCKII, ktoré môžu zasahovať do aktívneho efluxu liečiva.

Vzhľadom k tomu sme robili ďalšie experimenty s použitím Ko 143 (1 $\mu$ M), špecifického inhibítora ľudského BCRP, pôsobiaceho aj na myšie, potkanie, či psie transportéry (Apexbio 2013).

Efluxný pomer transportu [ $^3$ H]TDF (r) sa znížil cca o polovicu na obidvoch bunkových líniách (obrázok 12). Ďalším experimentom sme chceli vybrať, aký bude mať následok súčasná inhibícia P-gp, preto sme pridali jeho špecifický inhibítor P-gp - LY 335979 (1 $\mu$ M). Bohužiaľ, kombinovaná inhibícia P-gp a Bcrp viedla k zablokovaniu efluxu (obrázok 14), čo bol prvý náznak toho, že rozlíšenie zapojenia psieho a ľudského transportéra bude zložité. Napriek tomu sme pokračovali.

Nasledujúcimi experimentmi sme zisťovali, v akej miere je prestup [ $^3$ H]TDF v prítomnosti Ko 143 (1 $\mu$ M) zmenený postupným nasycovaním transportéra koncentráciou 100  $\mu$ M TDF (obrázok 16), 200  $\mu$ M TDF (obrázok 18) a 100  $\mu$ M ABC - substrátu P-gp (obrázok 20), keďže saturáciou sa dá obmedziť jeho efluxná aktivita (Hoosain et al. 2015, Shaik et al. 2007). Štatistická analýza našich výsledkov však nepotvrdila inhibíciu transportéra v žiadnom z týchto experimentov (aj keď treba brať do úvahy limity nášho modelu) (obrázok 17, obrázok 19, obrázok 21), čo by v konečnom dôsledku odpovedalo Kuritzkes (2005), že (autorom bližšie nekonkretizované) viaceré *in vitro* farmakokinetické štúdie nepreukázali výrazný efekt ABC na zmenu plazmatických hladín TDF.

Pretože výsledky predchádzajúcich experimentov nepriniesli žiadne nové, adekvátne informácie a poukazovali na limity použitého modelu, v rámci šetrenia rádioaktivity a materiálu sme sa rozhodli urobiť ešte experimenty *in vitro* metódou koncentračných ekvilibrií, s použitím dvoch liečiv zo skupiny PIs, ktoré podľa Storch et al. (2007), môžu zmeniť farmakokinetiku súčasne podávaných substrátov P-gp. PIs použité v práci (IDV, SQV) sú popísané Namanja et al. (2013) ako substráty P-gp, pričom obidva vykazujú voči nemu určitý inhibičný efekt (Sankatsing et al. 2004).

Metóda koncentračného ekvilibria (obrázok 8, 9) je vysoko citlivá a urobená tak, aby bolo na začiatku vytvoreným, vyrovnaným koncentračným gradientom zabránené pasívnym procesom transportu liečiv (Neumanova et al. 2014, Luna - Tortos et al. 2008). Táto metóda je výhodná aj vzhľadom k tomu, že znižuje počet nutných experimentov.

Rovnako ako aj pri predchádzajúcej metóde, tak aj na začiatku experimentov koncentračného ekvilibria sme chceli najskôr overiť mieru transportu [<sup>3</sup>H]TDF na modeli MDCKII - ABCB1 aj MDCKII - parentných bunkách s pridaním inhibítora Ko 143 (1μM). Výsledky ukázali určitý aktívny eflux na MDCKII - ABCB1 línii, u parentnej línie nedochádzalo k významnému transportu (obrázok 22), čo považujeme v kontexte výsledkov za chybu merania.

Na podklade publikácie Tong et al. (2007), sme použili 20 μM koncentrácie IDV a SQV s kombináciou Ko 143 (1μM). V prípade IDV boli efluxné pomery koncentrácií [<sup>3</sup>H]TDF už aj s inhibítorom Ko 143 (1μM) (r) na MDCKII - ABCB1 aj MDCKII - parentných bunkách prakticky rovnaké (obrázok 24), pripomínajúce hodnoty predchádzajúceho experimentu, naznačujúce nevhodný model pre inhibície P-gp. V prípade SQV boli hodnoty efluxných pomerov koncentrácie [<sup>3</sup>H]TDF (r) v oboch líniiach okolo jednej (obrázok 26). Vyššie popísaná teória inhibície transportéra pôsobením PIs sa nepotvrdila, štatistickou analýzou našich výsledkov sa nepreukázal žiadny signifikantný rozdiel v porovnaní s transportom [<sup>3</sup>H]TDF bez prítomnosti IDV (obrázok 25), či SQV (obrázok 27), z čoho súdime, že výpovedná hodnota experimentov nie je dostačujúca a výsledky sa dajú posudzovať iba v hypotetickej rovine.

Experimenty *in vitro* metódami obojsmerného transportu a koncentračného ekvilibria na bunkovom modeli MDCKII nepriniesli očakávané výsledky aplikovateľné do využiteľnej roviny. Okrem zapojenia psích endogénnych transportérov to mohlo byť spôsobené aj tým, že podľa Volpe (2008), sú rozdielnosti a podobnosti vo výsledkoch experimentov variabilné v závislosti na viacerých aspektoch, ako podmienky experimentu a v neposlednom rade prevedenie a spracovanie ľudským faktorom. Tomu by nasvedčovali aj výpočty normalizácie efluxných pomerov (obrázky 15, 19, 21, 25, 27), ktorých hodnoty sa pohybovali cca pod hranicou čísla jedna. Štúdia má určité limity, ktoré však neboli riešené do väčšej hĺbky z finančných i časových dôvodov, ako aj zložitej interpretácie výsledkov.

## 9. ZÁVER

V tejto práci som sa venovala skúmaniu interakcií TDF s antiretrovirotikami (TDF, ABC, IDV, SQV) pomocou *in vitro* metód obojstranného transportu a koncentračného ekvilibria cez bunkovú líniu MDCKII - ABCB1.

Potvrdili sme, že TDF je substrátom P-gp, ale ako sa ukázalo, testovanie liekových interakcií pomocou MDCKII bunkovej línie nie je pravdepodobne možné. Výsledky ovplyvnenia transportu [<sup>3</sup>H]TDF antiretrovirotikami bolo náročné interpretovať, pretože sme vždy pozorovali efekt testovaných látok na oboch typoch bunkových línií a nepodarilo sa nám rozlíšiť, či dochádza k inhibícii ľudského, či endogénneho transportéra. Vzhľadom k podobným poklesom efluxného pomeru u oboch testovaných línií sa ale prikláňame k viac k variante, že testované látky inhibovali skôr endogénne transportéry.

MDCKII nie je vhodnou bunkovou líniou pre štúdium a liekových interakcií TDF na P-gp a aj keď sme to v rámci práce nerobili, predpokladáme ich nevhodnosť i pre prípadné štúdie liekových interakcií na BCRP, alebo MRP2.

Napriek tomu, problematika liekových efluxných transportérov je rozsiahlou, komplikovanou a dôležitou témou, ovplyvnenou viacerými faktormi, ktorej je potrebné sa v aj naďalej venovať a prispievať tým k zefektívneniu terapie vo všeobecnosti, nielen HIV.

## 10. LITERÁRNE ZDROJE

Antoniou, T., L. Y. Park-Wyllie and A. L. Tseng (2003). "Tenofovir: A nucleotide analog for the management of human immunodeficiency virus infection." Pharmacotherapy **23**(1): 29-43.

Antunes, F., F. Andrade, D. Ferreira, H. M. Nielsen and B. Sarmiento (2013). "Models to Predict Intestinal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins." Current Drug Metabolism **14**(1): 4-20.

Aszalos, A. (2007). "Drug-drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1). I. Preclinical aspects." Drug Discovery Today **12**(19-20): 833-837.

Aurpibul, L. and T. Puthanakit (2015). "Review of Tenofovir Use in HIV-infected Children." Pediatric Infectious Disease Journal **34**(4): 383-391.

Balayssac, D., N. Authier, A. Cayre and F. Coudore (2005). "Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions?" Toxicology Letters **156**(3): 319-329.

Beis, K. (2015). "Structural basis for the mechanism of ABC transporters." Biochemical Society Transactions **43**: 889-893.

Cihlar, T., G. Birkus, D. E. Greenwalt and M. J. M. Hitchcock (2002). "Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Antiviral Research **54**(1): 37-45.

Coleman, C., J. Ross and P. Reddy (2002). "Tenofovir disoproxil fumarate - The first nucleotide reverse transcriptase inhibitor for treatment of patients with HIV-1 infection." Formulary **37**(1): 15-20.

Cooper, R. D., N. Wiebe, N. Smith, P. Keiser, S. Naicker and M. Tonelli (2011). "Systematic review and meta-analysis: Renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in

HIV-infected patients (vol 51, pg 496, 2010)." Clinical Infectious Diseases **52**(2): 283-283.

Danhof, M., E. C. M. de Lange, O. E. Della Pasqua, B. A. Ploeger and R. A. Voskuyl (2008). "Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling in translational drug research." Trends in Pharmacological Sciences **29**(4): 186-191.

Deeks, S. G. and A. N. Phillips (2009). "HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity." British Medical Journal **338**.

Di, L., C. Whitney-Pickett, J. P. Umland, H. Zhang, X. Zhang, D. F. Gebhard, Y. R. Lai, J. J. Federico, R. E. Davidson, R. Smith, E. L. Reyner, C. Lee, B. Feng, C. Rotter, M. V. Varma, S. Kempshall, K. Fenner, A. F. El-Kattan, T. E. Liston and M. D. Troutman (2011). "Development of a New Permeability Assay Using Low-Efflux MDCKII Cells." Journal of Pharmaceutical Sciences **100**(11): 4974-4985.

Dickinson, L., S. Khoo and D. Back (2010). "Pharmacokinetics and drug-drug interactions of antiretrovirals: An update." Antiviral Research **85**(1): 176-189.

Dukes, J. D., P. Whitley and A. D. Chalmers (2011). "The MDCK variety pack: choosing the right strain." Bmc Cell Biology **12**.

Estudante, M., J. G. Morais, G. Soveral and L. Z. Benet (2013). "Intestinal drug transporters: An overview." Advanced Drug Delivery Reviews **65**(10): 1340-1356.

Feng, B., J. B. Mills, R. E. Davidson, R. J. Mireles, J. S. Janiszewski, M. D. Troutman and S. M. de Morais (2008). "In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system." Drug Metabolism and Disposition **36**(2): 268-275.

Fung, H. B., E. A. Stone and F. J. Piacenti (2002). "Tenofovir disoproxil fumarate: A nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection." Clinical Therapeutics **24**(10): 1515-1548.



- Gallant, J. E. and S. Deresinski (2003). "Tenofovir disoproxil fumarate." Clinical Infectious Diseases **37**(7): 944-950.
- Grant, P. M. and A. G. Cotter (2016). "Tenofovir and bone health." Current Opinion in Hiv and Aids **11**(3): 326-332.
- Hoosain, F. G., Y. E. Choonara, L. K. Tomar, P. Kumar, C. Tyagi, L. C. du Toit and V. Pillay (2015). "Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy." Biomed Research International.
- Chapman, T. M., J. K. McGavin and S. Noble (2003). "Tenofovir disoproxil fumarate." Drugs **63**(15): 1597-1608.
- Chen, Z. L., T. L. Shi, L. Zhang, P. L. Zhu, M. Y. Deng, C. Huang, T. T. Hu, L. Jiang and J. Li (2016). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade." Cancer Letters **370**(1): 153-164.
- Jonker, D. M., S. A. G. Visser, P. H. van der Graaf, R. A. Voskuyl and M. Danhof (2005). "Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug-drug interactions in vivo." Pharmacology & Therapeutics **106**(1): 1-18.
- Kearney, B. P., J. F. Flaherty and J. Shah (2004). "Tenofovir disoproxil fumarate - Clinical pharmacology and pharmacokinetics." Clinical Pharmacokinetics **43**(9): 595-612.
- Kis, O., K. Robillard, G. N. Y. Chan and R. Bendayan (2010). "The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters." Trends in Pharmacological Sciences **31**(1): 22-35.
- Kuritzkes, D. R. (2005). "Less than the sum of its parts: Failure of a tenofovir-abacavir-lamivudine triple-nucleoside regimen." Journal of Infectious Diseases **192**(11): 1867-1868.

- Ledwith, K. V., R. W. Barnes and A. G. Roberts (2016). "Unravelling the complex drug-drug interactions of the cardiovascular drugs, verapamil and digoxin, with P-glycoprotein." Bioscience Reports **36**.
- Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." Physiology **22**: 122-130.
- Linton, K. J. and C. F. Higgins (2007). "Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control." Pflugers Archiv-European Journal of Physiology **453**(5): 555-567.
- Liu, C. X., X. L. Yi, H. R. Fan, W. D. Wu, X. Zhang, X. F. Xiao and X. He (2015). "Effects of Drug Transporters on Pharmacological Responses and Safety." Current Drug Metabolism **16**(9): 732-752.
- Liu, W., H. Pan, C. Y. Zhang, L. L. Zhao, R. X. Zhao, Y. T. Zhu and W. S. Pan (2016). "Developments in Methods for Measuring the Intestinal Absorption of Nanoparticle-Bound Drugs." International Journal of Molecular Sciences **17**(7).
- Luna-Tortos, C., M. Fedrowitz and W. Loscher (2008). "Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein." Neuropharmacology **55**(8): 1364-1375.
- Konig, J., F. Muller and M. F. Fromm (2013). "Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects." Pharmacological Reviews **65**(3): 944-966.
- Maartens, G., C. Celum and S. R. Lewin (2014). "HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention." Lancet **384**(9939): 258-271.
- Mariani, S. A., E. Vicenzi and G. Poli (2011). "Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4(+) T lymphocytes." Journal of Translational Medicine **9**.
- Michaud, V., T. Bar-Magen, J. Turgeon, D. Flockhart, Z. Desta and M. A. Wainberg (2012). "The Dual Role of Pharmacogenetics in HIV Treatment: Mutations and

Polymorphisms Regulating Antiretroviral Drug Resistance and Disposition." Pharmacological Reviews **64**(3): 803-833.

Montanari, F. and G. F. Ecker (2015). "Prediction of drug-ABC-transporter interaction - Recent advances and future challenges." Advanced Drug Delivery Reviews **86**: 17-26.

Namanja, H. A., D. Emmert, C. A. Hrycyna and J. Chmielewski (2013). "Homodimers of the antiviral abacavir as modulators of P-glycoprotein transport in cell culture: probing tether length." Medchemcomm **4**(10): 1344-1349.

Neumanova, Z., L. Cervený, M. Cecková and F. Staud (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.

Passaes, C. P. and A. Saez-Cirion (2014). "HIV cure research: Advances and prospects." Virology **454**: 340-352.

Prueksaritanont, T., X. Y. Chu, C. Gibson, D. H. Cui, K. L. Yee, J. Ballard, T. Cabalu and J. Hochman (2013). "Drug-Drug Interaction Studies: Regulatory Guidance and An Industry Perspective." Aaps Journal **15**(3): 629-645.

Ristig, M. B., J. Crippin, J. A. Aberg, W. G. Powderly, M. Lisker-Melman, L. Kessels and P. Tebas (2002). "Tenofovir disoproxil fumarate therapy for chronic hepatitis B in human immunodeficiency virus/hepatitis B virus-coinfected individuals for whom interferon-alpha and lamivudine therapy have failed." Journal of Infectious Diseases **186**(12): 1844-1847.

Sankatsing, S. U. C., J. H. Beijnen, A. H. Schinkel, J. M. A. Lange and J. M. Prins (2004). "P-glycoprotein in human immunodeficiency virus type 1 infection and therapy." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(4): 1073-1081.

Shaik, N., N. Giri, G. Pan and W. F. Elmquist (2007). "P-glycoprotein-mediated active efflux of the anti-HIV1 nucleoside abacavir limits cellular accumulation and brain distribution." Drug Metabolism and Disposition **35**(11): 2076-2085.

Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS Pandemic." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **1**(1).

Smith, P. F., B. P. Kearney, S. Liaw, D. Cloen, J. M. Bullock, C. E. Haas, K. Yale, B. M. Booker, C. S. Berenson, D. F. Coakley and J. F. Flaherty (2004). "Effect of tenofovir disoproxil fumarate on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of total, R-, and S-methadone." Pharmacotherapy **24**(8): 970-977.

Storch, C. H., D. Theile, H. Lindenmaier, W. E. Haefeli and J. Weiss (2007). "Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein." Biochemical Pharmacology **73**(10): 1573-1581.

Theodoulou, F. L. and I. D. Kerr (2015). "ABC transporter research: going strong 40 years on." Biochemical Society Transactions **43**: 1033-1040.

Tong, L., T. K. Phan, K. L. Robinson, D. Babusis, R. Strab, S. Bhoopathy, I. J. Hidalgo, G. R. Rhodes and A. S. Ray (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.

Troost, J., H. Lindenmaier, W. E. Haefeli and J. Weiss (2004). "Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells." Molecular Pharmacology **66**(5): 1332-1339.

Volpe, D. A. (2008). "Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays." Journal of Pharmaceutical Sciences **97**(2): 712-725.

Weiss, R. A., D. Pillay, A. G. Dalglish., C. Loveday. Human Immunodeficiency Viruses. In: Zuckerman A. J., Banatvala J. E., Pattison J. R., Griffiths P. D. and Schoub B. D. Principles and Practice of Clinical Virology, Fifth Edition. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004:728-736.

Wilens, C. B., J. C. Tilton, R. W. Doms. Molecular Mechanism of HIV Entry. In: Rossmann M. G. and Rao V. B. eds. Viral Molecular Machines, Advances in

Experimental Medicine and Biology 726. NY: Springer Science + Business Media, LLC, 2012:224-236.

Ye, L., C. Q. Hou and S. W. Liu (2017). "The Role of Metabolizing Enzymes and Transporters in Antiretroviral Therapy." Current Topics in Medicinal Chemistry **17**(3): 340-360.

Zhang, L., S. M. Huang and L. J. Lesko (2011). "Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions." Clinical Pharmacology & Therapeutics **89**(4): 481-484.

### **ELEKTRONICKÉ ZDROJE:**

AIDS.gov. HIV/AIDS Basics/HIV/AIDS 101: What is HIV/AIDS? 2016. Dostupné na URL: <https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/what-is-hiv-aids/index.html> Prístup 18.3.2017.

AIDSinfo. Understanding HIV/AIDS: The Basics. 2017a. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/45/hiv-aids--the-basics/> Prístup 17.3.2017.

AIDSinfo. Drugs/Tenofovir Disoproxil Fumarate. 2017b. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/290/tenofovir-disoproxil-fumarate/0/professional> Prístup 21.5.2017.

AIDSinfo. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-infected Adults and Adolescents. 2016. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-arv-guidelines/11/what-to-start> Prístup 23.5.2017.

Aidsmap. Resources/HIV treatments directory/A to Z of antiretroviral drugs/Tenofovir (Viread). Drug interactions. 2017. Dostupné na URL: <http://www.aidsmap.com/Drug-interactions/page/1731209/> Prístup 7.5.2017.

Apexbio. Home/Signaling Pathways/Others/BCRP/Ko 143. Ko143 BCRP inhibitor, potent and selective. 2013. Dostupné na URL: <http://www.apexbt.com/ko-143.html> Prístup 8.5.2017.

Balano K.. Drug - Drug interactions with HIV-Related Medications. 2014. Dostupné na URL: <https://aidsetc.org/guide/drug-drug-interactions-hiv-related-medications> Prístup 5.5.2017.

Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. [CD-ROM] New York: McGraw-Hill Companies, 2011.

CDC.gov. HIV/AIDS/HIV Basics/About HIV/AIDS. 2017. Dostupné na URL: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> Prístup 18.3.2017.

Cyprotex. Home/Services/ADME PK/MDCK (Wild Type) Permeability Assay/MDCK (wild type) permeability assay. 2017a. Dostupné na URL: <http://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability/wild-type-mdck-permeability> Prístup: 15.4.2017.

Cyprotex. Home/Services/ADME PK/MDR1-MDCK Permeability (P-glycoprotein) Assay/MDR1-MDCK Permeability Assay (P-glycoprotein substrate identification) for Screening and Regulatory Reporting Purposes. 2017b. Dostupné na URL: <http://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability/mdr1-mdck-permeability> Prístup: 14.4.2017.

Drugs. Tenofovir. 2017a. Dostupné na URL: <https://www.drugs.com/cdi/tenofovir.html> Prístup 21.5.2017.

Drugs. Drug Interactions Checker. 2017b. Dostupné na URL: [https://www.drugs.com/drug\\_interactions.html](https://www.drugs.com/drug_interactions.html) Prístup 22.5.2017.

Hunt R. Human Immunodeficiency Virus and AIDS. The History of the Disease. In: Microbiology and Immunology On-line. 2016a. Dostupné na URL: <http://www.microbiologybook.org/lecture/hiv2.htm> Prístup 20.3.2017.

Hunt R. Human Immunodeficiency Virus and AIDS. Introduction. In: Microbiology and Immunology On-line. 2016b. Dostupné na URL: <http://www.microbiologybook.org/lecture/hiv2000.htm> Prístup 18.3.2017.

Levinson W. Review of Medical Microbiology & Immunology. 11th ed. [CD-ROM] USA: The McGraw - Hill Companies, 2010.

Rang H.P, Dale M.M, Ritter J.M, Flower R.J. Rang & Dale's Pharmacology. 6th ed. [CD-ROM] Edinburg: Churchill livingstone, 2007.

UNAIDS. Global AIDS Update 2016. 2016. Dostupné na URL: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/Global-AIDS-update-2016> :2-16. Prístup 19.3. 2017.

WHO. Data. Global Health Observatory (GHO) data. 2017a. Dostupné na URL: <http://www.who.int/gho/hiv/en/> Prístup 17.3.2017.

WHO. Programmes/Pre-exposure prophylaxis. 2017b. Dostupné na URL: <http://www.who.int/hiv/topics/prep/en/> Prístup 19.3.2017.

WHO. Programmes/HIV/AIDS/Mother-to-child transmission of HIV. 2017c. Dostupné na URL: <http://www.who.int/hiv/topics/mtct/en/> Prístup 19.3.2017.

WHO. Programmes/HIV/AIDS/ Post-exposure prophylaxis to prevent HIV infection/Fact sheet. 2014. Dostupné na URL: <http://www.who.int/hiv/topics/prophylaxis/info/en/> Prístup 19.3.2017.

## **ZDROJE OBRÁZKOV**

AIDSinfo. Drugs/Tenofovir Disoproxil Fumarate. 2017. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/290/tenofovir-disoproxil-fumarate/0/professional> Prístup 21.5.2017.

DocCheck. DocCheck Pictures/Multiplication du VIH. 2017. Dostupné na URL: <http://pictures.doccheck.com/fr/photo/15051-multiplication-du-vih> Prístup 20.3.2017.

Gohel M. Novel Drug Approaches to bypass P - Glycoprotein Efflux Pump. 2011. Dostupné na URL: <http://www.pharmainfo.net/reviews/novel-drug-delivery-approaches-bypass-p-glycoprotein-efflux-pump> Prístup 25.4.2017.

Kis, O., K. Robillard, G. N. Y. Chan and R. Bendayan (2010). "The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters." Trends in Pharmacological Sciences **31**(1): 22-35.

Solvobitech. Product Services/Technologies/Monolayer Assay. 2017. Dostupné na  
URL: <http://www.solvobitech.com/technologies/monolayers-assay> Prístup 22.4.2017.