

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



Interakce antiretrovirálních léčiv s membránovými transportéry

Interactions of antiretroviral drugs with membrane transporters

Disertační práce

Mgr. Ondřej Martinec

Školitel: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Lukáše Červeného Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Mgr. Ondřej Martinec

Poděkování

Rád bych v první řadě poděkoval svému školiteli doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za cenné profesní rady při vedení mého studia, vedení mé práce, trpělivost a podporu po dobu studia.

Dále chci poděkovat kolegům, konkrétně pak PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D., Mgr. Martinu Huličiakovi, kteří měli klíčový podíl na tvorbě publikací obsažených v této práci, a zároveň projevovali neocenitelný lidský přístup, při prodělávání závažných životních zkoušek. Dále děkuji svému prvnímu školiteli na postgraduálním studiu, prof. PharmDr. Františku Štaudovi Ph.D., který mě v roce 2015 do skupiny Experimentální farmakologie a lékových interakcí přijal.

Také bych chtěl poděkovat zahraničním kolegům, kteří mě vedli během mé zahraniční stáže na Univerzitě v Groningen, jmenovitě prof. Peter Olinga, dr. Inge de Graaf, Carin Biel, MSc a Mitchel Ruigrok, Ph.D. za jejich velmi vřelý přístup, nadšení pro vědeckou práci a cenné rady.

Zvláštní poděkování pak náleží mé přítelkyni Mgr. Elišce Kohelové za dlouhé hodiny společných volnočasových a povzbuzujících rozprav, které byly tím nejúčinnějším prostředkem na dobrou náladu, bez nichž by dokončení mého PGS studia bylo asi nemožné. Dále PharmDr. Lence Applové, Ph.D., PharmDr. Aleši Šorfovi, Ph.D., RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. a dalším kolegyním a kolegům za jejich podporu a porozumění v pracovní, a hlavně osobní rovině.

Děkuji rovněž za finanční podporu, bez které by moje práce nebyla možná. Konkrétně jde o projekty ERASMUS+, GAUK 1600317, GAČR 18-07281Y, SVV 260 414 a EFSA-CDN CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841.

V neposlední řadě bych za bezmeznou podporu rád poděkoval **své nejbližší rodině**, kteří mi věřili a podporovali mě vždy více než kdokoliv jiný.

ABSTRAKT

Univerzita Kalova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Ondřej Martinec

Školitel: doc. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název disertační práce: Interakce antiretrovirálních léčiv s membránovými transportéry

Perorální podávání léčiv je nejběžnější, nejpohodlnější a nejekonomičtější formou aplikace léčiv. Absorpce perorálně podaných léčiv probíhá zejména ve střevě. Jedním z faktorů ovlivňujících střevní absorpci jsou efluxní lékové ABC transportéry lokalizované na apikální membráně střevního epitelu, přičemž dosud nedůležitější se zdá být p-glykoprotein (ABCB1) a breast cancer resistance protein (ABCG2).

Pacienti infikovaní HIV jsou odkázáni na celoživotní farmakoterapii, zahrnující kombinaci tří a více antiretrovirotik. Častou ko-infekcí HIV je hepatitida C (HCV). Díky postupnému stárnutí je navíc HIV pozitivní populace zatížena i dalšími komorbiditami. To vše vede u těchto pacientů k nutnosti indikace polyfarmakoterapie, a tedy zvýšenému riziku lékových interakcí. Řada užívaných antiretrovirotik je substrátem, inhibitorem a/nebo induktorem ABCB1. Proto lze předpokládat, že budou kvantitativně ovlivňovat střevní absorpci současně podaných léčiv (substrátů ABCB1), a tím přispívat k efektivitě/bezpečnosti léčby. V rámci řešení disertační práce jsme se zaměřili na lékové interakce anti-HIV a anti-HCV léčiv na střevním ABCB1 transportéru a na zavedení *ex vivo* modelu, který by umožnil analyzovat indukci střevního ABCB1.

Pomocí *in vitro* a *in vivo* metodik jsme prokázali, že abakavir je substrátem střevního ABCB1 a ABCG2 a jeho vstup střevní bariérou může být zvýšen inhibicí těchto dvou transportérů. V další fázi výzkumu jsme zavedli *ex vivo* metodu založenou na akumulaci rhodaminu123 v ultratenkých intestinálních řezech (PCIS) připravených z potkaního ilea a lidského jejunu, a jako první jsme ji využili pro otestování schopnosti klinicky využívaných terapeutik, konkrétně anti-HIV a anti-HCV léčiv, inhibovat střevní ABCB1. Jako významné inhibitory jsme identifikovali lopinavir, ritonavir, saquinavir a atazanavir.

Kromě inhibice ABCB1 je dalším důležitým typem interakce indukce ABCB1 transportéru. Z důvodu řady nedostatků současně dostupných modelů úřady v oblasti výzkumu léčiv a lékové politiky neposkytují žádná doporučení pro testování indukčního potenciálu ABCB1 *in vitro*. Proto jsme se v rámci další práce zaměřili na rozvinutí metodiky PCIS pro indukci střevních transportérů. Zjistili jsme, že PCIS inkubované po dobu 48 hodin, si zachovaly neporušenou morfologii, obsah ATP a plnou funkci ABCB1. Rifampicin, modelový ligand pregnanového receptoru X (PXR), významně zvýšil funkční expresi ABCB1 a genovou expresi *CYP3A4*.

Naše výsledky mohou přispět k objasnění molekulární podstaty popsaného zvýšení biologické dostupnosti některých substrátů ABCB1, při současné léčbě anti-HIV a/nebo anti-HCV léčivy. Dále jsme ukázali, že metoda PCIS umožňuje realizaci inhibičních i indukčních studií zaměřených na ABCB1, což z této metody dělá velmi slibnou metodu využitelnou v preklinických studiích. Zároveň by tato metoda mohla být velmi důležitá pro kvantifikaci příspěvku střevního ABCB1 a lékových interakcí v pre-systémové eliminaci léčiv.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Ondřej Martinec

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of doctoral thesis: Interactions of antiretroviral drugs with membrane transporters

Oral delivery is the most common, convenient, and economical form of drug administration. Absorption of orally administered drugs occurs mainly in the intestine. Intestinal absorption can be reduced by the activity of efflux drug ABC transporters, mainly p-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2), located in the apical membrane of the intestinal epithelium.

HIV-infected patients are dependent on lifelong pharmacotherapy, which includes a combination of three or more antiretroviral drugs. Hepatitis C (HCV) is a common co-infection of HIV. In addition, the HIV-positive population is aging, which is associated with burden of other comorbidities. This results in an indication of polypharmacy and thus an increased risk of drug-drug interactions. Many antiretroviral drugs used are substrates, inhibitors and /or inducers of ABCB1, so they might quantitatively affect the intestinal absorption of co-administered drugs (ABCB1 substrates), thereby affecting the efficacy/safety of treatment. As part of this dissertation, we focused on drug-drug interactions of anti-HIV and anti-HCV drugs on the intestinal ABCB1 transporter and on the introduction of an *ex vivo* model for analysis of the induction of intestinal ABCB1.

Using *in vitro* and *in vivo* methods, we have shown that abacavir is a substrate of intestinal ABCB1 and ABCG2 and that its intestinal barrier permeability can be increased by co-administration of rilpivirine. In the next phase of our research, we for the first time used a recently established *ex vivo* method based on the accumulation of rhodamine123 in precision-cut intestinal slices (PCIS) prepared from rat ileum and human jejunum and we assessed the potency of clinically relevant therapeutics to inhibit intestinal ABCB1. We tested, anti-HIV and anti-HCV drugs and we identified lopinavir, ritonavir, saquinavir and atazanavir as significant inhibitors.

In addition to inhibiting ABCB1, another important type of interaction is the induction of the ABCB1 transporter. Due to a number of shortcomings in the currently available models, the drug research and drug policy authorities do not provide any recommendations for testing the induction potential of ABCB1 *in vitro*. Therefore, in our further work we focused on the development of the PCIS methodology for the induction of intestinal transporters. We found that PCIS incubated for 48 hours retained intact morphology, ATP content, and full ABCB1 function. Rifampicin, a model ligand for the pregnane X receptor (PXR), significantly increased functional ABCB1 expression and *CYP3A4* gene expression.

Our results may help to elucidate the molecular basis of the described increase in the bioavailability of some ABCB1 substrates when they are co-administered with anti-HIV and / or anti-HCV drugs. We further demonstrated that the PCIS method allows to conduct inhibition and induction studies focused on ABCB1 parallelly, which makes this method interesting for preclinical studies. At the same time, this method could be very important for quantifying the contribution of intestinal ABCB1 and drug interactions in pre-systemic drug elimination.

OBSAH

1. Seznam zkratk	10
2. Úvod	12
3. Teoretická část	14
3.1. Funkce ABC transportérů a jejich fyziologická exprese	14
3.2. Střevní bariéra	17
3.3. Modely střevní bariéry	19
3.3.1. <i>In vivo</i> metody	19
3.3.2. <i>In situ</i> metody	20
3.3.3. <i>In vitro</i> a <i>ex vivo</i> metody	21
3.3.4. <i>In silico</i> metody	26
3.4. HIV a HCV infekce	27
3.5. Léčba HIV a HCV	29
3.6. Antivirotika studována v rámci této disertační práce	30
3.6.1. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy – NRTI	31
3.6.2. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy – NNRTI	33
3.6.3. Inhibitory proteázy – PI	34
3.6.4. Inhibitory vstupu – CCR5 antagonisté	36
3.6.5. Anti HCV léčiva	37
4. Hypotéza	40
5. Cíle práce	41
6. Seznam prací a podíl kandidáta na jednotlivých publikacích	42
7. Komentáře k jednotlivým publikacím	44
7.1. Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices	44
7.2. Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)	45
7.3. MDR1 and BCRP Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction between Rilpivirine and Abacavir and Effect on Intestinal Absorption.	47
7.4. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials-Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses.	48
7.5. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials - Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses.	49
8. Souhrn a závěr	50
9. Prezentace dat na odborných konferencích	54
9.1. Ústní prezentace	54

9.2.	Posterové prezentace	55
10.	Seznam použité literatury	56
11.	Seznam příloh.....	63

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP binding cassette (ATP-vázající transportéry)
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1 (p-glykoprotein)
ABCC2	Multidrug resistance-associated protein 2
ABCG2	Breast cancer resistance protein
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome (syndrom získaného selhání imunity)
ARV	Antiretrovirotika
BCS	Biopharmaceutics Classification System (systém klasifikace biofarmaceutik)
Caco-2	Buněčná linie lidských epitelálních buněk kolorektálního adenokarcinomu
cART	Combination antiretroviral therapy (kombinovaná antiretrovirální terapie)
CCR5	C-C chemokine receptor type 5 (C-C chemokinový receptor 5)
CYP	Cytochromy P450
DAA	Direct-acting antivirals (přímo působící antivirotika)
DDI	Drug-drug interactions (lékové interakce)
EMA	European Medicines Agency (Evropská léková agentura)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HCV	Hepatitis C virus (virus hepatitidy typu C)
HIV	Human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
NNRTI	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (ne-nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy)
NRTI	Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (nukleosidový/nukleotidový inhibitor reverzní transkriptázy)
NS3/4A	Nonstructural protein 3/4A (nestrukturální protein 3/4A)
NS5A	Nonstructural protein 5A (nestrukturální protein 5A)
PCIS	Precision-cut intestinal slices (ultratenké tkáňové řezy)

PI	Protease inhibitor (inhibitor proteázy)
PXR	Pregnane X receptor (pregnanonový receptor x)
RHD123	Rhodamin 123
RIF	Rifampicin
RXR	Retinoid X receptor (retinoidový receptor x)
TDF	Tenofovir disoproxil fumarát

2. ÚVOD

Membránové transportéry mohou být hlavním určujícím rysem farmakokinetiky, a tím i bezpečnosti a účinnosti léčiv [1]. Tyto transportéry kontrolují buněčné vychytávání důležitých fyziologických molekul jako jsou cukry, aminokyseliny, nukleotidy, anorganické ionty, ale v případě potřeby i do těla dodaných léčiv. Jejich úkol spočívá také v odstraňování látek pro buňky nežádoucí [2]. **Membránové efluxní transportéry** jsou exprimovány na apikální nebo basolaterální straně membrány enterocytů a hepatocytů, v renálním tubulárním epitelu a v buňkách tvořících hematoencefalickou, testikulární a placentární bariéru [3].

ATP-vázající (ABC) efluxní transportéry jsou v závislosti na typu umístěny na apikální a/nebo basolaterální plazmatické membráně. Jedná se o efluxní přenašeče, které zajišťují aktivní přestup různorodých látek směrem ven z buňky proti koncentračnímu gradientu [3]. ABC transportéry se v organismu vyskytují v mnoha tkáních a jejich aktivita zajišťuje, mimo jiné, přirozenou ochranu organismu před nežádoucími účinky léčiv [3, 4]. Řada *in vitro*, *in vivo* i klinických studií prokázala, že ABC transportéry mají klinický dopad na farmakokinetiku léčiv [4-6]. Pokud je pacientovi podáváno léčivo, které je zároveň substrátem jednoho nebo více transportérů, může dojít k zásadnímu ovlivnění jeho farmakokinetiky. A to jak indukci, tak i inhibici. Tímto způsobem dochází k rozvoji **lékových interakcí (DDI, z anglického drug-drug interactions)**, jejichž dopad pro pacienta může být v některých případech prospěšný a v některých naopak nežádoucí až nebezpečný.

Jako příklad negativního dopadu DDI lze uvést selhání terapie vlivem **indukce** ABC transportérů a následné **snížení absorpce léčiva**. Na druhou stranu **inhibice** ABC transportérů přítomných ve střevní bariéře může vést ke **zvýšení biodostupnosti léčiva** [7-10]. V praxi pak mohou nastat dvě situace. Pokud je daná inhibice/indukce popsána, snížíme/zvýšíme množství podávaného léčiva při zachování efektivity terapie. Klinicky se tohoto využívá právě v terapii infekce virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), ale i jiných onemocnění. Druhou variantu představuje nerespektování/neznalost této interakce, tj. při nezměněném dávkování může dojít k nežádoucímu nárůstu/poklesu plazmatické koncentrace a projevům toxicity nebo vymizení účinku léčiva [7-10].

Infekce HIV a/nebo virem **hepatitidy C (HCV)** představují závažná globální onemocnění. Dle dat publikovaných Světovou zdravotnickou organizací dosáhl v roce 2019 celkový počet nakažených virem HIV 38 miliónů lidí, přičemž až 1 milion každý rok zemře v důsledku rozvinutého onemocnění syndromu získaného selhání imunity (AIDS) [11, 12]. Celkový počet

pacientů s diagnostikovanou infekcí HCV přesáhl v roce 2015 80 milionů a 700 000 z nich onemocnění v tomto roce podlelo [13]. Jedná se tedy o statistiku, která je plně srovnatelná s onemocněním HIV. V rozvinutých zemích, jako jsou Spojené státy americké, mortalita způsobená chronickou formou HCV infekce převažuje mortalitu u HIV pozitivních pacientů [11-13]. Pro terapii HIV je v současnosti využívána **kombinovaná antiretrovirální terapie (cART)**, která využívá kombinace léčiv cílících převážně na specifické struktury viru. I přesto, že lze cART považovat za velký pokrok, může být tato terapie komplikována omezenou biodostupností léčiv, neboť řada antivirotik je ovlivněna aktivitou ABC transportérů [4]. Ve farmakoterapii chronické formy HCV došlo v posledním desetiletí k překotnému rozvoji, přičemž nejdůležitější úlohu momentálně sehrávají tzv. „**direct-acting antivirals**“ (DAA) a jejich kombinace.

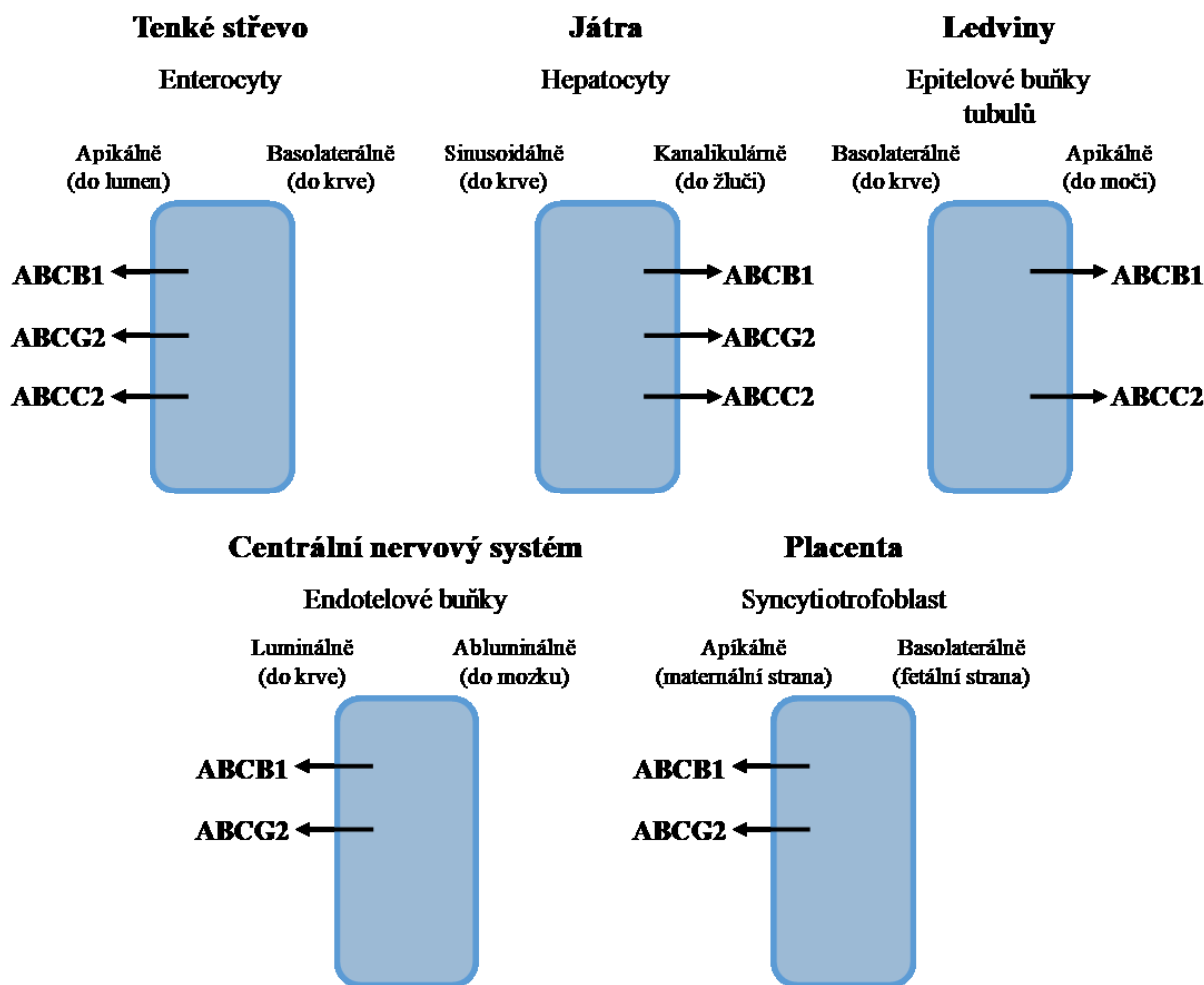
Nejdůležitějším a nejvíce zkoumaným (z pohledu transportu i genové regulace) střevním efluxním lékovým ABC transportérem se dosud zdá být **ABCB1 transportér** (p-glycoprotein) [14]. Navíc antiretrovirotika a DAA jsou známy pro své časté interakce s ABCB1 a lze předpokládat, že některé pozorované změny ve farmakokinetice současně podaných léčiv mohou být způsobeny právě DDI [5, 7]. Proto bylo tedy logickým krokem, že se náš výzkum zaměřil zejména na ně. Kromě sledování, zda efluxní lékové ABC transportéry ovlivňují přestup vybraných antiretrovirotik přes střevní bariéru, jsme se zaměřili i na zavedení nového *ex vivo* modelu využívajícího tenké řezy potkaního a lidského střeva pro i) testování schopnosti anti-HIV a anti-HCV léčiv inhibovat střevní ABCB1 a ii) kvantifikaci indukce střevního ABCB1 po expozici léčivu na úrovni mRNA, proteinu a funkce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Funkce ABC transportérů a jejich fyziologická exprese

ABC transportéry jsou transmembránové proteiny vyznačující se schopností aktivně přenášet širokou škálu substrátů, včetně iontů, cukrů, aminokyselin, peptidů, léčiv a jejich metabolitů přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu [15, 16]. Uplatňují se ve zdravých tkáních jako jsou tenké i tlusté střevo, ledviny, játra a mozek a vzhledem k jejich lokalizaci zásadně ovlivňují farmakokinetiku svých substrátů (**Obrázek 1**) [1-3]. ABC transportéry byly ovšem poprvé popsány v nádorové tkáni, kde snižují přestup chemoterapeutik přes membránu a tím přispívají ke vzniku mnohočetné nádorové rezistence [15, 17, 18]. Do současné doby bylo popsáno celkem 49 členů této transportérové rodiny, přičemž tato rodina je dále členěna do sedmi podrodin ABCA – ABCG [1, 3, 19]. ABC transportéry jsou fyziologicky exprimovány v mnoha bariérách lidského těla. Zde mohou ovlivnit farmakokinetiku endogenních látek i xenobiotik rozličné chemické struktury [1, 15]. Jejich přítomnost a značně široká substrátová specifita tak může vyústit v závažné lékové interakce.

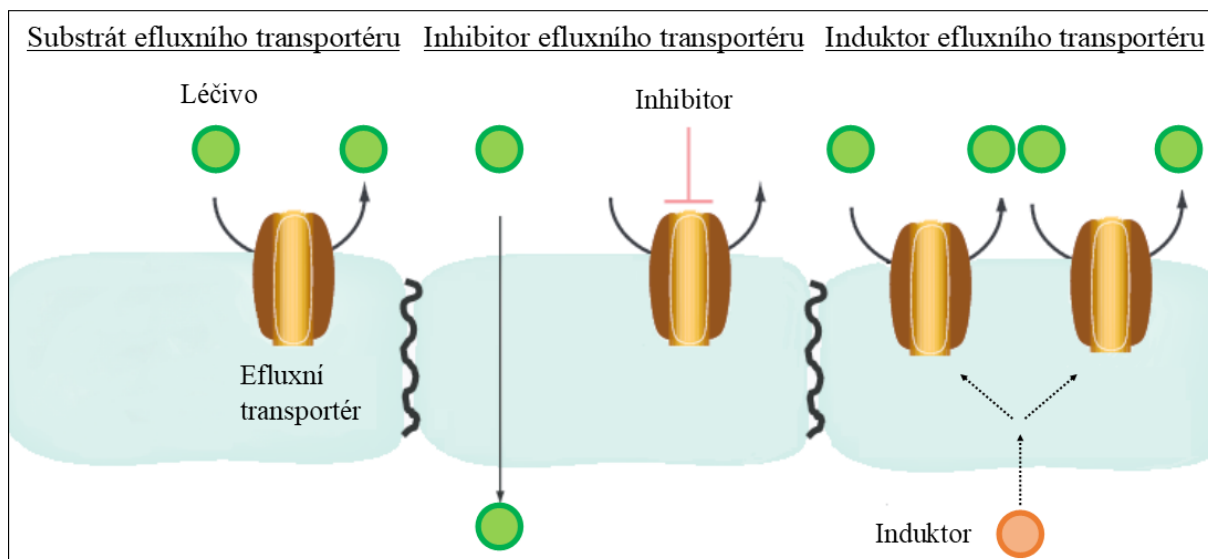
Fyziologická role ABC transportérů spočívá v zajištění ochrany organismu před vstupem exogenních látek s potenciálně toxickým účinkem, tzn. i léčiv [15, 20]. Zároveň tyto transportéry na jiných místech v organismu mohou zasahovat do distribuce nebo i exkrece léčiv. Z pohledu vlivu ABC transportérů na **farmakokinetiku léčiv** se hovoří hlavně o dvou zástupcích, lékových transportérech ABCB1 a ABCG2 (breast cancer resistance protein) [1, 19]. Dalšími důležitými jsou transportéry z podrodiny ABCC (multidrug resistance-associated proteins), a to především ABCC2, který se zásadně podílí především na exkreci konjugovaných metabolitů do žluči [21] (**Obrázek 1**).



Obrázek 1 - Příklady fyziologické lokalizace vybraných ABC transportérů v klíčových tkáních. Převzato a upraveno z Kis et al. 2010 [4].

Při podání dvou a více léčiv interagujících s ABC transportéry může dojít k rozvoji **farmakokinetických DDI**. Mezi **substráty** ABC transportérů, které mohou být obětí podobných interakcí, se řadí léčiva ze široké škály terapeutických skupin [1, 3, 22]. Jedná se například o zástupce antivirotik, cytostatik, antibiotik, ale také molekul využívaných v terapii kardiovaskulárních chorob, alergických reakcí a mnoha dalších [23]. Působením **inhibitorů** ABCB1 a ABCG2 lze zvýšit absorpci a tím i biologickou dostupnost léčiva po podání *per os*, při této inhibici zároveň může docházet i k nežádoucímu přestupu látek do citlivých tkání. Na druhé straně inhibicí transportérů v exkretčních orgánech lze prodloužit poločas léčiva v organismu a současně tak prodloužit jeho biologický poločas. Budeme-li inhibovat transportéry exkretčních orgánů dlouhodobě, dosáhneme toxických koncentrací léčiva v těle. Z druhého úhlu pohledu, **induktory** lékových transportérů mohou způsobit DDI, které budou mít opačný vliv na kinetiku léčiva. Všeobecně známým příkladem takového léčiva je například rifampicin (RIF) (**Obrázek 2**) [1, 3, 22].

Vzhledem k četnosti DDI na lékových transportérech, Mezinárodní transportérové konsorcium, Americký Úřad pro dohled nad potravinami a léčivými (FDA, Food and Drug Administration) i Evropské lékové agentury (EMA, European Medicines Agency), vyžadují testování případných DDI na lékových transportérech již v průběhu preklinického vývoje léčiva [24].

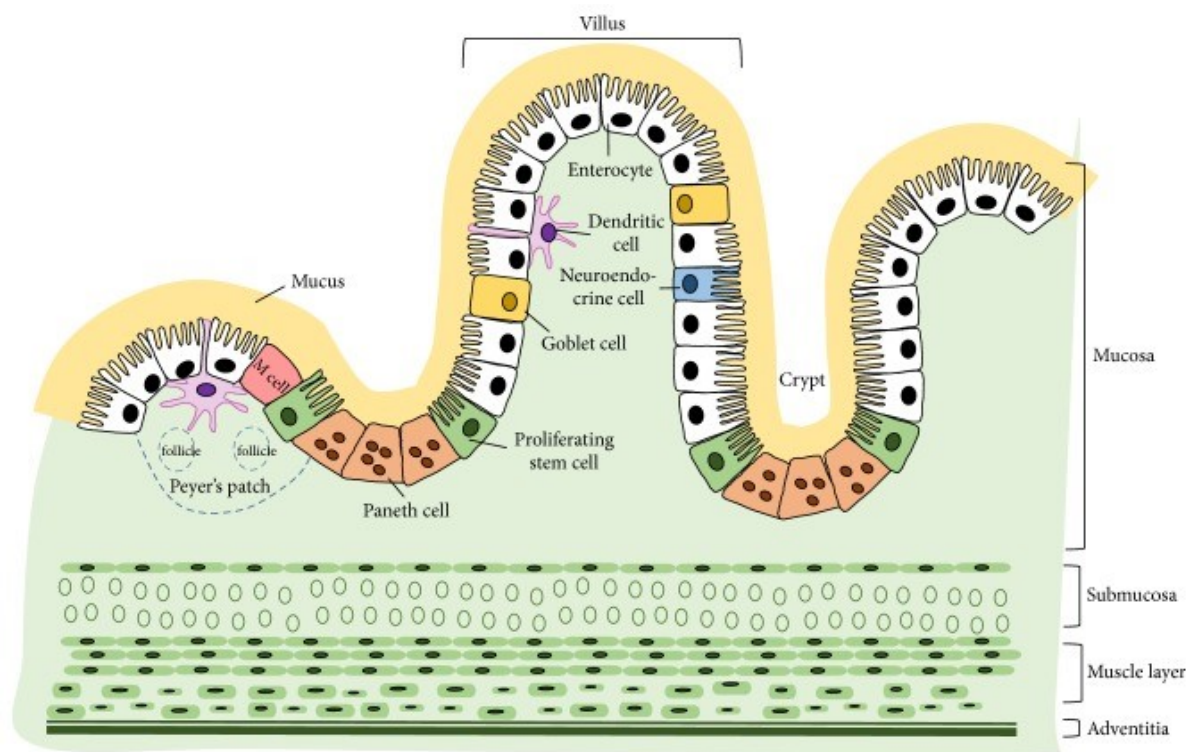


Obrázek 2 – Schéma farmakokinetických interakcí na ABC transportérech. Převzato a upraveno od Stenhjem et al. 2009 [25].

3.2. Střevní bariéra

Střevo reguluje absorpci vody, elektrolytů, živin a xenobiotik, vylučuje ionty, hlen, endogenní a exogenní sloučeniny z krve do lumen. Střevní motilita způsobuje smíchání složek a zajišťuje absorpci a transport podél střevního traktu. Kvantitativní absorpce je zajišťována obrovskou absorpční plochou, která vzniká díky četným ohybům střeva a přítomnosti klků a mikrokلكů [26]. **Intestinální trakt** je složen ze čtyř vrstev: *serosa (adventitia)*, *lamina muscularis*, *submucosa* a *mucosa (Obrázek 3)*. *Mucosa* je tvořena zejména enterocyty a dále pohárovými buňkami, Panethovými buňkami a proliferujícími se kmenovými buňkami [26]. Střevo je anatomicky rozděleno na *duodenum*, *jejunum*, *ileum* a *colon*. V každé z těchto oblastí mají enterocyty specifické spektrum a množství biotransformačních enzymů a membránových transportérů, které jsou schopny metabolizovat a transportovat endogenní a exogenní sloučeniny [27, 28]. Dalším důležitým aspektem střevní fyziologie je **gradient pH**. Luminální pH střeva je závislé na střevním obsahu [29] (orientační hodnoty pH jednotlivých částí lidského střeva: duodenum: 5-7, jejunum: 6-7, ileum: 7, colon: 5,5-7, rectum: 7), zatímco pH krve se pohybuje stabilně okolo 7,4. Z toho plyne, že za fyziologických podmínek je pH na basolaterální straně vyšší než pH na luminální straně [29]. Hodnota pH prostředí je určujícím faktorem pro výslednou povahu přenášené molekuly, tedy zda se kyselé a bazické molekuly budou vyskytovat ve své disociované nebo nedisociované formě. pH prostředí ovlivňuje i rychlost, kterou nenabitá molekula (léčivo) přestoupí přes lipofilní membránu pasivní difúzí. Navíc funkce některých transportérů je závislá na pH [30].

Orální podání léčiv je nejpohodlnější a nejrozšířenější formou aplikace léčiv. Při tomto podání musí léčivo překonat střevní bariéru, která do jisté míry určuje biologickou dostupnost léčiv [3, 27, 31]. **Bariérová funkce** střeva je zajištěna epiteliálními buňkami, které lemují luminální povrch střeva, a specializovanými těsnými spoji mezi nimi [26]. Pokud je léčivo podáno cestou *per os*, je prvním dějem farmakokinetiky absorpce léčiva, k níž u většiny látek dochází v tenkém střevě [32]. Odtud musí léčivo projít střevní bariérou do krevního oběhu. Míra přestupu léčiv z lumen střeva do krve může být snížena právě ABCB1 a ABCG2 transportéry, které jsou přítomny na apikální straně enterocytů [33, 34].



Obrázek 3 - Znárodnění buněčných typů a jednotlivých vrstev lokalizovaných ve střevní bariéře. Převzato a upraveno z Shanshan Kong et al 2018 [26].

Ačkoli je zřejmé, že játra často sehrávají hlavní roli v pre-systémové eliminaci enterálně podaných léčiv (v tzv. prvním průchodu játry), **metabolická role střeva** v enterocytech nebude v tomto procesu pravděpodobně zanedbatelná. Této teorii nahrává i fakt, že plocha střeva je obrovská a obsahuje nezanedbatelné množství enzymů jak první, tak druhé fáze biotransformace. CYP3A4 (Cytochrom P450 3A4) a velké množství regulačních faktorů pregnanového receptoru X (PXR), retinoidový receptor x (RXR) a konstitutivní androstanový receptor tzv. CAR, které řídí expresi biotransformačních enzymů i transportérů [28, 35]. Zároveň je střevní bariéra vystavena daleko větší koncentraci léčiva, která se může odrazit i na expresi jednotlivých enzymů či transportérů. Studie *in vivo* prokázaly, že kromě metabolické aktivity přispívají k pre-systémové eliminaci také efluxní transportéry střeva lokalizované na apikální straně enterocyty [1, 3, 33, 34, 36]. Současná znalost klinického významu transportu léčiv ve střevní bariéře člověka je nedostatečná. Důvodem je, že farmakokinetické studie provedené na člověku jsou technicky, finančně a eticky náročné a často nerozkryjí podíl jater a střeva na pre-systémové eliminaci [37]. Experimenty na zvířecích modelech jsou sice široce používanou náhradou, ale data jsou zatížena velkými mezidruhovými rozdíly. Dosud převažující *in vitro* postupy využívající lidské buněčné linie poskytují výsledky, které je však obtížné přímo extrapolovat na situaci *in vivo*.

Extrapolaci výsledků studií transportu léčiv *in vitro* komplikuje několik aspektů fyziologie střeva. Střevo není homogenní orgán. Expres transportérů sleduje různé koncentrační vzorce jak na ose krypta-klk, tak podél celé délky střeva. Aktivita ABCB1 transportéru byla hlášena jako nejvyšší v diferencovaných epiteliálních buňkách oblasti klku a klesala směrem ke kryptické oblasti [38, 39]. Tento fenomén je způsoben migrací enterocytů z krypt na vrchol klků, což se jeví jako společný proces diferenciací vedoucí k apoptóze a následnému odpadnutí buněk do lumen [40]. Migrace z krypty do osy klků probíhá přibližně 3 dny v lidském střevě a 2 dny ve střevě potkana [38-40].

Podél střevního traktu byla popsána celá řada různých gradientů transportní aktivity [41]. V lidské tkáni lze v distálním směru pozorovat zvýšenou expresi transportérů ABCB1 [42], exprese ABCG2 [43], ABCC2 [42]) se snižuje. Lokalizace a aktivita transportérů je podstatná pro biologickou využitelnost látek s vysokou propustností a nízkou rozpustností (2. třída BCS, z angl. Biopharmaceutics Classification System) a látek s vysokou rozpustností a nízkou propustností (3. třída BCS) [44, 45]. Pro správnou interpretaci *in vitro* dat je také nutné vzít v úvahu, ze které části střeva je odvozen vybraný segment na *in vitro* testování.

3.3. Modely střevní bariéry

Modely intestinální absorpce lze rozdělit podle jejich komplexnosti na *in vivo*, *in situ*, *in vitro* a *in silico*. Pomocí těchto modelů jsou vyšetřovány transportní mechanismy a je stanovována střevní propustnost potenciálních léčivých látek [46]. V následujícím textu jsou diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých metodik.

3.3.1. *In vivo* metody

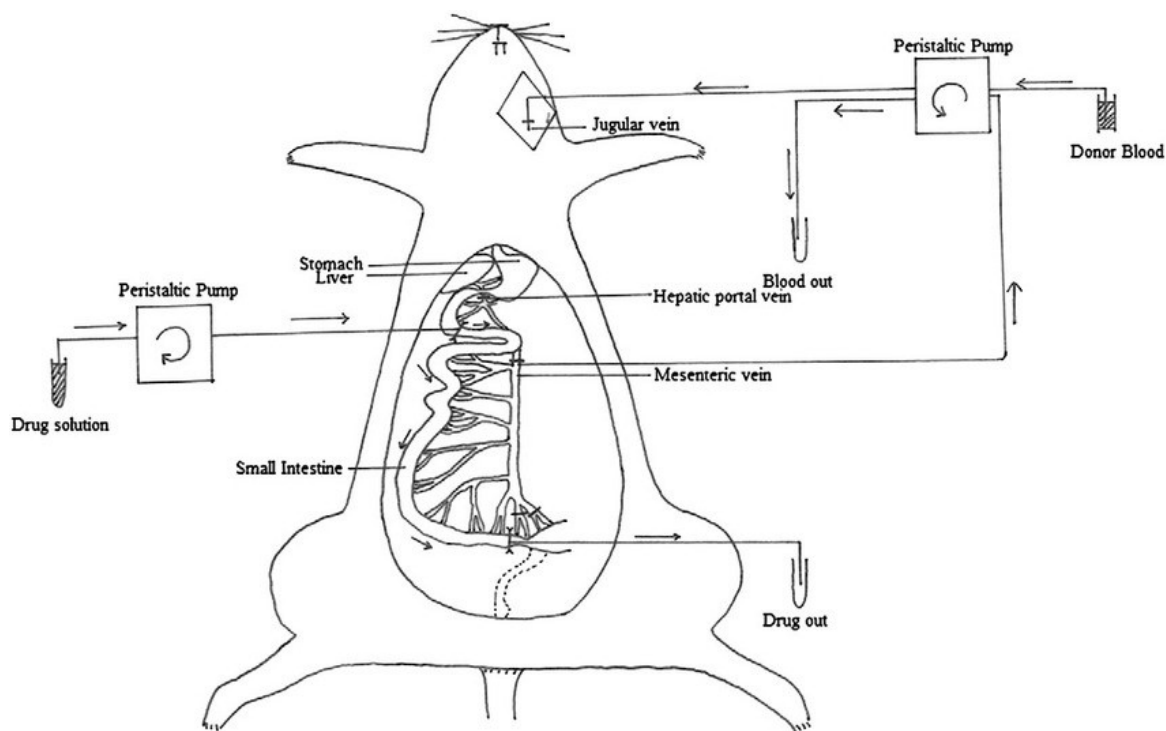
Testování *in vivo* neboli v neporušeném zvířecím organismu je možností, u které se roztoky nebo formulace léčiva podávají orálně nebo přímo do žaludku nebo střeva, a to jednorázově nebo opakovaně. Jedná se o komplexní metodiku pro kvantifikaci biologické dostupnosti [47], která navíc umožňuje pozorování celotělové kinetiky léčiv na úrovni absorpce, distribuce, metabolismu, exkrece, a i případné toxicity léčiva. Tento model plně zohledňuje fyziologické procesy a faktory, jako jsou vyprazdňování žaludku, obsah lumenální vody, motilitu střev, degradaci léčiva a efekt prvního průchodu. Poskytuje tak nejrelevantnější informaci o biodostupnosti testovaného léčiva. Tyto typy modelů jsou zjevně méně použitelné pro mechanistické studie absorpce ve střevě, protože relativní dopad různých faktorů může být obtížné podrobně posoudit [47]. Je důležité zmínit, že studium transportu léčiv ve střevě *in vivo*

neposkytuje přímé důkazy o přestupu testované látky přes střevní bariéru, neboť získané výsledky jsou dány sumou jaterního metabolismu a střevních mechanismů [48].

3.3.2. *In situ* metody

Model založený na intestinální *in situ* perfúzi je flexibilním systémem, který lze optimalizovat dle aktuálních požadavků na profilování absorpce léků. Vzorky jsou odebírány z mezenterické žíly, což umožňuje hodnotit přestup léčiva přes střevní bariéru včetně zapojení transportérů a střevní biotransformace léčiva (**Obrázek 4**). I přes to, že jsou experimenty *in situ* technicky náročné a relativně časově zdlouhavé, jsou důležité pro pochopení absorpčních procesů [49]. *In situ* postupy provedené na potkanovi prokázaly významnou roli ABCB1 v omezení absorpce digoxinu [50]. Zároveň byl stejnou metodikou prokázán inhibiční vliv na ABCB1 u gliklazidu, metforminu, pioglitazonu, atorvastatinu a ezetimibu [51].

Zapojení transportérů do přestupu léčiv přes střevní bariéru lze také zkoumat *in situ* perfúzí lidského střeva, která se provádí hlavně při studiích absorpce látek [50-53]. Ačkoli je tato technika výhodná, neboť fyziologie a krevní oběh zůstávají neporušeny, je kvůli etickým otázkám a omezené dostupnosti testovatelných subjektů využívána u člověka jen vzácně [54].



Obrázek 4 - Schématické zobrazení *in situ* experimentu střevní perfúze s odběrem vzorku z mezenterické žíly. Převzato z Zhiqiang Luo et al 2013 [55].

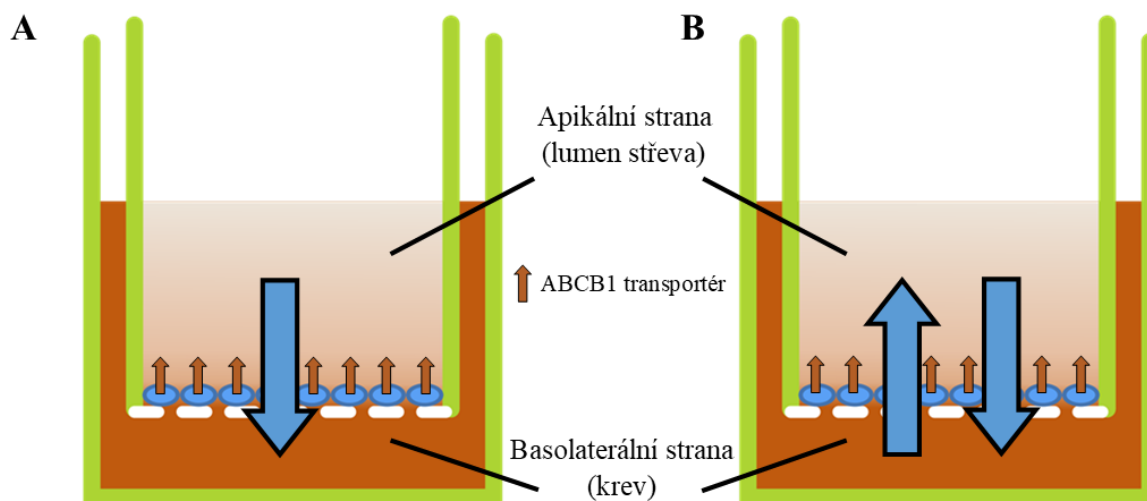
3.3.3. *In vitro* a *ex vivo* metody

Omezený přístup k lidské střevní tkáni prohlubuje důležitost dostupnosti spolehlivých, vysoce účinných metod *in vitro*. V tuto chvíli jsou ale *in vitro* modely svými vlastnostmi situací *in vivo* ve střevní bariéře do jisté míry stále vzdálené, proto nemohou plně nahradit studie *in vivo/in situ*. I přes tuto skutečnost, jsou však velmi užitečné pro řešení specifických otázek týkajících se střevní permeace léčiv nebo pro analýzu schopnosti léčiv inhibovat střevní transportéry. Podmínky při *in vitro* experimentech jsou v porovnání s *in vivo/in situ* modely snáze kontrolovatelné, zároveň jsou tyto metodiky dobře dostupné a výsledky jsou převážně jednodušeji interpretovatelné. *Ex vivo* techniky leží na pomezí *in vitro* a *in vivo* metodik [56]. Příkladem je například technika explantů a PCIS [57]. V *ex vivo* modelech, které vycházejí z tkáňových řezů, je zachována buněčná architektura, mezibuněčná spojení i metabolické procesy, díky tomu dané modely lépe odpovídají situaci *in vivo* v porovnání s *in vitro* technikami [58]. Někteří autoři považují *ex vivo* techniky za další typ *in vitro* metodik. V této disertační práci budou *in vitro* a *ex vivo* modely řešeny odděleně. [58, 59].

In vitro modely

In vitro přístupy se v této oblasti prosazují po celá desetiletí, protože existuje korelace mezi transportem přes buněčnou monovrstvu a střevní propustností u člověka [55, 60]. Mimo to jsou *in vitro* techniky pro hodnocení propustnosti méně pracné a méně nákladné. Navíc ve srovnání se studii na zvířatech a studii *in vivo* jsou vyjmuty z etických úvah [61]. Účelem jakéhokoli modelu *in vitro* je provádění studií za dobře kontrolovaných a snadno dosažitelných podmínek [62]. Úspěšné použití *in vitro* modelu k predikci absorpce léčiva přes střevní sliznici závisí na tom, jestli dostatečně napodobuje vlastnosti intestinálního epitelu *in vivo*. Je obtížné vytvořit jednoduchý experimentální systém *in vitro*, který by dokázal plně odrážet podmínky střevní absorpce. Nicméně jsou užitečné v řešení konkrétních otázek při studiích, které vyžadují dobře kontrolované podmínky [63, 64].

Ve výzkumu a farmaceutickém průmyslu se více než 30 let jako hlavní *in vitro* model střevní bariéry uplatňuje **buněčná linie Caco-2**. Ta je odvozena z buněk lidského adenokarcinomu tlustého střeva [65]. Při kultivaci na polykarbonátové membráně Caco-2 samovolně po 6-7 dnech diferencují a vytváří polarizovanou monovrstvu cylindrických buněk spojených pevnými spoji [65]. Jedná se o jednoduchý model. Na apikální straně mají Caco-2 buňky strukturu podobnou mikrokvlkům, což vytváří morfologickou podobnost s kartáčovým lemem střeva. Navíc i exprese a lokalizace důležitých intestinálních transportních systémů včetně ABCB1 je u tohoto modelu podobná. Jsou tedy experimentálně využívány ke studiu vektorového transportu (studium permeace ve směru lumen střeva – krev) a tzv. obousměrného transportu (pohyb léčiva se monitoruje ve směrech lumen střeva-krev a krev-lumen střeva) (**Obrázek 5**), pomocí kterého lze kvantifikovat, do jaké míry mohou membránové transportéry ovlivnit střevní absorpci. Testování obousměrného transportu *in vitro* patří mezi metodiky hodnocení substrátů a inhibitorů ABC transportérů doporučené FDA [24].



Obrázek 5 – Schéma popisující využití Caco-2 buněčné linie (modrý ovál) vektorový transport látek (A) a využití obousměrného transportu látek (B). Směr šipky demonstruje přestup léčiva v průběhu experimentu.

Je však stále otázkou, zda lze buňky Caco-2 považovat za relevantní model tenkého střeva. Caco-2, vzhledem ke svému původu, morfologicky více připomínají epitel tlustého střeva, a to zejména díky výborně vyvinutým těsným spojmům [65]. Zároveň se liší v expresi transportních a biotransformačních proteinů v porovnání s lidským ileem a jejunem. Příkladem může být výrazně nižší exprese ABCG2 a ztráta exprese CYP3A4 [66, 67]. Zároveň exprese transportérů a enzymů je závislá i na délce kultivace buněčné linie [28, 65, 67]. Aby bylo dosaženo větší komplexnosti testovacího systému, Caco-2 buňky mohou být kultivovány v přítomnosti dalších buněčných typů tvořících střevní epitel [31]. Caco-2 však není jediná střevní buněčná linie, která se běžně laboratorně používá. Mezi dalšími bychom mohli jmenovat například NCL-H716, STC-1, GlutagCells, LS174T a mnohé další. V rámci řešení naší práce jsme ale tyto linie nepoužili, a proto nejsou v rámci této disertační práce detailněji charakterizovány.

Ex vivo metody

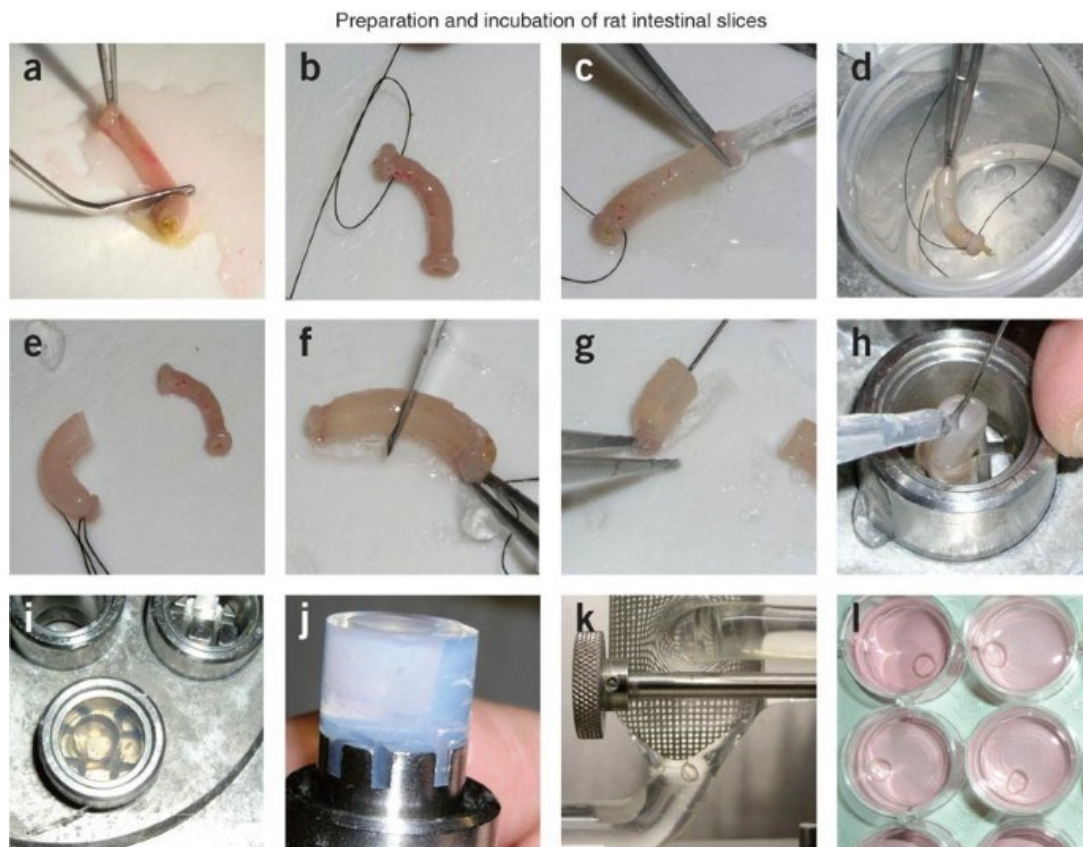
Modely *ex vivo* zahrnují postupy s živými funkčními tkáněmi nebo orgány izolovanými z organismu a kultivovanými mimo organismus v umělém prostředí za vysoce kontrolovaných podmínek. Tyto modely mají řadu charakteristických rysů, kterými se liší od buněčných modelů. U *ex vivo* modelů je zajištěna odpovídající paracelulární propustnost epitelu tenkého střeva, součástí modelu je vrstva mukózy a je zachována exprese transportních proteinů a metabolismus léčiv. Metody *ex vivo* představují nástroj pro rozlišení příspěvku střeva a/nebo jater k biodostupnosti jednotlivých látek a ke studiu regionálních rozdílů střeva.

K dispozici je několik modelů *ex vivo*, z nichž každý má jak své výhody, tak i svá omezení. Obecným požadavkem na studie *ex vivo* je možnost přípravy co největšího množství vzorků z fragmentu střevní tkáně takovým způsobem, aby byla zajištěna minimální deprivace kyslíkem a byla tak maximalizována životaschopnost tkáně. Historicky Fisher a Parsons [68, 69] doporučili pro zachování integrity tkáně perfundovat lumen střeva pomocí pufu nasyceného kyslíkem před přerušением oběhu střevní stěny. Toto bylo potvrzeno i o několik desítek let později skupinou Plumb et al. [70]. Je známo, že střeva zbavená kyslíku po dobu pouhých 4 minut vykazují závažné narušení klků a otoky, zatímco střeva, která jsou neustále proplachována okysličeným roztokem, si zachovávají svou strukturální integritu i po několik hodin [70]. Metody, které využívají lidskou tkáň, můžeme podle množství spotřebované tkáně rozdělit následujícím způsobem: izolovaná střevní perfúze > metoda převráceného střeva (Everted Sac) > metoda Ussingovy komory > explanty nebo metodika ultratenkých intestinálních řezů (PCIS).

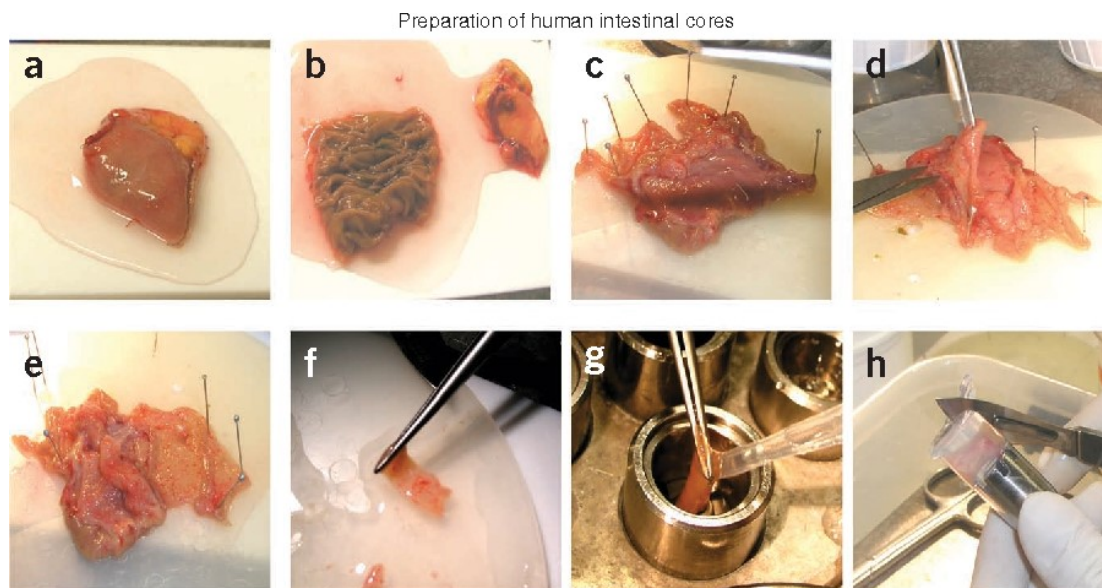
Metoda ultratenkých intestinálních řezů

Vzhledem k tématu disertační práce se budu věnovat hlavně metodě PCIS, které lze připravit ze zvířecích (**Obrázek 6**) i z lidských tkání (**Obrázek 7**). Tato metoda má široké uplatnění, které zahrnuje výzkum mezidruhových rozdílů v interakcích s lékovými transportéry či segmentální gradienty aktivit metabolizujících enzymů a membránových transportérů. PCIS je velmi efektivní metodika, kterou lze připravit i z malých vzorků tkáně (>1 cm²), poměrně velké množství řezů (>100) [71]. Jsou životaschopné po dobu několika dní inkubace [28, 71] a vykazují aktivitu enzymů metabolizujících léčiva odpovídající situaci *in vivo* [72]. Využitím střevních, ale také jaterních, ledvinných a plicních řezů je pak možno zkoumat metabolický či transportní efekt v jednotlivých orgánech [27, 28, 73]. PCIS jsou připravovány příčným krájením tkáně, následně jsou zality agarózou s nízkou teplotou tání a pomocí kráječe krájeny na řezy přesně definovaných rozměrů. Zachovávají si relativně dlouhou viabilitu, která se odráží v tkáňové koncentraci ATP a také si udržují morfologii střevního epitelu [28].

Tuto metodu limituje skutečnost, že apikální i basolaterální strana střeva je při experimentu vystavena stejnému médiu. Z toho důvodu nejsme schopni, na rozdíl například od Ussingovy komory a dalších uvedených *ex vivo* metod, zkoumat vektorový transport léčiv a stanovit permeabilitu léčiva [28].



Obrázek 6 - Ukázka přípravy ultratenkých intestinálních řezů připravených z potkaního střeva. Poté, co jsou ze střevního segmentu odstraněny fekální složky (a), je jedna strana střeva svázána (b). Segment se poté naplní kapalným agarózovým roztokem při 37 ° C (c), poté se ochladí (d), aby se vytvořil váleček o tloušťce asi 5 mm (e). Po rozříznutí segmentů na dvě poloviny (f) se do vyplněného lumenu (g) vloží špendlík, který zafixuje segment v předchlazeném válcovém pístu formy (h). Forma se poté naplní agarózovým roztokem při 37 ° C a znovu se ochladí (i). Agarózový váleček se vyjme z formy a přenesse se do kráječe tkáně (j). Řezy se krájí na přibližně 250 μ m tloušťku (k) a inkubují se na 12-24jamkových destičkách (l). Převzato z de Graaf et al. 2010 [71].



Obrázek 7 - Ukázka přípravy ultratenkých intestinálních řezů připravených z lidského střeva. Sešitý kus lidského střeva (a). Odstraní se sponky a tuková tkáň a střevo se rozřízne (na obrázku strana mukózy směřuje nahoru) (b). Segment se poté pomocí špendlíků (c) zafixuje na silikonovou matraci. Na předchlazené podložce se svalstvo šetrně odřívá, aby pro experiment zbyla pouze vrstva sliznice (d, e). Poté se střevo rozřeže na kousky přibližně 10×20 mm (f) a zalije agarózou (g, h). Převzato z de Graaf et al. 2010 [71].

3.3.4. *In silico* metody

Metody *in silico* jsou v současné době široce používány ve farmaceutickém průmyslu a regulačními autoritami v oblasti léčiv při výzkumu nových lékových forem, testování bioekvivalence a dalších vývojových procesů. Jedná se o procesy, které vztahují různé molekulární deskriptory a fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly léčiva (např. lipofilitu, disociační konstantu kyseliny pKa, vodíkové vazby, molekulová hmotnost) k zásadním biofarmaceutickým procesům [74]. Poměrně běžnými aplikacemi je predikce střevní propustnosti, hodnocení vztahu mezi strukturou a aktivitou (QSAR) nebo farmakokinetické modelování založené na fyziologii (PBPK). Vzhledem k nárůstu výkonu počítačů lze nyní provádět predikce permeace léčiv pomocí komplexních molekulárních simulací. Tyto modely mohou simulovat interakci mezi molekulou a biologickou membránou, a tím zlepšit naše porozumění membránovému transportu [75, 76]. Mimo jiné lze posoudit zapojení specifických transportních proteinů a tuto informaci následně využít pro molekulární adaptaci potenciálního léčiva nebo pro tvorbu proléčiva [77, 78].

3.4. HIV a HCV infekce

Na základě epidemiologických dat vydanými autoritami v oblasti zdravotnictví [11, 12] je zřejmé, že **HIV** představuje celosvětové zdravotní riziko. V roce 2019 bylo evidováno 38 milionů nakažených jedinců, přičemž každoročně přibližně 700 000 podlehnou rozvinutému onemocnění AIDS [11, 12]. Tento retrovirus infikuje buňky imunitního systému, především CD4+ Th-lymfocyty, ale i makrofágy a dendritické buňky [79]. Když počet CD4+ Th-lymfocytů klesne pod kritickou úroveň, infikovaný se stává náchylnější k oportunním infekcím, což v důsledku vede k rozvoji nemoci AIDS.

HIV virus v rámci svého **replikačního cyklu** nasedá svým gp120 proteinem na buněčný povrch právě vazbou na CD4+ molekulu a ko-receptor CCR5 (chemokinového receptoru 5) nebo CXCR4, a následně pomocí virového proteinu gp41 dochází k perforaci buněčné membrány, což vede k přenosu virového obsahu do hostitelské buňky. Poté dochází pomocí virové reverzní transkriptázy k přepisu virové RNA do DNA. Nově vzniklá virová DNA je transportována do buněčného jádra a vmezeřena do buněčné DNA dalším virovým enzymem, integrázou. Po aktivaci infikované buňky se integrovaná DNA transkribuje do mRNA. Z té vzniká při translačním kroku dlouhý proteinový řetězec, který je štěpen virovou proteázou na funkční proteiny, které dávají základ novému viru. Virové částice pak unikají z hostitelské buňky a při tomto procesu nesou ve svém plášti část cytoplasmatické membrány hostitelské buňky včetně proteinů. Následně jsou zralé virové částice schopny infikovat ostatní buňky a cyklus se může opakovat [80].

Infekce HCV stále představuje podobnou hrozbu jako HIV. HCV je v současné době celosvětově nakaženo více jak 80 miliónů lidí a přibližně 700 000 z nich ročně zemře v důsledku cirhózy jater nebo hepatocelulárního karcinomu [13]. Závažnost epidemie HCV podtrhuje i fakt, že mortalita způsobená virem HCV v rozvinutých zemích jako jsou Spojené státy americké, přesahuje počet úmrtí způsobených onemocněním AIDS [81]. HCV je RNA virus, který napadá lidské jaterní buňky.

Životní cyklus HCV začíná vazbou HCV na dva hostitelské receptory na povrchu hepatocytů: LDLr a HSPG. Tato počáteční interakce spouští v HCV vnější membránový heterodimerový protein E1 / E2, aby se HCV navázal na receptor B1 a tetraspaninový protein CD81. Interakce mezi těmito proteiny vytvářejí vlnu v lipidové membráně a pohánějí částice HCV k těsnému spojení (tight junction) mezi hepatocyty. Jakmile HCV dosáhne těsného spojení, iniciuje vnořování virové částice a buněčné membrány hepatocytu. Proces translace polyproteinů HCV

je zahájen, když se ribozomální podjednotky váží na HCV RNA v drsném endoplazmatickém retikulu. Proces translace generuje jeden polyprotein, který je dlouhý přibližně 3 000 aminokyselin. Nejprve buněčné proteázy štěpí jádro, proteiny E1, E2 a p7. Dále NS2 cysteinová proteáza ve spojení s N-terminálním koncem proteinu NS3 štěpí NS2 z NS3. A konečně, NS3, za pomoci NS4A vázaného na membránu, tvoří komplex proteázy NS3-4A, který štěpí zbývající proteiny (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Konečným výsledkem je 10 zralých HCV proteinů, včetně strukturních a nestrukturálních proteinů. Několik HCV proteinů, pravděpodobně ve spojení s hostitelskými faktory, indukuje přeskupení membrán hostitelských buněk za vzniku tzv. membránové pavučiny s dvojitou membránou. V membránové pavučině katalyzuje NS5B RNA-dependentní RNA polymeráza syntézu templátu, který se používá k vytvoření mnoha kopií RNA budoucích virionů HCV. Tyto nově syntetizované HCV RNA jsou buď inkorporovány do nukleokapsidových částic, nebo použity pro translaci a replikaci RNA. Částice HCV se shromažďují v blízkosti kapiček cytosolových lipidů, během sestavování jaderné proteiny viru používají HCV RNA jako kostru, protože proteiny tvoří ochranný obal kolem HCV RNA. Jakmile je jádro vytvořeno, nezralá částice HCV fúzuje s luminální lipidovou kapkou, která je naplněna ApoE proteiny, aby vytvořil prekurzor HCV s vysokou hustotou. V Golgiho aparátu se předpokládá, že pre-VLDL fúzují s velkými lipidovými kapičkami obohacenými o triacylglycerol za vzniku VLDL. VLDL pak fúzují s prekurzory HCV s vysokou hustotou za vzniku lipovirové částice HCV. Tato lipovirová částice HCV s nízkou hustotou opouští Golgiho aparát ve specializovaných transportních váčcích známých jako multivesikulární tělesa. Buněčný sekreční stroj transportuje multivesikulární těla na povrch buňky. Po transportu multivesikulárních těl, která obsahují lipovirové částice HCV na povrch buňky, se váčky spojí s buněčnou membránou hepatocytů. Generování lipovirové částice HCV je spojeno s buněčnou dráhou VLDL a během tohoto procesu se do extracelulárních oddílů uvolňují lipovirové částice HCV i částice VLDL [82-84].

Problém tohoto viru spočívá v tom, že pouze u 20 % pacientů dochází ke spontánní eliminaci viru. Bohužel u více než 80 % přechází onemocnění do chronické formy [85]. Chronická fáze nemoci často probíhá bez jakýchkoli příznaků nebo se mohou vyskytnout symptomy charakteru neurčitých dyspeptických potíží. Pacienti si mohou stěžovat na únavu, bolest v pravém podžebří, bolesti kloubů. Často je hepatitida C diagnostikována při vyšetření pro jiné onemocnění, například při poruše funkce štítné žlázy či při onemocnění ledvin. Chronicky probíhající infekce poškozuje játra. Onemocnění může být diagnostikováno až v pokročilé fázi

jaterního selhání, kdy se projeví žloutenkou, otoky končetin, ascitem či krvácením do trávicího traktu. V cirhotických játrech může vzniknout i nádor-hepatocelulární karcinom [86, 87].

Vzhledem ke společným mechanismům přenosu HIV a HCV jedna čtvrtina pacientů trpí koinfekcí HIV/HCV [88]. Počet lidí nakažených HIV a/nebo HCV se každý rok zvyšuje o stovky tisíc [13]. Dosud neexistuje vakcína, která by fungovala jako bezpečné a efektivní profylaktikum těchto onemocnění, a tak je jejich léčba plně odkázána na farmakoterapii [89].

3.5. Léčba HIV a HCV

Antiretrovirotika (ARV) proti HIV jsou doporučována všem pacientům, kteří jsou HIV pozitivní. Zajišťuje supresi proliferace viru, což vede v řadě případů k nedetekovatelným hladinám viru v tělních tekutinách (ale ne k úplnému vymizení HIV z organismu), čímž nedochází k progresi infekce a zároveň se významně snižuje možné riziko horizontálního i vertikálního přenosu viru na další jedince [90, 91].

Podle mechanismu působení a chemické struktury se **ARV klasifikují do celkem šesti skupin**, a to: nukleosidové/nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI), nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI), inhibitory proteázy (PI), inhibitory integrázy, inhibitory fúze a antagonisty chemokinového receptoru 5 (CCR5).

Pro zvýšení účinnosti a snížení pravděpodobnosti rozvoje rezistence viru jsou antiretrovirotika podávána vždy v kombinaci, hovoříme o již zmiňované **cART**. Nejčastěji se podávají dvě léčiva ze skupiny NRTI, ke kterým se přidávají další léčiva ze skupin INSTI, PI nebo NNRTI. Tato léčiva jsou již k dispozici na trhu ve fixních kombinacích. Zavedení cART dramaticky změnilo prognózu a kvalitu života HIV infikovaných [92]. Běžně předepisovaná ARV jsou podávána *per os*, existuje zde tak možnost vzniku **DDI** mezi jednotlivými složkami cART na střevních transportérech nebo biotransformačních enzymech. DDI však mohou být výhodné. Existují klinicky využívané kombinace, které umožňují snížit podávanou dávku a/nebo frekvenci podávání cART. Příkladem jsou cART doplněné o malou dávku ritonaviru, který v této dávce nemá antiretrovirový účinek, ale funguje jako tzv. **farmakokinetický „booster“** a zvyšuje biodostupnost těch ARV, které jsou substráty ABCB1 a/nebo CYP3A4 (např. atazanavir, lopinavir a darunavir). Podobně funguje i látka cobicistat, která nemá antiretrovirový účinek a byla primárně vyvíjena jako farmakokinetický „booster“ [93]. Častěji mají ale DDI negativní dopad na efektivitu a bezpečnost léčby [1, 3]. Vzhledem k častým komorbiditám a nutnosti aplikace polyfarmakoterapie u pacientů s HIV nejsou nežádoucí DDI

výjimkou [7]. Znalost potenciálu ARV ke vzniku DDI je tedy velmi důležitá, aby bylo možné jim předcházet vhodnou optimalizací léčby [5, 7].

Podobně jako v případě HIV je i všem pacientům s potvrzenou chronickou HCV infekcí předepisována farmakoterapie. Do roku 2011 byla pro léčbu chronické HCV jako standard brána kombinace pegylovaného interferonu - α s ribavirinem. Tato kombinace je spojena s velkou mírou nežádoucích účinků a slabou odpovědí na léčbu [94]. V roce 2011 však vstoupila na trh DAA [95]. Prvním klinicky využívaným léčivem byl telaprevir [96]. Později došlo k začlenění dalších DAA s velice dobrou tolerancí a trvalou virologickou odpovědí jako jsou sofosbovir a daclatasvir [96]. Dalšími léčivy používanými v terapii HCV jsou ledipasvir, velpatasvir, dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir, grazoprevir, elbasvir, simeprevir nebo voxilaprevir.

Léčba HIV/HCV infekce je často komplikována řadou dalších onemocnění, navíc v případě HIV se jedná o léčbu celoživotní. V těchto případech jsou pacienti odkázáni na polyfarmakoterapii [97].

DAA a ARV jsou častými substráty/inhibitory/induktory efluxních ABC transportérů, proto lze předpokládat, že mohou vznikat DDI nejen mezi DAA a ARV, ale i mezi anti(retro)virotiky a ostatními léčivy používanými k léčbě komorbidit [97-100]. **Riziko DDI** a z nich vyplývající nadměrná toxicita tak představují závažný klinický problém [101, 102]. Na druhou stranu existuje také možnost nalezení kombinačních režimů, umožňující podávání menších dávek při zachování stejné efektivity farmakoterapie, což může přinést i ekonomický benefit v podobě zlevnění terapie.

3.6. Antivirotika studována v rámci této disertační práce

V rámci testování látek jsme se zaměřili na klinicky využívaná ARV a DAA, která jsou všechna podávána *per os*, mají potenciál k interakci se střevními membránovými transportéry a zároveň jsme vybírali taková ARV, abychom obsáhli všechny skupiny léčiv. U mnohých léčiv byly již dříve popsány interakce s ABC transportéry ve smyslu substrátového přenosu a/nebo inhibiční či i indukční aktivity [4, 97] (**Tabulka 1**). Valná většina těchto interakcí byla však popsána pouze pomocí arteficiálních modelů *in vitro*. Většina z vybraných léčiv se momentálně nachází na *Seznamu esenciálních léčivých přípravků* Světové zdravotnické organizace [103].

Tabulka 1 Příklady vybraných ARV a DAA jako substrátů, inhibitorů nebo induktorů ABC transportérů

Transportér	Substrát	Inhibitor	Induktor
ABCB1	atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, TDF*, abakavir, maravirok, daclatasvir, ledipasvir, sofosbuvir	atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, abakavir, etravirin, maravirok, rilpivirin, daclatasvir, ledipasvir, simeprevir	ritonavir, lopinavir, saquinavir, atazanavir,
ABCG2	TDF*, abakavir, lopinavir, zidovudin, sofosbuvir	atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, abakavir, ledipasvir, zidovudin, rilpivirin, daclatasvir, etravirin	
ABCC2	atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir	abakavir, simeprevir	

* tenofovir disoproxil fumarát

3.6.1. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy – NRTI

Mechanismus účinku léčiv ARV ze skupiny NRTI vyplývá z jejich chemické struktury, která je podobná přirozeným nukleosidům (**Obrázek 8**). Tato léčiva jsou po vstupu do buňky aktivována fosforylací a následně začleněna do virové DNA, kde se chovají jako terminátor řetězce a inhibují tak reverzní transkriptázu HIV-1.

Abakavir

Abakavir je analog guanosinu, který se na trhu vyskytuje už více jak 20 let. Jeho aktivní formou je karbovir -5'trifosfát. Je lékem volby u HIV pozitivních pacientů, podmínkou je HLA5701 negativita, při zahajování terapii HIV [104].

Toto léčivo je popisovaným substrátem efluxních transportérů ABCB1 a ABCG2 [105]. Navzdory tomu je rychle absorbováno a jeho biologická dostupnost dosahuje přes 80 %. Více než 50 % se váže plazmatické proteiny, jeho eliminace probíhá hlavně metabolizací v játrech a následně je vyloučen ve formě glukuronátu moči [105, 106]. Plazmatické hladiny abakaviru mohou být sníženy současným podáním inhibitorů proteázy (atazanavir, lopinavir, darunavir), s nimiž je současně podán ritonavir jako booster [104].

Pomocí *in vitro* testování byl abakavir popsán jako slabý substrát i inhibitor ABCB1 [105].

Tenofovir disoproxil fumarát

Tenofovir disoproxil fumarát (TDF) je proléčivem tenofoviru, které bylo schváleno FDA v roce 2001. Následně bylo v roce 2018 schváleno další proléčivo, a to tenofovir alafenamid fumarát (TAF). Tenofovir má ve své prosté formě velmi nízkou biodostupnost přes střevní bariéru, proto v klinické praxi nemá uplatnění. TDF se v organismu hydrolyzuje na tenofovir a poté se v buňce vytváří aktivní difosfátová forma [107, 108].

TDF je v klinické praxi často kombinováno s dalšími ARV nebo i DAA. Biodostupnost tenofoviru je často ovlivněna současně podávanou medikací. Z mnoha léčiv můžeme uvést například sofosbuvir s ledipasvirem, či s antimikrobním rifampinem [109].

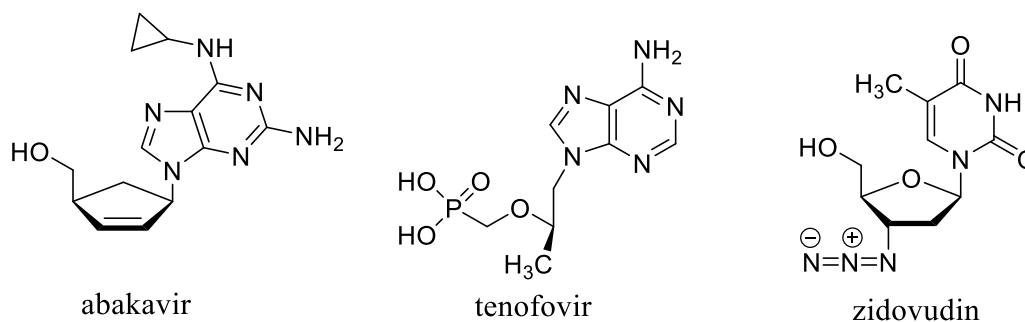
Byla popsána afinita TDF k ABCB1 i ABCG2 transportérům, naproti tomu prostý tenofovir nevykazoval afinitu ani k jednomu z nich [108]. Podle publikace Storch et al. je TDF slabým inhibítorem ABCB1 [110].

Zidovudin

Zidovudin je historicky nejstarším lékem schváleným proti viru HIV (1987), který je dodnes hojně využíván. Jeho biodostupnost po perorálním podání není kompletní a pohybuje se okolo 60-70 %. Stejně jako ostatní zástupci ze skupiny NRTI musí být v buňce postupně fosforylován do své trifosforylované formy na aktivní metabolit zidovudin-5'trifosfát.

Při užívání zidovudinu jsou často pozorovány nežádoucí účinky. Například v kombinaci s ganciclovirem je nutná kontrola hematologických funkcí. Kombinace s atovakvonem může vést k nižší supresi HIV [109].

Názor na roli ABCB1 transportéru na přenos tohoto léčiva není jednotný, nicméně recentní publikace přinesly důkazy, že buněčný uptake zidovudinu může být snížen aktivitou ABCB1 [111, 112]. Je zároveň potvrzeným substrátem i inhibítorem ABCG2 [112].



Obrázek 8 - Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy.

3.6.2. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy – NNRTI

NNRTI se, na rozdíl od NRTI, vážou přímo na reverzní transkriptázu HIV-1 a blokují RNA dependentní a DNA dependentní DNA polymerázovou aktivitu tím, že narušují katalytické místo enzymu (**Obrázek 9**).

Etravirin

Etravirin si zachovává svoji účinnost i proti kmenům HIV-1 rezistentním k NRTI i NNRTI a/nebo PI [113].

Z klinického hlediska vykazuje etravirin významné DDI obzvláště s antimikrobiálními látkami rifabutinem, rifampinem, klaritromycinem a dalšími léčivy. Zároveň je kontraindikováno podání spolu s antikonvulzivními látkami karbamazepinem a fenytoinem. Potenciálních DDI, které souvisí s farmakokinetikou toho léčiva je popsána celá řada [114].

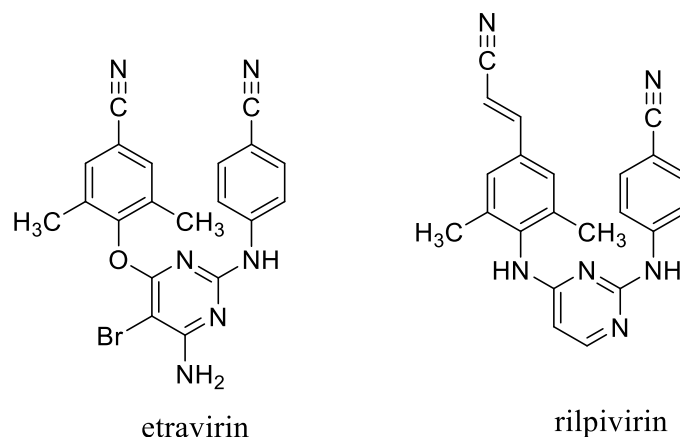
Toto léčivo bylo popsáno jako inhibitor ABCB1 a ABCG2 transportéru [113, 115]. Výsledky studií zaměřených na inhibiční vliv ABCB1 transportéru jsou často rozporuplné [113, 115, 116]. V naší práci jsme sledovali inhibiční vliv etravirinu na aktivitu střevního ABCB1 (P1).

Rilpivirin

Novějším ARV z této skupiny je rilpivirin, který vstoupil na trh vstoupil v roce 2011. Oproti ostatním léčivům ze skupiny NNRTI má méně nežádoucích účinků. Je používán ve fixních kombinacích, například v kombinaci s TDF.

Pokud je rilpivirin podáván společně s omeprazolem nebo rifabutinem dochází ke snížení biodostupnosti rilpivirinu. Klaritromycin a erytromycin vykazují zcela opačný efekt, při současném podávání těchto antibiotik s rilpivirinem je nutné sledovat nežádoucí účinky léčby vyplývající z této DDI [114].

Interakce rilpivirinu s ABC transportéry nebyla na počátku naší práce zřejmá (P3).



Obrázek 9 - Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy.

3.6.3. Inhibitory proteázy – PI

Jedná se o třídu antivirových léčiv, která jsou široce používána k léčbě HIV (**Obrázek 10**). Inhibitory proteázy zabraňují replikaci viru selektivní vazbou na HIV proteázu a blokuji proteolytické štěpení proteinových prekurzorů, jež jsou nezbytné pro vznik infekčních virových částic. PI jsou často popisovanými substráty a/nebo inhibitory ABCB1, ale zároveň je u valné většiny zástupců popsána i jejich indukční schopnost (ritonaviru, lopinaviru, atazanaviru, saquinaviru) [4].

Atazanavir

Atazanavir byl schválen k lékařskému použití ve Spojených státech v roce 2003. Klinická data prokazují, že se jedná o dobře tolerované léčivo. Nicméně byla popsána klinicky významná interakce s omeprazolem. Při současném podávání těchto léčiv dochází k výraznému snížení AUC atazanaviru. Společné podávání s některými antimikrobiálními léčivy, kterým může být například rifabutin, vede ke snížení AUC rifabutinu. Při léčbě je tedy potřeba pečlivě sledovat antimikrobiální aktivity léčiva a klinický stav pacienta [117].

Atazanavir je považován za substrát transportérů ABCB1 a ABCC2, také se jedná o inhibitor ABCB1 a ABCG2 transportérů, a zároveň induktor ABCB1 [4].

Lopinavir

Lopinavir je v praxi používán v kombinaci s dalšími PI. Fixní kombinace s ritonavirem, jako farmakokinetickým „boosterem“, se na trhu nachází od roku 2000. V klinické praxi má řadu popsaných interakcí. V kombinaci s rifabutinem se zvedá AUC lopinaviru až o 203 % a až

o 375 % u jeho metabolitů. Podobné zvýšení je předpokládáno i u podání s klaritromycinem [117].

Lopinavir je popsáným substrátem ABCB1 a ABCC2 a inhibítoem ABCB1 a ABCG2 transportér a zároveň induktor ABCB1 [4].

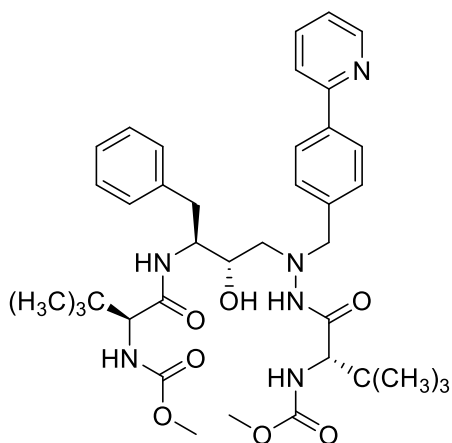
Ritonavir

Ritonavir patří k nejstarším zástupcům skupiny PI. Jeho uvedení na trh v 90. letech minulého století umožnilo vznik první vysoce účinné kombinace antiretrovirotik. Stejně jako ostatní zástupci této skupiny, patří i ritonavir mezi léčiva s potenciálem k DDI. Je prokázaným substrátem/kompetitivním inhibítoem ABCB1 a enzymu CYP3A4 a zároveň induktor ABCB1 [4]. V současnosti se ritonavir v rámci cART nepoužívá pro svůj vlastní farmakologický účinek, ale přidává se jako booster – inhibítoem efluxních transportérů a enzymu CYP3A4 pro pozitivní ovlivnění farmakokinetiky dalších PI.

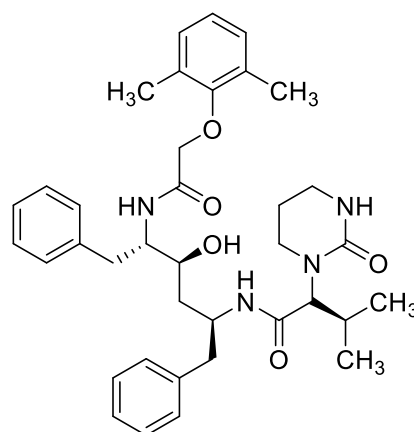
Saquinavir

Saquinavir se objevil na trhu již v roce 1995. Používá se především v kombinaci s dalšími PI pro podpoření účinku [118]. Při samostatném podání má saquinavir velmi nízkou biodostupnost, pouhá 4 % a krátký biologický poločas [119]. Farmakokinetické parametry saquinaviru lze zlepšit současným podáním s ritonavirem.

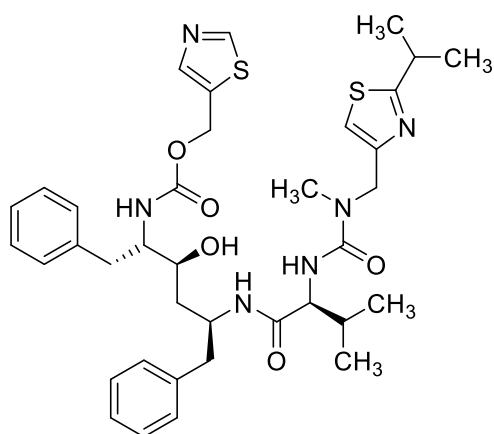
Saquinavir je prokázaným substrátem ABCB1 a ABCC2 a prokázaným inhibítoem ABCB1, ABCG2 a zároveň induktor ABCB1 [4].



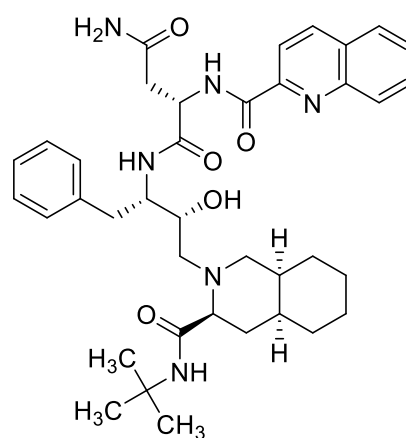
atazanavir



lopinavir



ritonavir



saquinavir

Obrázek 10 - Inhibitory proteáz.

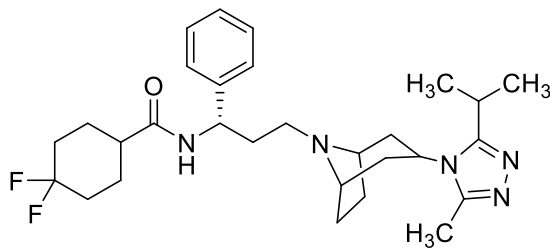
3.6.4. Inhibitory vstupu – CCR5 antagonisté

Maravirok

Maravirok představuje jediného zástupce této skupiny antiretrovirotik (**Obrázek 11**), který byl dosud schválen FDA pro terapii HIV. Působí jako antagonistista CCR5 receptoru a inhibuje tak vstup viru do buňky.

Maravirok je také testován pro jeho potenciální protinádorovou aktivitu a to již také na úrovni klinických testů [120, 121]. Při současném podávání s rifampinem se sníží jeho AUC o 63 %, vedle této interakce je předpokládána ještě celá řada dalších farmakokinetických DDI [122].

Absolutní biodostupnost se pohybuje okolo 30 %. Léčivo je navrženým substrátem a současně i inhibítorem ABCB1 a CYP3A4 [4, 123].



maravirok

Obrázek 11 - Inhibitory vstupu.

3.6.5. Anti HCV léčiva

Následující skupina léčiv má rozdílné mechanismy účinku, ale všechna jsou používána v terapii HCV (**Obrázek 12**).

Daclatasvir

Daclatasvir je perorálně dostupný inhibitor nestrukturálního proteinu 5A (NS5A) HCV. Přesný mechanismus účinku daclatasviru nebyl dosud zcela objasněn. S největší pravděpodobností léčivo po orálním podání a následném intracelulárním vylučování inhibuje virový protein NS5A, což vede k narušení replikačního komplexu virové RNA a blokáde produkce virové HCV RNA a následně k inhibici replikace viru [124].

Současné *in vitro* studie naznačují, že daclatasvir je inhibítorem transportérů ABCB1 a ABCG2 [124]. V rámci klinického šetření však vliv na farmakokinetiku současně podaných léčiv nebyl významný. Jedinou dosud popsanou výjimkou je rosuvastatin [124].

Ledipasvir

Ledipasvir má shodný mechanismus účinku jako daclatasvir [125].

Jeho vliv na kinetiku střevních intersticiálních transportérů ABCB1 byl studován pouze v rámci *in vitro* metodik. Jediné dostupné informace, které byly publikovány, před našimi výstupy, o jeho vlivu na střevní ABCB1 transportéry můžeme nalézt v pracích, kde byl studován v kombinaci se sofosbuvirem [125].

Byla popsána řada klinických interakcí s prokázanými induktory ABCB1 transportéru (karbamazepin, fenytoin, rifampicin), které měly za následek snížení AUC ledipasviru [126].

Simeprevir

Simeprevir se používá jako inhibitor NS3/4A proteázy viru HCV. Používá se v kombinaci se sofosbuvirem nebo ribavirinem a peginterferonem-alfa. Své využití ale našel i v terapii komorbidit v kombinační léčbě u HIV pozitivních pacientů [118, 127].

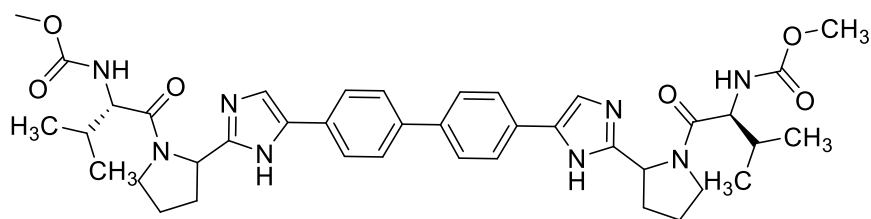
Simeprevir je substrátem i inhibitorem ABCB1. Za klinicky významné DDI simepreviru lze považovat jeho podání spolu s digoxinem a s léčivy ze skupiny statinů. Simeprevir výrazně zvyšuje plazmatické koncentrace digoxinu. Pokud je podán simeprevir spolu se statiny zvyšuje expozici rosuvastatinu, atorvastatinu a simvastatinu. Proto mohou být léky ze skupiny statinů (atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin) a digoxin podávány společně se simeprevirem pouze za předpokladu snížení jejich dávky a / nebo musí být pacient pečlivě monitorován [127].

Sofosbuvir

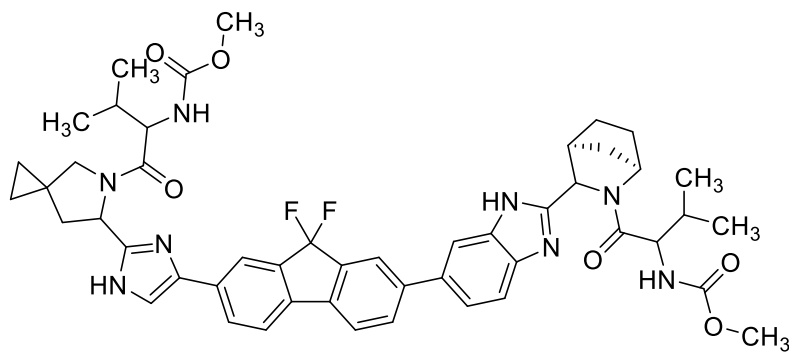
Sofosbuvir je prolečivo, které prodělává intracelulární trifosforylaci, jejíž produkt je pomocí RNA-dependentní RNA polymerázy inkorporován do HCV RNA. Mechanismem účinku je tzv. ukončení řetězce, kdy po navázání aktivní látky nemůže pokračovat další řetězení dceřiné virové RNA. Sofosbuvir je pravděpodobně nejúčinnější přípravek proti HCV na trhu. Jedná se o bezpečné, perorálně podávané léčivo s nízkou pravděpodobností vzniku virové rezistence [128].

Sofosbuvir, na rozdíl od anti-HCV léčiv nižších/starších generací, není metabolizován systémem cytochromu P-450. Potenciál DDI je tak výrazně nižší. Sofosbuvir je však na rozdíl od svého aktivního metabolitu substrátem lékového transportéru ABCB1 a ABCG2 [129].

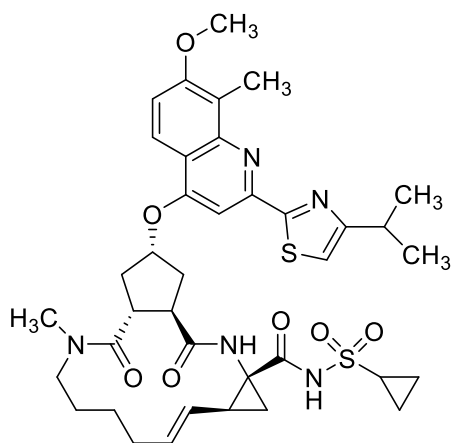
Tento vliv transportérů by mohl být vysvětlením klinicky rozdílných hladin sofosbuviru při současném podání rifampicinu, rifapentinu a karbamazepinu [126].



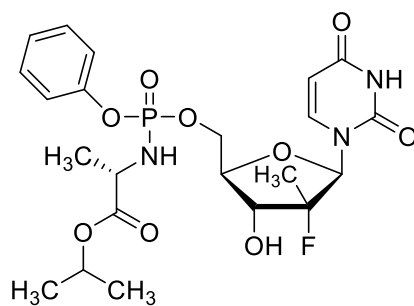
daclatasvir



ledispavir



simeprevir



sofosbuvir

Obrázek 12 - Anti-HCV léčiva.

4. HYPOTÉZA

Antivirotika představují skupinu léčiv s relativně velkým interakčním potenciálem. Pacienti s HIV stárnou a často trpí dalšími onemocněními, jež vyžadují farmakoterapii. Infekce, komorbidity, věk, cART, DAA a polyfarmakoterapie jsou rizikové faktory, jež se podílejí na rozvoji DDI [130]. Řada antivirotik představuje substráty, inhibitory nebo induktory ABC efluxních transportérů. Perorální podání cART a/nebo DAA s sebou nese riziko farmakokinetických interakcí mezi sebou a zároveň s léčivy podávanými v ko-medikaci, na úrovni střevní absorpce. Interakce na ABCB1 transportéru mohou pomoci vysvětlit molekulární podstatu klinického zvýšení či snížení hladin léčiv, jež jsou substráty ABCB1. Na základě znalostí těchto interakcí lze např. snížit dávku podávaných ARV při současném podání s tzv. boosterem (ritonavir, cobicistat) nebo podávat ARV v prodloužených dávkovacích intervalech.

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 DDI se objevuje až po zavedení léčiva na trh. Zároveň v současnosti EMA ani FDA nemají doporučení na jasný model, co se týká indukce efluxních transportérů.

5. CÍLE PRÁCE

Hlavní náplní této disertační práce bylo studium ABC transportérů, speciálně poté ABCB1 transportéru exprimovaného na střevní bariéře a jejich interakce s významnými antiviroty, která jsou v podávána pacientům s diagnostikovanou HIV a/nebo HCV infekcí. Často totiž jejich bezpečnostní profil není kompletní a tím není znám jejich potenciál k interakcím s lékovými transportéry na střevní bariéře. Konkrétními cíli mojí práce pak bylo:

- 1) studium DDI abakaviru na střevním ABCB1 a ABCG2; vliv současného podání rilpivirinu
- 2) analýza potenciálu vybraných antiviroty inhibovat aktivitu střevního ABCB1; porovnání výsledků získaných pomocí *ex vivo* metodik založených na akumulaci rhodaminu123 v PCIS připravených z potkaního a lidského střeva a pomocí dlouhodobě doporučené *in vitro* metodiky využívající Caco-2 buněčnou linii
- 3) optimalizace metody lidských ultratenkých tkáňových řezů jakožto modelu pro predikci indukčního potenciálu léčiv ovlivňující střevní ABCB1 transportér

6. SEZNAM PRACÍ A PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

Předkládaná disertační práce je komentovaným souborem čtyř prací, které byly publikovány v zahraničních časopisech s impakt faktorem a jednoho manuskriptu, který je v době odevzdání práce v revizním řízení. Kandidát je prvním autorem dvou experimentálních prací (publikace 1 a příložený manuskript 2) a ve zbylých třech případech je spoluautorem (publikace 3, 4 a 5). Podíl autora na jednotlivých publikacích zahrnutých v disertační práci je pak následující:

P1: Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices

Martinec O, Huliciak M, Staud F, Cecka F, Vokral I, Cerveny L.

Antimicrob Agents Chemother. 2019 Oct 22;63(11):e00910-19. doi: 10.1128/AAC.00910-19. Print 2019 Nov. IF₂₀₁₈=4.715, Q1, 1. decil dle AIS i IF.

- podíl na navrhování experimentů a na výběru testovaných látek
- zpracování střevní tkáně a příprava PCIS
- provádění buněčných experimentů *in vitro* a *ex vivo* experimentů používajících potkaní a lidské střevo.
- analýza dat
- podíl na přípravě manuskriptu

P2: Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)

Martinec O, Biel C, de Graaf IA, Olinga P, Huliciak M, Staud F, Vokřál I, Červený L

Manuskript v současné době v revizním řízení v časopise Biochemical Pharmacology

- podíl na navrhování experimentální části
- zpracování střevní tkáně a příprava PCIS
- provádění akumulčních experimentů
- analýza dat, zahrnující funkční, ATP, PCR a imunohistologické analýzy

- podíl na přípravě manuskriptu

P3: MDR1 and BCRP Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction between Rilpivirine and Abacavir and Effect on Intestinal Absorption.

Reznicek J, Ceckova M, Ptackova Z, **Martinec O**, Tupova L, Cervený L, Staud F

Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9):e00837-17. doi: 10.1128/AAC.00837-17. Print 2017 Sep., IF₂₀₁₇= 4.256, Q1, 1. decil dle AIS

- podíl při provádění *in vitro* experimentů

P4: Current antiviral drugs and their analysis in biological materials-Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses.

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:400-416. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.071. Epub 2017 Jul 3. IF₂₀₁₈= 2.983; Q2

- podíl na přípravě manuskriptu

P5: Current antiviral drugs and their analysis in biological materials - Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses.

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L.

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:378-399. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.003. Epub 2017 Jul 8. IF₂₀₁₈= 2.983; Q2

- podíl na přípravě manuskriptu

7. KOMENTÁŘE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM

7.1. Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices

Martinec O, Huliciak M, Staud F, Cecka F, Vokral I, Cerveny L.

Antimicrob Agents Chemother. 2019 Oct 22;63(11):e00910-19. doi: 10.1128/AAC.00910-19. Print 2019 Nov. IF₂₀₁₈=4.715, Q1, 1. decil dle AIS i IF; IF₂₀₁₉=4.904, Q1, 1. decil dle AIS

Záměrem této práce bylo posoudit schopnost vybraných anti-HIV a anti-HCV léčiv inhibovat střevní ABCB1 transportér. Pro tento účel jsme využili *in vitro* experimenty (obousměrný transport přes monovrstvu Caco-2 buněk) a *ex vivo* akumulární studie na PCIS připravených z potkaního ilea a lidského jejunu. Vzhledem k faktu, že jsme byli první, kdo využil PCIS pro testování klinicky používaných léčiv, porovnali jsme výsledky získané *in vitro* a *ex vivo*.

Lopinavir, ritonavir, saquinavir, atazanavir, maravirok, ledipasvir a daclatasvir inhibovaly aktivitu ABCB1, modelového substrátu ABCB1 rhodaminu 123 (RHD123), v buňkách Caco-2 a PCIS odvozených z potkanů. Lopinavir, ritonavir, saquinavir a atazanavir signifikantně inhibovaly eflux RHD123 v lidských PCIS, zatímco možná interindividuální variabilita byla pozorována při inhibici střevního ABCB1 maravirokem, ledipasvirem, a daclatasvirem. Abakavir, zidovudin, tenofovir-disoproxil-fumarát, etravirin, a rilpivirin neinhibovaly eflux RHD123.

Můžeme tedy konstatovat, že některá antivirotika mají vysoký potenciál inhibovat střevní ABCB1 transportér. Lze tedy předpokládat, že dříve popsaná zvýšená biodostupnost ABCB1 substrátů, včetně antivirotik a léků předepsaných k léčbě komorbidit, je alespoň z části podmíněna inhibicí střevního ABCB1. Tyto výsledky by mohly pomoci při výběru kombinačních farmakoterapií a/nebo vhodných dávkovacích schémat pro pacienty nakažené virem HIV a/nebo HCV.

7.2. Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)

Martinec O, Biel C, de Graaf IA, Huliciak M, Staud F, Vokřál I, Červený L, Olinga P

Manuskript byl vytvořen ve spolupráci s Universitou v Groningenu a v současné době se nachází v revizním řízení v časopise *Biochemical Pharmacology*,

Během svého postgraduálního studia jsem strávil 7 měsíců na zahraniční stáži na Univerzitě v Groningenu na katedře Farmaceutické technologie a biofarmacie pod vedením profesora Petera Olingy, která stála u zrodu metodiky PCIS. Po dohodě se školiteli jsem se věnoval dvěma tématům. Jedním byla optimalizace podmínek inkubace pro dosažení prodloužené viability PCIS a monitoring různých markerů viability. Získané výsledky budou připraveny k publikaci nizozemskou stranou. Vzhledem k faktu, že antiretrovirální látky jsou i popsány induktory ABCB1, ale v současnosti není žádný doporučovaný model pro testování indukce střevního ABCB1, druhým řešeným úkolem bylo testování možnosti, zda by metoda PCIS byla vhodná pro sledování vlivu léčiv na množství střevního ABCB1. Výsledky této části byly zkompletovány a připraveny k publikaci/odeslány do časopisu *Biochemical Pharmacology*, v současné době čekáme na oponentské posudky.

Jak je již uvedeno v předchozím odstavci, v současné době neexistují žádné metody *in vitro* pro vyhodnocení indukce střevního ABCB1 transportéru, které by zohledňovaly veškeré regulační faktory jejich fyziologické exprese. Regulační úřady pro léčiva jako EMA či FDA neposkytují žádná doporučení pro testování léků *in vitro* k indukci ABCB1. V minulosti však byla publikována práce popisující efekt induktorů na genovou expresi *ABCB1* v lidských PCIS. Využili jsme tedy tento model, tj. tkáň obsahující buňky v jejich přirozeném prostředí a exprimující fyziologické hladiny jaderných faktorů požadovaných pro indukci ABCB1, a zaměřili jsme se na testování, zda by lidské PCIS mohly být vhodnou metodou pro prodloužené indukční studie (od 48 do 72 hodin podle doporučení US Food and Drug Administration pro enzymy metabolizující léčiva) přímo v lidském střevě.

Zjistili jsme, že PCIS inkubované ve „Williams‘ medium E“ po dobu 48 hodin, si zachovaly neporušenou morfologii, obsah ATP a efluxní aktivita ABCB1 zůstala nezměněna. RIF (30 μ M), modelový ligand PXR, významně zvýšil genovou expresi, množství proteinu a aktivitu ABCB1 a genovou expresi *CYP3A4*, přičemž míra indukce byla úměrná bazálním hladinám *PXR* ve střevě.

Těmito daty jsme ukázali, že PCIS inkubované za podmínek srovnatelných s podmínkami používanými pro inhibiční studie lze použít k vyhodnocení účinnosti léčiva k indukci ABCB1 v lidském střevě. PCIS by tak mohl představovat hodnotný experimentální nástroj, který lze snadno použít v pre-klinickém výzkumu pro komplexní vyhodnocení DDI.

7.3. MDR1 and BCRP Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction between Rilpivirine and Abacavir and Effect on Intestinal Absorption.

Reznicek J, Ceckova M, Ptackova Z, **Martinec O**, Tupova L, Cervený L, Staud F

Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9):e00837-17. doi: 10.1128/AAC.00837-17. Print 2017 Sep., IF₂₀₁₇= 4.256, Q1, 1. decil dle AIS

Rilpivirin ze skupiny NNRTI který představuje účinnou složku cART při léčbě HIV pozitivních pacientů. Mnoho antiretrovirálních léčiv běžně používaných v cART jsou substrátem ABC transportérů a/nebo transportérů z rodiny SLC (Solute Carrier). DDI na membránových transportérech mohou vést ke změně farmakokinetiky jednotlivých složek cART.

Cílem této studie bylo zhodnotit interakce rilpivirinu s ABC a SLC transportérech *in vitro* a posoudit jeho význam pro farmakokinetiku *in vivo*.

Pomocí akumulčních testů na MDCKII buněčné linii, která nadměrně exprimuje vybrané ABC nebo SLC transportéry, jsme odhalili rilpivirin jako inhibitor ABCB1 a ABCG2, ale žádný vliv nebyl viděn na ABCC2, OCT1¹, OCT2² nebo MATE1³ transportérech. Následné transportní experimenty přes monovrstvy MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a Caco-2 buněk demonstrovaly, že **rilpivirin inhibuje ABCB1 i ABCG2**, a zvyšuje abakaviru jeho transmembránový transport. V rámci této studie jsme také zjistili, že ABCB1 a ABCG2 snižují biodostupnost abakaviru po intraduodenálním podání u samců potkana Wistar a současné podání rilpivirinu signifikantně zvýšilo AUC abakaviru. Lze předpokládat, že k tomu došlo na podkladě inhibice střevních ABCB1 a ABCG2 transportérů.

Závěrem této práce tedy je, že rilpivirin inhibuje ABCB1 a ABCG2 transportéry a může ovlivnit dispozici abakaviru po p.o. podání nebo dalších současně podávaných substrátů těchto transportérů. Naše data také ukazují, že DDI na vybraných membránových transportérech mezi rilpivirinem a lamivudinem jsou nepravděpodobné.

¹ OCT1 Organic cation transporter 1

² OCT2 Organic cation transporter 2

³ MATE1 Multidrug and toxin extrusion protein 1

7.4. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials-Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses.

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:400-416. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.071. Epub 2017 Jul 3. IF₂₀₁₈= 2.983; Q2

V rámci disertační práce bylo nutné vypracovat přípravnou rešerši o antiviroticích a jejich analýze jak z hlediska farmakologického, tak i analytického. Tato práce byla ve výsledku rozdělena do dvou na sebe navazujících publikací a byla vytvořena ve spolupráci s katedrou analytické chemie.

Tento přehledový článek poskytuje přehled aktuálně používaných antivirových léčiv proti respiračním virům a virům herpes simplex a představuje současné přístupy k jejich analýze. Velký počet dostupných antivirotik a jejich strukturální variabilit činí tento úkol často velmi náročným. Stručně jsou zde nastíněny mechanismy působení antivirotik proti respiračním a herpetickým virům a jejich použití v klinické praxi a podrobněji jsou popsány analytické metody pro vybrané zástupce každé třídy. Metody vyvinuté pro stanovení léčiv z těchto tříd většinou zahrnují konvenční postupy analýzy.

7.5. Current antiviral drugs and their analysis in biological materials - Part II: Antivirals against hepatitis and HIV viruses.

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L.

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:378-399. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.003. Epub 2017 Jul 8. IF₂₀₁₈= 2.983; Q2

Tento revizační článek je druhou částí série, jejímž cílem je poskytnout komplexní přehled o aktuálně používaných antivirových léčivech proti virům hepatitidy (B a C) a viru lidské imunodeficiency (HIV) a ukázat moderní přístupy k jejich analýze.

V poslední dekádě bylo do klinické praxe zavedeno mnoho nových antivirotik proti viru hepatitidy C (HCV) a HIV. Nedávné rozšiřující se portfolio těchto skupin antivirotik se odráží ve zvyšujícím se počtu vyvinutých analytických metod potřebných v klinické praxi. Část II shrnuje mechanismy působení antivirotik proti viru hepatitidy B (HBV), HCV a HIV, jejich použití v klinické praxi a analytické metody pro jednotlivé třídy. Poskytuje také odborný posudek o stavu techniky v oblasti bioanalýzy těchto léků. Analytické metody odrážejí novost těchto chemických struktur a použití zdaleka nejaktuálnějších přístupů, jako je jednoduchá a vysoce výkonná příprava vzorků a rychlá separace, často pomocí UHPLC-MS / MS.

8. SOUHRN A ZÁVĚR

Orální podání léčiv je nejpohodlnější a nejrozšířenější formou aplikace léčiv. Při tomto podání musí léčivo překonat střevní bariéru, která do jisté míry určuje biologickou dostupnost léčiv [3, 27, 31]. Vzhledem k tomu, že je většina antivirových látek podávána perorálně, sehrává ABCB1 transportér během střevní absorpce klíčovou roli [130, 131]. HIV a/nebo HCV infekce, komorbidita, věk, cART a polyfarmakoterapie, či v horším případě polypragmatie představují rizikové faktory, které se podílejí na **rozvoji DDI** [130]. Prevalence klinicky významných DDI se pohybuje v rozmezí 14 až 41 % [130, 131]. Interakce s/na ABCB1 transportéru by měly být studovány během preklinického výzkumu a klinických studií, nicméně řada DDI na ABCB1 transportéru zůstává neobjevena [130]. V důsledku toho narůstá snaha vyvinout dokonalejší postupy pro testování DDI, jejichž výsledky by lépe odrážely podmínky lidského organismu.

Pro studium aktivity střevních transportérů a pro hodnocení inhibičního potenciálu léků byla vyvinuta *ex vivo* metoda založená na akumulaci modelového substrátu v **potkaních a lidských PCIS** [27, 31, 71]. Díky této metodě lze i z jednoho usmrčeného zvířete provést experiment na všech segmentech střeva a společně s tím i experiment na játrech po případě dalších orgánech a kvantifikovat tak příspěvek střeva a jater k pre-systémové eliminaci léčiv.

PCIS představují silný translační model střeva pro studie metabolismu a toxicity léčiv a transportu. Tuto metodu limituje skutečnost, že nejsme schopni zkoumat vektorový transport léčiv a stanovit permeabilitu léčiva [28]. V případě lidských PCIS může být problémem i dostupnost biologického materiálu.

Při řešení této disertační práce jsme nejdříve pomocí buněčných *in vitro* experimentů prokázali inhibiční schopnost rilpivirinu na ABCB1 a ABCG2 transportérech. Toto chování bylo poté pozorováno i na *in vivo* potkaním modelu, kde byla zvýšená biodostupnost abakaviru (substrátu ABCB1 a ABCG2) při současném podávání s rilpivirinem.

V rámci **prvního předkládaného prvoautorského článku** jsme hodnotili schopnost vybraných antivirových inhibovat střevní ABCB1 pomocí obousměrného transportu přes buňky Caco-2 a akumulčních studií v potkaních a lidských PCIS [132, 133]. Jako substrát ABCB1 transportéru jsme použili RHD123 [4, 110, 124, 134-138]. Tento substrát je výhodný, protože je snadno detekovatelný a jeho eflux z enterocytů není ovlivněn metabolismem [136]. RHD123 je substrátem i dalších transportérů [139]. Nicméně se jedná transportéry bez funkční exprese

ve střevě [66, 140]. Další důležitý střevní efluxní transportér ABCG2 se na membránovém přenosu RHD123 nepodílí [27].

Během *in vitro* experimentů na buněčné linii Caco-2 a *ex vivo* experimentů na potkaních PCIS bylo **hodnoceno celkem 13 ARV**. Ritonavir, lopinavir, daclatasvir, saquinavir, maravirok, ledipasvir a atazanavir inhibovaly ABCB1. Tyto látky byly posléze testovány na lidských PCIS získaných od pěti dárců. Všechny zkoušené PI, tedy lopinavir, ritonavir, saquinavir a atazanavir, vykazovaly významnou inhibici ABCB1 transportéru ve vzorcích od všech pěti dárců, což je v souladu s dosud publikovanými klinickými daty. Ta naznačují, že námi zkoumané PI zvyšují biodostupnost současně podávaných substrátů ABCB1. Jako příklad lze uvést antituberkulotika rifabutin a bedaquillin nebo některá z nových antimalarik jako proguanil, atovachon a arthemeter [5, 97, 109, 114, 117, 122]. U ledipasviru, daclatasviru a maraviroku jsme nebyli schopni dohledat vliv na biodostupnost současně podaných léčiv, která jsou substráty ABCB1.

S klinicky popsányými DDI dále koresponduje skutečnost, že některé námi studované PI zvyšují biologickou **dostupnost tenofoviru**. Konkrétně atazanavir v kombinaci s ritonavirem zvyšuje jeho biologickou dostupnost o 91 % při podání tenofoviru ve formě proléčiva tenofovir alafenamidu. Podobně lopinavir v kombinaci s ritonavirem nebo samotný atazanavir zvyšuje biologickou dostupnost tenofoviru až o 32 %, respektive 37 %, když je tenofovir podán ve formě TDF [103]. Tenofovir alafenamid a TDF jsou popsányými substráty ABCB1 [136], ale samotný tenofovir není přenášen ABCB1, ABCG2 ani ABCC2 transportérem [139]. Tenofovir navíc není metabolizován ani izoenzymy cytochromu P450 (CYP450), které jsou inhibovány lopinavirem, atazanavirem nebo ritonavirem [66, 140]. Je tedy možné předpokládat, že střevní inhibice ABCB1 je klíčovým mechanismem vedoucím ke zvýšení plazmatických koncentrací tenofoviru.

Vzhledem k faktu, že se jedná o nový experimentální postup a klinicky relevantní ARV nebyla tímto způsobem dosud testována, pokusili jsme se porovnat výsledky získané *in vitro* a *ex vivo*. Výsledky *in vitro* a *ex vivo* na potkaních řezech jsou porovnatelné. Nicméně výsledky získané pomocí lidských řezů plně nekorelovaly s těmito experimenty. Nicméně je potřeba zmínit, že jsme testovali nižší koncentrace antivirotik, než se pravděpodobně vyskytují ve střevech pacientů užívajících tyto látky perorálně [132] a experimenty nebyly provedeny na ileu, kde je aktivita ABCB1 pravděpodobně nejvyšší [141].

Podle pokynů lékových agentur by měla být zkoumána schopnost léčiva indukovat transportéry a léčivo metabolizující enzymy minimálně na úrovni mRNA ještě před uvedením léčiva na trh [142]. Jak již bylo řečeno v teoretické části, některá antivirotika jsou popsány induktory ABCB1 (*Tabulka 1*), ale v důsledku nedostupnosti relevantních modelů zůstává schopnost indukce střevního ABCB1 antivirotiky či dalšími léčivy nepotvrzena. Indukce střevního ABCB1 a CYP3A4 může být významným klinickým fenoménem komplikujícím léčbu [72]. Enterocyty totiž exprimují v porovnání s játry asi dvoutřetinové množství CYP3A4, vyšší množství ABCB1 a srovnatelné hladiny jaderných faktorů PXR a RXR, které regulují expresi ABCB1 a CYP3A4 [108]. Střevní PXR navíc interaguje s vysokými koncentracemi induktoru a dalším faktorem je velký povrch střevní výstelky [143].

V rámci **druhé prvoautorské publikace** jsme se věnovali možnému použití lidských PCIS jakožto nového modelu ke studiu **indukce transportérů**, zejména pak ABCB1 transportérů. K experimentu jsme použili vzorky připravené z lidského jejunálního segmentu střeva. Testovali jsme možnost inkubace PCIS až po dobu 72 hodin a zkoumali jsme možnou indukci ABCB1 transportéru v PCIS nejen na úrovni genu, ale také na úrovni proteinu a funkce transportéru. K indukčním studiím jsme využili modelový ligand PXR, RIF [28].

Naše výsledky ukázaly, že je možné lidské PCIS inkubovat **po dobu 48 hodin**, aniž by byla změněna morfologie střevní výstelky a množství tkáňového ATP. 72hodinová inkubace naopak vedla k destrukci epitelální vrstvy u PCIS. Zároveň během 48hodinové inkubační doby byly zachovány hladiny ABCB1 i ABCB1, u něhož byla inhibice stále prokazatelná. Kromě toho byla exprese genů kódujících PXR a RXRA (rozhodující faktory pro RIF-zprostředkovanou transkripční aktivaci [35]) stabilní po celou dobu inkubace [144]. V rámci výsledků jsme pozorovali několikanásobné zvýšení ABCB1 a CYP3A4, které bylo následně prokázáno na úrovni proteinu a funkce ABCB1 transportéru.

V návaznosti na naše výsledky z inhibičních studií je potřeba naše testované látky ověřit i s jiným klinicky relevantním substrátem ABCB1 např. naše další navazující práce s digoxinem. Během této práce se snažíme zaměřit na inhibiční potenciál léčiv mířící na různá vazebná místa ABCB1, která jsou v poslední době hojně diskutována [145, 146]. Dále se hodláme blíže věnovat transintestinálnímu přenosu tenofoviru a jeho proléčiv (TDF a TAF) a také prověříme vhodnost PCIS jakožto indukčního modelu s použitím dalších klinicky relevantních léčiv, která snižují AUC spolu podávaných léčiv.

Závěrem můžeme konstatovat, že jsme provedli první komplexní studii kombinující obousměrné transportní experimenty *in vitro* a *ex vivo* akumulace v PCIS získaných z potkaní a lidské tkáně za účelem studia inhibice ABCB1 klinicky využívanými léčivy. Naše data přispívají k vysvětlení molekulárních mechanismů, které se podílejí na změně farmakokinetických vlastností léčiv, která jsou substráty ABCB1, při současném podání s testovanými antivirotiky. Po ověření v klinickém prostředí mohou naše výsledky pomoci při výběru kombinační farmakoterapie a / nebo optimalizaci dávkovacích schémat pro pacienty nakažené virem HIV a / nebo HCV. Dále jsme dokázali, že lidské PCIS zůstávají intaktní a stabilně exprimující *ABCB1*, *CYP3A4*, *PXR* a *RXR α* mRNA během 48 hodin inkubace, což představuje spodní limit FDA pro hodnocení indukční účinnosti léků [24], a RIF indukuje *ABCB1/ABCB1* i *CYP3A4*. Nespornou výhodou je i to, že tento model výhledově umožňuje odlišit roli střevní bariéry od jater v pre-systémové eliminaci léčiv. Navzdory nesporným výhodám lidských PCIS uvedeným výše, má tato metoda i svá omezení. Pro získání střevní tkáně je nutná úzká spolupráce s chirurgickým oddělením, dostupná střevní tkáň je často od geriatrických pacientů s operovanými patologiemi a získané výsledky jsou zatíženy interindividuální rozdíly v množství ABCB1 a CYP3A4. Ty mohou být způsobeny polymorfismy, přítomností indukčních a inhibičních látek (v dietě nebo léky), pohlavím, věkem pacientů a / nebo aktivitou jaderných faktorů [153, 154]. Z hlediska budoucího vývoje je třeba nadále testovat a ověřovat validitu PCIS, nicméně již dnes ho lze považovat za jednoduchý, robustní a levný model s fyziologickými hladinami ABCB1, CYP3A4 s přidruženými regulačními faktory pro testování DDI [157].

9. PREZENTACE DAT NA ODBORNÝCH KONFERENCÍCH

Seznam ústních a posterových prezentací experimentálních dat na domácích a mezinárodních odborných konferencích je uváděn chronologicky, podle data konání události.

9.1. Ústní prezentace

1. Optimization of *in vitro* and *ex vivo* methods to study role of ABCB1 and ABCG2 transporters for intestinal absorption

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference PGS konference, FaF Hradec Králové, 7.-8.2. 2017

2. The *in vitro* and *ex vivo* testing of antiviral drugs effect on rhodamine123 intestinal absorption

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference PGS konference, FaF Hradec Králové, 24.-25.1.2018

3. Human precision-cut intestinal slices as an *ex vivo* model for induction of the ABCB1 transporter

Ondřej Martinec, Carin Biel, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, Inge AM. De Graaf, Peter Olinga

69. Česko-Slovenské farmakologické dny, Praha, 11. – 13. 9. 2019

4. Precision-cut intestinal slices from human tissue as an *ex vivo* model for ABCB1 transporter induction

Ondřej Martinec, Carin Biel, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, Inge AM. De Graaf, Peter Olinga

10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská vědecká konference PGS konference, FaF Hradec Králové, 22.-23.1.2020

9.2. Posterové prezentace

1. Optimization of *in vitro* and *ex vivo* methods to study role of drug transporters for intestinal absorption

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

Farmakologické dny 2016, Brno, 13. - 15. 9. 2016

Ocenění za nejlepší Poster v sekci experimentální farmakologie

2. Comparison of drug-drug interaction studies using Caco-2 cell line and precision cut intestinal slices

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

Farmakologické dny 2017, Stará Lesná, SR, 2. – 4. 10. 2017

3. Evaluation of antiviral drug activity on intestinal ABCB1/ABCG2 transporters using rhodamine123 on *in vitro* and *ex vivo* methods

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

Meet the Experts Transporter Conference Budapest SOLVO Biotechnology, The transporter company, Maďarsko, 25.-27.4.2018

4. The *in vitro* and *ex vivo* testing of antivirals, effect on rhodamine123 intestinal absorption

Ondřej Martinec, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, František Štaud

Farmakologické dny 2018, Hradec Králové, 5. – 7. 9. 2018

5. Human Precision-cut intestinal slices as an *ex vivo* model for ABCB1 transporter induction

Ondřej Martinec, Carin Biel, Lukáš Červený, Ivan Vokřál, Inge AM. De Graaf, Peter Olinga

Meet the Experts Transporter Conference Boston 2019, USA, Boston, 3.-5. 9. 2019

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Giacomini, K.M., A. Galetin, and S.M. Huang, *The International Transporter Consortium: Summarizing Advances in the Role of Transporters in Drug Development*. Clin Pharmacol Ther, 2018. **104**(5): p. 766-771.
2. Estudante, M., et al., *Intestinal drug transporters: an overview*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(10): p. 1340-56.
3. Giacomini, K.M. and S.M. Huang, *Transporters in drug development and clinical pharmacology*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 3-9.
4. Kis, O., et al., *The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(1): p. 22-35.
5. Health, N.I.o. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV*. [Web Page] 2019 Dec. 18, 2019 [cited 2020 1st October]; Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/overview>.
6. Dagli, R.J. and A. Sharma, *Polypharmacy: a global risk factor for elderly people*. J Int Oral Health, 2014. **6**(6): p. i-ii.
7. AidsInfo, *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV*. [Webpage] 2020 12/18/2019 [cited 2020 8/26]; Available from: <https://aidsinfo.nih.gov/guidelines>.
8. Begley, R., et al., *Pharmacokinetics of Tenofovir Alafenamide When Coadministered With Other HIV Antiretrovirals*. J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2018. **78**(4): p. 465-472.
9. Yamazaki, S., et al., *Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Understanding Bosutinib Drug-Drug Interactions: Importance of Intestinal P-Glycoprotein*. Drug Metab Dispos, 2018. **46**(8): p. 1200-1211.
10. Luedtke, D., et al., *Effects of Ketoconazole and Rifampicin on the Pharmacokinetics of Nintedanib in Healthy Subjects*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2018. **43**(5): p. 533-541.
11. WHO. *Number of people (all ages) living with HIV*. 2020 2020-07-09; Available from: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=en>.
12. WHO. *Number of deaths due to HIV/AIDS*. 2020 2020-07-07; Available from: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.623?lang=en>.
13. WHO. *Hepatitis*. 2020 [cited 2020 08-18]; Available from: https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1.
14. Dietrich, C.G., A. Geier, and R.P.J.O. Elferink, *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. Gut, 2003. **52**(12): p. 1788-1795.
15. Glavinas, H., et al., *The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity*. Curr Drug Deliv, 2004. **1**(1): p. 27-42.
16. Higgins, C.F., *ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 205-10.
17. Cihalova, D., et al., *Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro*. Biochem Pharmacol, 2015. **98**(3): p. 465-72.
18. Cihalova, D., F. Staud, and M. Ceckova, *Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AT-7519, flavopiridol and SNS-032 with ABCB1, ABCG2 and ABCC1 transporters and their potential to overcome multidrug resistance in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(1): p. 105-16.
19. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
20. Szakacs, G., et al., *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discov Today, 2008. **13**(9-10): p. 379-93.

21. Gerk, P.M. and M. Vore, *Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 407-15.
22. Chen, J. and K. Raymond, *Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2006. **5**: p. 3.
23. Palmeira, A., et al., *Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds*. Curr Med Chem, 2012. **19**(13): p. 1946-2025.
24. Administration, U.S.F.a.D., *In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry.*, U.S.F.a.D. Administration, Editor. 2020.
25. Stenehjem, D.D., et al., *Novel and emerging strategies in drug delivery for overcoming the blood-brain barrier*. Future Med Chem, 2009. **1**(9): p. 1623-41.
26. Kong, S., Y.H. Zhang, and W. Zhang, *Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 2819154.
27. Li, M., et al., *P-gp activity and inhibition in the different regions of human intestine ex vivo*. Biopharm Drug Dispos, 2017. **38**(2): p. 127-138.
28. van de Kerkhof, E.G., et al., *Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(3): p. 604-13.
29. Neuhoff, S., et al., *pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers*. Eur J Pharm Sci, 2005. **25**(2-3): p. 211-20.
30. Ingels, F.M. and P.F. Augustijns, *Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2*. J Pharm Sci, 2003. **92**(8): p. 1545-58.
31. Li, M., I.A. de Graaf, and G.M. Groothuis, *Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2016. **12**(2): p. 175-90.
32. Murakami, T., *Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine*. Expert Opin Drug Discov, 2017. **12**(12): p. 1219-1232.
33. Varma, M.V.S., K. Sateesh, and R. Panchagnula, *Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: Contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport*. Molecular Pharmaceutics, 2005. **2**(1): p. 12-21.
34. Oostendorp, R.L., J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(2): p. 137-47.
35. Smutny, T., S. Mani, and P. Pavek, *Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily*. Curr Drug Metab, 2013. **14**(10): p. 1059-69.
36. Fenner, K.S., et al., *Drug-drug interactions mediated through P-glycoprotein: clinical relevance and in vitro-in vivo correlation using digoxin as a probe drug*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(2): p. 173-81.
37. von Richter, O., et al., *Determination of in vivo absorption, metabolism, and transport of drugs by the human intestinal wall and liver with a novel perfusion technique*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**(3): p. 217-27.
38. Dubey, R.K. and J. Singh, *Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine--II. Conjugases*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(2): p. 177-84.
39. Dubey, R.K. and J. Singh, *Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine--I. Monooxygenases*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(2): p. 169-76.
40. Kaminsky, L.S. and Q.Y. Zhang, *The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(12): p. 1520-5.

41. Pang, K.S., *Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series)*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(12): p. 1507-19.
42. Zimmermann, C., et al., *Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(2): p. 219-24.
43. Gutmann, H., et al., *Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(5): p. 695-9.
44. van de Waterbeemd, H., *The fundamental variables of the biopharmaceutics classification system (BCS): a commentary*. Eur J Pharm Sci, 1998. **7**(1): p. 1-3.
45. Pelkonen, O., et al., *In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report*. Eur J Clin Pharmacol, 2001. **57**(9): p. 621-9.
46. Dahlgren, D. and H. Lennernas, *Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches*. Pharmaceutics, 2019. **11**(8).
47. Dahlgren, D., et al., *The effects of three absorption-modifying critical excipients on the in vivo intestinal absorption of six model compounds in rats and dogs*. Int J Pharm, 2018. **547**(1-2): p. 158-168.
48. Baker, J.R., et al., *Propagation Characteristics of Fasting Duodeno-jejunal Contractions in Healthy Controls Measured by Clustered Closely-spaced Manometric Sensors*. J Neurogastroenterol Motil, 2019. **25**(1): p. 100-112.
49. Stappaerts, J., et al., *In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities*. Int J Pharm, 2015. **478**(2): p. 665-81.
50. Caldeira, T.G., et al., *Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin*. Int J Pharm, 2018. **551**(1-2): p. 148-157.
51. Abbasi M., V.H., Hamishehkar H., Amirkhiz M., Zakeri-Milani P., *In vitro and in situ effects of atorvastatin and ezetimibe on P-glycoprotein expression and function*. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2016. **11**(4): p. 911-919.
52. Holmstock, N., et al., *In situ intestinal perfusion in knockout mice demonstrates inhibition of intestinal p-glycoprotein by ritonavir causing increased darunavir absorption*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(9): p. 1407-10.
53. Reis, J.M., et al., *Lamivudine permeability study: a comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum*. Eur J Pharm Sci, 2013. **48**(4-5): p. 781-9.
54. Lennernas, H., S. Nylander, and A.L. Ungell, *Jejunal permeability: a comparison between the ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans*. Pharm Res, 1997. **14**(5): p. 667-71.
55. Luo, Z., et al., *Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2013. **68**(2): p. 208-216.
56. Clift, M.J., P. Gehr, and B. Rothen-Rutishauser, *Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative*. Arch Toxicol, 2011. **85**(7): p. 723-31.
57. Runden, E., et al., *Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism*. J Neurosci, 1998. **18**(18): p. 7296-305.
58. Fadeel Bengt, P.A., Shvedova Anna *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. 2017. 51-82.
59. Agu U. Remigius U. , U.I.M., *Drug Absorption Studies*. 2008.
60. Antunes, F., et al., *Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins*. Curr Drug Metab, 2013. **14**(1): p. 4-20.
61. Balimane, P.V., S. Chong, and R.A. Morrison, *Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(1): p. 301-12.
62. Roeselers, G., et al., *Ex vivo systems to study host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2013. **27**(1): p. 101-13.

63. van de Kerkhof, E.G., I.A. de Graaf, and G.M. Groothuis, *In vitro methods to study intestinal drug metabolism*. *Curr Drug Metab*, 2007. **8**(7): p. 658-75.
64. Bruno, S., *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. 1. ed. 2015.
65. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. *Cell Biology and Toxicology*, 2005. **21**(1): p. 1-26.
66. Englund, G., et al., *Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells*. *Eur J Pharm Sci*, 2006. **29**(3-4): p. 269-77.
67. Bruck, S., et al., *Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue*. *Biopharm Drug Dispos*, 2017. **38**(2): p. 115-126.
68. Fisher, R.B. and D.S. Parsons, *A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption*. *J Physiol*, 1949. **110**(1-2): p. 36-46, pl.
69. Fisher, R.B. and D.S. Parsons, *Glucose absorption from surviving rat small intestine*. *J Physiol*, 1949. **110**(3-4): p. 281-93.
70. Plumb, J.A., et al., *A comparison of the structural integrity of several commonly used preparations of rat small intestine in vitro*. *Clin Sci (Lond)*, 1987. **73**(1): p. 53-9.
71. de Graaf, I.A., et al., *Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(9): p. 1540-51.
72. Groothuis, G.M. and I.A. de Graaf, *Precision-cut intestinal slices as in vitro tool for studies on drug metabolism*. *Curr Drug Metab*, 2013. **14**(1): p. 112-9.
73. Ruigrok, M.J.R., et al., *siRNA-mediated protein knockdown in precision-cut lung slices*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. **133**: p. 339-348.
74. Gozalbes, R., et al., *QSAR-based permeability model for drug-like compounds*. *Bioorg Med Chem*, 2011. **19**(8): p. 2615-24.
75. Awoonor-Williams, E. and C.N. Rowley, *Molecular simulation of nonfacilitated membrane permeation*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1858**(7 Pt B): p. 1672-87.
76. Lee, C.T., et al., *Simulation-Based Approaches for Determining Membrane Permeability of Small Compounds*. *J Chem Inf Model*, 2016. **56**(4): p. 721-33.
77. Mathiowetz, A.M., *Design Principles for Intestinal Permeability of Cyclic Peptides*. *Methods Mol Biol*, 2019. **2001**: p. 1-15.
78. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
79. Cunningham, A.L., et al., *Manipulation of dendritic cell function by viruses*. *Curr Opin Microbiol*, 2010. **13**(4): p. 524-9.
80. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. *Ann Ist Super Sanita*, 2010. **46**(1): p. 5-14.
81. Klevens, R.M., et al., *Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States*. *Clin Infect Dis*, 2012. **55 Suppl 1**: p. S3-9.
82. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(7): p. 482-96.
83. Dubuisson, J. and F.L. Cosset, *Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update*. *J Hepatol*, 2014. **61**(1 Suppl): p. S3-S13.
84. Bukh, J., *The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control*. *J Hepatol*, 2016. **65**(1 Suppl): p. S2-S21.
85. Kim, C.W. and K.M. Chang, *Hepatitis C virus: virology and life cycle*. *Clin Mol Hepatol*, 2013. **19**(1): p. 17-25.
86. Roth, D., et al., *Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naive and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4-5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study*. *Lancet*, 2015. **386**(10003): p. 1537-45.

87. Forns, X., et al., *Glecaprevir plus pibrentasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4, 5, or 6 infection in adults with compensated cirrhosis (EXPEDITION-1): a single-arm, open-label, multicentre phase 3 trial*. *Lancet Infect Dis*, 2017. **17**(10): p. 1062-1068.
88. Soriano, V., et al., *Viral hepatitis and HIV co-infection*. *Antiviral Res*, 2010. **85**(1): p. 303-15.
89. Prevention, C.f.D.C.a. *Hepatitis C Questions and Answers for the Public*. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm#cfAQ71>.
90. Gallant, J.E., et al., *Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(3): p. 251-60.
91. Chearskul, P., et al., *New antiretroviral drugs in clinical use*. *Indian J Pediatr*, 2006. **73**(4): p. 335-41.
92. Gemtessa, T.A. and L.M. Chirch, *Update on Hepatitis C Virus and HIV Coinfection*. *J Clin Transl Hepatol*, 2013. **1**(2): p. 109-15.
93. Mathias, A.A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GS-9350: a novel pharmacokinetic enhancer without anti-HIV activity*. *Clin Pharmacol Ther*, 2010. **87**(3): p. 322-9.
94. Clark, V. and D.R. Nelson, *The role of ribavirin in direct acting antiviral drug regimens for chronic hepatitis C*. *Liver Int*, 2012. **32 Suppl 1**: p. 103-7.
95. Das, D. and M. Pandya, *Recent Advancement of Direct-acting Antiviral Agents (DAAs) in Hepatitis C Therapy*. *Mini Rev Med Chem*, 2018. **18**(7): p. 584-596.
96. Rivero-Juarez, A., et al., *Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of the combination of daclatasvir/sofosbuvir/ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018. **14**(9): p. 901-910.
97. Kiser, J.J., J.R. Burton, Jr., and G.T. Everson, *Drug-drug interactions during antiviral therapy for chronic hepatitis C*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(10): p. 596-606.
98. Rice, D.P., Jr., et al., *HIV/HCV Antiviral Drug Interactions in the Era of Direct-acting Antivirals*. *J Clin Transl Hepatol*, 2016. **4**(3): p. 234-240.
99. Seden, K. and D. Back, *Directly acting antivirals for hepatitis C and antiretrovirals: potential for drug-drug interactions*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011. **6**(6): p. 514-26.
100. Honer Zu Siederdisen, C., et al., *Drug-Drug Interactions With Novel All Oral Interferon-Free Antiviral Agents in a Large Real-World Cohort*. *Clin Infect Dis*, 2016. **62**(5): p. 561-7.
101. Oramasionwu, C.U., H.N. Moore, and J.C. Toliver, *Barriers to hepatitis C antiviral therapy in HIV/HCV co-infected patients in the United States: a review*. *AIDS Patient Care STDS*, 2014. **28**(5): p. 228-39.
102. Truong, W.R., J.J. Schafer, and W.R. Short, *Once-Daily, Single-Tablet Regimens For the Treatment of HIV-1 Infection*. *P T*, 2015. **40**(1): p. 44-55.
103. WHO. *World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List 2019*. [Web page] 2019; Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.
104. Health, N.I.o. *Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) Abacavir*. [web page] 2020 [cited 2020 9th October]; Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/pediatric-arv/abacavir?view=full>.
105. Neumanova, Z., et al., *Effect of drug efflux transporters on placental transport of antiretroviral agent abacavir*. *Reprod Toxicol*, 2015. **57**: p. 176-82.
106. Yuen, G.J., S. Weller, and G.E. Pakes, *A review of the pharmacokinetics of abacavir*. *Clin Pharmacokinet*, 2008. **47**(6): p. 351-71.
107. Colbers, A.P., et al., *The pharmacokinetics, safety and efficacy of tenofovir and emtricitabine in HIV-1-infected pregnant women*. *AIDS*, 2013. **27**(5): p. 739-48.
108. Neumanova, Z., et al., *Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta*. *AIDS*, 2014. **28**(1): p. 9-17.
109. Health, N.I.o. *Drug Interactions between Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Other Drugs (Including Antiretroviral Agents)*. [web page] 2019 18th December 2019; Available from:

- <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/drug-interactions-between-nucleoside-reverse-transcriptase?view=full>.
110. Storch, C.H., et al., *Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein*. *Biochem Pharmacol*, 2007. **73**(10): p. 1573-81.
 111. de Souza, J., et al., *Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers*. *J Pharm Sci*, 2009. **98**(11): p. 4413-9.
 112. Neumanova, Z., et al., *Role of ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC5 transporters in placental passage of zidovudine*. *Biopharm Drug Dispos*, 2016. **37**(1): p. 28-38.
 113. Seminari, E., A. Castagna, and A. Lazzarin, *Etravirine for the treatment of HIV infection*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008. **6**(4): p. 427-33.
 114. Health, N.I.o. *Drug Interactions between Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Other Drugs*. [web page] 2019 18th December 2019 [cited 2020 1st October]; Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/drug-interactions-between-non-nucleoside-reverse-transcriptase?view=full>.
 115. Reznicek, J., et al., *Etravirine inhibits ABCG2 drug transporter and affects transplacental passage of tenofovir disoproxil fumarate*. *Placenta*, 2016. **47**: p. 124-129.
 116. Zemruski, N.C., W.E. Haefeli, and J. Weiss, *Interaction potential of etravirine with drug transporters assessed in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(3): p. 1282-4.
 117. Health, N.I.o. *Drug Interactions between Protease Inhibitors and Other Drugs*. [web page] 2019 18th December [cited 2020 1st October]; Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/drug-interactions-between-protease-inhibitors-and-other-drugs?view=full>.
 118. Beard, E.L., Jr., *The American Society of Health System Pharmacists*. *JONAS Healthc Law Ethics Regul*, 2001. **3**(3): p. 78-9.
 119. He, Y., et al., *Enhancement of cellular uptake, transport and oral absorption of protease inhibitor saquinavir by nanocrystal formulation*. *Acta Pharmacol Sin*, 2015. **36**(9): p. 1151-60.
 120. Mencarelli, A., et al., *CCR5 Antagonism by Maraviroc Reduces the Potential for Gastric Cancer Cell Dissemination*. *Transl Oncol*, 2013. **6**(6): p. 784-93.
 121. Pervaiz, A., et al., *CCR5 blockage by maraviroc: a potential therapeutic option for metastatic breast cancer*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019. **42**(1): p. 93-106.
 122. Health, N.I.o. *Drug Interactions between CCR5 Antagonist and Other Drugs*. [web page] 2019 18th December [cited 2020 1st October]; Available from: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/drug-interactions-between-ccr5-antagonist-and-other-drugs?view=full>.
 123. MacArthur, R.D. and R.M. Novak, *Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(2): p. 236-41.
 124. Gandhi, Y., et al., *Daclatasvir: A Review of Preclinical and Clinical Pharmacokinetics*. *Clin Pharmacokinet*, 2018. **57**(8): p. 911-928.
 125. German, P., et al., *Drug-Drug Interaction Profile of the Fixed-Dose Combination Tablet Regimen Ledipasvir/Sofosbuvir*. *Clin Pharmacokinet*, 2018. **57**(11): p. 1369-1383.
 126. Center, D.o.V.A.N.H.C.R. *Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection: Treatment Considerations* [web page] 2018 August 27, 2018 [cited 2020 1st October]; Available from: <https://www.hepatitis.va.gov/pdf/treatment-considerations-2018-08-27.pdf#page=71>.
 127. Ouwerkerk-Mahadevan, S., et al., *Drug-Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir*. *Clin Pharmacokinet*, 2016. **55**(2): p. 197-208.
 128. Bhatia, H.K., et al., *Sofosbuvir: A novel treatment option for chronic hepatitis C infection*. *J Pharmacol Pharmacother*, 2014. **5**(4): p. 278-84.
 129. Kirby, B., et al., *No Clinically Significant Pharmacokinetic Drug Interactions between Sofosbuvir (GS-7977) and HIV Antiretrovirals Atripla (R), Rilpivirine, Darunavir/ritonavir, or Raltegravir in Healthy Volunteers*. *Hepatology*, 2012. **56**: p. 1067a-1067a.

130. Molas, E., et al., *Frequency and severity of potential drug interactions in a cohort of HIV-infected patients Identified through a Multidisciplinary team*. Hiv Clinical Trials, 2018. **19**(1): p. 1-7.
131. Marzolini, C., et al., *Ageing with HIV: medication use and risk for potential drug-drug interactions*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011. **66**(9): p. 2107-2111.
132. Tong, L., et al., *Effects of human immunodeficiency virus protease inhibitors on the intestinal absorption of tenofovir disoproxil fumarate in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(10): p. 3498-504.
133. Bode, H., et al., *The HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir, and nelfinavir induce apoptosis and decrease barrier function in human intestinal epithelial cells*. Antivir Ther, 2005. **10**(5): p. 645-55.
134. Perloff, E.S., et al., *Atazanavir: effects on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism in vitro*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(6): p. 764-70.
135. Shiraki, N., et al., *Inhibitory effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on multidrug resistance transporter P-glycoproteins*. Biol Pharm Bull, 2000. **23**(12): p. 1528-31.
136. Yumoto, R., et al., *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*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(1): p. 149-55.
137. Abel, S., D.J. Back, and M. Vourvahis, *Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions*. Antiviral Therapy, 2009. **14**(5): p. 607-618.
138. Gritsenko, D. and G. Hughes, *Ledipasvir/Sofosbuvir (harvoni): improving options for hepatitis C virus infection*. P T, 2015. **40**(4): p. 256-76.
139. Li, M., et al., *Rat precision-cut intestinal slices to study P-gp activity and the potency of its inhibitors ex vivo*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(5): p. 1070-8.
140. Drozdziak, M., et al., *Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine*. Mol Pharm, 2014. **11**(10): p. 3547-55.
141. Jilich, D., et al., *Prevalence of human leukocyte antigen HLA-B*57:01 in HIV-infected subjects in the Czech Republic*. Cent Eur J Public Health, 2011. **19**(3): p. 128-30.
142. Cole, S., E. Kerwash, and A. Andersson, *A summary of the current drug interaction guidance from the European Medicines Agency and considerations of future updates*. Drug Metab Pharmacokinet, 2020. **35**(1): p. 2-11.
143. Lin, J.H., M. Chiba, and T.A. Baillie, *Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?* Pharmacological Reviews, 1999. **51**(2): p. 135-157.
144. Albermann, N., et al., *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, 2005. **70**(6): p. 949-958.
145. Bonito, C.A., et al., *Theoretical insights on helix repacking as the origin of P-glycoprotein promiscuity*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 9823.
146. Kodan, A., et al., *Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 88.

11. SEZNAM PŘÍLOH

P1: Anti-HIV and Anti-Hepatitis C Virus Drugs Inhibit P-Glycoprotein Efflux Activity in Caco-2 Cells and Precision-Cut Rat and Human Intestinal Slices

Martinec O, Huliciak M, Staud F, Cecka F, Vokral I, Cerveny L.

Antimicrob Agents Chemother. 2019 Oct 22;63(11):e00910-19. doi: 10.1128/AAC.00910-19. Print 2019 Nov.

P2: Human precision-cut intestinal slices as a new model for testing induction potency of drugs targeting P-glycoprotein (ABCB1)

Martinec O, Biel C, de Graaf IA, Olinga P, Huliciak M, Staud F, Vokřál I, Červený L

Manuskript v současné době v revizním řízení v časopise Biochemical Pharmacology

P3: MDR1 and BCRP Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction between Rilpivirine and Abacavir and Effect on Intestinal Absorption.

Reznicek J, Ceckova M, Ptackova Z, **Martinec O**, Tupova L, Cerveny L, Staud F

Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9):e00837-17. doi: 10.1128/AAC.00837-17. Print 2017 Sep.

P4: Current antiviral drugs and their analysis in biological materials-Part I: Antivirals against respiratory and herpes viruses.

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:400-416. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.071. Epub 2017 Jul 3.

**P5: Current antiviral drugs and their analysis in biological materials - Part II:
Antivirals against hepatitis and HIV viruses.**

Nováková L, Pavlík J, Chrenková L, **Martinec O**, Červený L.

J Pharm Biomed Anal. 2018 Jan 5;147:378-399. doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.003. Epub 2017 Jul 8.