

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**ROLE VYBRANÝCH ABC A SLC TRANSPORTÉRŮ V PŘESTUPU
MARAVIROKU PŘES BUNĚČNÉ MEMBRÁNY: VLIV NA
TRANSPORT V PLACENTĚ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lenka Ťupová

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

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za její cenné připomínky a odborné vedení, dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Ťupové za trpělivost a podnětné rady při vypracování této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Zuzana Matiašková

Školitelka: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název diplomové práce: Role vybraných ABC a SLC transportérů v přestupu maraviroku přes buněčné membrány: vliv na transport v placentě

Antiretrovirální léčivo maravirok patří do skupiny inhibitorů vstupu CCR5-tropního viru HIV do hostitelské buňky. V současné době je maravirok podáván v rámci kombinované antiretrovirální terapie (cART) především u dospělých a dětí starších dvou let, a též u těhotných žen pro snížení rizika přenosu viru HIV na plod. Znalost interakce maraviroku s lékovými transportéry v placentě je klíčová pro optimalizaci terapie v těhotenství, jak z pohledu efektivity, tak případných nežádoucích účinků. Maravirok je popsáným substrátem ABCB1 transportéru, který svou efluxní aktivitou v apikální membráně trofoblastu plní ochrannou roli pro plod. Výsledky nedávné studie na duální perfúzi lidské placenty nicméně naznačují, že do transplacentární farmakokinetiky maraviroku je pravděpodobně zapojeno více lékových transportérů, zejména těch působících v opačném směru než ABCB1.

Cílem této práce bylo pomocí *in vitro* studií zjistit, zda maravirok interaguje s dalšími placentárními transportéry kromě ABCB1. Nejprve byla provedena akumuláční studie a studie obousměrného transportu maraviroku přes monovrstvu placentárních BeWo b30 buněk. Signifikantní snížení akumulace maraviroku v přítomnosti inhibitoru verapamilu (100 μM), ritonaviru (10 μM) a GF (2 μM) naznačuje zapojení influxního transportéru, naopak zvýšení akumulace v přítomnosti inhibitoru MK-571 (50 μM) specifického pro ABCC transportéry dále nasvědčuje zapojení některého z ABCCs transportérů. Po vyhodnocení transportní studie byl pozorován výraznější přestup maraviroku v B-A směru citlivý na přítomnost inhibitorů ritonaviru a MK-571. Pro identifikaci interagujících transportérů byly provedeny *in vitro* studie na MDCKII buněčné linii exprimující lidský ABCC1 transportér a A431 liniích exprimujících lidský OATP2B1, -1A2 nebo -1B3 transportér. Odhalena tak byla

substrátová afinita maraviroku k ABCC1, OATP1A2 a OATP1B3 transportním proteinům, ale nikoliv k OATP2B1.

Ze získaných dat lze usuzovat, že maravirok interaguje na placentě s více lékovými transportéry, které by mohly částečně zvrátit účinek apikálně lokalizovaného ABCB1. Vzhledem k povaze antiretrovirální léčby, která je ve vyspělých zemích vždy kombinovaná, lze současně předpokládat, že maravirok bude náchylný k lékovým interakcím a tato nově získaná data by mohla přispět k lepšímu pochopení transplacentární farmakokinetiky maraviroku a tím i optimalizaci terapie.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and toxicology

Student: Zuzana Matiašková

Supervisor: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Role of selected ABC and SLC transporters in transmembrane permeability of maraviroc: effect on transport in placenta

Antiretroviral drug maraviroc is an inhibitor of CCR5-trophic HIV virus and belongs to the group of entry inhibitors. Nowadays, maraviroc is administered as part of combination antiretroviral therapy (cART) primarily in adults, children over the age of two and pregnant women to reduce the risk of transmission of HIV to the fetus. The knowledge of interactions of maraviroc with drug transporters in placenta is crucial for optimizing the therapy during pregnancy, both in terms of efficacy and potential adverse effects. Maraviroc is known substrate of ABCB1 transporter, which plays a protective role to the fetus by its efflux activity in the apical membrane of trophoblast. However, the results of recent study employing dually perfused human placenta suggest, involvement of other transport mechanisms in the maraviroc transplacental pharmacokinetics, especially those operating in the opposite direction to ABCB1.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* studies whether, besides ABCB1, maraviroc interacts with other transplacental transporters. First, an accumulation study and bidirectional transport of maraviroc across the monolayer of placental BeWo b30 cells was performed. Significant reduction in maraviroc accumulation in the presence of verapamil (100 μM), ritonavir (10 μM) and GF (2 μM) suggests, that some influx transporters might be involved. On the other hand, an increase of accumulation in the presence of inhibitor MK-571 (50 μM) suggests also involvement of some ABCCs efflux transporter(s). After the following evaluation of transport study a significant transfer of maraviroc in B-A direction was observed sensitive to the presence of ritonavir and MK-571. In order to identify the interacting transport mechanisms *in vitro* studies were performed using MDCKII cells overexpressing human ABCC1 transporter and A431 cells overexpressing human OATP2B1, 1A2 or -1B3 transporter. We

revealed substrate affinity of maraviroc to ABCC1, OATP1A2 and OATP1B3 was revealed, but not to OATP2B1.

Based on the obtained data we can suggest, that maraviroc interacts with several drug transporters in placenta that could partly reverse the effect of apically localized ABCB1. Considering the fact that antiretroviral therapy is always administered as combination of drugs in developed countries, it can be assumed that maraviroc will be susceptible to drug-drug interactions and this newly obtained data could contribute to better understanding of the transplacental pharmacokinetics of maraviroc and optimization of the therapy.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	1
2. ÚVOD	3
3. TEORETICKÁ ČÁST	5
3.1. Infekce HIV	5
3.2. Antiretrovirová terapie (ART)	7
3.2.1. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI)	9
3.2.2. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI)	9
3.2.3. Inhibitory integrázy	9
3.2.4. Inhibitory proteáz	9
3.2.5. Inhibitory vstupu HIV do buňky	10
3.2.6. Inhibitory fúze	10
3.2.7. Inhibitory maturace	10
3.3. Maravirok (MVC)	11
3.3.1. Mechanismus účinku	12
3.3.2. Farmakokinetika	12
3.3.3. Toxicita	13
3.3.4. Lékové interakce	13
3.4. Přenos HIV z matky na dítě	14
3.5. Placenta	14
3.6. Membránové transportní proteiny	15
3.6.1. ABC efluxní lékové transportéry	15
3.6.1.1. P-glykoprotein (P-gp /ABCB1)	16
3.6.1.2. MRP1 (Multidrug resistance protein 1)	17
3.6.1.3. Lokalizace MRP1 a P-glykoproteinu v organismu	17
3.6.2. SLC transportéry	18
3.6.2.1. OATP1A2	20
3.6.2.2. OATP1B3	20
3.6.2.3. OATP2B1	21
3.7. Lékové interakce v placentě	21
4. HYPOTÉZA	22
5. CÍL PRÁCE	22
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
6.1. MATERIÁL	23
6.1.1. Buňky	23
6.1.2. Chemikálie a činidla	23
6.2. Obousměrný transport maraviroku přes monovrstvu BeWo (b30) a MDCKII-MRP1 buněk	24
6.2.1. Princip	24
6.2.2. Postup experimentu	24
6.3. Akumulační studie	26
6.3.1. Princip	26
6.3.2. Postup experimentu	28

6.4. Statistická analýza	29
7. VÝSLEDKY	30
7.1. Transportní studie - BeWo b30 buňky	30
7.2. Akumulační studie – BeWo b30 buňky	31
7.3. Transportní studie - MDCKII – MRP1 buňky	32
7.4. Akumulační studie - OATP-A431 buňky	35
8. DISKUZE	37
9. ZÁVĚR	40
10. LITERATURA	41

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC transportéry	nadrodina membránových lékových transportérů závislých na ATP (z angl. „ATP binding cassette transporters“)
ABCB1	P-glykoprotein (B1 člen nadrodiny ABC transportérů)
AIDS	syndrom získané imunodeficience (z angl. „acquired immunodeficiency syndrome“)
ART	antiretroviróvá terapie
BBB	hematoencefalická bariéra (z angl. „blood-brain barrier“)
BCRP/ABCG2	G2 člen nadrodiny ABC transportérů (z angl. „breast cancer resistance protein“)
CAR	karnitin
cART	kombinovaná antiretroviróvá terapie
CCR5	Chemokinový receptor typ 5 (C-C chemokine receptor type 5)
CXCR4	chemokinový receptor typ 4 (C-X-C chemokine receptor type 4)
DDI	lékové interakce (z angl. „drug-drug interaction“)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. „Food and Drug Administration“)
GF	GF120918, elacridar (popsaný modelový inhibitor ABCB1 a ABCG2)
HIV	virus lidské imunodeficience (z angl. „human immunodeficiency virus“)
LY	LY-335979, zosuquidar (popsaný modelový inhibitor ABCB1)
MDCK II	Madine darby canine kidney II, buněčná linie odvozená z tubulů psích ledvin
MRP1 (ABCC1)	C1 člen nadrodiny ABC transportérů (z angl. „multidrug resistance-associated protein 1“)
MRPs/ABCCs	C rodina ABC transportérů (z angl. „multidrug resistance-associated proteins“)

MVC	Maravirok
NBDs	Nukleotidové vazebné domény (z angl. „nucleotide-binding domains“)
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NRTI	nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
P-gp	P-glykoprotein
PI	proteázové inhibitory
RIT	Ritonavir
SLC	solute carrier transporter
TMDs	Transmembránové domény (angl. „transmembrane domains“)
VER	Verapamil

2. ÚVOD

Syndrom získané imunodeficiency neboli AIDS je zdravotní stav způsobený virem lidské imunodeficiency (HIV). Vědecká komunita poprvé popsala onemocnění AIDS po nárůstu výskytu velmi vzácných infekcí a nádorových onemocnění u jinak zdravých homosexuálních pacientů. V současné době je infekce HIV stále aktuálním problémem (Bhatti et al 2016). Dle aktuálních statistických údajů žije na celém světě přes 37 milionů obyvatel nakažených virem HIV (WHO, 2018).

Objev antiretrovirotik na konci 90. let minulého století a jejich podávání ve formě kombinované antiretrovirální léčby (cART), přispěly k dramatickému poklesu úmrtnosti na AIDS a zkvalitnění života pacientů, nicméně eradikace viru HIV z hostitelského organismu není v současné době stále možná (Cihlar a Fordyce 2016). Včasně diagnostikovaní pacienti však mohou díky cART přežít i desítky let a žít běžný život. Mezi HIV pozitivními je až 50 % žen fertilního věku, a proto velmi důležitou úlohu v antiretrovirální terapii představuje i prevence přenosu viru HIV z těhotné ženy na plod (AIDSinfo).

Kombinovaná terapie s sebou nese vždy riziko pro rozvoj lékových interakcí. Důležitým místem pro rozvoj farmakokinetických interakcí mohou být membránové lékové transportéry. ABC (ATP-binding transporters) transportéry, jako je P-glykoprotein (P-gp / ABCB1), MRPs (multidrug resistance-associated proteins) a BCRP (breast cancer resistance protein) pracují jako efluxní transportéry a významně ovlivňují biologickou dostupnost a distribuci léčiv. Mnohá antiretrovirotika jsou popsány jako substráty efluxních transportérů, ale mohou působit i jako jejich induktory nebo inhibitory, a tak zvyšovat riziko ovlivnění plazmatických hladin druhého současně podaného léčiva. To pak může vést k významnému ovlivnění účinnosti terapie či výraznějšímu vyjádření nežádoucích účinků (Kumar et al 2015).

Pro vstup viru HIV do lidské buňky je nutná interakce membránových proteinů (gp120) na povrchu virové buňky s receptorem CD4+ a koreceptory CCR5 nebo CXCR4 na povrchu T_H-lymfocyty (Gu et al. 2014). Maravirok patří mezi novější antiretrovirová léčiva a působí jako antagonist CCR5 koreceptoru, čímž znemožňuje vstup HIV do buňky (Woollard a Kanmogne 2015). Díky jeho nízké toxicitě může být podáván dětem starším 2 let (Giaquinto et al. 2018) a několikrát byl již indikován i u těhotných žen (Colbers et al. 2015). Předchozí studie naznačují, že maravirok je substrátem P-glykoproteinu (Walker et al. 2005), který se nachází na apikální straně

placentární bariéry a mohl by limitovat distribuci maraviroku z krevního řečiště matky do plodu (Ceckova-Novotna et al. 2006)

Cílem této práce bylo zjistit, zda je maravirok substrátem i jiných membránových transportérů přítomných v trofoblastu placentární bariéry, konkrétně efluxního ABC transportéru MRP1 lokalizovaného na bazální membráně trofoblastu a/nebo influxních transportérů OATP1A2, OATP1B3 či OATP2B1.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Infekce HIV

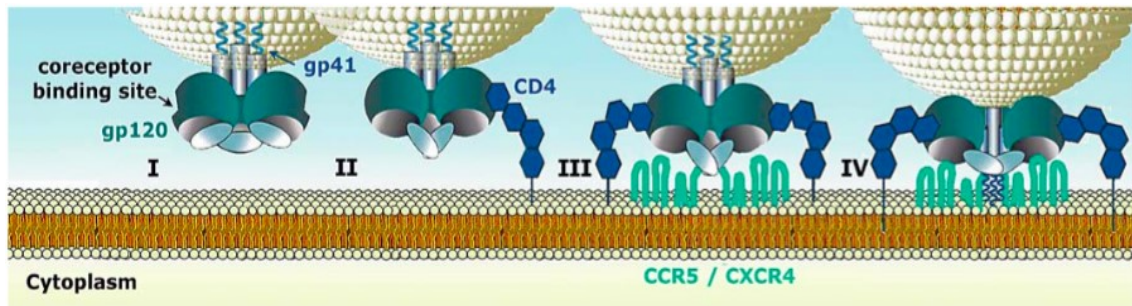
Virus lidské imunodeficiency (HIV, human immunodeficiency virus) je dnes rozšířený po celém světě. Poprvé byl popsán roku 1982, v Jižní Kalifornii a původně byl nazýván zkratkou GRID (gay-related immune deficiency). Později téhož roku byla infekce identifikována nejen u gayů, ale i u hemofiliků a obyvatel Haiti. V září roku 1982 pak byl poprvé použit termín AIDS. V současné době žije na světě asi 37 milionů lidí nakažených HIV, přičemž 66 % nakažených pochází z Afrického kontinentu (Avert 2018). Každoročně asi 1 milion postižených na toto onemocnění zemře (Fourcade et al. 2018).

HIV řadíme mezi retrovirové infekce. Specifickou součástí retroviru je enzym reverzní transkriptáza, která přepisuje RNA retroviru do DNA a integráza, která včleňuje virový genom (DNA) do genomu hostitelské buňky (Bernier a Sagan 2018). Životní cyklus viru HIV probíhá v několika charakteristických fázích, na které je též cílená antiretrovirová terapie.

Při procesu infekce lidské buňky virem HIV dochází nejprve k interakci mezi virovými membránovými proteiny typu gp120, které se vážou na CD4 receptory T_H-lymfocytů lidského imunitního systému. Tato vazba spustí konformační změnu virového glykoproteinu gp120 a to umožní virovému koreceptoru interakci s CCR5 nebo CXCR4 koreceptory lidského T_H-lymfocytu (Obr. 1). Po dalších konformačních změnách dochází k fúzi buněk a průniku viru HIV do hostitelské buňky. Proces uvnitř buňky je zahájen odpláštěním virové částice a následným přepisem virového RNA do DNA za pomoci reverzní transkriptázy. Virový genom pak prochází do jádra hostitelské buňky jadernými póry a integruje se do její DNA. Hlavní roli zde hraje virový enzym integráza, která rozštěpí DNA hostitelské buňky a zařadí virovou část. Lidské buňky, které mají včleněný virový genom do jádra, se stávají permanentními nosiči tohoto viru. Následuje transkripce a translace (včetně virových glykoproteinů), prekurzorové proteiny se sekretují ven z buňky. Tyto proteiny jsou zatím inaktivní. Enzym proteáza je štěpí na funkční jednotky, uvolňuje zralé virové proteiny a následně dochází k maturaci buňky a vzniku infekčního viru (Gu et al. 2014). Celý tento cyklus *in vivo* trvá přibližně 52 hodin (Murray et al. 2011).

K přenosu viru dochází prostřednictvím krve nebo jiných tělních sekretů (vaginální, sperma), dále přenosem z matky na plod během těhotenství, porodu nebo kojení (Avert 2018).

Vliv na šíření viru má i genetický polymorfismus. Byl potvrzen protektivní vliv heterozygotní HLA-B alely (McLaren et al. 2015) a odolnost homozygotních jedinců s CCR5 Δ 32 alelou vůči infekci (Zhu et al. 2015).



Obrázek 1: Přichycení viru na hostitelskou buňku. Virový gp120 se naváže na buněčný receptor CD4. Tato vazba spustí konformační změny na gp120, což umožní odkrytí vazebných míst koreceptoru a interakci s koreceptory CCR5 nebo CXCR4 hostitelské buňky. Vazba s těmito koreceptory spustí další kaskádu konformačních změn, mimo jiné i odkrytí domény gp41, což vede k fúzi hostitelské a virové buňky a jejímu uvolnění do cytoplasmy (převzato z: Sierra-Argón a Walter 2012)

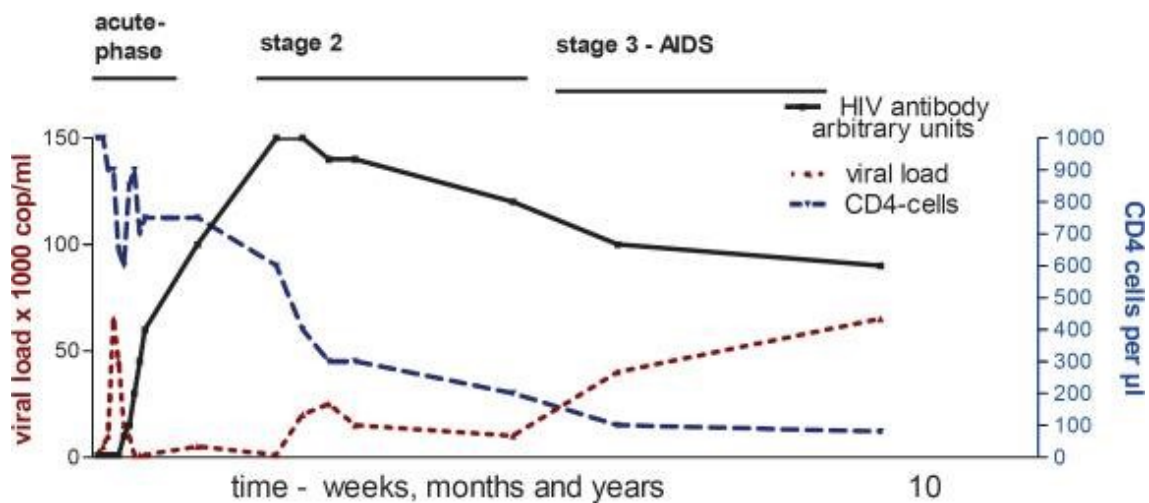
KLINICKÁ STADIA HIV

Infekce virem HIV má tři fáze: akutní, chronickou a fázi AIDS. Průběh infekce znázorněn na obr. 2.

Akutní HIV infekce: Jedná se o počáteční fázi infekce, která se rozvíjí v průběhu 2-4 týdnů od nakažení. Projevuje se bolestí hlavy, horečkou a vyrážkou. Dochází k rychlému a masivnímu množení viru v organismu a pacient je v tomto období velice infekční.

Chronická HIV infekce: V této fázi dochází k pomalejšímu množení viru. Většinou se nevyskytují žádné symptomy onemocnění HIV, ale pacient je stále infekční. Bez antiretrovirální terapie nemoc postoupí do fáze AIDS.

AIDS: Jedná se o poslední fázi HIV infekce. Hladina CD4⁺ buněk klesá pod 200 buněk/cm³. Z důvodu malfunkce imunitního systému se ve značné míře objevují oportunní infekce, zejména pneumocystická pneumonie, toxoplazmóza nebo Kaposiho sarkom (AIDSinfo 2018).



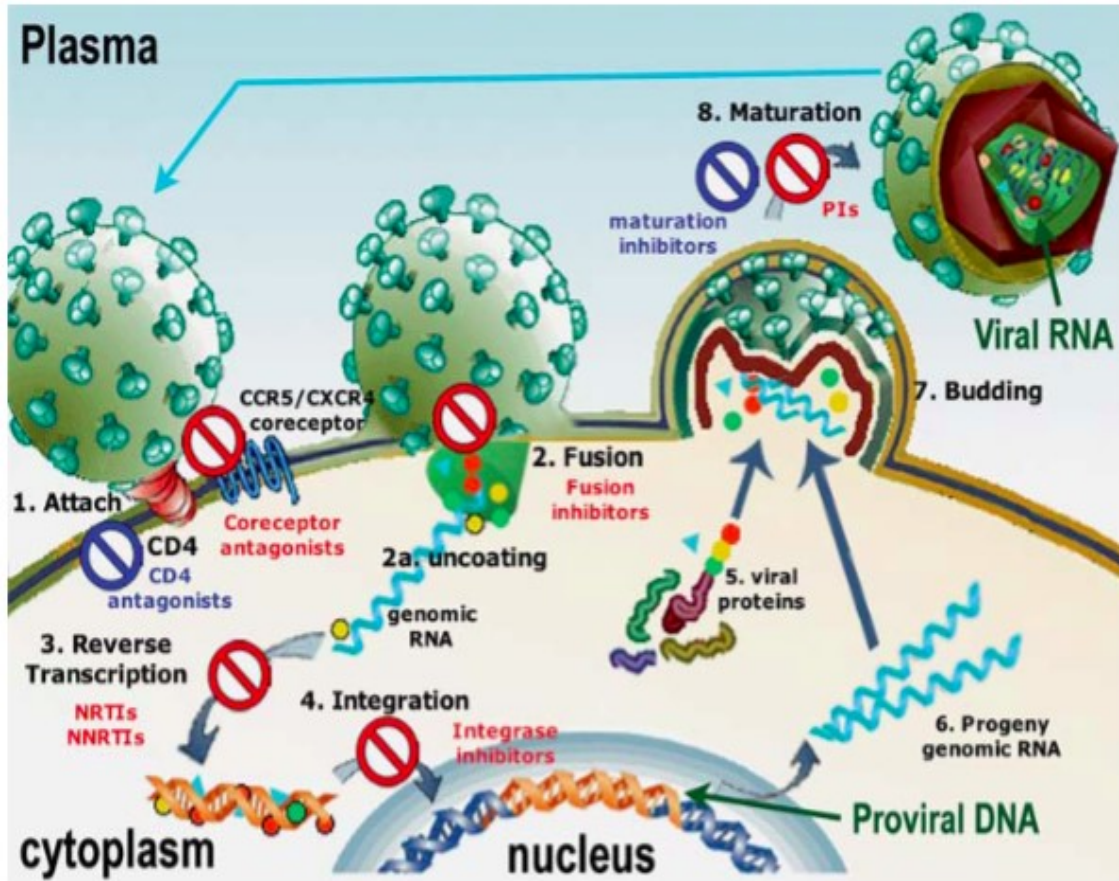
Obrázek 2: Znárodnění průběhu neléčené HIV infekce. Na časové ose jsou označeny nejdříve týdny (akutní fáze) pak měsíce a nakonec roky (latentní fáze a symptomatická HIV fáze). Na počátku dochází k vzestupu HIV virových částic a počet T_H CD4+ buněk klesá. Postupem času hladina protilátek proti HIV klesá z důvodu suprese imunitního systému jedince (převzato z: Winslow a Kerdel 2015).

3.2. Antiretrovirová terapie (ART)

Antiretrovirová terapie se používá k potlačení množení viru a progresi onemocnění. Její zavedení do praxe bylo zlomovým bodem léčby HIV – ze smrtelného onemocnění se stala léčitelná nemoc. Největší rozvoj ART proběhl v letech 1981-1986, kdy velké množství pacientů umíralo na HIV (Staňková 2008).

Léčba viru HIV je celoživotní. Začátek terapie byl dříve doporučován u jedinců, u nichž hladina pomocných T_H -lymfocytů s receptory CD4+ klesla pod hranici 350 buněk/ mm^3 nebo měli pokročilé stádium HIV infekce, objevila se u nich aktivní forma tuberkulózy nebo zároveň mají hepatitidu B s jaterním selháváním (Consolidated ARV guidelines 2013). Aktuálně se nicméně terapie zahajuje již bezprostředně po potvrzení HIV infekce. Navíc se v aktuálních doporučeních WHO diskutuje i preventivní podání antiretrovirových u zdravých jedinců, kteří přišli do kontaktu s krví infikované osoby nebo měli pohlavním styk s infikovanou osobou (Consolidated guidelines 2016). Speciální skupinou pacientů vyžadujících podání antiretrovirálních léčiv jsou pak HIV pozitivní těhotné ženy, u kterých tato léčba umožňuje významné snížení rizika přenosu HIV viru z matky na plod (AIDSinfo 2018).

V současné době je pro terapii HIV používáno sedm hlavních farmakologických tříd antiretrovirálních léčiv (Zhang 2018), přičemž každá třída cílí na specifickou část životního cyklu viru (Obr. 3).



Obrázek 3: Životní cyklus HIV viru a možné zásahy antiretrovirotik. (1) Virus se váže na receptory CD4+ T_H buněk pomocí koreceptorů a po několika konformačních změnách zahajuje (2) fúzi virové buňky s buněčnou membránou hostitelské buňky. (2 a) Po vstupu dochází k odpláštění (3) následované reverzní transkripci. (4) Nově vzniklý komplex je transportován do jádra, kde dochází k integraci virového genomu do DNA hostitelské buňky pomocí enzymu proteinové integrázy. (5) Následuje transkripce a pak translace virových genů a dochází ke vzniku virových glykoproteinů a gag-(pol) prekursorových proteinů. (6) Po přenosu virových proteinů a virového genomu k membráně se gag-(pol) prekursorové zanoří do membrány a (7) začnou tvořit kulovitou částici a dochází tak k sekreci. Uvolněné částice jsou inaktivní. Posledním krokem v HIV cyklu je maturace. Virová proteáza rozštěpí gag a gag-pol proteiny, virion se stává aktivním a může infikovat další buňky (převzato z: Sierra-Argón a Walter 2012).

3.2.1. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI)

NRTI představují falešné substráty strukturálně podobné nukleosidům, které jsou potřebné pro syntézu virové DNA. Na deoxyriboze postrádají hydroxylovou skupinu a po inkorporaci tohoto nukleotidu do DNA zablokují činnost reverzní transkriptázy a nedojde tedy k přepisu virové RNA do DNA. Do této skupiny patří zidovudin, stavudin, lamivudin, didanosin, abacavir, tenofovir a emtricitabin. Rezistence na tuto skupinu je způsobená mutacemi viru HIV, kdy dojde ke snížení afinity reverzní transkriptázy k léčivům a podpoře v zabudování přírodních substrátů (Argón a Walter 2014), a dále je rezistence způsobená TAMs (thymidine analog mutations), které zvyšují aktivitu odblokování primeru (Hu et al. 2006). Jedná se o nejstarší skupinu antiretrovirotik, prvním z používaných byl zidovudin, syntetizován v roce 1987 (Staňková, Na, & Uk, 2008). NRTI jsou lékem volby při cART (Sierra-Argón a Walter 2012).

3.2.2. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI)

Do této skupiny patří látky, které se váží přímo na reverzní transkriptázu v blízkosti katalytických míst a tím zablokují její činnost. Patří sem nevirapin, efavirenz, etravirin a rilpivirin. Časté mutace vedou k rezistenci viru na NNRTI, avšak u látek druhé generace (etravirin a rilpivirin) je pravděpodobnost rezistence nižší. Mají dlouhý plazmatický poločas a podávají se pouze jednou denně. Patří mezi léky volby při cART v kombinaci s NRTI (Sierra-Argón a Walter 2012).

3.2.3. Inhibitory integrázy

Tyto látky blokují integrázovou aktivitu. Nemůže dojít k inkorporaci virového genomu do genomu hostitelské buňky a nevratně je zastavena virová replikace. Mezi zástupce této skupiny patří raltegravir a elvitegravir. Elvitegravir se řadí mezi léky první linie cART v kombinaci s NRTI a NNRTI (Sierra-Argón a Walter 2012). Na rozdíl od inhibitorů reverzní transkriptázy nevzniká na tyto látky rezistence a jsou používány i u multirezistentních pacientů (Staňková 2008).

3.2.4. Inhibitory proteáz

Proteázové inhibitory se chovají jako falešné substráty enzymu proteázy a specificky se váží na aktivní místa enzymu (Sierra-Argón a Walter 2012). Proteáza je

inaktivována a HIV virus se stává neinfekčním. Mezi tato léčiva patří ritonavir, saquinavir, indinavir, tipranavir, lopinavir a další (Gu et al. 2014). Inhibitory proteáz jsou silnými blokátory enzymu CYP3A4 a mají tudíž vysoký interakční potenciál. Ritonavir se z tohoto důvodu používá jako tzv. „booster“ do kombinace s jinými inhibitory proteáz, a tím zvyšuje účinnost terapie (Staňková 2008).

3.2.5. Inhibitory vstupu HIV do buňky

Na rozdíl od ostatních látek se inhibitory vstupu HIV neváží na virové proteiny, ale na proteiny na povrchu hostitelské buňky. Jediným léčivem této skupiny je maravirok (MVC), který je antagonistou CCR5 koreceptoru a je tudíž účinný pouze u pacientů infikovaných R5-tropním virem HIV. Selhání terapie MVC je spojeno se změnou tropismu viru na X4. Inhibici koreceptoru CXCR4 v současné době není možná, neboť dochází k mnoha mutacím a rezistenci (De Feo a Weiss 2012). Ibalizumab je protilátka, která se váže na CD4+ lymfocyt a zabrání tak konformačním změnám, které umožňují vstup HIV do buňky. Dne 6. března 2018 byl v Americe schválen pro léčbu multirezistentních HIV pacientů (Markham 2018). Další klinicky testované látky této skupiny jsou: aplavirok a cenicivirok (Zhang 2018).

3.2.6. Inhibitory fúze

Inhibitory fúze dělíme na HR1 a HR2 analoga v závislosti na tom, na kterou část virového gp41 koreceptoru se váží. Jediným zástupcem této skupiny je enfuvirtidin, HR2 analog, který působí proti HIV-1 R5 a HIV-1 X4 virům (Sierra-Argón a Walter 2012). Další inhibitor sifuviritid vstoupil nedávno do počáteční fáze vývoje (Zhang 2018).

3.2.7. Inhibitory maturace

Tato skupina látek je zatím na počátku svého vývoje. Jediným zástupcem této skupiny je bevirimat. Inhibitory maturace se váží na HIV kapsidu a inhibují dozrání virových proteinů uvnitř buňky. Vzniká neinfekční, nezralá virová částice (Zhang 2018).

Virus HIV podléhá velmi snadno mutacím, při léčbě pouze jedním antiretrovirotikem dochází k selhání léčby a rozvoji rezistence, proto byla v roce 1996

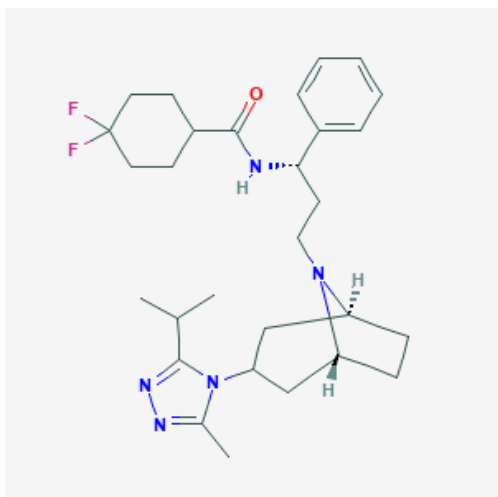
poprvé zahájena kombinovaná antiretrovirální terapie (cART). Jedná se o kombinaci tří až čtyř antiretrovirálních léčiv, přičemž cílí na více fází replikačního cyklu viru, což zvyšuje efektivitu terapie a snižuje rezistenci viru. Tato terapie potlačuje progresi viru mnohem efektivněji než léčba jedním antiretrovirotikem. Výrazně obnovuje imunitní funkce, zmírňuje klinické příznaky onemocnění a zlepšuje kvalitu života pacientů (Zhang 2018). Je doporučeno zahájit cART kombinací dvou NRTI a jednou látkou z kategorie NNRTI nebo inhibitorů integrázy. Účinnost této kombinace je změřena pomocí virového titru, kde se měří množství virového mRNA v určitém objemu krve. Pokud se jeho hodnota stále zvyšuje a zároveň klesá počet T_H -lymfocytů s receptory CD4+, je nutné změnit kombinaci antiretrovirotik (Consolidated guidelines 2016).

Na konci roku 2017 bylo FDA schváleno celkem 43 antiretrovirálních léčiv. Hlavní překážkou při vývoji nových léčiv je léková toxicita, rezistence a vysoká cena léku (Zhang 2018). V současné době je vývoj nových antiretrovirálních léčiv v pozadí, důraz je kladen na optimalizaci kombinační léčby (Zhang 2018).

Možnosti vývoje nové léčby HIV se neustále rozvíjejí a v současné době se pracuje na vývinu vakcín, které by zabránily vzniku HIV infekce. Tým Louise Pickera vyvinul CMV vektor a mosaikovou antigenovou strategii, který využívá genetických algoritmů a vytváří malé sady uměle vyrobených virových proteinů, které pokrývají rozmanitost různých epitopů v populaci. Nyní bohužel není žádná vakcína dostupná, i přesto že byla izolována celá řada bNAbs (broadly neutralizing antibody), vždy došlo k infikování hostitelské buňky. Důvody zatím nejsou známy (Ahmed et al. 2017).

3.3. Maravirok (MVC)

Maravirok je prvním antiretrovirotikem ze skupiny inhibitorů vstupu, který byl roku 2007 schválen FDA pro léčbu dospělých pacientů, kteří jsou infikováni R5-tropním virem HIV (Woollard a Kanmogne 2015). V roce 2017 byl schválen i pro léčbu dětí starších 2 let (Giaquinto et al. 2018). Terapie MVC se zahajuje po neúspěšné léčbě jinými antiretrovirotiky nebo pro intenzifikaci terapie. (Woollard a Kanmogne 2015).



Obrázek 4: Chemická struktura maraviroku (převzato z: PubChem Compound Database 2018)

IUPAC název: 4,4-difluoro-N-[(1S)-3-[(1S,5R)-3-(3-methyl-5-propan-2-yl-1,2,4-triazol-4-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-yl]-1-phenylpropyl]cyclohexane-1-carboxamide, struktura znázorněna na obr. 4 (převzato z: PubChem Compound Database 2018)

Chemický sumární vzorec: $C_{29}H_{41}F_2N_5O$

3.3.1. Mechanismus účinku

Maravirok je antagonistou chemokinového koreceptoru CCR5. Při jeho blokaci není možná vazba mezi virovou (přes gp120) a hostitelskou buňkou. Nedojde k fúzi membrán a replikace viru je blokována (Woollard a Kanmogne 2015).

3.3.2. Farmakokinetika

Standardní dávka MVC je 300 mg, dvakrát denně. Díky tomu, že je středně lipofilní látkou, snadno přechází přes membrány a tělní bariéry. Biologická dostupnost MVC při dávce 100 mg činí asi 23,1 % a při dávce 300 mg 33 %. Největší koncentrace je dosaženo 0,5 – 4 hodiny po podání (PubChem Compound Database 2018). Podání po tučné stravě snižuje koncentraci látky v těle, ale neovlivňuje antiretrovirální aktivitu. MVC se váže na plazmatické bílkoviny ze 76 % (Woollard a Kanmogne 2015).

Distribuční objem MVC je 197 litrů (PubChem Compound Database 2018). Je distribuován po celém těle: plazma, sperma, vaginální tkáň, cervikovaginální tekutině, rektu a mozkomíšním moku (Woollard a Kanmogne 2015).

MVC je substrátem P-glykoproteinu (P-gp / ABCB1) (Walker et al. 2005). Je metabolizován cytochromem CYP3A4 a CYP3A5. Eliminuje se ze 76 % stolicí a z 19-20 % močí (Woollard a Kanmogne 2015).

3.3.3. Toxicita

Terapie MVC způsobuje elevaci ALT (alaninaminotransferáza) a to až o 10 % i přesto není potřeba modifikace dávky, neboť klinické příznaky nejsou s tímto zvýšením spojovány. Byly hlášeny pouze běžné nežádoucí účinky: bolest hlavy, motání hlavy, nevolnost, průjem, infekce horních cest dýchacích, kašel, bolest břicha a další. Celková míra nežádoucích účinků vedoucích k přerušení léčby byla v provedených studiích nízká, což posiluje příznivý profil tohoto léčiva (Gilliam et al. 2010).

3.3.4. Lékové interakce

MVC je substrátem enzymu CYP3A4 a efluxního transportéru P-gp.

Při inhibici cytochromu CYP3A4 se MVC pomaleji metabolizuje a větší koncentrace léčiva zůstává v krvi. Aby nedošlo k rozvoji nežádoucích účinků, dávka MVC se snižuje na 150 mg dvakrát denně při současném podání s inhibitory CYP3A4 (inhibitory proteáz, itraconazol, klaritromycin). Induktory cytochromu CYP3A4 naopak zvyšují metabolizaci MVC, koncentrace léčiva v krvi se snižuje a může dojít k poddávkování pacienta. S induktory CYP3A4 (efavirenz, rifampin) je dávka zvýšena až na 600 mg dvakrát denně. Dávku není třeba upravovat při současném podávání s dalšími antiretrovirálními léčivy jako tenofovir (NRTI), nevirapin (NNRTI), enfuviritid (inhibitor fúze) nebo raltegravir (inhibitor integrázy). Mnoho antiretrovirálních léčiv jsou inhibitory nebo induktory cytochromu CYP3A4, a proto je nutné zohlednit tyto interakce v terapii (Gilliam et al. 2010).

Při podání MVC s inhibitory P-gp dojde ke snížení efluxní aktivity P-gp a tím k snadnějšímu prostupu MVC do organismu. Induktory P-gp naopak potencují jeho expresi a dochází k limitované absorpci, distribuci a rychlejší exkreci MVC z organismu (Abel et al. 2009). Mezi inhibitory P-gp patří například: azitromycin, ketokonazol, saquinavir, ritonavir, indinavir, grapefruitová šťáva,.. Mezi induktory P-gp řadíme: cyklosporin, karbamazepin, tipranavir nebo venlafaxin (Wessler et al.2013).

3.4. Přenos HIV z matky na dítě

Perinatální přenos HIV neboli přenos HIV z matky na dítě, znamená přenos viru HIV z infikované ženy na dítě během těhotenství, porodu nebo kojení prostřednictvím mateřského mléka.

Riziko perinatálního přenosu bez ART je 15-45 %. Toto riziko lze minimalizovat na méně než 5 % (Avert 2018), jestliže nemocná žena během těhotenství užívá antiretrovirální léčiva a následně je narozenému dítěti po dobu 4-6 týdnů preventivně podávána antiretrovirální terapie. Aby se minimalizoval přenos HIV během porodu, je naplánován císařský řez.

Mechanismus ochrany plodu není zcela objasněn. Avšak důležitou roli hraje snížení koncentrace viru v krvi matky, čímž se snižuje riziko transmise. Dále některá antiretrovirotika přestupují přes placentární bariéru a dostávají se do krevního oběhu plodu, kde přispívají k ochraně plodu před HIV infekcí, zejména pak v průběhu porodu. (AIDSinfo 2018).

Preferované režimy pro léčbu HIV pozitivních žen zahrnují kombinaci dvou NRTI (abakavir a lamivudin nebo tenofovir s emtricitabinem nebo lamivudinem) používaných v kombinaci s inhibitory proteáz (atazanavir, ritonavir, darunavir) nebo inhibitory integráz (dolutegravir, raltegravir) (AIDSinfo 2018). Maravirok v současné době nepatří mezi doporučená léčiva u těhotných, ale již byl podáván a jeví se jako poměrně bezpečné léčivo (Colbers et al. 2015).

3.5. Placenta

Placenta je dočasný komplexní orgán, který v průběhu těhotenství funguje jako plíce, střeva, ledviny a zároveň játra a zajišťuje tak všechny nezbytné funkce pro plod a tím podporuje normální růst a vývoj plodu (Burton a Jauniaux 2015). Placenta funguje jako bariéra, která zajišťuje výměnu živin a odpadních produktů mezi mateřským a plodovým krevním oběhem a současně chrání plod před přestupem cizorodých látek (včetně xenobiotik) a infekcí. Dále také uvolňuje hormony do mateřského i plodového oběhu, což ovlivňuje těhotenství, metabolismus, růst plodu, porod a další funkce (Gude et al. 2004).

Důležitou součástí placentární bariéry jsou lékové transportéry, které zajišťují prostup endogenních a exogenních látek přes biologické membrány. Transportéry jsou v placentě hojně exprimovány v syncytiotrofoblastu a endotelu plodových kapilár.

Můžeme je nalézt v apikální i bazální membráně těchto polarizovaných buněk, dle lokalizace mohou snižovat nebo zvyšovat koncentraci léčiv v mateřském nebo v plodovém krevním oběhu. Efluxní transportéry na apikální mikrovilózní membráně syncytiotrofoblastu (která je omývána mateřskou krví) chrání plod před expozicí xenobiotiky a usnadňují odchod odpadních látek, zatímco efluxní transportéry na bazolaterální straně napomáhají endogenním látkám prostoupit do plodové cirkulace (Vähäkangas a Myllyen 2009).

3.6. Membránové transportní proteiny

Transportní proteiny zprostředkovávají přechod různých endogenních, ale i exogenních látek přes buněčnou membránu. Dle aktuální nomenklatury se membránové transportéry dělí na dvě základní skupiny: (1) primárně aktivní ABC (ATP-binding cassette) transportéry a (2) sekundárně aktivní SLC transportní proteiny (solute carriers).

Znalost těchto transportérů, jejich substrátů, inhibitorů a induktorů je velice důležitá z hlediska lékových interakcí. Léky mohou navzájem soutěžit o vazbu na transportér, což vede k neočekávaným změnám koncentrace léku v krvi a možným toxickým vedlejším účinkům (Nigam 2014).

3.6.1. ABC efluxní lékové transportéry

ABC transportéry zprostředkovávají primárně aktivní transport látek, především xenobiotik a jejich metabolitů, za hydrolýzy ATP (Nigam 2014).

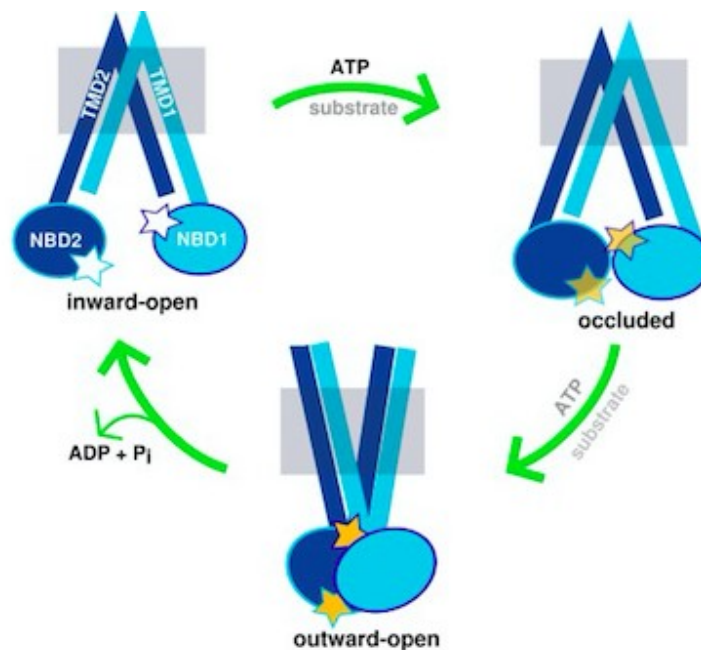
Dále je dělíme do 7 tříd, z nichž nejdůležitější jsou:

P-glykoprotein (MDR1, ABCB1), BCRP (breast cancer resistance protein, ABCG2) a MRPs (multidrug resistance-associated proteins, ABCCs) (Szakács et al. 2006). Tyto transportéry byly nejdříve nalezeny v nádorových buňkách, kde zprostředkovávají rezistenci vůči chemoterapeutikům, což má za následek selhání léčby. Následně bylo zjištěno, že se vyskytují fyziologicky v lidských tkáních a mají mnoho důležitých, především ochranných funkcí (Štefková et al. 2004).

Efluxní ABC transportéry zprostředkovávají buněčnou sekreci endogenních látek a xenobiotik ven z buněk a nalezneme je téměř ve všech eukaryotických buňkách (Morita a Imanaka 2012).

Všechny ABC transportéry mají podobnou strukturu. Skládají se z alespoň dvou NBDs (nucleotide-binding domains) a alespoň dvou TMDs (transmembrane domains)

(Lewinson a Livnat-Levanon 2017). Při transportu látek z jedné strany membrány na druhou dochází k vazbě substrátu na TMDs, poté dochází k vazbě a hydrolýze ATP na NBDs. To spustí řadu konformačních změn TMDs a přenos substrátu na druhou stranu membrány. Konformační změny TMD jsou spojeny se změnami NBDs, který dodává energii celému ději, neboť zprostředkovává vazbu a následnou hydrolýzu ATP (Obr. 5) (Szöllösi et al. 2018).



Obrázek 5: Transportní cyklus P-gp: Předpokládá se, že cyklus začíná, když je transportér otevřený do intracelulárních prostor buňky. Po navázání substrátu a ATP dochází k jeho uzavření a díky konformačním změnám řízených hydrolýzou ATP dochází k jeho otevření a uvolnění substrátu do extracelulárních prostor (převzato z: Condic-Jurkic et al. 2018).

3.6.1.1. P-glykoprotein (P-gp /ABCB1)

P-glykoprotein (P-gp) je hlavním a dosud nejlépe popsáním zástupcem B rodiny ABC transportérů. Identifikován byl v nádorových buňkách, fyziologicky je ale významně exprimován v tkáních jater, střev, ledvin, mozku, kardiovaskulárního systému a placenty. Role P-gp v lidském organismu spočívá v ochraně citlivých tkání (mozek, zárodečné buňky, plod) před potenciálně toxickými xenobiotiky včetně léčiv.

Je též schopný ovlivnit farmakokinetiku léčiv omezením absorpce a distribuce látek a urychlením jejich eliminace. Dokáže rozpoznat širokou škálu chemicky i strukturně rozdílných látek. Jeho substráty jsou většinou neutrální nebo kladně nabitě hydrofobní molekuly (Ceckova-Novotna et al. 2006).

Mezi známé substráty P-gp patří klaritromycin, doxycyklin, erytromycin, cisplatina, amitriptylin, ritonavir, saquinavir, nelfivirin, celiprolol, losartan a další.

Mezi inhibitory patří například azitromycin, erytromycin, sertralin, paroxetin, fluoxetin, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, cyklosporin A, takrolimus, sirolimus a další.

Mezi popsané induktory P-gp řadíme například abakavir, amiodaron, atorvastatin, cisplatinu nebo digoxin (Genovese et al. 2017).

3.6.1.2. MRP1 (Multidrug resistance protein 1)

MRP1 je prvním ze zástupců C rodiny ABCC transportérů a skládá se z 12 proteinů. Gen *ABCC1* se nachází na chromosomu 16p13.1 (Cole 2014), objeven byl poprvé v roce 1992 u buněk plicního karcinomu (Deeley a Cole 2005).

MRP1 přenáší širokou škálu látek od chemoterapeutik po fluorescenční barviva. Většinou se jedná o organické kyseliny s hydrofobními skupinami (Ehman et al. 2017).

Mezi substráty MRP1 transportéru patří organické anionty, konjugáty glutathionu, nukleotidová analoga a některá antiretrovirotika, například ritonavir a saquinavir (Vähäkangas a Myllyen 2009). Genetický polymorfismus genu *ABCC1* tak díky tomu může ovlivnit léčbu HIV (Yin a Zhang 2011).

Mezi inhibitory MRP1 řadíme například probenecid nebo cyklosporin A (Vähäkangas a Myllyen 2009).

3.6.1.3. Lokalizace MRP1 a P-glykoproteinu v organismu

P-gp je exprimován v apikální membráně polarizovaných buněk řady tkání, ve kterých svou efluxní aktivitou ovlivňuje absorpci, distribuci a eliminaci léčiv a jejich metabolitů do/z organismu. MRP1 plní podobnou funkci, nicméně dle typu tkáně může být lokalizován buď apikálně nebo bazolaterálně.

Střevní lumen: Na apikální straně enterocyty je lokalizován P-gp, který snižuje perorální absorpci léčiv do organismu, neboť transportuje látky z enterocyty zpět do střevního lumen. MRP1 je lokalizován na bazolaterální straně a transportuje substráty

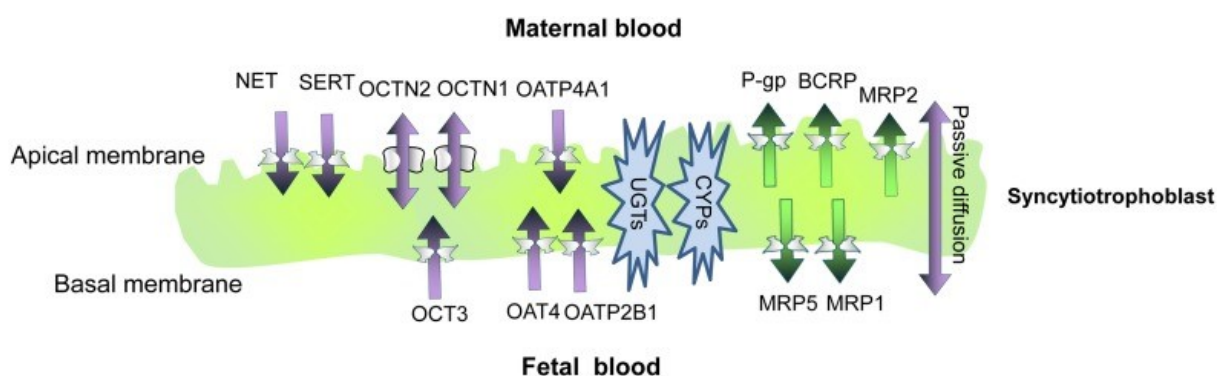
z enterocytu do krevního oběhu, a tím zvyšuje perorální biodostupnost (Gameiro et al 2017).

Hematoencefalická bariéra (BBB): Skládá se z monovrstvy endotelových buněk mozkových kapilár a na apikální i bazální straně jsou náhodně distribuovány různé transportéry včetně efluxních transportérů P-gp a MRP1. Oba jsou lokalizovány na apikální straně membrány mozkových endoteliálních buněk a minimalizují tak riziko toxických nežádoucích účinků léčiv, které by jinak pronikly do mozku. Snižují ale i distribuci léčiv, která jsou pro CNS prospěšná (Gameiro et al 2017).

Placenta: MRP1 je lokalizován na bazální straně trofoblastu a zlepšuje transport látek do krevního oběhu plodu, zatímco P-gp (apikální strana membrány) zvyšuje přenos látek z plodu do krevního oběhu matky a chrání plod před škodlivými látkami (Obr. 6) (Staud et al. 2012).

Játra: MRP1 je lokalizován na bazolaterální straně, transportuje endogenní látky a xenobiotika z hepatocytu do krve, a tyto látky jsou následně vylučovány močí. Transportéry lokalizované na apikální straně membrány jako je P-gp způsobují eflux látek do žluči (Gameiro et al 2017).

Ledviny: MRP1 je lokalizován na bazolaterální straně membrány proximálních tubulů ledvin a transportuje substráty zpět do krve. Na apikální straně membrány je P-gp, který sekretuje látky do moči a urychluje jejich eliminaci z organismu ven.



Obrázek 6: Lidská placentární bariéra. Hlavní transportní proteiny lokalizované v lidské placentě a jejich funkce (převzato z: Rubinchik-Stern a Eyal 2012).

3.6.2. SLC transportéry

SLC (solute carrier transporters) zprostředkovávají přenos látek přes membránu pomocí facilitované difuze nebo sekundárního aktivního transportu (symport, antiport)

(Liang et al. 2015). Do skupiny SLC transportérů řadíme širokou škálu transportérů (Nigam 2014). Pro tuto práci jsou důležité zejména OATP transportéry.

OATP (organic anion transporting polypeptides) patří mezi membránové transportéry zodpovědné za přenos endogenních i exogenních látek. Kódovány jsou pomocí SLCO genů. Celkem je 11 tříd OATP transportérů (Obr. 7). Mají poměrně homologní strukturu, která se skládá z dvanácti transmembránových proteinů a aminokyselinové sekvence (Wilson a Rb 2014).

<i>OATP</i>	<i>Gene name</i>	<i>Gene locus</i>	<i>Tissue distribution</i>
OATP1A2	<i>SLCO1A2</i>	12p12	Brain, kidney, liver, intestine
OATP1B1	<i>SLCO1B1</i>	12p12	Liver
OATP1B3	<i>SLCO1B3</i>	12p12	Liver
OATP1C1	<i>SLCO1C1</i>	12p12	Brain, testis, ciliary body
OATP2A1	<i>SLCO2A1</i>	3q21	Ubiquitous
OATP2B1	<i>SLCO2B1</i>	11q13	Liver, placenta, intestine, heart, skin
OATP3A1	<i>SLCO3A1</i>	15q26	Ubiquitous
OATP4A1	<i>SLCO4A1</i>	20q13.1	Ubiquitous
OATP4C1	<i>SLCO4C1</i>	5q21	Kidney
OATP5A1	<i>SLCO5A1</i>	8q13.1	Unknown
OATP6A1	<i>SLCO6A1</i>	5q21	Testis

Obrázek 7: Přehled lidských OATP transportérů, jejich lokalizace na chromozomu a výskyt v organismu (převzato z: Kalliokoski a Niemi 2009).

Mechanismus transportu substrátů OATP transportéry zůstává kontroverzní. Je dobře známo, že transport je nezávislý na ATP nebo sodíku, ale zatím je nejasné, co tyto transportéry využívají jako zdroj energie. OATP jsou schopny obousměrného transportu. Některé studie naznačují, že jednotlivé OATP mohou vyměňovat substrát za intracelulární bikarbonát, glutathion nebo glutathionové konjugáty. Mezi jednotlivými OATPs ale existují rozdíly, neboť transport zprostředkovaný OATP1B1 nebo OATP1B3 není ovlivněn glutathionem.

Transport zprostředkovaný OATP je také ovlivněný pH a mnohé studie ukazují, že v kyselém prostředí se aktivita těchto transportérů zvyšuje (Roth et al. 2012).

3.6.2.1. OATP1A2

První objevený transportér z třídy OATP transportérů byl právě OATP1A2. Je exprimován v řadě tkání, jako je například mozek, játra, ledviny a střevo. OATP1A2 ve střevě usnadňuje přestup substrátů do krevního oběhu (Kalliokoski a Niemi 2009). V játrech je lokalizován na bazolaterální straně membrány a napomáhá transportu substrátů z krve do hepatocytu. V ledvinách je exprimován na apikální straně membrány, kde je zodpovědný za reabsorpci xenobiotik z moči nebo naopak jejich eliminaci (Zhou et al. 2015).

OATP1A2 patří mezi transportéry se širokou substrátovou specifikou. Podílí se na transportu endogenních amfifilních substrátů, ale také xenobiotik. Mezi jeho endogenní substráty patří například žlučové kyseliny, steroidní hormony a hormony štítné žlázy. Mezi důležité léčivé substráty patří imatinib, fexofenadin, metotrexát, inhibitory HIV proteázy a statiny (Zhou et al. 2015).

Mezi inhibitory OATP1A2 patří saquinavir, lovastatin, verapamil, dexametazon, naloxon, flavonoidy, grapefruitová šťáva a hesperidin (Kalliokoski a Niemi 2009). Inhibice vede k rozvoji interakcí mezi léčivy (drug-drug reactions / DDI) nebo interakcemi mezi léky a potravinami (Zhou et al. 2015).

3.6.2.2. OATP1B3

Sekvence aminokyselin OATP1B3 vykazuje 80 % homologii s OATP1B1. V mnoha případech jsou si oba transportéry (OATP1B1 a OATP1B3) podobné (Kalliokoski a Niemi 2009). OATP1B3 je lokalizovaný na sinusoidální membráně hepatocytu a zprostředkovává influx mnoha endogenních a exogenních látek (Alam et al. 2018).

Mezi endogenní substráty patří žlučové kyseliny, bilirubin, konjugované steroidy, eikosanoidy a hormony štítné žlázy (Kalliokoski a Niemi 2009). Léčivé substráty OATP1B3 jsou například statiny, rifampicin, valsartan a olmesartan (Alam et al. 2018). Jako jediný OATP transportér lokalizovaný v játrech je schopný přenosu digoxinu, docetaxelu a paclitaxelu (Kalliokoski a Niemi 2009).

Mezi inhibitory tohoto transportéru řadíme gemfibrozil, ritonavir, rifampicin a cyklosporin A. Kombinace inhibitorů a substrátů (statiny) může způsobit klinicky závažné nežádoucí účinky, jako je myopatie (Alam et al. 2018).

3.6.2.3. OATP2B1

Tento transportér je široce lokalizován v celém těle. Nejvyšší výskyt je v játrech, kde je umístěný na bazolaterální straně hepatocytů a napomáhá transportu z krve do buněk. Exprese OATP2B1 byla také popsána na apikální membráně střevních epitelálních buněk, kde napomáhá vstřebávání látek (Roth et al. 2012). Dále na bazolaterální straně syncytiotrofoblastů v placentě, kde ve spolupráci s efluxním transportérem BCRP umožňuje přenos zejména sulfátových konjugátů a steroidních hormonů z plodu do krve matky (Grube et al. 2006). Mezi další tkáně exprimující OATP2B1 transportérem řadíme keratinocyty, myoepitelia prsní žlázy, srdce, kosterní sval a hematoencefalickou bariéru (Roth et al. 2012).

Mezi substráty OATP2B1 řadíme aliskiren, nandolol, steroidní hormony, statiny, fexofenadin (Yu et al. 2017). Inhibitory tohoto transportéru pak jsou cyklosporin, gemfibrozil, graperuitová šťáva (Kalliokoski a Niemi 2009).

3.7. Lékové interakce v placentě

Těhotné ženy v dnešní době užívají značné množství léčiv. Léčiva jsou podávána z důvodu léčby chronických onemocnění, jako je hypertenze, astma, epilepsie či HIV, ale i u akutních stavů. Polyterapeutické režimy mohou vyústit v lékové interakce (DDI), které mohou ovlivnit matku, dítě nebo oba. DDI mohou ovlivnit nejen placentární distribuci, ale ovlivňují i farmakokinetiku léčiv v celém organismu matky (Rubinchik-Stern a Eyal 2012).

Mnoho antiretrovirálních léčiv interaguje s různými lékovými transportéry a vzhledem ke kombinované léčbě je zde vysoké riziko rozvoje lékových interakcí, včetně ovlivnění placentární distribuce při léčbě HIV pozitivních žen. Příkladem mohou být ARV léčiva jako maravirok, ritonavir, saquinavir, nelfivirin, která jsou aktivně odčerpávána z plodové krve za pomoci P-gp a nemohou efektivně chránit plod před HIV infekcí. Induktory P-gp, které zvyšují jeho aktivitu na jednu stranu napomáhají v protekci plodu před škodlivými látkami, ale zároveň limitují prostupnost antiretrovirotik do krevního oběhu plodu a snižují tak jeho ochranu před HIV infekcí. (Iqbal et al. 2012). Inhibitory P-gp (amiodaron, sertralin, omeprazol, zelený čaj, česnek,..) naopak zvyšují přechod ARV léčiv z krve matky do plodu a potencují účinek antiretrovirální terapie, je však nutné zároveň znát bezpečnostní profil těchto léčiv (Rubinchik-Stern a Eyal 2012).

4. HYPOTÉZA

Antiretrovirální léčivo maravirok je popsáným substrátem lidského P-glykoproteinu (Tupova et al. 2019). Jak je uvedeno výše, tento transportér je mimo jiné lokalizován na apikální membráně placentárního trofoblastu, kde plní protektivní úlohu vůči plodu tím, že limituje přestup xenobiotik z mateřské krve přes placentární bariéru. Nedávná data získaná během uzavřené duální perfúze maraviroku přes lidský placentární kotyledon však naznačují, že vliv P-glykoproteinu je umenšen zapojením dalších placentárních lékových transportérů, které působí v opačném směru a pravděpodobně pomáhají transportovat maravirok do placentární tkáně.

5. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo pomocí *in vitro* studií na buněčných kulturách zjistit, zda je maravirok substrátem dalších placentárních transportérů, kromě P-glykoproteinu.

Konkrétní dílčí cíle byly následující:

1. Provedení studie akumulace a transportu maraviroku přes monovrstvu BeWo buněk jako *in vitro* modelu lidského trofoblastu
2. Provedení transportní studie přes monovrstvu MDCKII-MRP1 buněk pro zjištění, zda je maravirok substrátem lidského MRP1
3. Provedení akumulčních studií na A431 buněčných liniích transfekovaných pro expresi lidských OATP transportérů 1A2, 1B3 a 2B1 za účelem zjištění, zda jsou tyto schopné přenášet maravirok přes buněčnou membránu.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1. MATERIÁL

6.1.1. Buňky

- **BeWo (klon b30)** – Patří mezi lidské nádorové buňky získané z choriokarcinomu lidské placenty, sloužící jako celulární model placentární bariéry. Buňky byly poskytnuty z laboratoře prof. Christiane Albrecht (University of Bern, Švýcarsko) s povolením od prof. Alana Schwartze (Washington University, USA).
- **Madine Darby Canine Kidney II** (MDCK II parentní sloužily jako kontrolní linie) a exprimující lidský MRP1 (MDCKII-MRP1), byly použity pro studium přímé interakce maraviroku s lidským MRP1 transportérem. Buňky byly poskytnuty od prof. Alfreda Schinkela (The Netherland Cancer Institute, Nizozemí).
- **Buňky A431** – Buňky získané z lidského epidermálního karcinomu. Pro experiment byly použity buňky exprimující lidské OATP1B3, OATP1A2 a OATP2B1 transportéry. Buňky byly poskytnuty z laboratoře Dr. Csilly Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Maďarsko).

6.1.2. Chemikálie a činidla

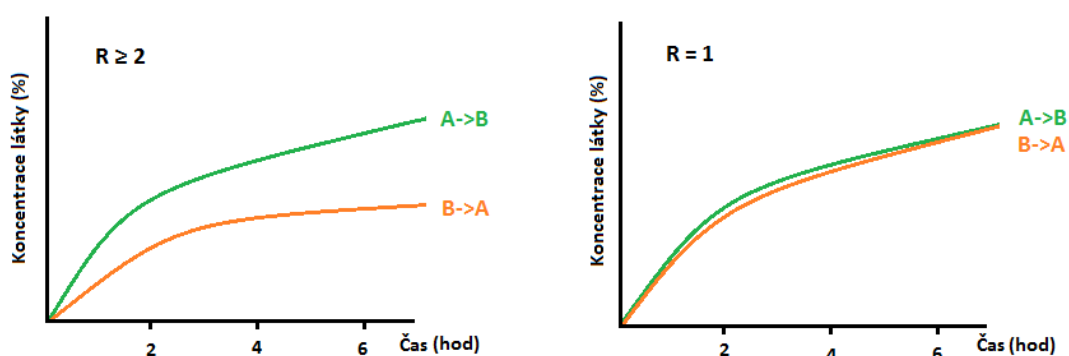
- [³H]-maravirok (M.G.P. spol. s.r.o.)
- Opti-Mem® (Lonza)
- Phosphate Saline Buffer (Lonza)
- Dodecyl síran sodný (Sigma Aldrich)
- Kolagen z lidské placenty (Sigma Aldrich)
- GF120918 (Scintila)
- MK-571 (Scintila)
- Ritonavir (Scintila)
- Zosuquidar hydrochloride (Scintila)
- Cyklosporin A (Sigma Aldrich)
- Rifampicin (Sigma Aldrich)
- Atazanavir (Scintila)
- Sulfasalazin (Sigma Aldrich)
- 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES, Sigma Aldrich)

- 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES, Sigma Aldrich)

6.2. Obousměrný transport maraviroku přes monovrstvu BeWo (b30) a MDCKII-MRP1 buněk

6.2.1. Princip

Lipofilní léčiva v neionizovaném stavu jsou v lidském organismu přenášena převážně pasivní difuzí ve směru koncentračního gradientu. Pokud je léčivo současně substrátem lékového transportéru, může být za spotřeby energie přenášeno i proti koncentračnímu gradientu. V tomto experimentu byla využita metoda obousměrného transportu (bidirectional transport). Maravirok byl přidán na apikální nebo na bazální stranu a porovnávali jsme míru přestupu ve směru A->B ku směru B->A. Pokud je látka substrátem efluxního transportéru na straně bazální nebo influxního transportéru na straně apikální, bude silnější transport ve směru A->B a naopak (Obr. 8).



Obrázek 8: Grafické znázornění transportu léčiva při využití metody obousměrného transportu. Na obrázku vlevo je transport v jednom směru mohutnější než ve druhém, léčivo je tedy pravděpodobně substrátem některého z lékových transportérů. Na obrázku vpravo jsou transporty A->B a B->A vyrovnány. Přenos léčiva přes monovrstvu buněk probíhá pouze pasivní difuzí.

6.2.2. Postup experimentu

BeWo (b30) buňky – Pokus byl prováděn na destičce Transwell (Costar Corning® 3401) o 12-ti jamkách. Každá jamka je rozdělena na 2 kompartmenty pomocí polopropustné polykarbonátové membrány s velikostí pórů 0,4 μm a tloušťkou membrány 10 μm . Pro lepší přilnavost BeWo (b30) buněk byla membrána před experimentem potažena vrstvou placentárního kolagenu o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Buňky byly nasazeny v hustotě 112 000 buněk na jamku a kultivovány v Dulbecco's

Modified Eagle's Medium (DMEM) obsahující 10 % fetal bovine serum (FBS) při teplotě 37°C po dobu 6 dní (včetně dne nasazení). Každý den bylo měněno čerstvé médium. V den pokusu byla pro kontrolu integrity buněčné monovrstvy měřena hodnota transepiteliární elektrické rezistence (TEER). Tolerované hodnoty byly v rozmezí 80 - 110 Ω/cm^2 . Následně bylo odsáto medium, buňky byly opláchnuty roztokem PBS (37°C) a poté byly na každou stranu jamky napipetovány preinkubační roztoky o objemu 750 μl , které obsahovaly různé inhibitory nebo čistý opti-MEM. Preinkubace trvala 10 minut. Pokus byl zahájen odsátím preinkubačních roztoků a přidáním roztoku s radioaktivně značeným maravirokem (^3H)-MVC 0,2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 65 nM) a to buď na stranu apikální, nebo bazální. Následně byly odebrány vzorky (50 μl) z protilehlé strany v čase 1, 2 a 4 hod.

- Použité inhibitory a jejich koncentrace:

- GF 2 μM
- Ritonavir 10 μM
- MK-571 50 μM

Buňky MDCKII-MRP1 a parentní – Pokus byl prováděn na destičce Transwell (Costar Corning® 3402) o 12-ti jamkách s polopropustnou polykarbonátovou membránou s velikostí pórů 3 μm a tloušťkou membrány 10 μm . Buňky byly nasezeny v hustotě 750 000 buněk na jamku a kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) obsahující 10 % fetal bovine serum (FBS) při teplotě 37°C po dobu 4 dní, včetně dne nasazení. Buňkám bylo každý den vyměňováno medium. Postup experimentu byl stejný, jako u BeWo (b30) buněk. Odběr vzorku následoval v časovém intervalu a to po 2, 4 a 6 hodinách.

- Použité inhibitory a jejich koncentrace:

- MK-571 50 μM
- Ritonavir 10 μM
- Zosuquidar (LY-335979) 2 μM

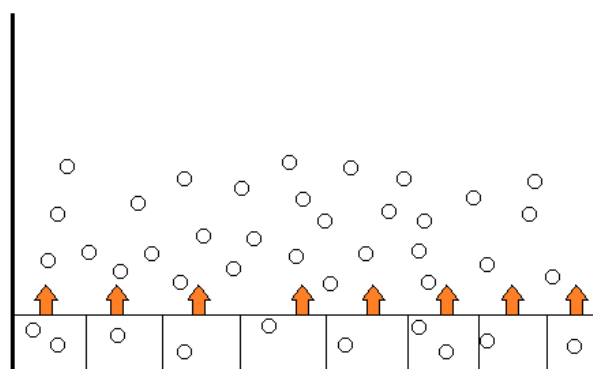
Míra transportu byla vyjádřena v procentech, kdy naměřené hodnoty v jednotlivých časových intervalech byly vztaženy k iniciální koncentraci ^3H)-MVC v pracovním roztoku. Transportní poměr R byl spočítán jako podíl koncentrací naměřených

v jednotlivých kompartmentech v čase posledního odběru, $R = c_{B/A}/c_{A/B}$. Radioaktivita byla měřena po přidání scintilačního roztoku Ultima Gold-LSC Coctail (Sigma Aldrich) pomocí přístroje Tri Carb 2009 TR Perkin Elmer.

6.3. Akumulační studie

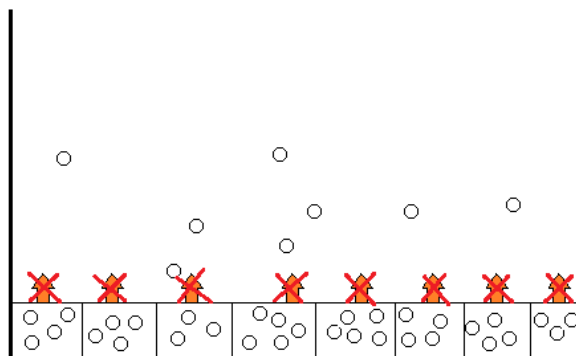
6.3.1. Princip

Akumulační studie popisuje tendenci léčiva kumulovat se uvnitř buňky. Jestliže je léčivo substrátem efluxního transportéru (např. MRP1), je léčivo aktivně odčerpáváno ven z buňky a jeho koncentrace uvnitř buňky je nízká (Obr. 9). Po inhibici tohoto efluxního transportéru, není možné látku aktivně transportovat ven a její koncentrace v buňce se zvýší (Obr. 10).



- Lipofilní léčivo
- ↑ Efluxní transportér

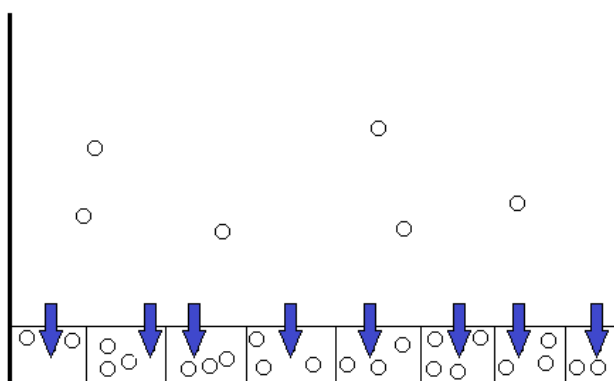
Obrázek 9: Znázornění principu akumulace léčiva v buňkách. Koncentrace léčiva v buňkách je nízká, protože efluxní transportér odčerpává léčivo ven z buňky.



- Lipofilní léčivo
- ↑ Efluxní transportér
- ✗ Inhibitor

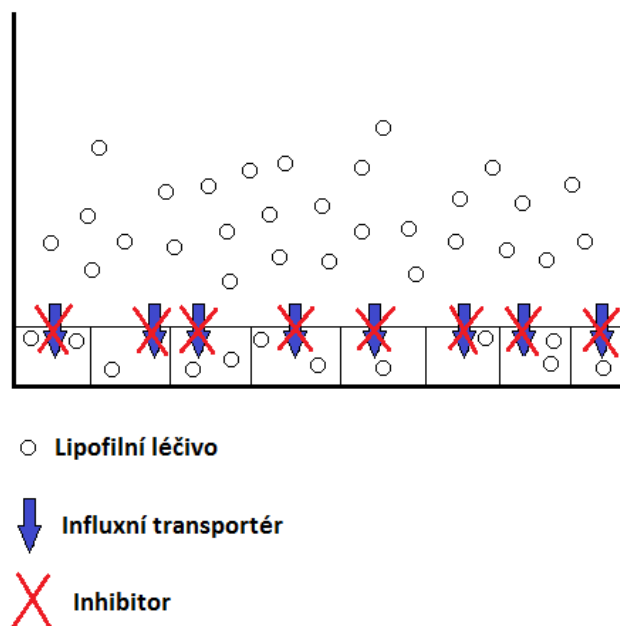
Obrázek 10: Po přidání inhibitoru dochází k zablokování efluxního transportéru. Léčivo není aktivně transportováno z buňky ven a kumuluje se uvnitř buněk.

Jestliže je léčivo substrátem influxního transportéru (např. OATP), dochází k posílenému transportu léčiva dovnitř buňky a jeho koncentrace v buňkách se zvyšuje (Obr. 11). Po inhibici influxního transportéru dochází k zablokování transportu a léčivo proniká do buněk ve snížené míře (Obr. 12).



- Lipofilní léčivo
- ↓ Influxní transportér

Obrázek 11: Koncentrace léčiva v buňkách je vysoká, protože influxní transportér přispívá k transportu léčiva dovnitř buňky.



Obrázek 12: Po přidání inhibitoru dochází k zablokování influxu léčiva dovnitř buněk. Koncentrace léčiva v buňkách je poté nižší.

6.3.2. Postup experimentu

Akumulační studie byly prováděny s BeWo (b30) a A431-OATP1A2, -1B3 a -2B1 buněčnými liniemi. Buňky byly nasazeny na 24 jamkovou destičku (TPP®) v hustotě 300 000 buněk na jamku a kultivovány po dobu 24 hodin v DMEM obsahující 10 % FBS při teplotě 37°C. V den experimentu bylo z jamek odsáto médium a buňky byly opláchnuty pomocí PBS o teplotě 37°C. Následně byly napipetovány preinkubační roztoky o objemu 250 μ l s inhibitory, popřípadě čistý Opti-MEM. Preinkubace trvala 10 minut. Po odsátí preinkubačních roztoků byl zahájen experiment přidáním roztoku [³H]-MVC (65 nM). Akumulace trvala 30 minut a byla ukončena odsátím roztoků a dvojitým oplachem buněk ledovým PBS. Do jamek bylo přidáno 250 μ l 0,02 % SDS pro lýzu buněk.

V případě A431 buněk exprimujících lidské OATP1A2, OATP1B3, OATP2B1 byl místo Opti-MEM jako pracovní roztok použit pufr o následujícím složení:

- 125 mM NaCl
- 4,5 mM KCl
- 1,2 mM CaCl₂
- 1,2 mM KH₂PO₄
- 12 mM MgSO₄
- 5,6 mM D-glukóza

- 1 M HEPES

Radioaktivita byla měřena pomocí přístroje Tri Carb 2009 TR Perkin Elmer po přidání scintilačního roztoku Ultima Gold-LSC Coctail (Sigma Aldrich) a naměřená koncentrace maraviroku byla standardizována na protein.

- Použité inhibitory a jejich koncentrace:
 - GF (2 μ M)
 - Zosuquidar (2 μ M)
 - MK-571 (50 μ M)
 - Ritonavir (10 μ M)
 - Maravirok (100 μ M)
 - L-karnitin (1 mM)
 - Verapamil (100 mM)

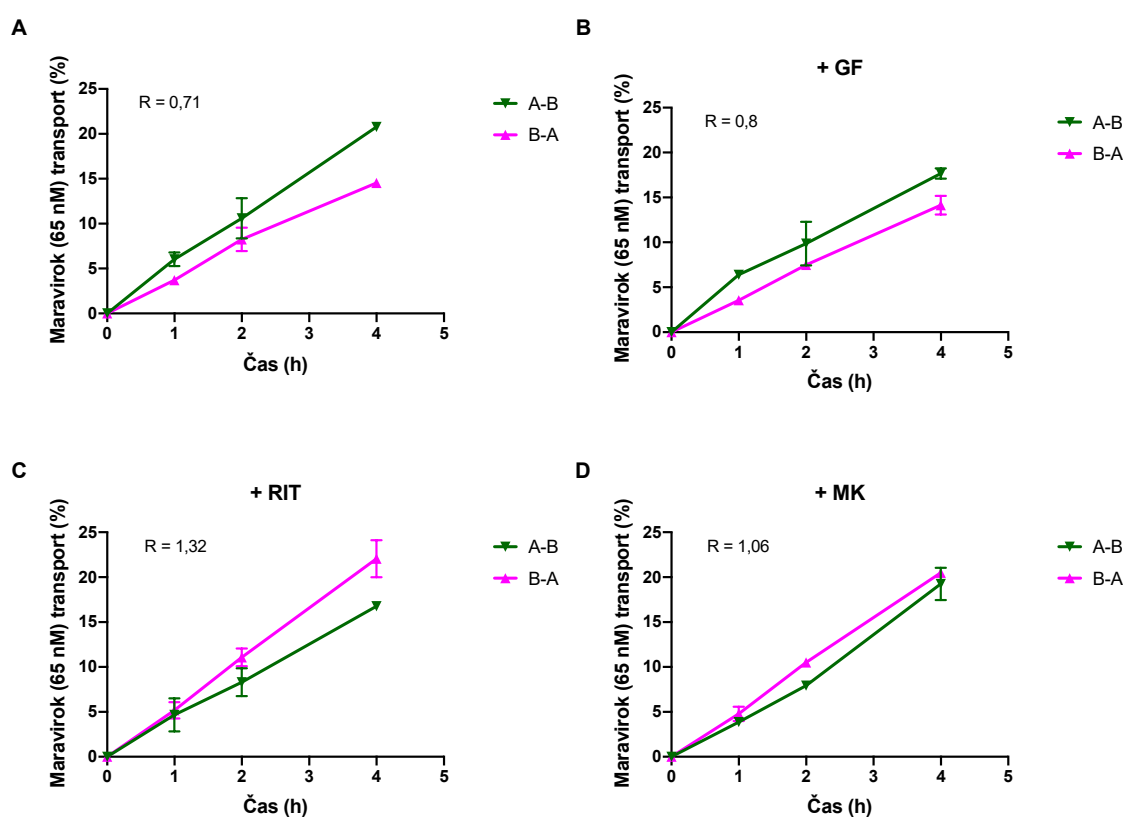
6.4. Statistická analýza

Získaná data z transportních i akumulčních experimentů byla statisticky vyhodnocena a grafy byly generovány za použití softwaru GraphPad Prism verze 7.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Hodnoty P byly vypočteny jednosměrným ANOVA nebo parametrickým t-testem a považovány za statisticky významné, pokud $P < 0,05$

7. VÝSLEDKY

7.1. Transportní studie - BeWo b30 buňky

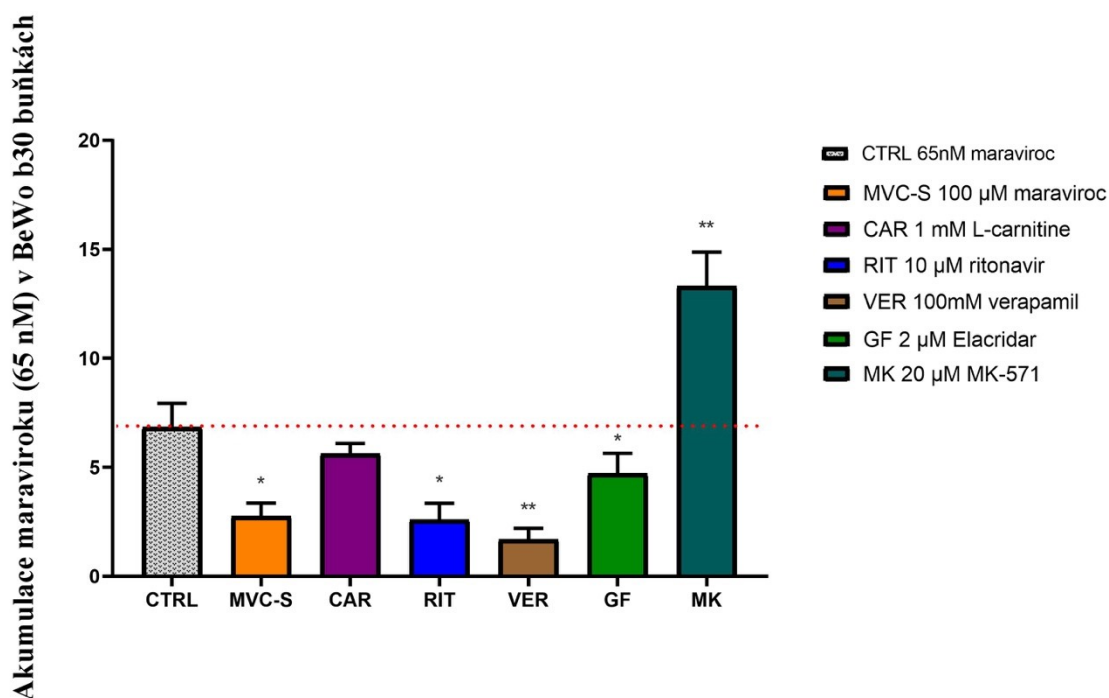
Transport maraviroku přes monovrstvu BeWo (b30) buněk je zvýšen ve směru A->B oproti směru B->A, což naznačuje interakci maraviroku s lékovým transportérem (transportní poměr $R = 0,71$) (A). Po přidání GF nebyl transport maraviroku téměř ovlivněn (transportní poměr $R = 0,8$) (B). Při přidání ritonaviru došlo k převrácení transportu maraviroku ve prospěch směru B->A ($R = 1,32$) (C). MK-571 též ovlivnil transport maraviroku a došlo k vyrovnání transportů A->B a B->A ($R = 1,06$) (D) (Obr. 13).



Obrázek 13: Grafické znázornění transportu maraviroku přes buněčnou monovrstvu BeWo buněk. (A) transport maraviroku je zvýšen ve směru A->B, $R = 0,71$. (B) Přidání GF (GF, 2 μM) nemělo efekt na transport maraviroku, $R = 0,8$ (C) Ritonavir (RIT, 10 μM) zvýšil přestup maraviroku ve směru B->A a snížil A->B, $R = 1,32$ (D) Přidáním inhibitoru MK-571 (MK, 50 μM) došlo k vyrovnání transportů A->B a B->A, $R = 1,06$. Data jsou znázorněna jako průměr \pm SD nejméně tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátu.

7.2. Akumulační studie – BeWo b30 buňky

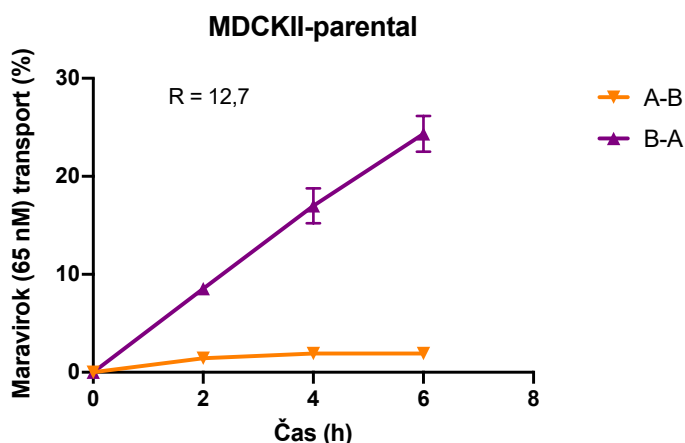
Akumulační studie s maraviroem na BeWo buněčné linii odhalila významné zvýšení koncentrace maraviroku v buňkách při použití MRP inhibitoru MK-571, což svědčí pro inhibici efluxu tohoto antivirotika, pravděpodobně MRP mechanismem. V přítomnosti inhibitorů RIT (10 μ M), VER (100 μ M) a GF (2 μ M) došlo k signifikantnímu snížení akumulace maraviroku v buňkách, což odpovídá inhibici naopak influxního mechanismu transportu. Vysoká (předpokládaná saturační) koncentrace maraviroku (100 μ M), pak prokázala stejný efekt jako tyto inhibitory, což svědčí pro aktivní uptake maraviroku do buněk (Obr. 14). V přítomnosti CAR (1 mM) naopak nedošlo k žádné změně v akumulaci maraviroku v BeWo buňkách, což naznačuje, že maravirok není substrátem transportu pro karnitin a nedochází tak na něm k interakci s tímto esenciálním faktorem pro oxidaci mastných kyselin.



Obrázek 14: Akumulační studie a změna koncentrace maraviroku za přítomnosti jednotlivých inhibitorů (viz legenda). Data jsou znázorněna jako průměr \pm SD nejméně tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátu. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA test.

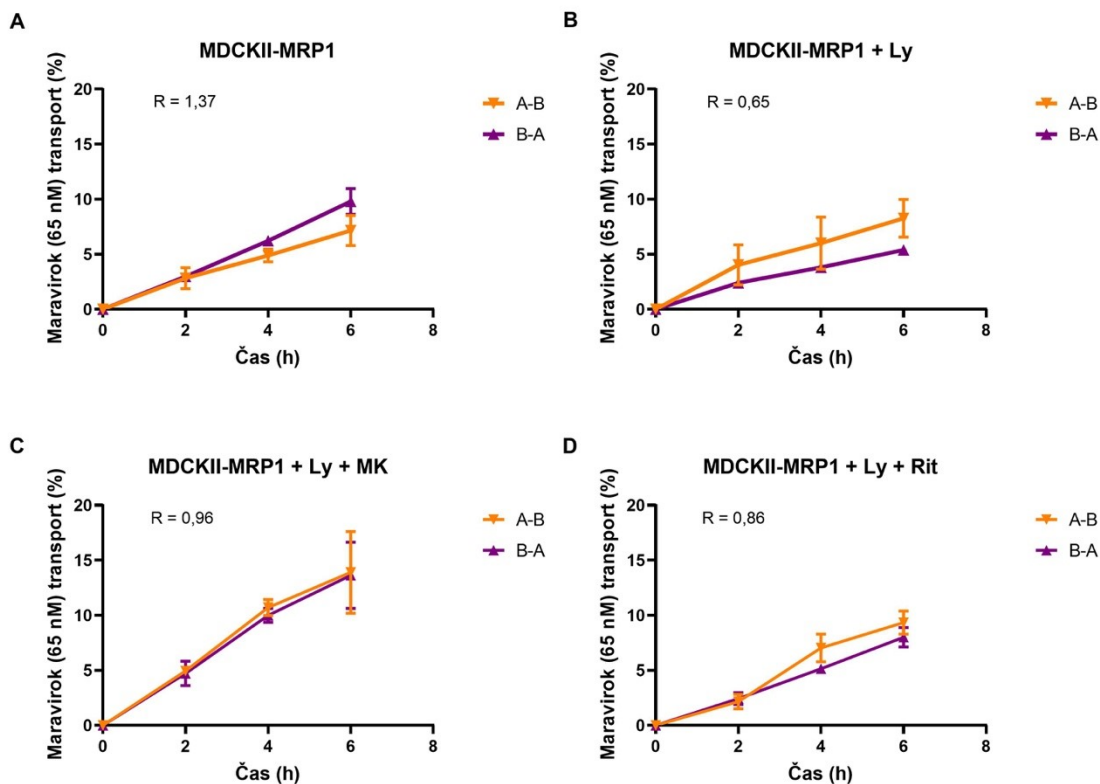
7.3. Transportní studie - MDCKII – MRP1 buňky

V případě MDCKII-parentní linie je maravirok vlivem afinity k endogennímu psímu P-gp transportován zejména ve směru B->A (transportní poměr $R = 12,7$) (Obr. 15).



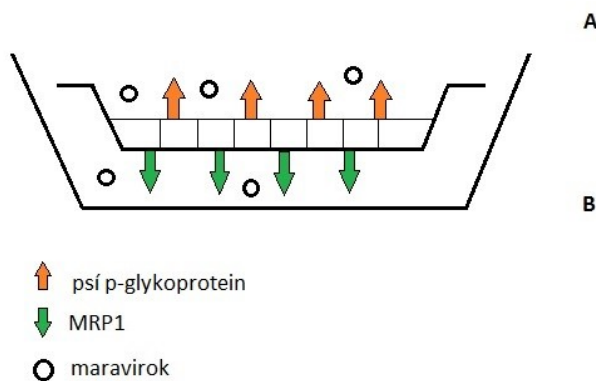
Obrázek 15: Grafické znázornění přenosu maraviroku přes buněčnou monovrstvu MDCKII parentních buněk. Data jsou znázorněna jako průměr \pm SD nejméně tři nezávislých experimentů prováděných v triplicátu.

Při porovnání s parentní linií, vzrostl transport maraviroku ve směru A->B při transportu přes monovrstvu buněk MDCKII-MRP1 ($R = 1,37$) (A). Přidáním zosuquidaru, který inhibuje endogenní psí P-gp v MDCKII buňkách došlo k posílení transportu ve směru A->B ($R = 0,65$), což odpovídá efluxní aktivitě MRP1 exprimovaného na bazolaterální membráně těchto buněk (B). Po přidání inhibitoru MK-571, který inhibuje MRP1 transportér došlo ke srovnání transportů v obou směrech a velikost transportu A->B a B->A je rovna přibližně jedné ($R = 0,96$) (C). V případě kombinace zosuquidaru a dalšího MRP1 inhibitoru ritonaviru jsme dosáhli podobných výsledků ($R = 0,86$) (D) (Obr. 16).



Obrázek 16: Grafické znázornění přenosu maraviroku přes buněčnou monovrstvu MDCKII-MRP1 buněk: (A) Transport ve směru A->B je výrazně vyšší oproti parentním buňkám (obr. 15) avšak maskován vnitřní aktivitou psiho P-gp, hodnota $R = 1,37$. (B) Po inhibici endogenního psiho P-gp zosuquidarem (LY, $2 \mu\text{M}$) došlo ke snížení transportu ve směru B->A a prohloubení převahy směru A->B, $R = 0,65$. (C) Inhibicí MRP1 pomocí inhibitoru MK-571 (MK, $50 \mu\text{M}$) došlo k vyrovnání transportu, $R = 0,96$. (D) Ritonavir (RIT, $10 \mu\text{M}$), inhibující také MRP1 transportér, způsobil též vyrovnání transportů v obou směrech, $R = 0,86$. Data jsou znázorněna jako průměr \pm SD nejméně tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátu.

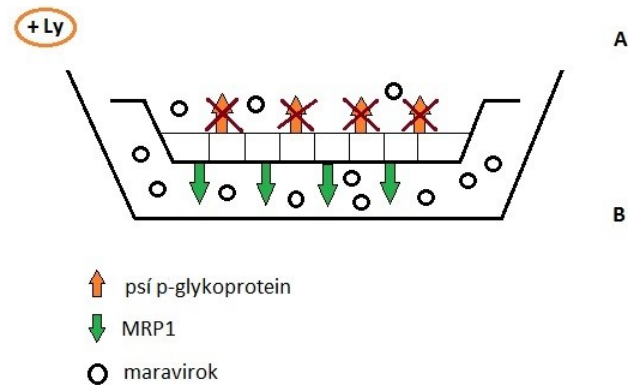
Transport maraviroku v MDCKII-MRP1 buňkách (Obr. 17).



Obrázek 17: Schematický transport maraviroku přes monovrstvu MDCKII-MRP1 buněk, bez přítomnosti inhibitorů. Transport v obou směrech je téměř vyrovnaný, díky

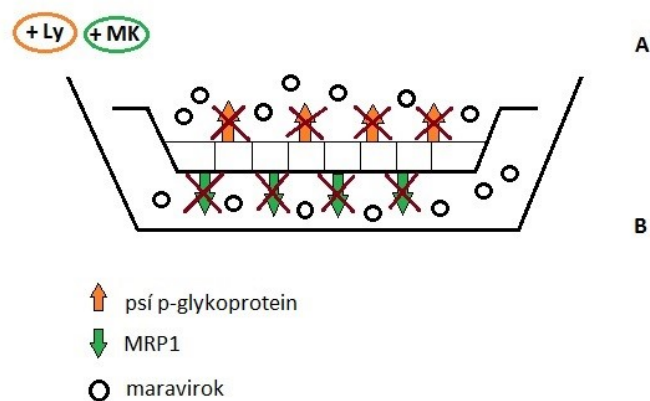
afinitě maraviroku k lidskému MRP1 na bazální straně a endogennímu psímu P-gp na straně apikální.

Po přidání inhibitoru zosuquidar (LY) došlo k inhibici efluxu prostřednictvím endogenního psího P-glykoproteinu na straně apikální. Koncentrace maraviroku na straně bazolaterální vzrostla vlivem aktivity lidského MRP1 (Obr. 18).



Obrázek 18: Transport maraviroku přes monovrstvu MDCKII-MRP1 buněk v přítomnosti inhibitoru LY.

Po přidání dalšího inhibitoru MK-571, který inhibuje transportér MRP1, došlo k vyrovnání koncentrace maraviroku na obou stranách, protože maravirok může přecházet přes buňky pouze pasivní difuzí (Obr. 19).



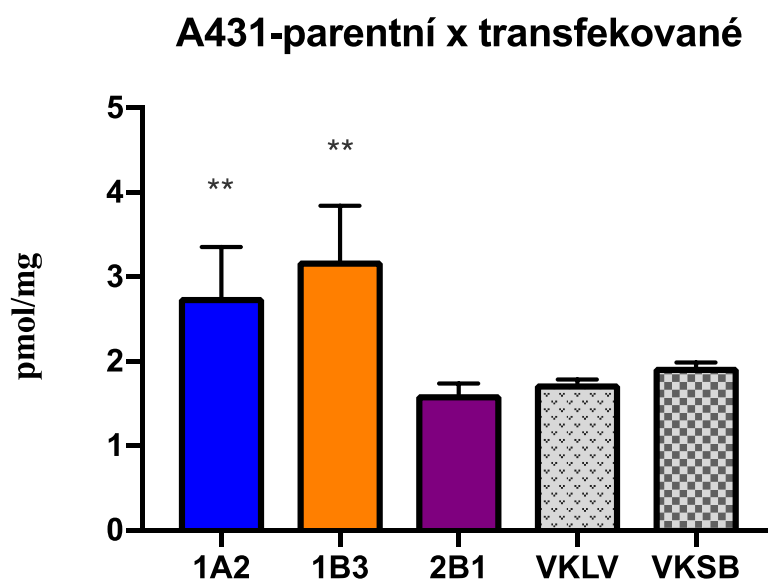
Obrázek 19: Transport maraviroku přes monovrstvu MDCKII-MRP1 v přítomnosti LY a MK-571

Na základě získaných výsledků usuzujeme, že maravirok by mohl být potenciálním substrátem lidského MRP1 transportéru.

7.4. Akumulační studie - OATP-A431 buňky

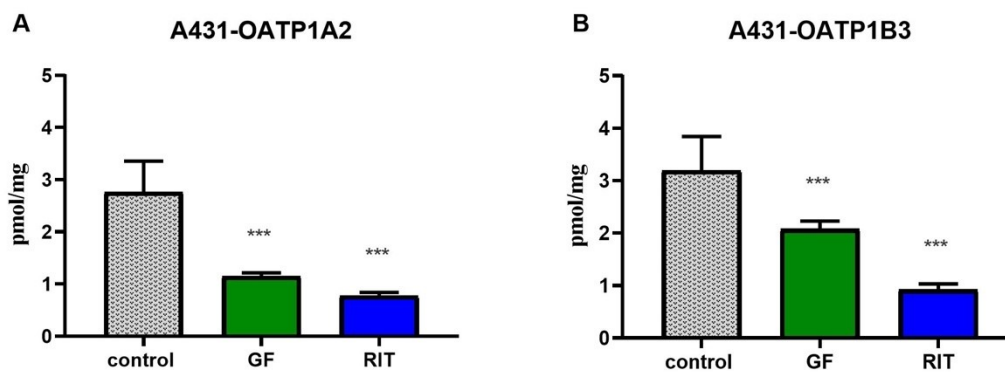
Na buňkách OATP-A431 jsme chtěli zjistit další možné transportéry, kterými by mohl být maravirok transportován, neboť víme, že je substrátem pro OATP1B1 (Kimoto et al 2019).

Na obr. 20 je vidět porovnání akumulace maraviroku v parentních a transfekovaných buňkách. Kontrolní linií pro buňky OATP1A2 a OATP1B3 jsou buňky VKLV. Zde je pozorována signifikantně vyšší akumulace maraviroku v transfekovaných buňkách. Je tedy velmi pravděpodobné, že maravirok bude substrátem OATP1A2 a OATP1B3 buněk. Kontrolní linií pro OATP2B1 jsou VKSB buňky. Při porovnání akumulace maraviroku v těchto parentních a transfekovaných buňkách zde není signifikantní rozdíl v akumulaci, a proto je pravděpodobné, že maravirok není substrátem OATP2B1 (Obr. 20).



Obrázek 20: Akumulace maraviroku v parentních a transfekovaných A431 buňkách. Data jsou znázorněna jako průměr \pm SD nejméně tří nezávislých experimentů prováděných v triplicátu. ** $p < 0,01$, t-test vždy k relevantní kontrolní buněčné linii.

Při pokusu s A431-OATP1A2 buňkami jsme po inhibici GF (GF, 2 μ M) a ritonavirem (RIT, 10 μ M) viděli signifikantní snížení v intracelulární koncentraci maraviroku, což naznačuje, že oba tyto inhibitory blokují činnost OATP1A2 (A). Při použití A431-OATP1B3 buněk jsme pozorovali podobné výsledky (B). (Obr. 21).



Obrázek 21: Akumulační studie s A431 buňkami exprimující jednotlivé OATP transportéry. (A) Inhibicí OATP1A2 transportéru pomocí GF a ritonaviru došlo ke snížení koncentrace maraviroku v buňkách. (B) Inhibicí OATP1B3 transportéru pomocí GF a ritonaviru došlo ke snížení koncentrace maraviroku. Data jsou znázorněna jako průměr±SD nejméně tří nezávislých experimentů prováděných v triplikátu. *** $p < 0,001$, t-test.

8. DISKUZE

Maravirok je antiretrovirotikum, patřící do kategorie inhibitorů vstupu HIV viru do buňky. Je metabolizován cytochromy CYP3A4 a CYP3A5 (Woollard a Kanmogne 2015) a je potvrzeným substrátem P-gp a OATP1B1 transportérů (Siccardi et al. 2010). Studie vyhodnocující *in vitro* data prostřednictvím farmakokinetického modelování naznačují, že vzájemné interakce maraviroku s dalšími substráty, induktory či inhibitory těchto enzymů a transportérů mohou být významné i *in vivo* (Kimoto et al 2019). Vzhledem k faktu, že maravirok je pro léčbu HIV používán vždy jako součást cART (van Lelyveld et al. 2015) a zároveň lze očekávat jeho sklon k lékovým interakcím, mohou být nové informace přispívající k širšímu pochopení farmakokinetiky maraviroku přínosné pro bezpečnější léčbu. V současné době je maravirok jediný antagonist CCR5 receptoru, který je schválený FDA pro léčbu dospělých pacientů s předchozí neúspěšnou antiretrovirální terapií (AIDSinfo 2019) a také pro léčbu dětí starších dvou let (Giaquinto et al. 2018). V několika případech byl maravirok použit též u těhotných žen k prevenci přenosu infekce na vyvíjející se plod. Narozené děti byly zdravé a ve většině případů HIV negativní, tudíž se zdá, že maravirok by mohl být vhodným a bezpečným kandidátem pro tuto indikaci (Colbers et al. 2015). Nicméně přestup maraviroku přes placentární bariéru není stále zcela pochopen. Poměr hladiny maraviroku naměřený po porodu v pupečnickové krvi plodu a matky je průměrně 0,33 (Colbers et al. 2015), což by mohlo naznačovat zapojení P-gp, který je lokalizován též na apikální straně trofoblastu placentární bariéry (Ceckova-Novotna et al. 2006). Data získaná z nedávné studie uzavřené duální perfúze maraviroku přes lidský placentární kotyledon ukazují, že maravirok je pravděpodobně transportován v placentě i dalšími transportéry, pravděpodobně lokalizovanými v opačném směru než P-gp (nepublikovaná data). V této práci jsme se pokusili některé z těchto transportérů identifikovat *in vitro*.

Jako první buněčný model byla použita buněčná linie BeWo (b30), která je odvozená od choriokarcinomu lidské placenty a slouží jako častý *in vitro* model pro studii placentární bariéry. Protože tato linie neexprimuje P-gp, je vhodným nástrojem pro studium maraviroku, neboť P-gp neruší jeho transport. Transportní studie přes monovrstvu BeWo b30 buněk odhalily zvýšený transport maraviroku ve směru A->B oproti směru B->A ($R = 0,71$), což odpovídá hypotéze o zapojení transportních

mechanismů pracujících v opačném směru oproti P-gp. Po přidání inhibitoru MK-571, který blokuje aktivitu bazálně lokalizovaného efluxního transportéru MRP1, (Tivnan et al. 2015) došlo ke snížení transportu maraviroku ve směru A->B a transportní poměr na konci pokusů se blížil jedné ($R = 1,06$). Po přidání inhibitoru ritonaviru, došlo opět ke snížení transportu ve směru A->B, ale též k výraznějšímu zvýšení ve směru B->A s transportním poměrem $R = 1,32$. Tyto výsledky naznačují možné zapojení MRP1. Toto je zcela nová informace, v žádné z předchozích prací zabývajících se transmembránovým přenosem maraviroku a možným zapojením transportních proteinů, nebyl MRP1 jako transportér s afinitou k maraviroku uvažován. Poslední použitý inhibitor GF nijak významně neovlivnil transport maraviroku přes monovrstvu BeWo (b30) buněk ($R = 0,8$).

Transportní studie byly dále doplněny o akumulační studie na BeWo (b30) buňkách. Signifikantně zvýšená akumulace maraviroku v přítomnosti MK-571 opět naznačila pravděpodobné zapojení MRP1. Avšak v přítomnosti ritonaviru byla akumulace maraviroku překvapivě snížena. Stejný efekt byl pozorován v přítomnosti GF a verapamilu. Jelikož verapamil slouží mimo jiné i jako modelový inhibitor influxních transportérů OCTN1 a 2 také přítomných v placentě (Bai et al. 2017), byla následně hodnocena akumulace maraviroku v přítomnosti L-karnitinu. Protože nebyla pozorována žádná změna, byl vliv těchto transportérů na akumulaci maraviroku vyloučen. Vysoká koncentrace neznačeného maraviroku pak opět vedla ke snížené akumulaci značeného izotopu. Tento výsledek opět potvrzuje zapojení zatím nedefinovaného influxního transportéru v akumulaci maraviroku. Navíc lze usuzovat, že tento transportér/transportéry hraje v tomto případě důležitější roli než výše zmíněný efluxní transportér MRP1, resp. maravirok k němu pravděpodobně vykazuje i vyšší afinitu.

Data získaná o transportu maraviroku na buněčné linii BeWo (b30) jasně prokazují, že maravirok interaguje na *in vitro* placentárním modelu s dalšími transportéry. Jelikož BeWo buňky exprimují celou řadu lidských transportérů (Ceckova et al. 2006, Ikeda et al. 2011, Mani et al. 1998, Rytting a Adus 2007), bylo nutné doplnit studii o experimenty na dalších buněčných liniích, exprimujících konkrétní lidské transportéry.

Pro studium interakce maraviroku s MRP1 byly zvoleny buňky MDCKII-parentní a MDCKII exprimující lidský MRP1. Komplikací této buněčné linie je potvrzená silná interakce maraviroku s endogenním psím P-gp (Tupova et al. 2019).

Tato interakce vede k silné asymetrii na parentní linii ve prospěch B->A směru při transportu maraviroku, což jsme potvrdili i v naší studii ($R = 12,7$). Po srovnání s transportem maraviroku přes monovrstvu MDCKII-MRP1 buněk, kde byl B->A transport výrazně snížen a A->B transport naopak zvýšen s finálním $R = 1,37$, můžeme usuzovat, že maravirok je skutečně substrátem lidského MRP1. Navíc tento efekt byl dále prohlouben v přítomnosti inhibitoru P-gp zosuquidaru ($R = 0,65$) a transport v obou směrech byl roven přibližně jedné v přítomnosti různých inhibitorů MRP1 – ritonaviru ($R = 0,86$) a MK-571 ($R = 0,96$).

Vzhledem k tomu, že maravirok je popsán jako substrát OATP1B1 transportéru, ale afinita k OATP transportérům se často překrývá (Roth et al. 2012), rozhodli jsme se ověřit jeho interakce s jinými OATP transportéry, který by mohly být přítomny v lidské placentě i BeWo buňkách a mohly by tak být zodpovědné za pozorovaný influx maraviroku. Bohužel příprava buněk specificky exprimující lidské OATP transportéry je velmi složitá, tudíž nebylo možné testovat všechny kandidáty. Pro naši studii jsme měli k dispozici buňky A431 exprimující lidský OATP2B1, který je popsán jako nejdůležitější OATP transportér přítomný v lidské placentě (Daud et al. 2017) a dále A431-OATP1A2 a -OATP1B3, avšak tyto transportéry jsou lokalizovány převážně v jiných tkáních (Kalliokoski a Niemi 2009). Akumulace maraviroku byla vždy srovnána k příslušné kontrolní linii. Signifikantně zvýšená koncentrace maraviroku byla pozorována v buněčných liniích A431-OATP1A2 a -OATP1B3 naznačující, že maravirok je pravděpodobně substrátem těchto dvou transportérů. Navíc akumulace v obou liniích byla zpětně snížena v přítomnosti inhibitorů ritonaviru a GF. Žádné signifikantní změny nebyly pozorovány v buněčné linii OATP2B1.

Na základě popsaných dat můžeme usuzovat, že maravirok má v placentě substrátovou afinitu k několika transportérům, které mohou zvrátit i protektivní úlohu apikálně lokalizovaného P-gp. Zároveň lze očekávat vysokou náchylnost maraviroku k rozvoji lékových interakcí.

9. ZÁVĚR

V této práci byly studovány *in vitro* interakce antiretrovirálního léčiva maravirok s placentárními transportéry, které by mohly ovlivnit farmakokinetiku tohoto léčiva při přestupu přes placentární bariéru.

Na základě našich výsledků jsme definovali maravirok jako substrát ABC efluxního transportéru MRP1, který je lokalizován na bazální membráně trofoblastu a urychluje přechod léčiv v materno-fetálním směru. Data z *in vitro* studií dále naznačují zapojení influxních transportérů, z nichž jsme vyloučili OCTN1 a 2 a OATP2B1 transportéry. Navíc jsme popsali maravirok jako substrát OATP1A2 a OATP1B3 *in vitro*, avšak tyto transportéry jsou přítomny v placentě pouze v omezené míře a je tedy málo pravděpodobné, že hrají v placentárním transportu maraviroku významnou roli.

Tato data mohou přispět k lepšímu pochopení transplacentární farmakokinetiky maraviroku, zbezpečnění a zefektivnění léčby HIV pozitivních žen.

10. LITERATURA

- Abel, S., Back, D. J., & Vourvahis, M. (2009). Maraviroc: Pharmacokinetics and drug interactions. *Antiviral Therapy*, *14*(5), 607–618.
- Ahmed, Y., Tian, M., & Gao, Y. (2017). Development of an anti-HIV vaccine eliciting broadly neutralizing antibodies. *AIDS Research and Therapy*, *14*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0178-3>
- Alam, K., Crowe, A., Wang, X., Zhang, P., Ding, K., Li, L., & Yue, W. (2018). Regulation of organic anion transporting polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated transport: An updated review in the context of OATP-mediated drug-drug interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms19030855>
- Bai, M., Ma, Z., Sun, D., Zheng, C., Weng, Y., Yang, X., ... Jiang, H. (2017). Multiple drug transporters mediate the placental transport of sulpiride. *Archives of Toxicology*, *91*(12), 3873–3884. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2008-8>
- Bernier, A., & Sagan, S. M. (2018). The diverse roles of microRNAs at the host–virus interface. *Viruses*, *10*(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/v10080440>
- Bhatti, A. B., Usman, M., & Kandi, V. (2016). Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. *Cureus*, *8*(3), 1–12. <https://doi.org/10.7759/cureus.515>
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*(4), S6.e1-S6.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050>
- Ceckova, M., Libra, A., Pavek, P., Nachtigal, P., Brabec, M., Fuchs, R., & Staud, F. (2006). <ieuctsbl esaliislo.hni ning ,t hLetd c.ell line BeWo EXPRESSION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF BREAST CANCER.pdf>. 58–65.
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., & Staud, F. (2006). P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology*, *22*(3), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007>
- Cihlar, T., & Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. *Current Opinion in Virology*, *18*, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.004>
- Colbers, A., Best, B., Schalkwijk, S., Wang, J., Stek, A., Hidalgo Tenorio, C., ... Tamayo, V. (2015). Maraviroc Pharmacokinetics in HIV-1-Infected Pregnant Women. *Clinical Infectious Diseases*, *61*(10), 1582–1589. <https://doi.org/10.1093/cid/civ587>

- Cole, S. P. C. (2014). Multidrug resistance protein 1 (mrp1, abcc1), a “multitasking” atp-binding cassette (abc,) transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30880–30888. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609248>
- Condic-Jurkic, K., Subramanian, N., Mark, A. E., & O’Mara, M. L. (2018). The reliability of molecular dynamics simulations of the multidrug transporter P-glycoprotein in a membrane environment. *PLoS ONE*, 13(1), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191882>
- Daud.A.N.A., J.E.H., B., M.P., O., W.S., K.-F., H., G., J.H., B., & E., H. (2017). Maternal use of drug substrates of placental transporters and the effect of transporter-mediated drug interactions on the risk of congenital anomalies. *PLoS ONE*, 12(3), e0173530. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173530>
- De Feo, C. J., & Weiss, C. D. (2012). Escape from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry inhibitors. *Viruses*, 4(12), 3859–3911. <https://doi.org/10.3390/v4123859>
- Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters*, 580(4), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.036>
- Ehman, E. C., Johnson, G. B., Villanueva-meyer, J. E., Cha, S., Leynes, A. P., Eric, P., ... Hope, T. A. (2017). *HHS Public Access*. 46(5), 1247–1262. <https://doi.org/10.1002/jmri.25711.PET/MRI>
- Fourcade, L., Poudrier, J., & Roger, M. (2018). Natural immunity to HIV: A template for vaccine strategies. *Viruses*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v10040215>
- Gameiro, M., Silva, R., Rocha-Pereira, C., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M. D. L., & Remião, F. (2017). Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules*, 22(4), 4–6. <https://doi.org/10.3390/molecules22040600>
- Genovese, I., Ilari, A., Assaraf, Y. G., Fazi, F., & Colotti, G. (2017). Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resistance Updates*, 32(September), 23–46. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2017.10.003>
- Giaquinto, C., Mawela, M. P., Chokephaibulkit, K., Negra, M. Della, Mitha, I. H., Fourie, J., ... Heera, J. (2018). Pharmacokinetics, Safety and Efficacy of Maraviroc in Treatment-experienced Pediatric Patients Infected With CCR5-Tropic HIV-1. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 37(5), 459–465. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001808>
- Gilliam, B. L., Riedel, D. J., & Redfield, R. R. (2010). Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *Journal of Translational Medicine*, 9(SUPPL. 1), S9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-S1-S9>

- Grube, M., Reuther, S., Meyer Zu Schwabedissen, H., Köck, K., Draber, K., Ritter, C. A., ... Kroemer, H. K. (2007). Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(1), 30–35. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.011411>
- Gu, W.-G., Zhang, X., & Yuan, J.-F. (2014). Anti-HIV Drug Development Through Computational Methods. *The AAPS Journal*, 16(4), 674–680. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9604-9>
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5–6 SPEC. ISS.), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>
- Hu, Z., Giguel, F., Hatano, H., Reid, P., Lu, J., & Kuritzkes, D. R. (2006). Fitness Comparison of Thymidine Analog Resistance Pathways in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, 80(14), 7020–7027. <https://doi.org/10.1128/jvi.02747-05>
- Ikeda, K., Yamasaki, K., Homemoto, M., Yamaue, S., Ogawa, M., Nakao, E., ... Hirotani, Y. (2012). Efflux transporter mRNA expression profiles in differentiating JEG-3 human choriocarcinoma cells as a placental transport model. *Pharmazie*, 67(1), 86–90. <https://doi.org/10.1691/ph.2012.1593>
- Iqbal, M., Audette, M. C., Petropoulos, S., Gibb, W., & Matthews, S. G. (2012). Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta*, 33(3), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.008>
- Kalliokoski, A., & Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 693–705. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x>
- Kimoto, E., Vourvahis, M., Scialis, R. J., Eng, H., Rodrigues, A. D., & Varma, M. V. S. (2019). Mechanistic Evaluation of the Complex Drug-Drug Interactions of Maraviroc: Contribution of Cytochrome P450 3A, P-Glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1. In *Drug Metabolism and Disposition*. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.085241>
- Kumar, S., Rao, P., Earla, R., & Kumar, A. (2014). Drug–drug interactions between anti-retroviral therapies and drugs of abuse in HIV systems. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(3), 343–355. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.996546>
- Lewinson, O., & Livnat-Levanon, N. (2017). Mechanism of Action of ABC Importers: Conservation, Divergence, and Physiological Adaptations. *Journal of Molecular Biology*, 429(5), 606–619. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.010>
- Liang, Y., Li, S., & Chen, L. (2015). The physiological role of drug transporters. *Protein and Cell*, 6(5), 334–350. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0148-2>

- Lu, Y., Fuchs, E. J., Hendrix, C. W., & Bumpus, N. N. (2014). CYP3A5 genotype impacts Maraviroc concentrations in healthy volunteers. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(11), 1796–1802. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060194>
- Mani, R. S., Hammond, J. R., Marjan, J. M. J., Graham, K. A., Young, J. D., Baldwin, S. A., & Cass, C. E. (1998). Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30818–30825. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30818>
- McKeage, K. (2019). Ravulizumab: First Global Approval. *Drugs*, 79(3), 347–352. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01068-2>
- McLaren, P. J., Coulonges, C., Bartha, I., Lenz, T. L., Deutsch, A. J., Bashirova, A., ... Fellay, J. (2015). Polymorphisms of large effect explain the majority of the host genetic contribution to variation of HIV-1 virus load. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14658–14663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514867112>
- Morita, M., & Imanaka, T. (2012). Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1387–1396. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.009>
- Murray, J. M., Kelleher, A. D., & Cooper, D. A. (2011). Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4+ T Cells in a Population of HIV-Infected Individuals. *Journal of Virology*, 85(20), 10798–10805. <https://doi.org/10.1128/jvi.05095-11>
- Nigam, S. K. (2014). What do drug transporters really do? *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(1), 29–44. <https://doi.org/10.1038/nrd4461>
- Roth, M., Obaidat, A., & Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British Journal of Pharmacology*, 165(5), 1260–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x>
- Rubinchik-Stern, M., & Eyal, S. (2012). Drug interactions at the human placenta: What is the evidence? *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUL(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00126>
- Rytting, E., & Audus, K. L. (2007). Effects of low oxygen levels on the expression and function of transporter OCTN2 in BeWo cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(8), 1095–1102. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.8.0006>
- Siccardi, M., D'Avolio, A., Nozza, S., Simiele, M., Baietto, L., Stefani, F. R., ... Owen, A. (2010). Maraviroc is a substrate for OATP1B1 in vitro and maraviroc plasma concentrations are influenced by SLCO1B1 521 T>C polymorphism. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(12), 759–765. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283402efb>

- Sierra-Aragón, S., & Walter, H. (2012). Targets for inhibition of HIV replication: Entry, enzyme action, release and maturation. *Intervirology*, 55(2), 84–97. <https://doi.org/10.1159/000331995>
- Staňková, M., Na, F. N., & Uk, L. F. (2008). Novinky V Antiretrovirové Terapii Hiv / Aids Infekce. *In Vitro*, 10(11), 498–502.
- Staud, F., Cervený, L., & Ceckova, M. (2012). Pharmacotherapy in pregnancy; Effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), 736–763. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>
- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(3), 219–234. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>
- Szöllösi, D., Rose-Sperling, D., Hellmich, U. A., & Stockner, T. (2018). Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(4), 818–832. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.028>
- Štefková, J., Poledne, R., & Hubáček, J. A. (2004). ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological Research*, 53(3), 235–243.
- Tivnan, A., Zakaria, Z., O’Leary, C., Kögel, D., Pokorny, J. L., Sarkaria, J. N., & Prehn, J. H. M. (2015). Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Frontiers in Neuroscience*, 9(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00218>
- Tupova Lenka, Ceckova Martina, Ambrus Csilla, Sorf Ales, Ptackova Zuzana, Gaborik Zsuzsanna, Staud Frantisek: Interactions between maraviroc and the ABCB1, ABCG2 and ABCC2 transporters: an important role in transplacental pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition*, provisionally accepted.
- Vähäkangas, K., & Myllynen, P. (2009). Drug transporters in the human blood-placental barrier. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 665–678. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x>
- van Lelyveld, S. F. L., Drylewicz, J., Krikke, M., Veel, E. M., Otto, S. A., Richter, C., ... Hoepelman, A. I. M. (2015). Maraviroc Intensification of cART in Patients with Suboptimal Immunological Recovery: A 48-Week, Placebo-Controlled Randomized Trial. *Plos One*, 10(7), e0132430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132430>
- Walker, D. K., Abel, S., Comby, P., Muirhead, G. J., Nedderman, A. N. R., & Smith, D. A. (2005). Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(4), 587–595. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002626>

- Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., & Giugliano, R. P. (2013). The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *Journal of the American College of Cardiology*, *61*(25), 2495–2502. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.02.058>
- Wilson, A., & Rb, K. (2014). OATP Transporters : Potential Targets for Enhancing Organ and Tissue Specific Drug Delivery. *J Pharmacol Clin Toxicol*, *2*((3)), 1–10.
- Winslow, C. Y., & Kerdel, F. A. (2015). Human immunodeficiency virus. *Dermatological Manifestations of Kidney Disease*, 45–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2395-3_4
- Woollard, S. M., & Kanmogne, G. D. (2015). Maraviroc: A review of its use in hivinfection and beyond. *Drug Design, Development and Therapy*, *9*, 5447–5468. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S90580>
- Yin, J., & Zhang, J. (2011). Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: From discovery to clinical application. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, *36*(10), 927–938. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002>
- Yu, J., Zhou, Z., Tay-Sontheimer, J., Levy, R. H., & Ragueneau-Majlessi, I. (2017). Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*(9), 2312–2325. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.004>
- Zhang, X. (2018). Anti-retroviral drugs: current state and development in the next decade. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *8*(2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.012>
- Zhou, Y., Yuan, J., Li, Z., Wang, Z., Cheng, D., Du, Y., ... Zhang, W. (2015). Genetic polymorphisms and function of the organic anion-transporting polypeptide 1A2 and its clinical relevance in drug disposition. *Pharmacology*, *95*(3–4), 201–208. <https://doi.org/10.1159/000381313>
- Zhu, Q., Zhu, P., Zhang, Y., Li, J., Ma, X., Li, N., ... Su, L. (2015). Analysis of social and genetic factors influencing heterosexual transmission of HIV within serodiscordant couples in the henan cohort. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129979>

Internetové zdroje:

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 20.1.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/73/the-hiv-life-cycle>

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 20.1.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/46/the-stages-of-hiv-infection>

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 20.1.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/20/50/preventing-mother-to-child-transmission-of-hiv>

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 10.1.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/52/when-to-start-antiretroviral-therapy>

AIDSinfo. www.aidsinfo.com [online]. [cit. 13.5.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/58/fda-approved-hiv-medicines>

Avert. www.avert.org [online]. [cit. 13.5.2019]. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/45/hiv-aids--the-basics>

Avert. www.avert.org [online]. [cit. 10.2.2019]. Dostupné na URL: <https://www.avert.org/global-hiv-and-aids-statistics>

Avert. www.avert.org [online]. [cit. 10.2.2019]. Dostupné na URL: <https://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview>

Avert. www.avert.org [online]. [cit. 10.2.2019]. Dostupné na URL: <https://www.avert.org/professionals/hiv-programming/prevention/prevention-mother-child>

AUTOR NEUVEDEN. www.pubchem.com [online]. [cit. 20.11.2018]. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maraviroc>

Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. [cit. 13.5. 2018]. Dostupné na URL: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/PerinatalGL.pdf>.

WHO. www.who.int [online]. [cit. 15.11. 2018]. Dostupné na URL: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=en>

WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach. Second edition 2016. [cit. 13.5. 2018]. Dostupné na URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208825/9789241549684_eng.pdf?sequence=1

WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Recommendations for a public health approach. June 2013. [cit. 13.5. 2018]. Dostupné na URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85321/9789241505727_eng.pdf?sequence=1