

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**IN VITRO A EX VIVO STUDIUM LÉKOVÝCH INTERAKCÍ
ANTIRETROVIRÁLNÍCH LÁTEK NA STŘEVNÍCH
ATP-VÁZAJÍCÍCH LÉKOVÝCH TRANSPORTÉRECH**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2017

Bc. Michaela Jahodová

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

V Hradci Králové

Podpis:

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za odborné vedení, zájem a připomínky, přátelský přístup a čas, který mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

Mé poděkování si zaslouží též Mgr. Ondřej Martinec za odborné rady, velkou trpělivost a pomoc s experimentální částí diplomové práce a Ing. David Herman za pomoc a podporu při zpracování části teoretické i experimentální.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Bc. Michaela Jahodová

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* a *ex vivo* studium lékových interakcí antiretrovirálních látek na střevních ATP-vázajících lékových transportérech

Absorpce perorálně podaných léčiv probíhá zejména ve střevě, kde může být ovlivněna aktivitou lékových ABC transportérů lokalizovaných na apikální membráně střevního epitelu. Studium lékových interakcí na střevních ABC transportérech je nezbytné pro zajištění efektivní a bezpečné farmakoterapie. Testování obousměrného transportu na buňkách Caco-2 je obecně preferovanou metodou pro *in vitro* hodnocení substrátů a inhibitorů ABC transportérů. Nevýhody modelu Caco-2 zvyšují nutnost a potřebu zavádění nových modelů. Velký potenciál má zapojení *ex vivo* metodik na lidském či potkaním střevě. Cílem práce bylo tedy zavedení *in vitro* metodiky využívající monovrstvu buněk Caco-2 a *ex vivo* metodiky ultratenkých potkaních intestinálních řezů. Metodou obousměrného transportu jsme analyzovali lékové interakce modelového substrátu P-gp a BCRP Rhodaminu 123 (RHD123) a klinicky využívaného antiretrovirotika (ARV) tenofoviru disoproxil fumarátu (TDF) s vybranými navrženými inhibitory P-gp/BCRP ze skupiny ARV. Lopinavir, ritonavir a abakavir snížily efluxní poměr RHD123 a *ex vivo* akumulární studie s RHD123 prokázaly, na koncentraci závislý inhibiční účinek lopinaviru a ritonaviru. Lopinavir navíc významně ovlivňoval transport TDF přes monovrstvu Caco-2 buněk. Závěrem lze říci, že se podařilo zavést *in vitro* a *ex vivo* metodiky pro analýzu lékových interakcí na střevních P-gp a BCRP a dále jsme potvrdili, že některá ARV (zjm. ze skupiny inhibitorů proteázy) mohou inhibovat střevní P-gp a BCRP a měnit transmembránový transport TDF.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Bc. Michaela Jahodová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* and *ex vivo* study of drug-drug interactions of antiretrovirals on intestinal ATP-binding drug transporters

The absorption of orally administered drugs takes place especially in the intestine, where it can be affected by the activity of drug's ABC transporters located on the apical membrane of the intestinal epithelium. Study of drug interactions in intestinal ABC transporters is essential to ensure effective and safe pharmacotherapy. Testing of bi-directional transport on Caco-2 cells is generally the preferred method for *in vitro* evaluation of substrates and inhibitors of ABC transporters. Drawbacks of the Caco-2 model increase the need and necessity to introduce new models. A great potential is the involvement of *ex vivo* methodologies in the human or rat intestine. The aim of the work was to introduce an *in vitro* methodology using the Caco-2 cell monolayer and the *ex vivo* methodology of precision-cut rat intestinal slices. By the bi-directional transport method, we analyzed drug interactions of the model substrate P-gp and BCRP Rhodamine 123 (RHD123) and clinically-used tenofovir disoproxil fumarate (TDF) antiretroviral agents (ARV) with selected P-gp/BCRP inhibitors of the antiretroviral group. Lopinavir, ritonavir and abacavir decreased the efflux ratio of RHD123 and the *ex vivo* accumulation study with RHD123 demonstrated the concentration-dependent inhibitory effect of lopinavir and ritonavir. In addition, Lopinavir significantly affected transport of TDF through the monolayer of Caco-2 cells. In conclusion, we have been able to introduce *in vitro* and *ex vivo* methods for drug interaction analysis on intestinal P-gp and BCRP, and we have confirmed that some ARV (i.e. the protease inhibitor group) can inhibit intestinal P-gp and BCRP and to modify the TDF transmembrane transport.

OBSAH

1.	Seznam zkratk.....	9
2.	Úvod.....	11
3.	Teoretická část.....	12
3.1	Výskyt lékových interakcí.....	12
3.2	Perorální podání léčiv.....	12
3.3	ABC efluxní lékové transportéry ve střevní bariéře.....	13
3.3.1	P-glykoprotein.....	13
3.3.2	BCRP.....	14
3.3.3	MRP2.....	15
3.4	Regulační autority v oblasti lékové politiky.....	16
3.5	Terapie HIV a komorbidit.....	16
3.5.1	Kombinační léčba antiretrovirotiky.....	17
3.5.2	Léčba komorbidit a lékové interakce s antiretrovirotiky.....	18
3.6	Modely studia střevní absorpce.....	19
3.6.1	<i>In vitro</i> modely a buněčná linie Caco-2.....	20
3.6.2	<i>Ex vivo</i> modely a potkaní intestinální řezy.....	21
4.	Hypotéza.....	23
5.	Cíl.....	23
6.	Experimentální část.....	24
6.1	Chemikálie a reagentie.....	24
6.2	<i>In vitro</i> transportní studie na buněčné linii Caco-2.....	25
6.2.1	Kultivace buněk.....	25
6.2.2	Metoda obousměrného transportu na monovrstvě Caco-2 buněk.....	25
6.2.3	Permeabilní koeficient.....	27
6.2.4	Efluxní poměr.....	27
6.3	<i>Ex vivo</i> metodika ultratenkých potkaních intestinálních řezů.....	27

6.3.1	Příprava intestinálních řezů.....	27
6.3.2	Akumulační studie s využitím intestinálních řezů	28
6.4	Statistické zpracování.....	28
7.	Výsledky.....	29
7.1	Transport RHD123 přes monovrstvu buněk Caco-2 a efekt vybraných antiretrovirálních látek	29
7.2	Transport TDF přes monovrstvu buněk Caco-2.....	33
7.3	<i>Ex vivo</i> akumulační studie RHD123 s využitím PCIS	34
8.	Diskuze.....	36
9.	Závěr.....	40
10.	Zdroje	41

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC - ATP binding cassette

ART - antiretroviral therapy

ARV - antiretrovirotika

ATT - antituberculosis therapy

AUC - area under the curve (plocha pod křivkou)

BCRP - breast cancer resistance protein

DAAs - direct-acting antivirals (přímo působící antivirotika)

DDIs - drug-drug interactions (lékové interakce)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (kultivační medium)

DMSO - dimethyl sulfoxide

ER - efluxní poměr

FBS - Fetal Bovine Serum (fetální hovězí sérum)

FDA - Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)

EMA – Evropská léková agentura

FI - fusion inhibitor

HAART - highly active antiretroviral therapy (vysoce účinná antiretrovirální terapie)

HBSS - Hank's Balanced Salt solution (experimentální medium)

HCV - virová hepatitida C

HIV - human immunodeficiency virus

INSTI - integrase strand transfer inhibitors (inhibitory integrázy)

ITC - International Transporter Consortium

KHP - Krebs-Henseleit pufr (Krebsův pufr)

MRP - multidrug resistance-associated protein

NEAA - Non-essential Amino Acid (neesenciální aminokyseliny)

NNRTI - non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor

NRTI - nucleoside reverse transcriptase inhibitor

NtRTI - nucleotide reverse transcriptase inhibitor

P_{app} - permeabilní koeficient

PBS - phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)

PCIS - precision-cut intestinal slices (potkaní intestinální řezy)

P-gp - P-glykoprotein

PI - protease inhibitor

RHD123 - rhodamin 123

TBC - tuberkulóza

TDF - tenofovir disoproxil fumarát

TEER - transepithelial electrical resistance (transepiteliální elektrický odpor)

WHO - World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

2. ÚVOD

Kombinovaná farmakoterapie často zvyšuje riziko lékových interakcí (DDIs) (Kis, Robillard, Chan, & Bendayan, 2010). Významně vyšší výskyt interakčních komplikací je dlouhodobě zaznamenáván u skupiny HIV (human immunodeficiency virus) pozitivních pacientů, u kterých je polypragmatie běžná a z dlouhodobého hlediska zlepšuje klinickou prognózu (Karageorgopoulos, Allen, & Bhagani, 2015; Luetkemeyer, Havlir, & Currier, 2006; D Pal et al., 2011; Weiss, 2007). V terapii HIV se vždy využívá kombinace antiretrovirotik (ARV) patřících do odlišných farmakologických skupin (Kis et al., 2010). Četnost DDIs u HIV pozitivních pacientů dále zvyšuje i léčba komorbidit, kterými tato populace často trpí (Jilich et al., 2014; Soriano et al., 2015). Pokud je to možné, dává se přednost perorálnímu podání léčiva, jakožto nejvhodnějšímu způsobu co se pohodlí pacienta týče. Absorpce takto podaných léčiv probíhá zejména ve střevě. Střevní bariéra představuje největší rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím. Funguje jako selektivní filtr intraluminálních entit a proto hraje důležitou roli v absorpci léčiv (Groschwitz & Hogan, 2009; Kis, Zastre, Hoque, Walmsley, & Bendayan, 2013; van Breemen & Li, 2005). Mnoho lékových interakcí vzniká na základě aktivity střevních ATP-vázajících (ABC) transportérů (Bousquet, Pruvost, Guyot, Farinotti, & Mabondzo, 2009; Kis et al., 2013; D Pal et al., 2011; Dhananjay Pal & Mitra, 2006). Tyto transportéry představují dynamické mechanismy ovlivňující střevní permeabilitu léčiv, čímž značně ovlivňují koncentraci léčiva v plazmě a tudíž terapeutickou účinnost a nežádoucí účinky (Ding et al., 2004; Edwards et al., 1999; Westphal, Weinbrenner, Giessmann, et al., 2000). Je důležité znát substrátovou specifitu a inhibiční účinnost perorálně podávaných léků vůči těmto transportérům, aby bylo možné předpokládat možné interakce. Bylo zjištěno, že DDIs na intestinální transportéry ABC mohou mít za následek buď vyšší (toxické) nebo nižší (subterapeutické) plazmatické koncentrace (Giacomini, Huang, Tweedie DJ, & Benet, 2012). Spolehlivá predikce perorální biologické dostupnosti je zásadní pro zařazení léčiva do klinických studií (FDA, 2012; Westerhout et al., 2014). Pro studium střevní absorpce a predikci DDIs s ABC transportéry lze využít modely *in vitro* a *ex vivo* (D Pal et al., 2011; Weiss, 2007; Yumoto et al., 1999).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Výskyt lékových interakcí

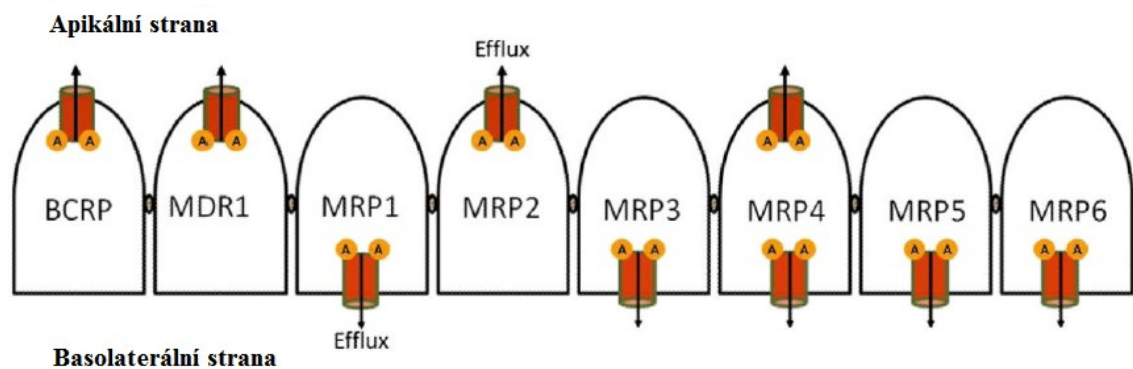
Lékové interakce představují závažný klinický problém. Jsou jednou z hlavních příčin toxicity a nežádoucích účinků (Květina & Grundmann, 2000; Olkkola & Ahonen, 2001; Rice, Faragon, Banks, & Chirch, 2016; Westphal, Weinbrenner, Zschiesche, et al., 2000). Nežádoucí účinky léčiv jsou v USA a Kanadě (ve 4,2 – 30 %) a v Evropě (ve 2,5 – 10,6 %) příčinou všech hospitalizací. Jedná se o obrovskou ekonomickou zátěž, která v USA přesahuje částku odhadovanou na 30 miliard dolarů ročně (Sultana, Cutroneo, & Trifirò, 2013). Podíl DDIs na klinicky relevantních nežádoucích příhodách představuje asi 13 % a souvisí s počtem léků užívaných pacientem. Zároveň jsou DDIs zodpovědné zhruba za 5 % hospitalizací (Collection, 2016; Olkkola & Ahonen, 2001). DDIs mají farmakokinetický nebo farmakodynamický původ (Collection, 2016) a lze jim předcházet na základě pochopení jejich molekulárních principů (Juurlink, Mamdani, Kopp, Laupacis, & Redelmeier, 2003; Sultana et al., 2013). Důležitost tématu podtrhuje skutečnost, že za posledních 10 let bylo do databáze PubMed umístěno přes 4500 odborných článků zabývajícím se tématikou DDIs (klíčová slova: „DRUG-DRUG INTERACTIONS“, informace je aktuální ke dni 4. 3. 2017).

3.2 Perorální podání léčiv

Perorální podávání je nejfyziologičtější způsobem, jakým lze dopravit léčivo do organismu (Květina & Grundmann, 2000), zároveň je i velmi výhodné, protože je levné, relativně bezpečné a pro pacienty přijatelné (Schinkel & Jonker, 2012). Léky takto aplikované musí projít střevní sliznicí. Tato bariéra se skládá z polarizovaných enterocytů, mezi nimiž jsou těsné pevné spoje (Fromm, 2011). Na střevním epitelu jsou lokalizovány lékové transportéry, jejichž aktivita často určuje rychlost a rozsah absorpce xenobiotik z lumen střeva do krevního oběhu (D Pal et al., 2011). Střevní lékové transportéry jsou místem DDIs (Olkkola & Ahonen, 2001; Schinkel & Jonker, 2012).

3.3 ABC efluxní lékové transportéry ve střevní bariéře

Střevní ABC efluxní lékové transportéry jsou transmembránové proteiny, schopné přenášet strukturálně velmi rozmanité látky zpět do střevního lumen a snižovat tak jejich absorpci (Albermann et al., 2005; Fromm, 2011). Export je saturabilní a vyskytuje se v aktivní, ATP dependentní formě, čímž je umožněn přenos proti koncentračnímu gradientu (Higgins, 1992; Sun, Chow, Liu, Du, & Pang, 2008; Yu & Zeng, 2007). Nejvýznamnějšími střevními efluxními ABC transportéry jsou: P-glykoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) a multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). Kromě nich exprimuje střevní epitel i jiné méně důležité ABC transportéry; přehled a lokalizace ABC transportérů v rámci střevního epitelu je vyobrazena na Obr. 1. ABC efluxní transportéry mají vliv na farmakologické chování většiny v současné době používaných léčiv (Schinkel & Jonker, 2012; L Zhang, Zhang, Strong, Reynolds, & Huang, 2008).



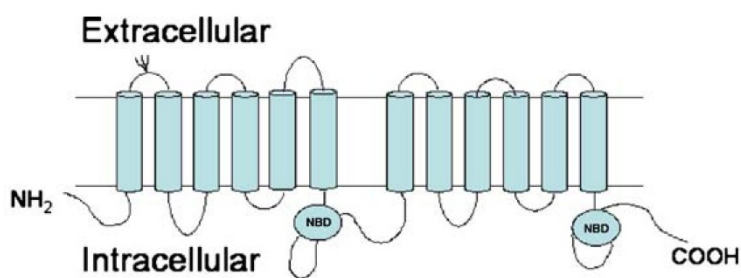
Obrázek 1: Lokalizace efluxních transportérů na střevním epitelu. „A“ reprezentuje ATP vazací strany. Převzato a upraveno z (D Pal et al., 2011).

3.3.1 P-glykoprotein

P-gp je 170 kDa velký transmembránový protein (Obr. 2), známý také jako MDR1 (Multidrug resistance protein 1) nebo ABCB1. Je pravděpodobně nejlépe prostudovaným efluxním lékovým transportérem. Původně byl P-gp objeven v rakovinných buňkách. Název MDR1 je odvozen od multičetné lékové rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům. Až později se zjistilo, že je konstitutivně přítomen v celé řadě normálních tkání. Ve střevě je lokalizován téměř výhradně v rámci

kartáčového lemu na apikální (luminální) straně polarizovaných zralých enterocytů a tím významně omezuje biologickou dostupnost svých substrátů. Exprese P-gp se v lidském tenkém střevě zvyšuje od proximální k distální oblasti (Fromm, 2011; Klein, Sarkadi, & Váradi, 1999; D Pal et al., 2011; Pang, 2003; Schinkel & Jonker, 2012; Westphal, Weinbrenner, Zschiesche, et al., 2000)

P-gp transportuje rozmanité substráty o velikosti 200 – 1900 Da (Schinkel & Jonker, 2012), které jsou většinou poměrně hydrofobní (Bousquet et al., 2009). Intestinální P-gp může přispívat k systémové clearance intravenózně podávaných léčiv (např. digoxin) a to aktivní sekrecí do střevního lumen (Fromm, 2011; Schinkel et al., 2014).

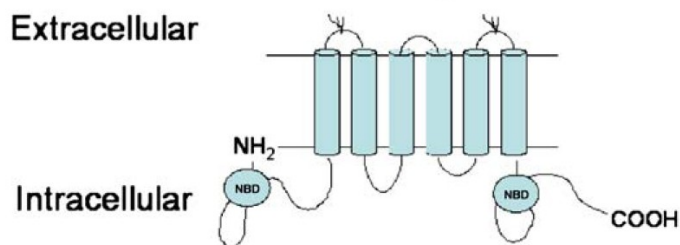


Obrázek 2: Schematické znázornění P-gp. Převzato a upraveno z (Dhananjay Pal & Mitra, 2006)

3.3.2 BCRP

BCRP také známý jako ABCG2 (Giacomini et al., 2012) je druhý člen G-rodiny ABC transportérů (Transporters, 2010). Název je odvozený od skutečnosti, že byl poprvé nalezen v prsních rakovinných buňkách (Schinkel & Jonker, 2012) rezistentních na doxorubicin (Choudhuri & Klaassen, 2006). Je považován pouze za poloviční ABC transportér, protože má pouze 6 transmembránových domén a podle studií může fungovat jako homodimer (Obr. 3) (Giacomini et al., 2012; Choudhuri & Klaassen, 2006; Murakami & Takano, 2008; D Pal et al., 2011). Je zajímavé, že exprese BCRP je stimulována v tkáních s nízkým obsahem kyslíku (Transporters, 2010). V polarizovaných buňkách střevního epitelu je exprimován na apikální straně (D Pal et al., 2011). Exprese BCRP je maximální v lidském duodenu a kontinuálně klesá k tlustému střevu (Xia, Yang, & Gan, 2005).

Vedle hydrofobních substrátů jako je např. mitoxantron nebo topotekan, může transportovat hydrofilní organické konjugované anionty, zejména sulfátové konjugáty a pozitivně a/nebo negativně nabitě molekuly. Substrátová specifita u BCRP a P-gp se překrývá, což může vést k synergickému účinku obou transportérů (Lee et al., 2015; Ni, Bikadi, Rosenberg, & Mao, 2010; Schinkel & Jonker, 2012).

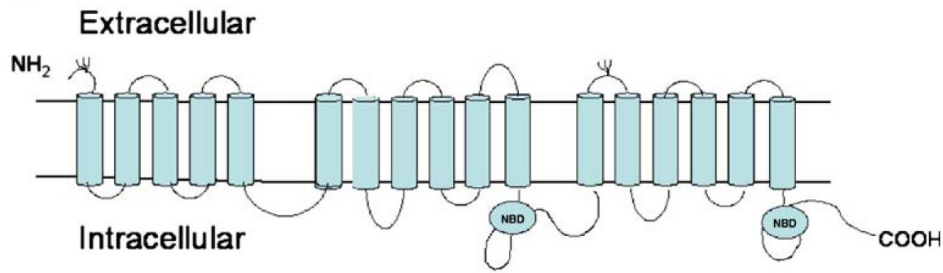


Obrázek 3: Schematické znázornění BCRP transportéru. Převzato a upraveno z (Dhananjay Pal & Mitra, 2006)

3.3.3 MRP2

MRP patří také do ABC superrodiny. Jsou to proteiny o velikosti 190 kDa (Obr. 4), které primárně transportují přes lipidové membrány konjugované organické anionty (Dhananjay Pal & Mitra, 2006). Zatím je známo osm různých MRP (D Pal et al., 2011).

Největší potenciál pro DDIs ve střevě má MRP2 (ABCC2), který byl poprvé popsán u člověka v roce 1996. Bohatě se vyskytuje na apikální střevní membráně (D Pal et al., 2011; Transporters, 2010; L Zhang et al., 2008). Nejvyšší exprese MRP2 je v lidském duodenu a jejunu a klesá směrem k ileu. Podobně jako u P-gp i u MRP2 byla prokázána role při eliminaci systémově aplikovaných xenobiotik. Kromě konjugovaných organických aniontů patří mezi jeho substráty nekonjugovaná léčiva: metotrexát, ritonavir, vinblastin a další (Pang, 2003; Tocchetti, Rigalli, Arana, Villanueva, & Mottino, 2016).



Obrázek 4: Schematické znázornění MRP efluxních transportérů. Převzato a upraveno z (Dhananjay Pal & Mitra, 2006)

3.4 Regulační autority v oblasti lékové politiky

DDIs související s aktivitou lékových transportérů se v průběhu posledních sedmi let staly oblastí intenzivního výzkumu (SOLVO, 2017b). V roce 2007 bylo vytvořeno International Transporter Consortium (ITC) s členy z akademické sféry, průmyslu a Úřadu pro kontrolu léčiv a potravin (FDA) (L Zhang, Huang, & Lesko, 2011). ITC nedávno zveřejnila sérii „bílých knih“ ve snaze poskytnout odborný přehled o lékových transportérech. Zároveň dávají „bílé knihy“ jasné pokyny ohledně studia transportérů a použitelných metod (SOLVO, 2017b). FDA a Evropská léková agentura (EMA) vyžadují preklinické testování každého nového léčiva na úrovni lékových transportérů uvedených v „bílých knihách“. Ve všech případech není potřeba studovat všechny transportéry. Na úrovni ABC efluxních intestinálních transportérů vyžaduje FDA a EMA inhibiční studie u P-gp a BCRP. Substrátové studie jsou vyžadovány FDA u P-gp a BCRP. Preklinické studie ale neodhalí veškeré DDIs léčiv a je potřeba je studovat i po uvedení na trh (FDA, 2012; Giacomini et al., 2012; Lee et al., 2015; SOLVO, 2017a; Sultana et al., 2013; L Zhang et al., 2008; Lei Zhang, Zhang, & Huang, 2009).

3.5 Terapie HIV a komorbidit

Ke konci roku 2015 uváděla Světová zdravotnická organizace (WHO) přes 36 miliónů lidí infikovaných virem HIV. V polovině roku 2016 bylo více než 18 miliónů pacientů po celém světě léčeno ARV (WHO, 2017). Příklad kombinované antiretrovirální terapie dramaticky změnil prognózu a kvalitu života HIV infikovaných dospělých, ale i dětí (Gemtessa & Chirch, 2013; Cheerskul, Rongkavilit, Al-Tatari, & Asmar,

2006). Hlavní léčebnou strategii představuje tzv. highly active antiretroviral therapy (HAART) (Jilich et al., 2014). Principem HAART je kombinace minimálně tří léčiv ze dvou lékových skupin, protože se prokázalo, že tento přístup snižuje množství viru v krvi (virovou nálož), oddaluje nástup virové rezistence a prodlužuje účinnost léčby (Gallant et al., 2006; Chearskul et al., 2006). Různé kombinace ARV ovšem představují potenciál pro výskyt DDIs (Kis et al., 2010). Nehledě na to, že HIV populace často trpí komorbiditami vyžadující farmakoterapii, což riziko DDIs ještě zvyšuje (Jilich et al., 2014; Soriano et al., 2015).

3.5.1 Kombinační léčba antiretrovirotiky

Aktuálně dostupných ARV k léčbě HIV je více než 20 (Jilich et al., 2014). Podle mechanismu působení a chemického složení je lze zařadit do celkem šesti skupin (Chearskul et al., 2006): nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI), nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI), inhibitory proteázy (PI), inhibitory integrázy (INSTI), inhibitory fúze (FI) a CCR5 antagonisté (FDA, 2017). HAART v léčbě dospělých kombinuje dvě léčiva ze skupiny NRTI a přidává NNRTI, INSTI nebo PI potencovaný nízkými dávkami ritonaviru (Gallant et al., 2006; Hammer et al., 2006; Jilich et al., 2014). ARV jsou častými substráty/inhibitory/induktory efluxních ABC transportérů. Podávání různých kombinačních režimů ARV může vést k toxickým/nízkým hladinám léčiv a selhání léčby z důvodu intolerance léčby nebo její nízké efektivity (Kis et al., 2010; D Pal et al., 2011; Weiss, 2007).

Tenofovir disoproxil fumarat (TDF) je proléčivo tenofoviru patřící mezi nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy (NtRTI). Tenofovir má špatnou perorální biologickou dostupnost (Tong et al., 2007). V klinické praxi se prokázala vysoká efektivita podávání kombinačních režimů založených na TDF (Chearskul et al., 2006; Truong, Schafer, & Short, 2015). TDF je dobře popsán substrát P-gp (Kis et al., 2010). Z *in vitro* studií lze vyvozovat, že TDF inhibuje MRP2 a podílí se tak na známé interakci mezi TDF a didanosinem. TDF podstatně přispívá ke zvýšení AUC (area under the curve) didanosinu o 44 – 60 %, dávky didanosinu by měly být sníženy, aby se zabránilo potenciální toxicitě (Kearney et al., 2005; Weiss, 2007).

P-gp a MRP přenášejí PI (př. atazanavir, ritonavir, lopinavir a saquinavir) a jsou citlivé k inhibici několika NRTI (Kis et al., 2013). Kvůli schopnosti NRTI inhibovat několik MRP mohou být pacienti s HIV asociovanou multicentrickou Castlemanovou nemocí ohroženi toxicitou vinblastinu (Weiss, 2007). PI stejně jako NNRTI (efavirenz, delavirdin) mohou inhibovat P-gp v klinicky relevantních koncentracích. Některá dlouhodobě podávaná ARV mohou expresi P-gp indukovat. Současné podání tipranaviru/ritonaviru snižuje plazmatické hladiny TDF a abakaviru o 23 – 44 %. Bylo popsáno i několik dalších interakcí mezi inhibitory proteázy a NRTI. Mnohá ARV jsou silnými inhibitory P-gp, a to zejména ritonavir a lopinavir. Ritonavir se používá jako „booster therapy“ v kombinaci s PI pro zvýšení jejich biologické dostupnosti. PI ani NNRTI nejsou transportovány BCRP, ale mnoho z nich jsou v klinicky relevantních koncentracích inhibitory BCRP. Proto se může BCRP podílet na antiretrovirálních DDIs (Kis et al., 2010, 2013).

3.5.2 Léčba komorbidit a lékové interakce s antiretrovirotiky

V průběhu infekce HIV dochází ničením buněk imunitního systému k selhávání obranyschopnosti, což umožňuje nástup jiné infekce u již oslabeného hostitele (Pasman, 2012). HIV je nejsilnější známý rizikový faktor pro progresi infekce *Mycobacterium tuberculosis* v aktivní onemocnění (Pawlowski, Jansson, Sköld, Rottenberg, & Källenius, 2012). V Africe a Asii je častou příčinou úmrtí u HIV infikované populace. Antiretrovirální terapie (ART) snižuje riziko recidivy tuberkulózy (TBC) a měla by být vybrána na základě minimálních lékových interakcí s antituberkulózní terapií (ATT) (Shankar et al., 2014; W. & S., 2016). Klíčovou součástí ATT je rifampicin, který je spojován s významnými DDIs s mnoha ARV (Jiang et al., 2014; W. & S., 2016). Rifampicin indukuje MRP2 a P-gp, u kterého zvyšuje expresi v duodenu až 4,2 krát (Transporters, 2010; Westphal, Weinbrenner, Zschiesche, et al., 2000). Souběžné podávání rifampicinu s rilpivirinem, etravirinem, nevirapinem a všemi PI se nedoporučuje vzhledem k výraznému snížení plazmatické koncentrace všech zmíněných ARV a špatným výsledkům léčby (Shankar et al., 2014; W. & S., 2016). Vyšší dávky ARV vedly k nepřijatelné míře jaterní toxicity a netolerance léčby. Podávání raltegraviru s rifampicinem vedlo ke snížení minimální koncentrace raltegraviru o 61 % (W. & S., 2016). WHO doporučuje efavirenz jako lék volby z důvodu zvládnutelných lékových interakcí, s výjimkou podmínek jako je těhotenství,

kdy je kontraindikován (Jiang et al., 2014; Shankar et al., 2014). U HIV/TBC pacientů léčených rifampicinem, se efavirenz kombinuje se dvěma NRTI (W. & S., 2016).

Onemocnění virovou hepatitidou C (HCV) je běžné vzhledem ke společné cestě přenosu a skutečnosti, že lidé s HIV jsou vystaveni vyššímu riziku nákazy HCV. V současnosti je incidence HCV na vzestupu (Gemtessa & Chirch, 2013; Chen, Feeney, & Chung, 2014; Karageorgopoulos et al., 2015). Nedávný rozvoj přímo působících antivirových léčiv (DAAs) představuje revoluční potenciál v léčbě chronické formy HCV u HIV infikované populace. DAAs jsou léčiva dobře tolerovaná a vysoce účinná (Gemtessa & Chirch, 2013; Chen et al., 2014; Luetkemeyer et al., 2006; Oramasionwu, Moore, & Toliver, 2014). Aktuálním problémem u HIV/HCV koinfikovaných pacientů je riziko DDIs a nadměrná toxicita se současně podávanou antiretrovirální medikací (Oramasionwu et al., 2014; Truong et al., 2015). Úvaha vychází ze skutečnosti, že DAAs mohou být ovlivněny nebo mít vliv na absorpci ARV prostřednictvím střevních ABC transportérů (Rice et al., 2016). Nefrotoxicita TDF může být zvýšena současným podáváním s ledipasvirem, který jako inhibitor P-gp zvyšuje jeho hladiny (Rice et al., 2016). Přípustné antiretrovirální režimy se simeprevirem jsou v současné době omezeny na raltegravir, rilpivirin, maravirok, tenofovir, emtricitabin, lamivudin a abakavir (Chen et al., 2014). Hladiny grazopreviru dramaticky vzrostou při kombinaci s potencovanými PI, což vede k hepatotoxicitě. Hladiny paritapreviru, ritonaviru, ombitasviru a dasabuviru se zvyšují v kombinované terapii s rilpivirinem, což může vést k prodloužení QT intervalu. Efavirenz snižuje hladiny velpatasviru a hrozí selhání terapie (Rice et al., 2016). V roce 2012 FDA varovala před současným podáváním bocepreviru a PI jejichž hladiny byly podstatně snižovány (Luetkemeyer et al., 2006).

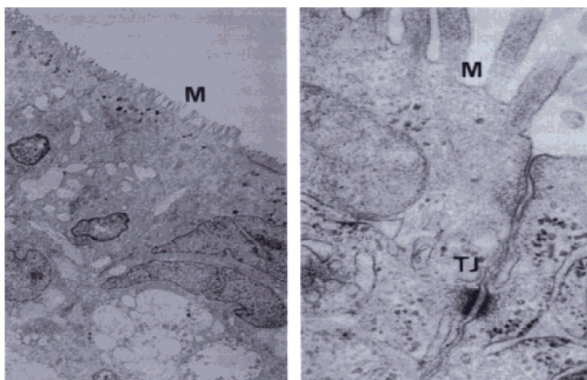
3.6 Modely studia střevní absorpce

ABC efluxní transportéry jsou exprimovány v gastrointestinálním traktu a omezují perorální biologickou dostupnost. Nedílnou součástí vývoje léčiv je hodnocení jejich vlivu na absorpci léčiv (FDA, 2012). Mezi biologické modely vhodné pro studium vlivu ABC transportérů patří *in vitro* využívající různé buněčné linie, *in situ* střevní segmenty, *in vivo* zvířecí modely a postupně zaváděné *ex vivo* modely (de Graaf et al., 2010; van Breemen & Li, 2005)

3.6.1 *In vitro* modely a buněčná linie Caco-2

In vitro modely napodobují lidský střevní epitel. Poskytují jednoduchý „high through put“ systém pro studium absorpce léčiv ze střeva. Buňky vytváří konfluentní monovrstvu a procházejí spontánní diferenciací. Pro modelování lidské střevní absorpce je používáno několik buněčných linií: MDCK („Madin Darby canine kidney“ – buněčná linie psích ledvinných buněk Madin-Darby), TC-7, HT29-MTX, 2/4/A1 a lidské buněčné linie karcinomu tlustého střeva T-84, HT-29 a nejpopulárnější Caco-2 (Matsson et al., 2005; Meunier, Bourrie, Berger, & Fabre, 1995; van Breemen & Li, 2005; Lei Zhang, Reynolds, Zhao, & Huang, 2010).

Buněčná linie Caco-2 je linie buněk lidského adenokarcinomu tlustého střeva (Sun et al., 2008). Poprvé byla použita jako model lidské intestinální absorpce kolem 80. let 20. století (van Breemen & Li, 2005). Caco-2 exprimují většinu známých ABC transportérů v pořadí podobném tenkému střevu. Byla zjištěna silná korelace mezi absorpcí léčiva v humánním jejunu a buňkami Caco-2 (Sun et al., 2008). Monovrstvu vytváří po sedmi dnech kultivace (Meunier et al., 1995), následně dochází k diferenciaci a po 21 až 25 dnech tvoří konfluentní monovrstvu cylindrických, polarizovaných epiteliálních buněk, s dobře definovanými těsnými spoji (Life & Services, 2011; van Breemen & Li, 2005). Na apikálním povrchu vykazují dobře diferencovaný kartáčový lem (Obr. 5). Integrita monovrstvy se běžně kontroluje měření transepiteliálního elektrického odporu (TEER) (Sun et al., 2008).



Obrázek 5: Pohled na monovrstvu buněk Caco-2 pořízený elektronovým mikroskopem (vlevo) s detailem apikální membrány (vpravo). Povšimněte si mikroklků (M) a těsných mezibuněčných spojů tzv. „tight junction“ (TJ). Převzato z (Shah, Jogani, Bagchi, & Misra, 2006).

Lékové transportéry v polarizované buněčné linii Caco-2 představují vektoriální dopravní systém, který může být měřen ve dvou směrech (apikálně-bazolaterálně a naopak) (Giacomini et al., 2012). Testování obousměrného transportu na buňkách Caco-2 je preferovanou metodou pro *in vitro* hodnocení substrátů a inhibitorů ABC transportérů (FDA, 2012). Každý substrát ABC transportéru může působit jako kompetitivní inhibitor pro jiný substrát, záleží na jeho afinitě a koncentraci (Krämer, 2016). Tato konkurence může vést k DDIs (Shah et al., 2006).

Další využití buněk Caco-2 je v transportních studiích (pasivní transcelulární a paracelulární transport, vezikulární transport) a studiu pre-systémového metabolismu léčiv, protože buňky exprimují různé izoenzymy cytochromu P450. I přes velkou užitečnost má model určité nedostatky: variabilní exprese transportérů (P-gp je nadměrně exprimován, což vede k podhodnocení absorpce jeho substrátů), nedostatek enzymů CYP450, „tight junctions“ jsou ve srovnání s tenkým střevem těsnější, nelze studovat jednotlivé střevní segmenty, nehybná vodní vrstva může působit jako bariéra pro transport lipofilních léčiv, určitou pracovní nevýhodou je dlouhá kultivační doba atd. (Krämer, 2016; Meunier et al., 1995; Pang, 2003; Shah et al., 2006; Sun et al., 2008; van Breemen & Li, 2005; Yumoto et al., 1999). Nevýhody Caco-2 a ostatních *in vitro* systémů zvyšují nutnost a potřebu zavádění nových modelů. Velký potenciál má zapojení *ex vivo* metodik.

3.6.2 *Ex vivo* modely a potkaní intestinální řezy

Lidské střevo je velmi heterogenní orgán, s výraznými strukturálními a funkčními rozdíly mezi duodenem, jejunem, ileem a tlustým střevem (de Graaf et al., 2010). *Ex vivo* metody poskytují teoretické prostředky pro odhadování lidské střevní absorpce. Řadíme mezi ně intestinální perfúzi (izolované perfundované střevní segmenty), techniku „evertovaného“ střeva, „Ussing“ komoru a tenké potkaní/lidské intestinální řezy (de Graaf et al., 2010; Dixit, Jain, & Dumbwani, 2012; Luo et al., 2013; Westerhout et al., 2014).

Model tkáňových řezů vymyslel v r. 1923 Otto Warburgem a v dnešní době se znovuobjevuje jeho potenciál pro testování DDIs. Techniku lze aplikovat na střevo lidské i pokusných zvířat (M. Li, de Graaf, & Groothuis, 2016). FDA uznává lidskou

střevní tkáň jako nejideálnější model pro pre-klinické studium střevní permeability. Vzhledem k její omezené dostupnosti (M. Li et al., 2016; Westerhout et al., 2014) se používá střevo potkaní. Potkan a člověk vykazují podobnou absorpci léčiva a expresi transportérů v tenkém střevě (Dezani, Pereira, Caffaro, Reis, & Serra, 2013; Maclean, Moenning, Reichel, & Fricker, 2008). Potkaní intestinální řezy (PCIS) představují *ex vivo* miniorgánový model, který obsahuje všechny typy intestinálních buněk v jejich přirozeném prostředí (de Graaf et al., 2010). Je to model vhodný pro studium transportu léčiv. Cenná je i možnost studia regionálního gradientu aktivity střevních transportérů. Studie aktivity ABC transportérů jsou zatím ale velmi omezené (M. Li, de Graaf, de Jager, & Groothuis, 2015; M. Li et al., 2016). Pomocí speciálně navržených tkáňových kráječů se připravují řezy reprodukovatelné a dobře definované tloušťky. U nepevného orgánu jako je střevo, se využívá jeho vkládání do agarózy a vytvoření válce, který se následně krájí (de Graaf et al., 2010). V rámci jednoho experimentu, je takto možné připravit více než 100 řezů z každé oblasti střeva, čímž se také snižuje počet potřebných experimentálních zvířat (M. Li et al., 2015). Technika je do velké míry limitována životaschopností tkáně (2 – 4 hodiny), ztrátou nervové činnosti a potenciálem pro morfologické poškození během přípravy (de Graaf et al., 2010; van Breemen & Li, 2005) Výsledky *ex vivo* mohou někdy vést k nesprávnému odhadu míry perorální absorpce (Luo et al., 2013). Dále je vzhledem ke kolmému řezání jak slizniční, tak serózní strana vystavena stejnému médiu, tudíž nemůže být studován vektorový transport léčiv přes střevní stěnu (M. Li et al., 2016).

4. HYPOTÉZA

Terapie HIV je založena na podávání kombinace antiretrovirotik. Řada těchto léčiv jsou popsány substráty nebo inhibitory ABC efluxních transportérů. Perorální podání HAART s sebou nese riziko interakcí antiretrovirotik na úrovni střevní absorpce. Pro zajištění kvalitní a bezpečné terapie je nezbytné mít přehled o interakcích těchto léčiv se střevními efluxními ABC transportéry. Ačkoli je screening interakcí s lékovými transportéry prováděn na úrovni pre-klinických studií, mnoho klinicky relevantních DDIs se objevuje až po zavedení léčiva na trh.

5. CÍL

- a) Zavedení *in vitro* metody využívající monovrstvu tvořenou Caco-2 buněčnou linií a *ex vivo* metodiky ultratenkých potkaních intestinálních řezů. Analýza interakcí modelového substrátu Rhodaminu 123 se střevními P-gp a BCRP s antiretrovirotiky; sledování inhibičního potenciálu vybraných antiretrovirotik.
- b) *In vitro* analýza DDIs TDF s vybranými antiretrovirotiky na intestinálních ABC transportérech.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

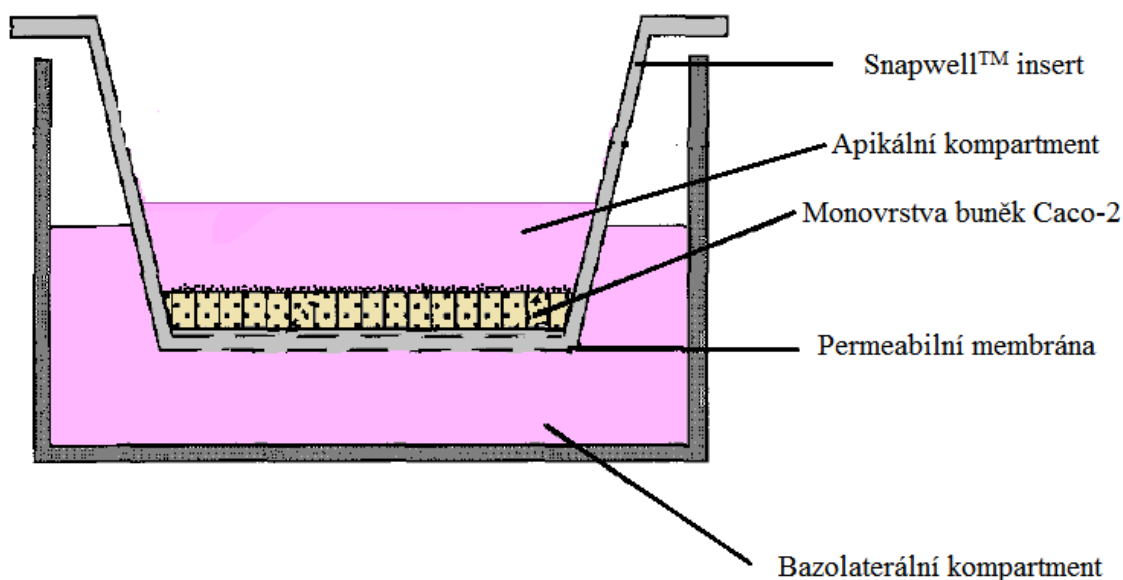
6.1 Chemikálie a reagensie

- Rhodamin 123 (RHD123)
- [3H] TDF Moravek: biochemicals
- Elakridar (GF120918; Sigma Aldrich)
- Lopinavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Ritonavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Abakavir (NIH AIDS Reagent Program)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide; Sigma Aldrich)
- HBSS (Hank's Balanced Salt solution; Sigma Aldrich)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma Aldrich)
- FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma Aldrich)
- NEAA (Non-essential Amino Acid)
- P/S (Penicilin/Streptomycin)
- Albumin
- PBS (Phosphate buffered saline)
- Trypsin
- KHP (Krebs-Henseleit pufr); pH = 7,42
- Agaróza (Agarose, low gelling temperature, Type VII-A; Sigma-Aldrich, cat. no. A0701)
- Williams E medium s obsahem L-glutaminu (Invitrogen cat no. 32551), s přídatkem glukózy
- ACN
- NaOH
- Ether
- Hovězí sérový albumin

6.2 *In vitro* transportní studie na buněčné linii Caco-2

6.2.1 Kultivace buněk

Buněčná linie Caco-2 byla získána od organizace ATCC (American Type Culture Collection). Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu (DMEM) obohaceném o 1% neesenciální aminokyseliny (NEAA) a 10% fetální hovězí sérum (FBS) v atmosféře 5% CO₂ při teplotě 37 °C. Buňky byly nasazeny na inserty s mikroporézní polykarbonátovou membránou v koncentraci 300 000 buněk/membránu (Transwell® Permeable Support, Corning Incorporated; Cat. No. 3401; plocha membrány 1,12 cm², 0,4 μm velikost pórů, průměr Snapwell™ insertu 12 mm). Kultivace probíhala 21 dní (Obr. 6). Během této doby bylo obden měněno kultivační médium DMEM obohacené o 1% NEAA, 10% FBS s 1% P/S a byla kontrolována integrita monovrstvy pomocí TEER.

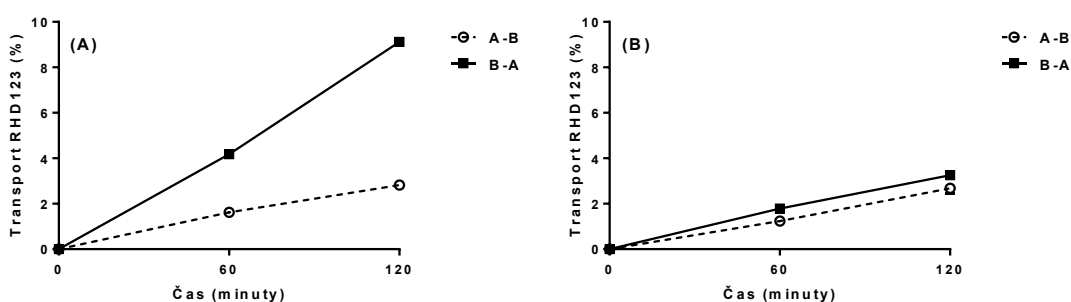


Obrázek 6: *Insert s polarizovanými buňkami Caco-2 narostlými do konfluentní diferencované vrstvy. Převzato a upraveno z (Meunier et al., 1995).*

6.2.2 Metoda obousměrného transportu na monovrstvě Caco-2 buněk

Rhodamin 123 (RHD123) byl vybrán jako modelový substrát P-gp/BCRP. Jeho transport přes buněčnou monovrstvu byl analyzován ve směru apikálně-bazolaterálním

(A-B) a bazolaterálně-apikálním (B-A). Před provedením experimentu byl u buněk změřen TEER a následně bylo odsáto kultivační médium. Buňky byly omyty pomocí přehřátého fosfátového pufru (PBS, 37 °C). Poté byla provedena pre-inkubace (30 minut) v experimentálním mediu HBSS s/bez testované látky (modelový inhibitor P-gp/BCRP elakridar, lopinavir, ritonavir nebo abakavir). Následně byl pre-inkubační roztok odstraněn a nahrazen inkubačním roztokem s RHD123. Akceptorový kompartment obsahoval 1% albumin, apikální kompartment (0,5 ml) měl pH upravené na hodnotu 6,5 a bazolaterální kompartment (1,5 ml) na hodnotu pH = 7,4 (pozn. pH bylo upravené i v průběhu pre-inkubace). Po 60 a 120 minutách byly odebírány z akceptorového kompartmentu vzorky o objemu 200 μ l a odebrané množství bylo nahrazováno příslušným pufrem s/bez testované látky. Koncentrace RHD123 byla vyhodnocena měřením fluorescence na přístroji TECAN Infinite M200 (ex: 485 nm, em: 529 nm). Byl-li jako modelový substrát P-gp použit TDF, byla jeho koncentrace stanovena měřením radioaktivity pomocí liquid scintillation counting přístrojem Tri-Carb 2900 TR Perkin Elmer. Obr. 7 graficky znázorňuje situaci, kdy testovaná látka je/není substrátem aktivních transportérů lokalizovaných na apikální membráně buněk v monovrstvě, kdy je/není transport ovlivněn ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A).



Obrázek 7: Schématické grafické znázornění obousměrného transportu, kdy testovaná látka přechází přes monovrstvu buněk Caco-2 (A) za účasti aktivního efluxního transportu v apikální membráně, (B) bez účasti aktivního střevního transportu nebo v přítomnosti inhibitoru. (A) Rychlost transportu je ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) snížena a ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A) zvýšena, tj. efluxní poměr (BA/AB) je > 1 ; (B) Rychlost transportu je ve směru apikálně-

bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A) srovnatelná, tj. efluxní poměr (BA/AB) je ≈ 1 .

6.2.3 Permeabilní koeficient

Permeabilní koeficienty (P_{app}) na buňkách Caco-2 byly vypočteny dle standardních doporučení s použitím rovnice $P_{app} [10^{-6} \text{ cm/s}] = (dC/dt) \times V_r / (A \times C_0)$, kde dC/dt je změna koncentrace v čase (měřená ve 120. minutě) v [koncentrace/s]; V_r je objem akceptorového kompartmentu v [cm^3]; A je plocha buněčné monovrstvy v [cm^2]; a C_0 vyjadřuje počáteční koncentraci v donorovém kompartmentu v [koncentrace] (Tong et al., 2007).

6.2.4 Efluxní poměr

Efluxní poměr (ER) definovaný jako poměr P_{app} ve směru B-A a P_{app} ve směru A-B, byl použit k odhadu velikosti efluxního transportu (Tong et al., 2007).

6.3 Ex vivo metodika ultratenkých potkaních intestinálních řezů

6.3.1 Příprava intestinálních řezů

Potkan (samec; rozmezí váhy 380 – 440 g) byl uveden inhalací etheru do celkové narkózy a usmrčen zlomením vazy. Poté byl vykvrven přerušáním karotid (experiment byl povolen Etickou komisí FaF číslo: 201511 S26P). Odebrané střevo bylo neprodleně vloženo do Krebsova pufru (KHP) o teplotě 4 °C, dostatečně okysličeným probubláváním pneumoxidem (95% O₂, 5% CO₂). S tkání se dále pracovalo na ledem chlazené desce. Střevo se pravidelně polévalo KHP, čímž se bránilo jeho oschnutí. Pomocí skalpelu bylo odděleno ileum, které bylo umístěno do KHP a udržováno při 4 °C. Z ilea byla odříznuta 4 cm dlouhá část, která se několikrát promyla pomocí KHP. Pak byly odstraněny zbytky KHP a ileum se na jednom konci uzavřelo, aby bylo možné ho naplnit agarózou. Naplněné ileum se okamžitě zchladilo ve studeném KHP po dobu 30 vteřin. Po odstranění přebytečné tukové tkáně se připravený segment příčně rozdělil na dvě stejné části, obě se vložily do kovového válečku a zalily agarózou. Po ztuhnutí agarózy se vyjmul váleček s tkání a krájel se na kráječi napojeném na chladicí okruh

(4 °C) na ultratenké řezy o tloušťce 250 μm (Krumdieck Tissue Slicer MD4000/MD6000).

6.3.2 Akumulační studie s využitím intestinálních řezů

Každý fragment ilea byl zbaven zbytku agarózy a vložen do 500 μl Williams E media s/bez inhibitoru předem nasyceného pneumoxidem (95% O₂, 5% CO₂, 37 °C). Pre-inkubace probíhala 30 minut na horizontální třepačce (frekvence 90 kmitů za minutu) v atmosféře pneumoxidu (95% O₂, 5% CO₂, 37 °C). Po pre-inkubaci byl každý řez přenesen do Williams E media (500 μl) s modelovým substrátem RHD123. Řezy byly odebírány po 120 minutách inkubace (probíhala za stejných podmínek jako pre-inkubace). Každý řez se dvakrát opláchnul ve studeném KHP a vložil do mikrozkušavky se skleněnými kuličkami. Přidalo se 600 μl ACN:H₂O (2:1). Tkáň byla zhomogenizována v homogenizátoru (2 x 40 vteřin; FastPrep-24TM 5G Instrument) a posléze odstředěna na centrifuze (10 minut, 10000 G). Koncentrace RHD123 se stanovila měřením fluorescence na přístroji TECAN Infinite M200 (ex: 485 nm, em: 529 nm).

6.4 Statistické zpracování

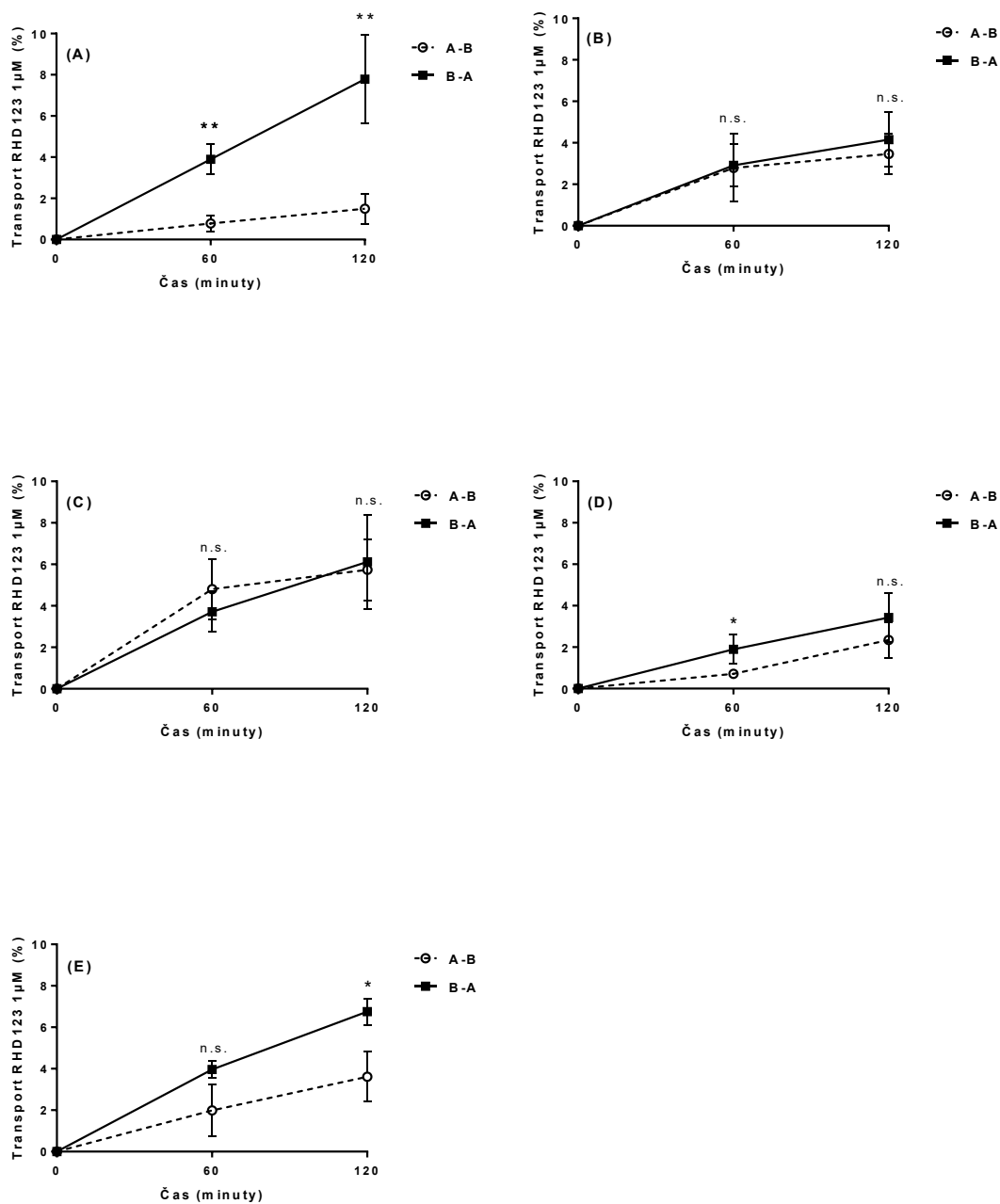
Statistická analýza a grafické vyjádření výsledků byly zpracovány prostřednictvím programu GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Pro zhodnocení rozdílu v transportu v A-B a B-A směru byl použit parametrický two-tailed Student's *t*-test a pro porovnání vlivu jednotlivých testovaných látek v *in vitro* a *ex vivo* studii byla použita one-way ANOVA s *post hoc* Dunnett testem. Data jsou prezentována jako průměry ± SD. Statistická významnost byla označena následovně: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

7. VÝSLEDKY

7.1 Transport RHD123 přes monovrstvu buněk Caco-2 a efekt vybraných antiretrovirálních látek

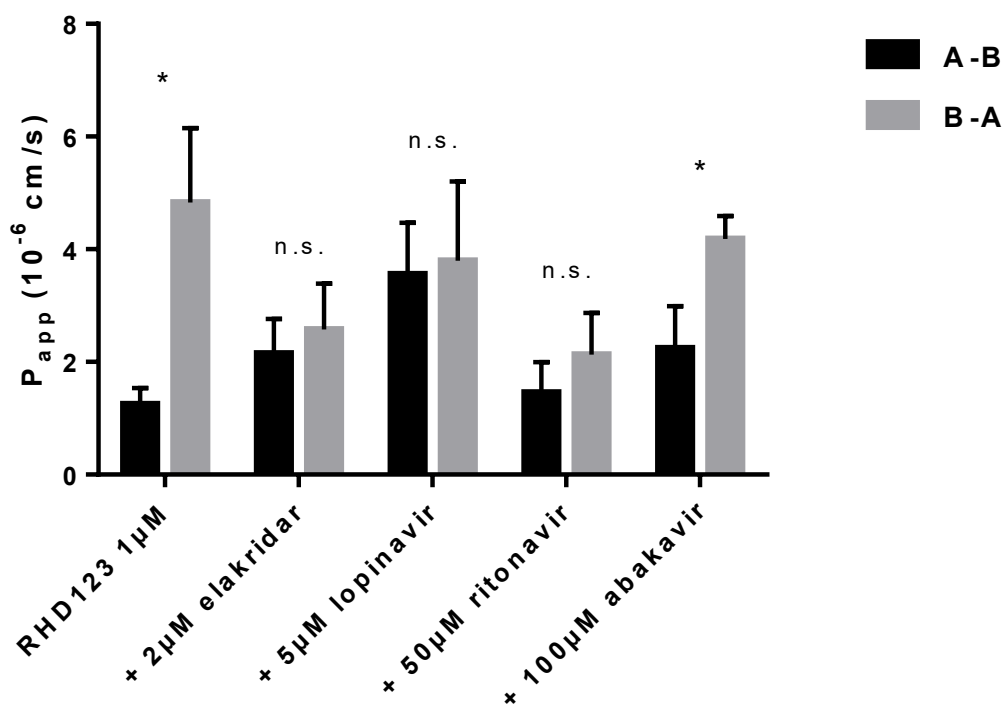
V první řadě byl na buňkách Caco-2 testován modelový substrát P-gp a BCRP, RHD123 (1 μM). Graf 1A - B zobrazuje časovou závislost změny koncentrace RHD123 v akceptorovém kompartmentu v přítomnosti/nepřítomnosti modelového inhibitoru elakridaru (2 μM), či dalších vybraných látek v obou měřených časových intervalech (60 a 120 minut), jak je vidět na Grafu 1C – E.

V Graf 2 jsou dále uvedeny permeabilní koeficienty transportu RHD123 (1 μM) při absenci/přítomnosti elakridaru (2 μM) nebo testovaných ARV. Permeabilita RHD123 (1 μM) v apikálně-bazolaterálním směru ($P_{\text{app (A-B)}} = 1,25 \pm 0,17 \times 10^{-6}$ cm/s) byla významně nižší než v měřeném směru bazolaterálně-apikálním ($P_{\text{app (B-A)}} = 4,83 \pm 0,76 \times 10^{-6}$ cm/s). Vlivem přidání testovaných ARV byla permeabilita v obou směrech srovnatelná. U duálního inhibitoru P-gp a BCRP elakridaru (2 μM) byla permeabilita ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) zvýšena na hodnotu ($P_{\text{app (A-B)}} = 2,15 \pm 0,36 \times 10^{-6}$ cm/s) a ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A) hodnoty poklesly na $P_{\text{app (B-A)}} = 2,58 \pm 0,47 \times 10^{-6}$ cm/s. Lopinavir (5 μM) především zvýšil permeabilitu RHD123 (1 μM) ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) na hodnotu ($P_{\text{app (A-B)}} = 3,56 \pm 0,53 \times 10^{-6}$ cm/s). Jeho vliv ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A) byl menší, permeabilita poklesla na $P_{\text{app (B-A)}} = 3,80 \pm 0,81 \times 10^{-6}$ cm/s. Vliv ritonaviru (50 μM) byl především pozorován ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A), o čemž svědčí hodnoty $P_{\text{app (B-A)}} = 2,13 \pm 0,43 \times 10^{-6}$ cm/s. Permeabilita ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) $P_{\text{app (A-B)}} = 1,45 \pm 0,31 \times 10^{-6}$ cm/s byla v jeho přítomnosti ovlivněna nejméně ze všech ARV. Abakavir (100 μM) měl na transport RHD123 (1 μM) ve směru bazolaterálně-apikálním (B-A) nejmenší vliv, permeabilita klesla k hodnotám $P_{\text{app (B-A)}} = 4,19 \pm 0,23 \times 10^{-6}$ cm/s. Ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) byla zvýšena na ($P_{\text{app (A-B)}} = 2,24 \pm 0,43 \times 10^{-6}$ cm/s).



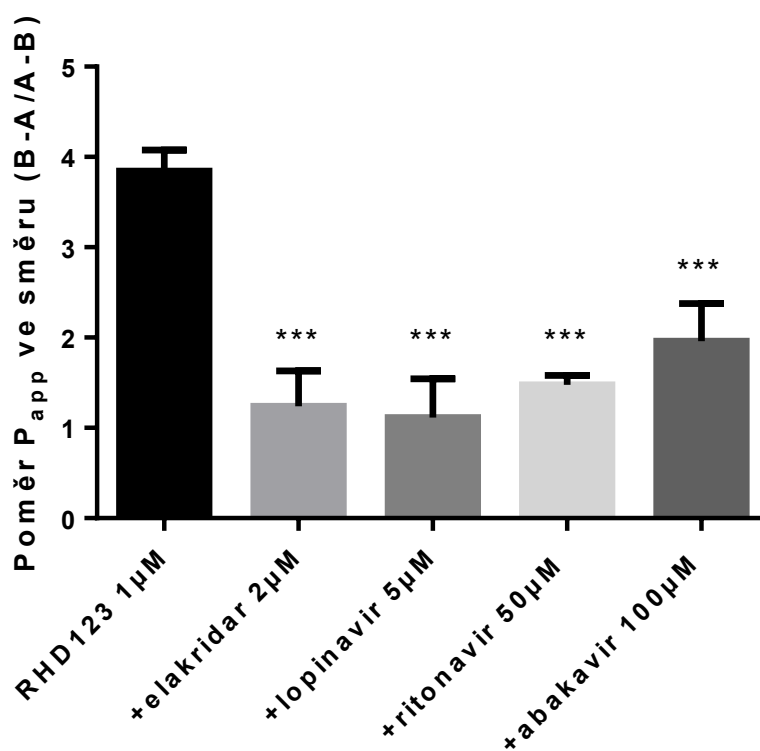
Graf 1: Časová závislost změny koncentrace (A) RHD123 (1 μM) v přítomnosti (B) duálního inhibitoru P-gp a BCRP elakridaru (2 μM), antiretrovirotik (C) lopinaviru (5 μM), (D) ritonaviru (50 μM) a (E) abakaviru (100 μM) metodou obousměrného transportu přes monovrstvu tvořenou buňkami Caco-2. Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) ze tří nezávislých experimentů provedených

v triplikátech. Statistická signifikance změn procentuálně vyjádřeného transportu byla posuzována pomocí *t*-testu; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; n.s. (bez signifikance).



Graf 2: Vliv testovaných látek na obousměrný transport RHD123 (1 μ M) přes monovrstvu buněk Caco-2 po 120 minutách inkubace. Uvedené hodnoty P_{app} pro směr apikálně-bazolaterální (A-B) a bazolaterálně-apikální (B-A) jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD) ze tří nezávislých experimentů, provedených v triplikátech. Statistická významnost P_{app} pro B-A a A-B směr byla posuzována pomocí *t*-testu; *, $p \leq 0,05$; n.s. (bez signifikance).

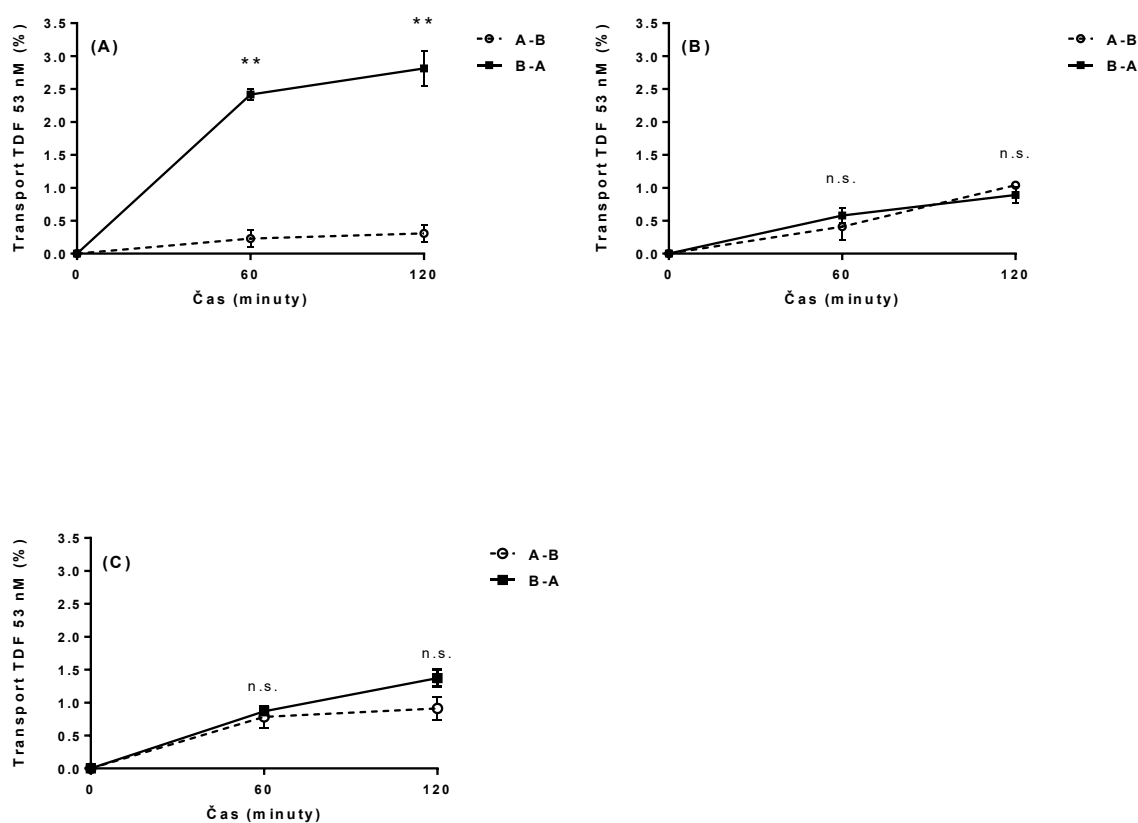
Statická analýza efluxních poměrů (ER) po 120 minutách inkubace prokázala signifikantní snížení ER v přítomnosti testovaných látek (Graf 3). Vliv testovaných látek na snížení ER ($ER_{RHD123} = 3,84 \pm 0,23$) je přibližně stejný: lopinavir ($ER_{lopinavir} = 1,11 \pm 0,43$), elakridar ($ER_{elakridar} = 1,24 \pm 0,39$), ritonavir ($ER_{ritonavir} = 1,48 \pm 0,10$) a abakavir ($ER_{abakavir} = 1,96 \pm 0,42$). Z výsledků vyplývá, že všechna tři testovaná ARV mají významné inhibiční účinky na střevních ABC efluxních transportérech. V přítomnosti abakaviru sice zůstává signifikantní rozdíl mezi $P_{app(A-B)}$ a $P_{app(B-A)}$ (Graf 2), ale mění se $ER_{abakavir}$ (Graf 3).



Graf 3: Statistická analýza poměrů permeabilních koeficientů P_{app} ve směru (B-A/A-B) metodou obousměrného transportu na buňkách Caco-2 po 120 minutách probíhající inkubace. Byl prokázán signifikantní pokles ER v přítomnosti testovaných látek. Uvedené hodnoty ER jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD) ze tří nezávislých experimentů, provedených v triplicátech. Statisticky významné změny ER byly hodnoceny one-way ANOVA s post hoc Dunnett testem; *, $p \leq 0,001$.**

7.2 Transport TDF přes monovrstvu buněk Caco-2

Druhým modelovým substrátem testovaným na buněčné monovrstvě Caco-2 bylo klinicky využívané ARV TDF (53 nM). Asymetrie v rychlosti transepiteliálního transportu modelového substrátu naznačuje zapojení aktivního transportu (Graf 4A). Rychlost transportu TDF (53 nM) v přítomnosti duálního inhibitoru P-gp a BCRP elakridaru (2 μ M) a v přítomnosti ARV lopinaviru (20 μ M) byla stejná v obou směrech (Graf 4B – C). Výsledky naznačují inhibiční vliv lopinaviru na aktivní transport, který vedl k ovlivnění permeability TDF přes monovrstvu buněk Caco-2.

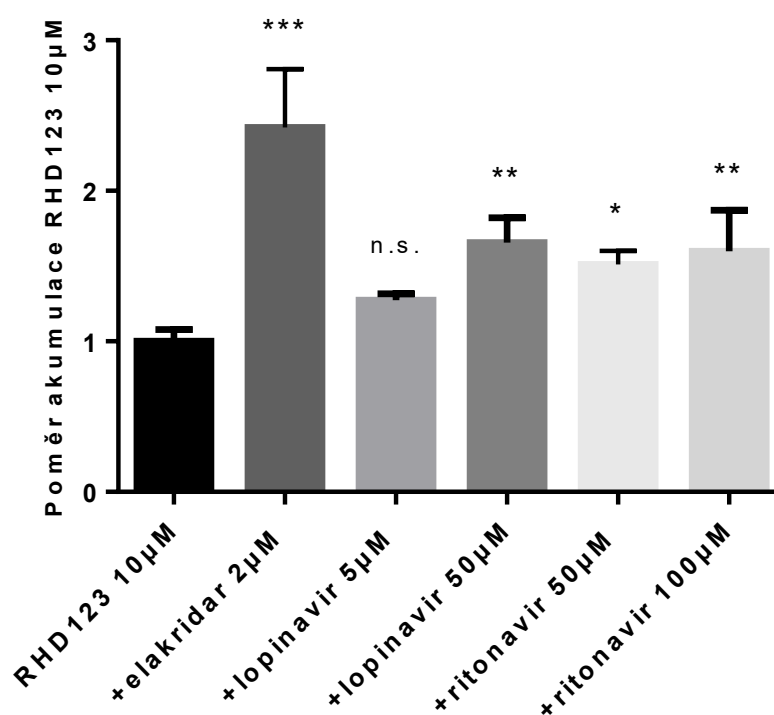


Graf 4: Časová závislost změny koncentrace (A) TDF (53 nM) v přítomnosti (B) duálního inhibitoru P-gp a BCRP elakridaru (2 μ M) a antiretrovirotika (C) lopinaviru (20 μ M) metodou obousměrného transportu přes monovrstvu tvořenou buňkami Caco-2. Transport byl sledován ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) i bazolaterálně-apikálním (B-A). Přestup přes monovrstvu je vyjádřen jako procento koncentrace modelového substrátu aplikovaného do donorového kompartmentu. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD) z jednoho experimentu provedeného v technickém duplikátu. Statistická signifikance

změn procentuálně vyjádřeného transportu byla posuzována pomocí *t*-testu; **, $p \leq 0,01$; n.s. (bez statistické významnosti).

7.3 *Ex vivo* akumulční studie RHD123 s využitím PCIS

Na PCIS ilea byla sledována interakce RHD123 (10 μ M) s intestinálním efluxními lékovými transportéry a dále efekt elakridaru (2 μ M) a klinicky relevantních antiretrovirotik lopinaviru (5 μ M a 50 μ M) a ritonaviru (50 μ M a 100 μ M) na akumulaci RHD123 (10 μ M). Elakridar signifikantně zvýšil akumulaci RHD123 na hodnotu $2,42 \pm 0,39$. Lopinavir v koncentraci 5 μ M neprokázal statisticky významné zvýšení akumulace RHD123 ($1,27 \pm 0,04$). Signifikantní nárůst akumulace RHD123 ($1,66 \pm 0,16$) byl zaznamenán u lopinaviru v koncentraci 50 μ M. U ritonaviru byl pozorován statisticky významný inhibiční efekt v obou testovaných koncentracích. Akumulace RHD123 při použití ritonaviru 50 μ M byla $1,51 \pm 0,09$ a při zvýšení koncentrace na 100 μ M se akumulace zvýšila na $1,60 \pm 0,27$ (Graf 5).



Graf 5: Poměr akumulace 10 μ M RHD123 vůči kontrole v řezech ilea po 120 minutách. Byl prokázán signifikantní nárůst akumulace RHD123 v řezech ilea v přítomnosti všech testovaných látek vyjma lopinaviru (5 μ M). Naměřené hodnoty jsou

vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD) ze tří nezávislých experimentů, provedených v triplikátech. Pro hodnocení statistické významnosti byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnett testem; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; n.s. (bez statistické signifikance).

8. DISKUZE

Aktivita efluxních ABC transportérů signifikantně přispívá ke snížení střevní absorpce tím, že pumpují své substráty z vnitřního prostřední enterocyty zpět do lumen střev (Fromm, 2011). Efluxní ABC transportéry jsou místem častého výskytu DDI, kdy současné podání dvou a více látek může významně ovlivnit jejich dosažené plazmatické koncentrace. ART je založena na kombinačních režimech, a protože je řada antiretrovirotik substrátem/inhibitorem ABC transportérů, výskyt DDI je častý (Bousquet et al., 2009; Kis et al., 2010; D Pal et al., 2011; Weiss, 2007). Studium interakcí se střevními transportéry je součástí preklinického výzkumu. Na základě těchto znalostí lze anticipovat DDI na intestinálních transportérech, nicméně, tyto DDI je nutné dále kvantifikovat, aby bylo možné předjímat klinickou závažnost (FDA, 2012; Giacomini et al., 2012). Pro sledování interakcí s/na lékových transportérech jsou vhodné *in vitro* modely. Pro modelování lidské střevní absorpce je používáno několik buněčných linií, ale zlatým standardem je buněčná linie Caco-2 (Matsson et al., 2005; Meunier et al., 1995; van Breemen & Li, 2005; Lei Zhang et al., 2010). Testování obousměrného transportu přes monovrstvu buněk Caco-2 je preferovanou *in vitro* metodou pro hodnocení substrátů a inhibitorů ABC transportérů (FDA, 2012). Doporučuje se používat nízké koncentrace, typicky v nízkém nano- až mikromolárním rozmezí, aby nedošlo k saturaci transportéru a tím i dosažení falešně negativního výsledku. Pokud jsou používány inhibitory transportních proteinů, má být udržována jejich konstantní koncentrace po celou dobu experimentu a v ideálním případě by měly být použity specifické inhibitory transportního procesu. Ve screeningu jsou však spíše upřednostňovány nescifické inhibitory, aby se dosáhlo současné inhibice několika efluxních transportérů. Tento postup „all-in-one“ (všechno v jednom) je užitečný pro kvalitativní posouzení přínosu aktivního transportu na permeabilitu (Hubatsch, Ragnarsson, & Artursson, 2007).

V této diplomové práci jsme pro studium interakcí ARV se střevními efluxními transportéry zaváděli a optimalizovali *in vitro* model založený na buněčné linii Caco-2. Výsledkem optimalizace bylo nastavení různé kyselosti prostředí na apikální (pH = 6,5) a bazolaterální (pH = 7,4) straně a přidávání albuminu do akceptorového kompartmentu (Neuhoff, Artursson, Zamora, & Ungell, 2006). Jako modelový substrát P-gp a BCRP byl pro transportní studie na buněčné linii Caco-2 zvolen RHD123, který

je fluorescenčně detekovatelný (Netsomboon, Laffleur, Suchaoin, & Bernkop-Schnürch, 2016; Yumoto et al., 1999). Testovaná koncentrace 1 μM byla nižší, než uvádí současná literatura, důvodem byla snaha použít nesaturující koncentraci (Dubray et al., 2016; Netsomboon et al., 2016; Oltra-Noguera et al., 2015; Zhao et al., 2016). Námi naměřený ER pro RHD123 ($ER_{\text{RHD123}} = 3,84 \pm 0,23$) (Graf 3) je v souladu s literaturou, která uvádí hodnoty ER od 2,3 do 12 (H. Li et al., 2016; Mandracchia et al., 2017; Troutman & Thakker, 2003; Wang et al., 2009; Zhao et al., 2016). Důvodem rozptylu v hodnotách ER_{RHD123} může být jiné nastavené pH prostředí obou kompartmentů, číslo pasáže buněk, přítomnost albuminu v akceptorovém kompartmentu, doba diferenciacce buněk, typ použitého plastu, typ rozpouštědla atd. (Oltra-Noguera et al., 2015).

Jako modelový inhibitor P-gp/BCRP byl použit inhibitor druhé generace elakridar. Jeho použití potvrdilo specifitu transportu RHD123 přes monovrstvu buněk Caco-2 (Choudhuri & Klaassen, 2006). Pro potvrzení využitelnosti tohoto substrátu pro sledování DDIs *in vitro* jsme vybrali ARV (lopinavir, ritonavir a abakavir) (Graf 1C – D). Lopinavir je popsáným inhibitorem P-gp (Kis et al., 2010, 2013); literatura uvádí $IC_{50} (\text{lopinavir}) = 1,7 \mu\text{M}$ na buňkách Caco-2 s RHD123 jako použitým substrátem (Vishnuvardhan, D., Moltke LL., Richert C., 2003). Lopinavir byl v našem případě testován v koncentraci 5 μM a prokázal inhibiční potenciál snížením ER k hodnotám $ER_{\text{lopinavir}} = 1,11 \pm 0,43$ (Graf 3). Abakavir je v literatuře uváděným substrátem/inhibitorem P-gp a BCRP (Neumanova, Cervený, Greenwood, Ceckova, & Staud, 2015) a na buněčné linii Caco-2 byl testován v koncentraci 100 μM . V této koncentraci významně snížil ER k hodnotám ($ER_{\text{abakavir}} = 1,96 \pm 0,42$) (Graf 3), ačkoliv transport ve směru apikálně-bazolaterálním (A-B) a bazolaterálně-apikálním (B-A) se moc nezměnil (Graf 2). Při volbě testované koncentrace jsme vycházely ze studie Neumanova et al. provedené na placentě (Neumanova et al., 2015). Ritonavir je popsáným inhibitorem P-gp (Gemtessa & Chirch, 2013). Ritonavir testovaný v koncentraci 50 μM , volené na základě literatury (Tong et al., 2007), významně snížil ER k hodnotě $ER_{\text{ritonavir}} = 1,48 \pm 0,10$. Netsomboon et al. (2016) testovali ritonavir v koncentraci 20 μM , kdy po 120 minutách inkubace poklesly hodnoty $ER_{\text{ritonavir}} = 2,3$. Námi prezentovaná hodnota $ER_{\text{ritonavir}}$ je nižší z důvodu použití vyšší koncentrace ritonaviru (Netsomboon et al., 2016). Statistická analýza poměrů P_{app} je ke zhlédnutí v Grafu 3.

Tenofovir má špatnou biologickou dostupnost po p.o. podání a proto je podáván ve formě proléčiva TDF. Absorpce TDF je nicméně také omezena aktivitou P-gp (Tong et al., 2007). Po absorpci se TDF rychle hydrolyzuje na tenofovir. Klinické studie uvádějí mírné změny farmakokinetických parametrů při současném podávání TDF v dávce 300 mg v kombinaci s lopinavirem potencovaným ritonavirem (400 mg/100 mg), které vedlo ke zvýšení AUC o 32 % a c_{\max} o 15 % tenofoviru. Za účelem studia účinku lopinaviru na permeabilitu TDF ve fyziologicky relevantním modelu gastrointestinální absorpce, jsme provedli obousměrnou transportní studii na buňkách Caco-2 (Graf 4C). Lopinavir byl zvolen jako modelová látka, protože Tong et al. jej popisují jako nejsilnější inhibitor TDF efluxu na buňkách Caco-2 a získaný výsledek je srovnatelný s jejich publikovanými daty (Tong et al., 2007). Ve spojení s předchozími studiemi naše výsledky naznačují významnou lékovou interakci lopinaviru s TDF na intestinálních transportérech, která může významně ovlivňovat střevní absorpci a tedy i plazmatické hladiny tenofoviru. Interakce mezi TDF a lopinavirem na úrovni cytochromu P450 nejsou pravděpodobné kvůli nedostatečnému zapojení cytochromu P450 v eliminační cestě TDF nebo tenofoviru (Tong et al., 2007). Byly provedeny i další experimenty, kde byl sledován efekt ARV na obousměrný transport TDF. Jejich výsledky ovšem neuvádíme z důvodu značné variability výsledků, kterou přisuzujeme zejména zvolené metodě analýzy a předčasné hydrolyze TDF na tenofovir monoester a tenofovir (Tong et al., 2007). V současné době se pracuje na vyvinutí analytické metody k detekci TDF a jeho metabolitů.

Model PCIS může být v porovnání s Caco-2 buňkami lepší a z pohledu fyziologie praktičtější alternativou (M. Li et al., 2015). Při studiu na potkaních bylo použito ileum, protože tento segment vykazuje nejvyšší transport RHD123 zprostředkovaný P-gp a BCRP (Maclean et al., 2008; Yumoto et al., 1999). Pracuje se s čerstvou tkání a exprese transportérů a enzymů je na fyziologické úrovni (M. Li et al., 2015). Na druhou stranu je střevo vysoce citlivé k ischemii. Střevní tkáň rychle ztrácí životaschopnost a měla by být uchovávána a krájena v KHB. Agaróza musí mít při plnění střeva 37 °C, jakmile by byla teplota vyšší, slizniční epitel může být poškozen. Pokud by byly řezy tlusté, může docházet k nekróze ve středu řezu, protože difúzní vzdálenost pro živiny a kyslík je příliš dlouhá. Na druhou stranu řezy by neměly být tenčí než 100 μm , protože poměr mezi poškozenými a zdravými buňkami by byl příliš

vysoký. Je důležité okamžitě přenést plata zpět do inkubátoru, protože pH prostředí se v normální atmosféře rychle mění (de Graaf et al., 2010).

Použitá testovaná koncentrace RHD123 10 μM je v souladu s literaturou (M. Li et al., 2015). Jako pozitivní kontrola pro inhibici P-gp/BCRP byl použit elakridar (2 μM), který signifikantně zvýšil akumulaci RHD123 na $2,42 \pm 0,39$. Protože lopinavir v koncentraci 5 μM neprokázal statisticky významné zvýšení akumulace RHD123 ($1,27 \pm 0,04$), byla látka testována v koncentraci vyšší, což již vedlo k signifikantnímu nárůstu akumulace RHD123 ($1,66 \pm 0,16$). U ritonaviru byl pozorován statisticky významný inhibiční efekt. Akumulace RHD123 při použití ritonaviru 50 μM byla $1,51 \pm 0,09$ a při zvýšení koncentrace na 100 μM se signifikantně zvýšila na $1,60 \pm 0,27$) (Graf 5). Uvedené hodnoty poměrů akumulace nebylo možné porovnat s dostupnou literaturou. Doposud nebylo provedeno testování ARV ani elakridaru na PCIS. V této oblasti, resp. na *ex vivo* modelu PCIS přináší tato práce nová data. Výchozí koncentrace lopinaviru, ritonaviru a elakridaru byly použity stejné jako na modelu buněk Caco-2 a je možné, že jsou ještě nižší než koncentrace, které se vyskytují v lumen střev. Na modelu PCIS jsme se pokusili testovat i vliv ARV na akumulaci TDF, ale opět jsme narazili na problém použití radioizotopu popsany výše u buněk Caco-2, proto data neuvádíme.

9. ZÁVĚR

Tato práce přispěla k zavedení *in vitro* a *ex vivo* experimentálních modelů pro studium interakcí ARV se střevními lékovými efluxními transportéry. Metoda *in vitro* byla založena na buněčné linii Caco-2. Za modelový substrát P-gp byl zvolen RHD123 a kontrolním inhibítozem P-gp/BCRP byl elakridar. Testovanými ARV byla: lopinavir, ritonavir a abakavir. Druhým testovaným substrátem na buněčné monovrstvě Caco-2 bylo klinicky využívané antiretrovirotikum TDF. Lopinavir, ritonavir i abakavir mohou ovlivnit *in vitro* absorpci modelové látky RHD123 a lopinavir zvyšuje transmembránový přestup TDF. Z důvodu značné variability výsledků u TDF v přítomnosti dalších zástupců ze skupiny ARV je potřeba provést další *in vitro* experimenty, pravděpodobně s odlišnou technikou analýzy. Testování popsaných substrátů P-gp/BCRP ze skupiny ARV pak ukázalo, že pomocí PCIS je možné získat výsledky srovnatelné s těmi získanými *in vitro* na Caco-2 buněčné linii. Akumulační studie na intestinálních řezech potkana tak představují zajímavou alternativu k pokusům *in vitro*. Do budoucna je zde potřeba dalších analýz a studií dokončovat.

10. ZDROJE

- Albermann, N., Schmitz-Winnenthal, F. H., Zraggen, K., Volk, C., Hoffmann, M. M., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2005). Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochemical Pharmacology*, 70(6), 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.06.018>
- Bousquet, L., Pruvost, A., Guyot, A. C., Farinotti, R., & Mabondzo, A. (2009). Combination of tenofovir and emtricitabine plus efavirenz: In vitro modulation of ABC transporter and intracellular drug accumulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 896–902. <https://doi.org/10.1128/AAC.00733-08>
- Collection, S. (2016). HHS Public Access, 8(5), 583–592. <https://doi.org/10.1002/aur.1474.Replication>
- de Graaf, I. a M., Olinga, P., de Jager, M. H., Merema, M. T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E. G., & Groothuis, G. M. M. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature Protocols*, 5(9), 1540–51. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.111>
- Dezani, A. B., Pereira, T. M., Caffaro, A. M., Reis, J. M., & Serra, C. H. dos R. (2013). Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(3), 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.005>
- Ding, R., Tayrouz, Y., Riedel, K. D., Burhenne, J., Weiss, J., Mikus, G., & Haefeli, W. E. (2004). Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 76(1), 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.02.008>
- Dixit, P., Jain, D. K., & Dumbwani, J. (2012). Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 65(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2011.11.001>
- Dubray, O., Jannin, V., Demarne, F., Pellequer, Y., Lamprecht, A., & Béduneau, A. (2016). In-vitro investigation regarding the effects of Gelucire 44/14 and Labrasol ALF on the secretory intestinal transport of P-gp substrates. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.012>
- Edwards, D. J., Fitzsimmons, M. E., Schuetz, E. G., Yasuda, K., Ducharme, M. P., Warbasse, L. H., ... Watkins, P. (1999). 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 65(3), 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(99\)70102-5](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(99)70102-5)
- FDA. (2012). Guidance for industry. Drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. *Guidance Document*, (February), 79.
- FDA. (2017). Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection. Retrieved February 6, 2017, from <https://www.fda.gov/forpatients/illness/hiv/aids/treatment/ucm118915.htm>
- Fromm, M. F. (2011). Transporter-mediated drug – drug interactions Review. *Blood*, 1017–1037.
- Gallant, J. E., DeJesus, E., Arribas, J. R., Pozniak, A. L., Gazzard, B., Campo, R. E., ...

- Cheng, A. K. (2006). Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *New Engl J Med*, 354(3), 251–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051871>
- Gemtessa, T. A., & Chirch, L. M. (2013). Update on Hepatitis C Virus and HIV Coinfection. *J Clin Transl Hepatol*, 1(2), 109–115. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2013.00018>
- Giacomini, K. M., Huang, S., Tweedie DJ, & Benet, L. Z. (2012). NIH Public Access. *Nature*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>. Membrane
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3–20–2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Hammer, S. M., Saag, M. S., Schooley, R. T., Jacobsen, D. M., Thompson, M. A., Carpenter, C. C. J., ... Volberding, P. A. (2006). CLINICIAN ' S CORNER Treatment for Adult HIV Infection. *The Journal of the American Medical Association*, 296(7), 827–843. <https://doi.org/10.1001/jama.292.2.251>
- Higgins, C. F. (1992). ABC Transporters: From Microorganisms to Man. <Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Cb.08.110192.000435>, 67–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.8.1.67>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Chearskul, P., Rongkavilit, C., Al-Tatari, H., & Asmar, B. (2006). New antiretroviral drugs in clinical use. *Indian J Pediatr*, 73(4), 335–341.
- Chen, J., Feeney, E. R., & Chung, R. (2014). HCV and HIV Co-infection: Mechanisms and Management. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 19(2), 161–169. <https://doi.org/10.3851/IMP2701>. Changes
- Choudhuri, S., & Klaassen, C. D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *International Journal of Toxicology*, 25(4), 231–259. <https://doi.org/10.1080/10915810600746023>
- Jiang, H.-Y., Zhang, M.-N., Chen, H.-J., Yang, Y., Deng, M., & Ruan, B. (2014). Nevirapine versus efavirenz for patients co-infected with HIV and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 25, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.020>
- Jilich, D., Rozsypal, H., Zjevíková, A., Sedláček, D., Snopková, S., & Machala, L. (2014). Etravirin v klinické praxi, 28(2), 6–8.
- Juurlink, D. N., Mamdani, M., Kopp, A., Laupacis, A., & Redelmeier, D. A. (2003). Drug-drug interactions among elderly patients hospitalized for drug toxicity. *Journal of the American Medical Association*, 289(13), 1652–1658. <https://doi.org/10.1001/jama.289.13.1652>
- Karageorgopoulos, D. E., Allen, J., & Bhagani, S. (2015). Hepatitis C in human immunodeficiency virus co-infected individuals: Is this still a “special population”? *World Journal of Hepatology*, 7(15), 1936–52. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i15.1936>
- Kearney, B. P., Sayre, J. R., Flaherty, J. F., Chen, S.-S., Kaul, S., & Cheng, A. K. (2005). Drug-Drug and Drug-Food Interactions Between Tenofovir Disoproxil Fumarate and Didanosine. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45(12), 1360–1367. <https://doi.org/10.1177/0091270005281351>
- Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N. Y., & Bendayan, R. (2010). The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in*

- Pharmacological Sciences*, 31(1), 22–35.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.10.001>
- Kis, O., Zastre, J. A., Hoque, M. T., Walmsley, S. L., & Bendayan, R. (2013). Role of drug efflux and uptake transporters in atazanavir intestinal permeability and drug-drug interactions. *Pharmaceutical Research*, 30(4), 1050–1064.
<https://doi.org/10.1007/s11095-012-0942-y>
- Klein, I., Sarkadi, B., & Váradi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1461(2), 237–262.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00161-3)
- Krämer, S. D. (2016). Quantitative aspects of drug permeation across in vitro and in vivo barriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 30–46.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.013>
- Květina, J., & Grundmann, M. (2000). Farmakologické interakce, 17–21.
- Lee, C. A., O'Connor, M. A., Ritchie, T. K., Galetin, A., Cook, J. A., Ragueneau-Majlessi, I., ... Zamek-Gliszczynski, M. J. (2015). Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 43(4), 490–509. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.062174>
- Li, H., Li, J., Liu, L., Zhang, Y., Luo, Y., Zhang, X., ... Qu, S. (2016). Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model. *Planta Medica*, 82(13), 1202–1207. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1568597>
- Li, M., de Graaf, I. A. M., de Jager, M. H., & Groothuis, G. M. M. (2015). Rat precision-cut intestinal slices to study P-gp activity and the potency of its inhibitors ex vivo. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1070–1078.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.011>
- Li, M., de Graaf, I. A. M., & Groothuis, G. M. M. (2016). Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(2), 175–90.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1125882>
- Life, S. G. S., & Services, S. (2011). Caco-2 Cellular System : *Technical Bulletin, february*(February), 1–2.
- Luetkemeyer, A. F., Havlir, D. V., & Currier, J. S. (2006). Complications of HIV disease and antiretroviral therapy. *Topics in Antiviral Medicine*, 20(2), 48–60.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Luo, Z., Liu, Y., Zhao, B., Tang, M., Dong, H., Zhang, L., ... Wei, L. (2013). Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(2), 208–216.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.06.001>
- Maclean, C., Moenning, U., Reichel, A., & Fricker, G. (2008). Closing the Gaps : A Full Scan of the Intestinal Expression of P-Glycoprotein , Breast Cancer Resistance Protein , and Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in Male and Female Rats ABSTRACT : *Pharmacology*, 36(7), 1249–1254.
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.020859.clinically>
- Mandracchia, D., Trapani, A., Tripodo, G., Perrone, M. G., Giammona, G., Trapani, G., & Colabufo, N. A. (2017). In vitro evaluation of glycol chitosan based formulations as oral delivery systems for efflux pump inhibition. *Carbohydrate Polymers*, 166, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.096>
- Matsson, P., Bergström, C. A. S., Nagahara, N., Tavelin, S., Norinder, U., & Artursson,

- P. (2005). Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(2), 604–613. <https://doi.org/10.1021/jm049711o>
- Meunier, V., Bourrie, M., Berger, Y., & Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology*, 11(3–4), 187–194. <https://doi.org/10.1007/BF00756522>
- Murakami, T., & Takano, M. (2008). Intestinal efflux transporters and drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(7), 923–940. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.7.923>
- Netsomboon, K., Laffleur, F., Suchaoin, W., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Novel in vitro transport method for screening the reversibility of P-glycoprotein inhibitors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 100, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.019>
- Neuhoff, S., Artursson, P., Zamora, I., & Ungell, A.-L. (2006). Impact of extracellular protein binding on passive and active drug transport across Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research*, 23(2), 350–359. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9304-3>
- Neumanova, Z., Cervený, L., Greenwood, S. L., Ceckova, M., & Staud, F. (2015). Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir. *Reproductive Toxicology*, 57, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.07.070>
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M. F., & Mao, Q. (2010). Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism*, 11(7), 603–17. <https://doi.org/10.2174/138920010792927325>
- Olkola, K. T., & Ahonen, J. (2001). Drug interactions. *Drugs*, 44(7), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.04.015>
- Ultra-Noguera, D., Mangas-Sanjuan, V., Centelles-Sangüesa, A., Gonzalez-Garcia, I., Sanchez-Castaño, G., Gonzalez-Alvarez, M., ... Bermejo, M. (2015). Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 71, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.004>
- Oramasionwu, C. U., Moore, H. N., & Toliver, J. C. (2014). Barriers to hepatitis C antiviral therapy in HIV/HCV co-infected patients in the United States: a review. *AIDS Patient Care and STDs*, 28(5), 228–39. <https://doi.org/10.1089/apc.2014.0033>
- Pal, D., Kwatra, D., Minocha, M., Paturi, D., Budda, B., & Miltra, A. (2011). Efflux transporters and cytochrome P450 mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Science*, 88(21), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.012>
- Pal, D., & Mitra, A. K. (2006). MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 323–339. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9034-2>
- Pang, K. S. (2003). Modeling of intestinal drug absorption: Role of transporters and metabolic enzymes (For the Gillette Book Series). *Drug Metabolism and Disposition*, 31(12), 1507–1519. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.12.1507>
- Pasman, L. (2012). The complication of coinfection. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(1), 127–132.
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M. E., & Källenius, G. (2012). Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002464>

- Rice, D. P., Faragon, J. J., Banks, S., & Chirch, L. M. (2016). HIV/HCV Antiviral Drug Interactions in the Era of Direct-acting Antivirals. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 4(3), 234–240. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2016.00026>
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., & Misra, A. (2006). Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnology Progress*, 22(1), 186–198. <https://doi.org/10.1021/bp050208u>
- Shankar, E. M., Vignesh, R., Ellegård, R., Barathan, M., Chong, Y. K., Bador, M. K., ... Larsson, M. (2014). HIV-Myco**acterium** tuberculosis co-infection: A “danger-couple model” of disease pathogenesis. *Pathogens and Disease*, 70(2), 110–118. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12108>
- Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 138–153. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.027>
- Schinkel, A. H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C. A. A. M., Van, L., Smit, J. J. M., ... Borst, P. (2014). Normal viability and altered pharmacokinetics, (May).
- SOLVO. (2017a). Regulatory Guidance for Drug Interaction Studies. Retrieved March 16, 2017, from http://www.solvobiotech.com/regulatory-guidance/FDA_EMA_Guidance_for_Drug_Interaction_Studies
- SOLVO. (2017b). Take home messages from the ITC papers. Retrieved March 16, 2017, from <http://www.solvobiotech.com/regulatory-guidance/take-home-messages-from-the-itc-papers>
- Soriano, V., Labarga, P., de Mendoza, C., Pe??a, J. M., Fern??andez-Montero, J. V., Ben??tez, L., ... Barreiro, P. (2015). Emerging Challenges in Managing Hepatitis B in HIV Patients. *Current HIV/AIDS Reports*, 12(3), 344–352. <https://doi.org/10.1007/s11904-015-0275-7>
- Sultana, J., Cutroneo, P., & Trifirò, G. (2013). Clinical and economic burden of adverse drug reactions. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(Suppl1), S73–S77. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.120957>
- Sun, H., Chow, E. C. Y., Liu, S., Du, Y., & Pang, K. S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 4(4), 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>
- Tocchetti, G. N., Rigalli, J. P., Arana, M. R., Villanueva, S. S. M., & Mottino, A. D. (2016). Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobiotics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 303, 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.002>
- Tong, L., Phan, T. K., Robinson, K. L., Babusis, D., Strab, R., Bhoopathy, S., ... Ray, A. S. (2007). Effects of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors on the Intestinal Absorption of Tenofovir Disoproxil Fumarate In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3498–3504. <https://doi.org/10.1128/AAC.00671-07>
- Transporters, A. C. (2010). Multi-Drug Resistance in Cancer. *Business*, 596. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6>
- Troutman, M. D., & Thakker, D. R. (2003). Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: Asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*, 20(8), 1200–1209. <https://doi.org/10.1023/A:1025049014674>
- Truong, W. R., Schafer, J. J., & Short, W. R. (2015). Once-daily, single-tablet regimens for the treatment of HIV-1 infection. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(1), 44–55.

- van Breemen, R. B., & Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *1*(2), 175–185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- Vishnuvardhan, D., Moltke LL., Richert C., G. D. (2003). Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein. *AIDS (London, England)*, *17*(7), 1092–1094. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000060380.78202.b5>
- W., M., & S., W. (2016). Integrated therapy for HIV and tuberculosis. *AIDS Research and Therapy*, *13*(1), no pagination. <https://doi.org/10.1186/s12981-016-0106-y>
- Wang, X. dan, Meng, M. xin, Gao, L. bo, Liu, T., Xu, Q., & Zeng, S. (2009). Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp. *International Journal of Pharmaceutics*, *378*(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.022>
- Weiss, J. (2007). Short Communication Nucleoside , Nucleotide , and Non-Nucleoside Reverse ABSTRACT: *Drug Metabolism and Disposition*, *35*(3), 340–344. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012765>.For
- Westerhout, J., Van De Steeg, E., Grossouw, D., Zeijdner, E. E., Krul, C. A. M., Verwei, M., & Wortelboer, H. M. (2014). A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *63*, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.07.003>
- Westphal, K., Weinbrenner, A., Giessmann, T., Stuhr, M., Franke, G., Zschiesche, M., ... Siegmund, W. (2000). Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: Evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *68*(1), 6–12. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.107579>
- Westphal, K., Weinbrenner, A., Zschiesche, M., Franke, G., Knoke, M., Oertel, R., ... Siegmund, W. (2000). Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: A new type of drug/drug interaction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *68*(4), 345–355. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.109797>
- WHO. (2017). 10 facts on HIV/AIDS. Retrieved February 6, 2017, from <http://www.who.int/features/factfiles/hiv/en/>
- Xia, C. Q., Yang, J. J., & Gan, L.-S. (2005). Breast cancer resistance protein in pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *1*(4), 595–611. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.4.595>
- Yu, L., & Zeng, S. (2007). Transport characteristics of zolmitriptan in a human intestinal epithelial cell line Caco-2. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(30225047), 655–660. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.5.0005>
- Yumoto, R., Murakami, T., Nakamoto, Y., Hasegawa, R., Nagai, J., & Takano, M. (1999). Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *289*(1), 149–155.
- Zhang, L., Huang, S.-M., & Lesko, L. J. (2011). Transporter-Mediated Drug–Drug Interactions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *89*(4), 481–484. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.359>
- Zhang, L., Reynolds, K. S., Zhao, P., & Huang, S.-M. (2010). Drug interactions evaluation: an integrated part of risk assessment of therapeutics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *243*(2), 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.016>

- Zhang, L., Zhang, Y. D., Strong, J. M., Reynolds, K. S., & Huang, S.-M. (2008). A regulatory viewpoint on transporter-based drug interactions. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 38(7–8), 709–724. <https://doi.org/10.1080/00498250802017715>
- Zhang, L., Zhang, Y., & Huang, S. M. (2009). Scientific and regulatory perspectives on metabolizing enzyme-transporter interplay and its role in drug interactions: Challenges in predicting drug interactions. *Molecular Pharmaceutics*, 6(6), 1766–1774. <https://doi.org/10.1021/mp900132e>
- Zhao, W., Uehera, S., Tanaka, K., Tadokoro, S., Kusamori, K., Katsumi, H., ... Yamamoto, A. (2016). Effects of Polyoxyethylene Alkyl Ethers on the Intestinal Transport and Absorption of Rhodamine 123: A P-glycoprotein Substrate by in Vitro and in Vivo Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(4), 1526–1534. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.01.020>