

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM LÉKOVÝCH INTERAKCÍ INHIBITORU HIV PROTEÁZY
DARUNAVIRU NA EFLUXNÍCH ABC TRANSPORTÉRECH IN VITRO**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Dominika Bezděková

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10. 5. 2021

Dominika Bezděková

Poděkování:

Poděkování patří zejména mému školiteli doc. PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za čas, odborné vedení a zároveň velmi milý a přátelský přístup během celého procesu vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat také Mgr. Haně Horáčkové a Mgr. Martinu Huličiakovi za pomoc během experimentální části této práce. Poděkování dále patří celé Katedře farmakologie a toxikologie za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Dominika Bezděková

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

Název diplomové práce: STUDIUM LÉKOVÝCH INTERAKCÍ INHIBITORU HIV PROTEÁZY DARUNAVIRU NA EFLUXNÍCH ABC TRANSPORTÉRECH IN VITRO

Abstrakt:

Darunavir je léčivo užívané v terapii HIV, patřící do skupiny proteázových inhibitorů. Tyto inhibitory proteáz bývají součástí kombinované antiretrovirální terapie. Darunavir se pro zvýšení biodostupnosti užívá vždy v kombinaci s ritonavirem či kobicistatem. Jakožto substrát CYP3A4 a ABCB1 (P-glykoproteinu) je DRV léčivem s vysokým potenciálem k lékovým interakcím a s ohledem také na množství nežádoucích účinků, kterými disponuje, je nezbytné tyto lékové interakce pro bezpečnou terapii znát. Inhibicí intestinálního ABCB1 současně podávanými léčivy by mohlo navíc dojít ke zvýšení biodostupnosti darunaviru, a tím i snížení četnosti administrace s důsledkem zlevnění terapie.

Práce se zabývá studiem lékových interakcí darunaviru *in vitro* metodami za využití dvou buněčných linií – MDCKII a Caco-2 buněk. Výsledky získané z transportu darunaviru přes monovrstvy MDCKII buněk naznačují, že je darunavir substrátem ABCB1, nikoliv ABCG2 a ABCC2 transportéru. Výsledky lékových interakcí jak s modelovým inhibitorem GF120918, tak s testovanými antiviroty na MDCKII jsou však značně nekonzistentní a MDCKII linie se tak zdá být nevhodným modelem pro studium lékových interakcí darunaviru na lidském ABCB1, převážně vzhledem k přítomnosti endogenních transportérů ovlivňujících jeho transport. Na Caco-2 linii jsme potvrdili, že darunavir je substrátem ABCB1 a v menší míře také pravděpodobně substrátem ABCG2. Jeho eflux inhibovala všechna testovaná antivirotika (lopinavir, ritonavir a asunaprevir). Testováním saturace transportérů bylo však zjištěno, že inhibice efluxu nebude mít pravděpodobně významný vliv při intestinální absorpci darunaviru, nicméně je možné, že k lékovým interakcím darunaviru na ABCB1 dochází na jiných biologických bariérách, např. v hepatocytech.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Dominika Bezděková

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

Title of diploma thesis: IN VITRO STUDY OF DRUG-DRUG INTERACTIONS OF HIV PROTEASE INHIBITOR DARUNAVIR ON EFFLUX ABC TRANSPORTERS

Abstract:

Darunavir is a drug used in the therapy of HIV belonging to the group of protease inhibitors. These protease inhibitors are used as a part of the combination antiretroviral therapy. For the increase of bioavailability, darunavir is always used in combination with ritonavir or cobicistat. As the CYP3A4 and ABCB1 (P-glycoprotein) transporter substrate, darunavir is a drug with a high potential to drug interactions. Considering the amount of adverse effects that can be caused by darunavir, it is necessary to know these drug interactions for the safety of therapy. Inhibition of the intestinal ABCB1 by the co-administrated drugs could also lead to the increased bioavailability of darunavir and to reduction of frequency of administration leading to a cheaper therapy.

This thesis studies the drug-drug interactions of darunavir with *in vitro* methods using two cell lines – MDCKII and Caco-2 cells. The results from the transport of darunavir across the MDCKII cell monolayer indicates that darunavir is a ABCB1 substrate, not a ABCG2 and ABCC2 substrate. The results of the drug-drug interactions with the model inhibitor GF120918 and studied antivirals on MDCKII were significantly contaminated by the activity of endogenous transporters. We concluded that MDCKII cell line is not an appropriate model for the study of the drug-drug interactions of darunavir on human ABCB1 transporter. The results from the Caco-2 cell line suggested that darunavir is the substrate of ABCB1 and to a lesser extent the substrate of ABCG2. Its efflux was inhibited by all of the studied antivirals (lopinavir, ritonavir and asunaprevir). By testing the transporters saturation we found that the efflux inhibition will probably not have a significant influence on the intestinal absorption of darunavir, however can be of importance in other biological barriers such as hepatocytes.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK.....	1
2.	ÚVOD	3
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	5
3.1.	VIRUS HIV	5
3.1.1.	Charakteristika viru HIV a onemocnění AIDS	5
3.1.2.	Mechanismus působení viru HIV na imunitní systém	5
3.1.3.	Způsob přenosu	5
3.1.4.	Životní cyklus viru	6
3.1.5.	Symptomy a průběh onemocnění	6
3.2.	TERAPIE HIV.....	7
3.2.1.	Antiretrovirální terapie	7
3.2.2.	Proteázové inhibitory	7
3.2.3.	Darunavir.....	8
3.2.4.	Lopinavir	10
3.2.5.	Ritonavir.....	10
3.2.6.	Důležitost p.o. podání.....	10
3.2.7.	HIV/HCV koinfekce	10
3.3.	STŘEVO JAKO HLAVNÍ MÍSTO ABSORPCE	11
3.3.1.	Tenké střevo a střevní bariéra	11
3.3.2.	Absorpce léčiv	11
3.3.3.	Presystémová eliminace	12
3.4.	EFLUXNÍ TRANSPORTÉRY	13
3.4.1.	Charakteristika transportérů a rozdělení.....	13
3.4.2.	ABC transportéry	13
3.5.	LÉKOVÉ INTERAKCE.....	15

3.6. METODY STUDIA INTERAKCÍ S EFLUXNÍMI TRANSPORTÉRY A LÉKOVÝCH INTERAKCÍ	16
3.6.1. <i>In vitro</i> buněčné metody	16
3.6.2. Další metody	18
4. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA	19
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
5.1. Chemikálie, jejich původ	20
5.2. Buněčné linie	20
5.2.1. MDCKII	20
5.2.2. CACO-2	21
5.3. Postup experimentu	21
5.4. Vyhodnocení experimentu	23
6. VÝSLEDKY	24
6.1. Transport [¹⁴ C]-DRV přes monovrstvy MDCKII parentních, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2 buněk	24
6.2. Transport [¹⁴ C]-DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII- ABCB1 v přítomnosti inhibitorů a antivirotik	25
6.2.1. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 2μM GF120918	25
6.2.2. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM RTV	27
6.2.3. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 5μM LPV	28
6.2.4. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM LPV	29
6.2.5. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM ASV	30
6.3. Záchyt [¹⁴ C]-DRV v membránách insertů MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk	31
6.4. Transport [¹⁴ C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie bez přítomnosti inhibitoru	31
6.5. Transport [¹⁴ C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti inhibitorů a antivirotik	32

6.5.1. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 2μM Ko143	32
6.5.2. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 1μM Ly335979	33
6.5.3. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM RTV	33
6.5.4. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 5μM LPV	34
6.5.5. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM LPV	34
6.5.6. Transport [¹⁴ C]-DRV v přítomnosti 20μM ASV	35
6.5.7. Porovnání hodnot efluxních poměrů získaných z transportu [¹⁴ C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie	35
6.6. Záchyt [¹⁴ C]-DRV v membránách insertů Caco-2 buněk	36
6.7. Saturace efluxních transportérů Caco-2 buněčné linie při zvyšující se koncentraci DRV	37
7. DISKUZE	39
8. ZÁVĚR	45
9. LITERATURA	46

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	ABC-transportér (P-glykoprotein)
ABCC	ABC-transportér (multidrug resistance-associated protein)
ABCG2	ABC-transportér (breast cancer resistance protein)
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome (syndrom získané imunitní nedostatečnosti)
ART/cART	antiretrovirální terapie/kombinovaná antiretrovirální terapie
ASV	asunaprevir
ATP	adenosin trifosfát
AUC	area under the curve (plocha pod křivkou)
BCRP	breast cancer resistance protein
BCS	biopharmaceutical classification system (biofarmaceutický klasifikační systém)
Caco-2	buněčná linie
CD4	označení povrchových glykoproteinů buněk
CYP	cytochrom
DAA	direct acting antivirals (přímo působící antivirotika)
DRV	darunavir
DRV/c	kombinace darunavir/kobicistat
DRV/r	kombinace darunavir/ritonavir
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HAART	highly active antiretroviral therapy (vysoce aktivní antiretrovirální terapie)
HCV	virus hepatitidy C

HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
LPV	lopinavir
LPV/r	kombinace lopinavir/ritonavir
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (buněčná linie)
MRP	multidrug resistance-associated protein
PI	inhibitory proteázy
RTV	ritonavir
SLC	solute carrier transportéry
SPC	summary of product characteristics (souhrn údajů o přípravku)
TEER	transepithelial electrical resistance (transepiteliální elektrická rezistence)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

2. ÚVOD

Virus HIV je jedním z hlavních globálních zdravotních problémů (WHO 2020). První případy AIDS byly hlášeny v roce 1981 a od té doby je epidemie HIV/AIDS jedna z nejnebezpečnějších a nejvytrvalejších epidemií na světě (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2020). Aktuální odhady za rok 2019 předpokládají 38 miliónů osob nakažených virem HIV (AIDSinfo a UNAIDS 2020).

Od roku 2016 je Světovou zdravotnickou organizací (WHO) doporučováno, aby byla všem lidem žijícím s HIV poskytnuta celoživotní antiretrovirální terapie (ART), přičemž k potlačení HIV dochází při užívání kombinace antiretrovirálních léčiv (WHO 2020).

Objev a vývoj antiretrovirálních léčiv pomohl smrtelnou infekci HIV proměnit především při včas zahájené kombinované terapii ve zvladatelný chronický stav. Součástí vývoje je také postupná optimalizace terapie, zahrnující snadnější dávkování a vývoj vhodných lékových kombinací. Možnost a úspěšnost trojkombinace léčiv, nazývané také jako vysoce aktivní antiretrovirální terapie (HAART = highly active antiretroviral therapy), byla částečně umožněna díky objevu proteázových inhibitorů. I přesto, že se HAART stala život zachraňující, jsou zde určité nedostatky terapie, mezi které patří i složité a časté dávkování či nežádoucí účinky (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2018).

Darunavir (DRV) je nejnovějším zástupcem inhibitorů proteázy s vysokou genetickou bariérou proti rozvoji rezistence (Deeks 2014, Ruela Corrêa et al. 2012). Pro zvýšení biodostupnosti se vždy užívá v kombinaci s ritonavirem (RTV) či kobicistatem (Clinical info HIV.gov 2019b).

Kromě metabolizace může být biodostupnost léčiv snižována také efluxními transportéry (Kato 2008). Transportéry ovlivňují jak absorpci a distribuci, tak exkreci léčiv (Li et al. 2019, Leslie et al. 2005). Střevní bariéra obsahuje jak influxní, tak efluxní transportéry. Hlavními intestinálními efluxními transportéry jsou ABCB1, ABCC2 a ABCG2 (Li et al. 2019).

ABCB1 ovlivňuje kromě střevní absorpce také vstup léčiv do centrálního nervového systému či exkreci léčiv do žluči a moči. Jeho funkce může být modulována inhibicí či indukcí, což ovlivňuje farmakokinetiku, účinnost a bezpečnost substrátů tohoto transportéru (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010).

Fujimoto et al. (2009) ve své *in vitro* studii na buněčných liniích ukazují, že je DRV substrátem ABCB1 a k jeho efluxu pravděpodobně přispívá také ABCC transportér (předpokladem je transportér ABCC2). Ukazují také na inhibiční vliv RTV na ABCB1, který tímto mechanismem

může přispívat ke zvýšené biodostupnosti DRV při této kombinaci. Také König et al. (2010) ukazují na to, že DRV je substrátem ABCB1, a také jeho slabým inhibitorem.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. VIRUS HIV

3.1.1. Charakteristika viru HIV a onemocnění AIDS

HIV (human immunodeficiency virus) čili virus lidské imunitní nedostatečnosti napadá a ničí CD4 buňky imunitního systému, čímž snižuje obranyschopnost organismu proti infekcím a některým typům rakoviny (AIDSinfo 2019). Virus HIV je řazen do skupiny RNA-virů čeledi Retroviridae, podčeledi Orthoretroviridae, rodu Lentivirus (German Advisory Committee Blood 2016).

Onemocnění AIDS čili syndrom získané imunitní nedostatečnosti (acquired immunodeficiency syndrome) je spojováno s poklesem CD4 lymfocytů pod 200 buněk/mm³ nebo propuknutím oportunní infekce bez ohledu na počet CD4 buněk (HIV.gov 2020a, Centers for Diseases Control and Prevention 2020). Podle WHO (2020) je AIDS definován jako rozvoj některých typů rakoviny, infekcí a jiných dlouhodobých závažných klinických manifestací.

Počet nakažených virem HIV byl v roce 2019 odhadován na 38 miliónů lidí, z toho 1,7 miliónů bylo nově nakažených. Předpokládá se, že pouze 81 % lidí o své nemoci ví a 67 % nakažených je léčeno pomocí ART. Počet úmrtí na HIV, tedy na nemoci asociované s AIDS, činil v tomtéž roce 690 000 (AIDSinfo a UNAIDS 2020).

3.1.2. Mechanismus působení viru HIV na imunitní systém

Hlavním cílem viru HIV jsou CD4 buňky, zejména tedy T_h lymfocyty, ale i makrofágy, dendritické buňky a astrocyty. Deplece CD4 lymfocytů je masivní během rané fáze infekce a je následována pomalým a stabilním poklesem, čímž je narušena efektivita imunitní odpovědi (Vajpayee et al. 2013, German Advisory Committee Blood 2016).

3.1.3. Způsob přenosu

K přenosu viru HIV dochází při kontaktu HIV negativní osoby s tělními tekutinami HIV pozitivních osob s detekovatelným množstvím viru (tzv. viral load). Mezi tyto tekutiny patří krev, sperma, preejakulační tekutina, rektální tekutina, vaginální sekret a mateřské mléko. K přenosu je zapotřebí kontakt těchto tělních tekutin s mukózní membránou, která se nachází např. v rektu, vagině, či penisu, přes otevřené rány či přímou injekcí. Právě ART často snižuje množství viru v krvi a jiných tělních tekutinách HIV pozitivní osoby pod detekovatelnou hranici, čímž brání přenosu viru na HIV negativní osoby. Nejčastějším způsobem přenosu viru HIV je nechráněný vaginální či anální pohlavní styk či sdílení injekčních jehel a dalšího vybavení při užívání drog. Méně častým způsobem přenosu je přenos z matky na dítě

(prenatálně, během porodu či mateřským mlékem), který se díky ART podstatně snížil (HIV.gov 2019, WHO 2020).

3.1.4. Životní cyklus viru

Iniciální stádium virové infekce spočívá v proteinových interakcích. Povrchový glykoprotein viru HIV gp120 se váže na CD4 receptory lymfocytů. Po navázání dochází ke konformačním změnám receptorů a je umožněno navázání na koreceptor (CCR5 nebo CXCR4) hostitelské buňky. Dalšími konformačními změnami (aktivací gp41) dochází k prostupu virové částice do buňky (German Advisory Committee Blood 2016).

Následuje reverzní transkripce virové RNA do DNA, což je umožněno díky enzymu reverzní transkriptáza. Nově vzniklá virová DNA je pomocí integrázy zabudována do DNA napadené buňky. Poté dochází k transkripci a translaci buněčné a virové DNA a vzniku polypeptidu, který je pomocí HIV proteázy štěpen na funkční proteiny, které jsou základem nových virionů (Fanales-Belasio et al. 2010).

3.1.5. Symptomy a průběh onemocnění

Symptomy infekce HIV jsou individuální a velmi se liší podle stádia onemocnění (WHO 2020, HIV.gov 2020b).

- **Stádium 1: Akutní HIV infekce**

Během prvních dvou až čtyř týdnů po infekci se může projevit tzv. flu-like syndrom. Zahrnuje příznaky jako je horečka, zimnice, bolest hlavy a fotofobie, bolest v krku, noční pocení, bolest kloubů a svalů, závratě, ústní ulcerace, oteklé lymfatické uzliny a vyrážka. Syndrom přetrvává v průměru dva týdny (v rozsahu od jednoho týdne až po dva měsíce), nemusí se ovšem projevit vůbec (Stekler a Collier 2004, WHO 2020, HIV.gov 2020b).

- **Stádium 2: Klinická latence (chronická HIV infekce)**

Během této fáze se vir pomalu množí, většinou asymptomaticky (HIV.gov 2020b). HIV postupně snižuje počet CD4 buněk v těle, a tím oslabuje imunitní systém. Délka asymptomatické fáze je v průměru 10 let a závisí na tom, jak rychlý je pokles CD4 buněk (AVERT 2019). Ke konci této fáze dochází k přechodu do fáze 3 – AIDS. V případě, že pacient správně a dlouhodobě užívá ART, nemusí do stádia AIDS nikdy dojít (Centers for Diseases Control and Prevention 2020).

- **Stádium 3: AIDS (acquired immunodeficiency syndrome – syndrom získané imunitní nedostatečnosti)**

S progresí nemoci a kontinuálním oslabováním imunitního systému dochází bez léčby k rozvoji AIDS a rozvoji závažných klinických stavů jako je tuberkulóza, kryptokoková meningitida, rakovina, či rozvoj závažných bakteriálních infekcí (WHO 2020). Neléčení lidé s AIDS obvykle přežívají okolo tří let. Mívají vysoké množství viru v krvi a mohou tak být vysoce nakažliví (Centers for Diseases Control and Prevention 2020).

3.2. TERAPIE HIV

3.2.1. Antiretrovirální terapie

Léčba HIV je nazývána antiretrovirální terapie (ART). Současná ART nemůže vyléčit infekci HIV, nicméně vysoce potlačuje virovou replikaci a umožňuje obnovení a posílení imunitního systému dané osoby do takové míry, že je schopný odolávat infekcím. Od roku 2016 WHO doporučuje, aby byla všem lidem žijícím s HIV poskytnuta celoživotní ART, včetně dětí, těhotných a kojících, bez ohledu na jejich klinický stav či počet CD4 buněk. Na konci roku 2019 přijalo toto doporučení již 185 zemí (WHO 2020).

Přerušování ART je obecně nedoporučováno a je spojeno s riziky jako je opětovné množení viru, zvýšené riziko přenosu HIV, pokles CD4 buněk, progresse HIV a manifestace komplikací a rozvoj lékové rezistence (Clinical info HIV.gov 2015).

Díky cART (kombinovaná antiretrovirální terapie), kombinující léčiva alespoň ze dvou tříd antiretrovirotik, došlo u mnoha pacientů k poklesu množství HIV v krvi pod detekovatelnou hranici (National Institute of Allergy and Infectious Diseases 2018).

3.2.2. Proteázové inhibitory

HIV proteáza je enzym, který zpracovává polyproteinové prekurzory Gag a Gag-Pol do výsledných strukturálních proteinů a enzymů (Ruela Corrêa et al. 2012). Inhibice proteázy brání štěpení polyproteinů v infikovaných buňkách, čímž zabraňuje vzniku zralých virových částic (Deeks 2014).

Prvním proteázovým inhibitorem (PI) na trhu byl saquinavir, který umožnil zavedení trojkombinační léčby neboli HAART (vysoce aktivní antiretrovirální terapie). Dalšími inhibitory první generace jsou ritonavir, indinavir, nelfinavir a amprenavir. Většina PI první generace sdílí podobnou chemickou strukturu, a často se tak mezi nimi objevuje zkřížená rezistence. Navíc mají poměrně krátký plazmatický poločas a nízkou biologickou dostupnost po p.o. podání. Došlo tedy k vývoji novějších léčiv této skupiny jako je lopinavir, atazanavir

a amprenavir s nižší frekvencí podávání a nižším rizikem rozvoje rezistence. Nejnovějším PI je darunavir (Maeda et al. 2019). Ke zvýšení biodostupnosti PI se využívají tzv. farmakokinetické boostery (ritonavir či kobicistat) (Clinical info HIV.gov 2019b).

Pro většinu HIV pozitivních pacientů je doporučována jako počáteční terapie kombinovaná léčba inhibitorů integrázy s nukleosidovými inhibitory reverzní transkriptázy (Clinical info HIV.gov 2019b, European AIDS Clinical Society 2020). Terapeutické režimy založené na farmakokineticky potencovaných PI jsou doporučovanými počátečními režimy v určitých klinických situacích. Jejich nevýhodou je oproti jiným antiretrovirálním léčivům vyšší potenciál k lékovým interakcím. Příkladem situace, ve které je výhodou počáteční režim založený na PI, a to na potencovaném DRV vzhledem k jeho vysoké bariéře vůči rozvoji rezistence, je situace, kdy je potřeba okamžitého nasazení léčby při neznalosti výsledků rezistence (Clinical info HIV.gov 2019b). I dle guidelinů European AIDS Clinical Society (2020) jsou režimy založené na DRV/r či DRV/c a dalších PI řazeny mezi alternativní počáteční terapeutické režimy.

Management terapie již léčených pacientů, u kterých léčba selhává a nedosahuje požadovaných výsledků, je komplexní a výběr nové vhodné terapie souvisí zejména s rezistencí. Terapeutické režimy založené na farmakokineticky potencovaných PI jsou v mnoha případech vhodnou a doporučenou volbou (Clinical info HIV.gov 2019d).

Užívání PI bylo asociováno s metabolickými abnormalitami jako je dyslipidémie a inzulínová rezistence. Dostupné PI se liší ve schopnosti způsobovat tyto metabolické komplikace, roli hraje také množství užitého RTV jakožto boosteru (Clinical info HIV.gov 2019b).

3.2.3. Darunavir

- **Charakteristika**

Darunavir (DRV) je nejnovějším zástupcem PI s vysokou genetickou bariérou proti rozvoji rezistence, což znamená, že je zapotřebí velké množství mutací pro snížení citlivosti viru k léčivu (Deeks 2014, Ruela Corrêa et al. 2012). Užívá se v rámci cART a je třeba jej podávat v kombinaci s farmakokinetickým boosterem RTV (DRV/r) či kobicistatem (DRV/c). Podává se jednou až dvakrát denně v závislosti na předchozí léčbě. Užívat jej mohou jak začínající, tak již léčení pacienti (Clinical info HIV.gov 2019b).

- **Farmakokinetika**

DRV se po p.o. podání rychle absorbuje. Biodostupnost kombinace DRV/r se oproti samotnému DRV zvyšuje z 37 % na 82 %. Absorpce se také zvyšuje s potravou, proto je třeba DRV podávat

s jídlem. DRV se přibližně z 95 % váže na plazmatické bílkoviny, zejména na α 1-kyselý glykoprotein. Jeho metabolismus je zprostředkován oxidací, je metabolizován CYP3A4. Jeho identifikované metabolity jsou alespoň 10x méně účinné oproti mateřské látce (Ruela Corrêa et al. 2012). Velká část DRV se vylučuje v nezměněné podobě. V případě užívání samotného DRV je to 7 %, při koadministraci DRV/r se v nezměněné podobě vylučuje téměř 49 % DRV (41 % játry a 8 % ledvinami) (Rittweger a Arastéh 2007, Prezista® 2020).

Permeabilita ani solubilita DRV na základě BCS (biofarmaceutická klasifikace) kritérií nebyla definována. Vzhledem k tomu, že se DRV vždy užívá s kombinací s farmakokinetickým boosterem, který zvyšuje jeho biodostupnost, by se při podání s tímto boosterem mohl považovat za vysoce propustnou substanci (kategorie I a II). S ohledem na poměrně nízkou rozpustnost ve vodě by se jednalo pravděpodobně o kategorii II (Ruela Corrêa et al. 2012).

- **Nežádoucí účinky**

Přibližně u poloviny pacientů se v rámci klinického testování při kombinaci DRV/r objevil aspoň jeden nežádoucí účinek (nejčastějšími byly průjem, nauzea, zvracení, vyrážka a bolest hlavy). Klinické studie kombinace DRV/c odhalily alespoň jeden nežádoucí účinek u 66,5 % subjektů (nejčastěji průjem, nauzeu nebo vyrážku) (Prezista® 2020).

Mezi nežádoucí účinky DRV patří kromě výše zmíněných také hyperlipidémie a hyperglykémie, hepatotoxicita, sérové zvýšení transamináz, tuková maldistribuce, Stevens-Johnsonův syndrom či toxická epidermální nekróza. Při kombinaci DRV/c je nežádoucím účinkem také sérové zvýšení kreatininu (Clinical info HIV.gov 2019c). Kumulativní užívání DRV/r je asociováno se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (Ryom et al. 2018).

- **Lékové interakce**

Dle SPC přípravku Prezista® (2020) je třeba brát v potaz lékové interakce zejména také v závislosti na užitém boosteru – tedy zda je DRV kombinován s RTV či kobicistatem. Kombinace DRV/r je náchylná k interakcím se substráty CYP a ABCB1, vzhledem k ovlivnění jejich farmakokinetiky, ale také k interakcím s induktory a inhibitory CYP3A, které naopak ovlivňují metabolismus DRV/r (Prezista® 2020). Užívání DRV/r v kombinaci s LPV/r vede ke snížení systémové expozice DRV až o 40 %, a proto není společné podávání doporučeno (Prezista® 2020, Back et al. 2008). Jak již bylo zmíněno, DRV je substrátem ABCB1 (Fujimoto et al. 2009, König et al. 2010) a zdá se, že k jeho efluxu přispívá také ABCC transportér, pravděpodobně ABCC2 (Fujimoto et al. 2009).

3.2.4. Lopinavir

Lopinavir (LPV) je dalším zástupcem inhibitorů HIV proteázy (Maeda et al. 2019). Dle Drugs@FDA (2021) databáze je LPV aktuálně schválen pouze v léčivých přípravcích ve fixní kombinaci s RTV (LPV/r). V porovnání s ostatními PI je LPV/r zatížen nevýhodami v podobě většího množství užívaných tablet, nižší účinností a vyšší toxicitou, a proto již nepatří mezi doporučené terapeutické režimy pro počáteční terapii (Clinical info HIV.gov 2019b).

Jedná se o substrát a inhibitor CYP3A (Clinical info HIV.gov 2019c). Storch et al. (2007) ve své studii zařazují LPV i RTV mezi potentní inhibitory ABCB1. Další studie zkoumající inhibiční efekt antivirotik na ABCB1 *in vitro* a *ex vivo* prokázala vliv LPV i RTV jako inhibitorů ABCB1 snižujících prostup modelového substrátu rhodaminu123 (Martinec et al. 2019). V současnosti probíhající výzkum ukazuje také inhibici efluxu klinicky významného substrátu ABCB1 digoxinu. Kromě toho má LPV inhibiční vliv také na ABCG2 transportér (Weiss et. al 2007). Dle Biermana et. al (2010) je LPV inhibitorem ABCB1, ABCC1 a v menší míře také ABCG2.

3.2.5. Ritonavir

Jedná se o inhibitor proteáz, avšak v klinické praxi se využívá převážně jako farmakokinetický booster jiných PI. Je potentním inhibitorem a také substrátem CYP3A4 a CYP2D6 (Clinical info HIV.gov 2019c). Kromě vlivu na metabolismus je také inhibitorem ABCB1, ABCG2 a ABCC transportérů (Drewe et al. 1999, Bachmeier et. al 2005, Storch et al.2007, Martinec et al. 2019, Gupta et al. 2004, Bierman et al. 2010). Aktuálně je dle Drugs@FDA (2021) databáze RTV registrován jak v léčivých přípravcích s jedinou účinnou látkou, tak ve fixních kombinacích s dalšími antivirotiky.

3.2.6. Důležitost p.o. podání

Perorální podání je pro pacienty obecně nejvýhodnějším způsobem aplikace léčiv. Pacienti jsou schopni léčiva perorálně přijímat samostatně, není zde tak potřeba často nákladné a opakované hospitalizace a dyskomfort plynoucí z injekčního podání, které navíc disponuje vyšším rizikem infekce. Pravidelné chronické podávání léčiv může mít navíc klinický benefit oproti intermitentnímu podávání. Nevýhodou je riziko snížené a variabilní biologické dostupnosti perorálně podávaných léčiv (Oostendorp et al. 2009).

3.2.7. HIV/HCV koinfekce

Vzhledem k tomu, že virus hepatitidy C (HCV) je přenášen podobnými cestami jako HIV, dochází často ke koinfekci těmito onemocněními (Yu et al. 2020, Platt et al. 2016). Podle

meta-analýzy z roku 2016 je celosvětově přibližně 2,3 miliónů HIV-HCV koinfikovaných pacientů, z toho téměř 1,4 miliónů je uživateli injekčních drog (Platt et al. 2016).

Některé interakce mezi ART a antivirotiky působícími proti HCV (tzv. Direct-Acting Antivirals = DAA) jsou již známy. Při koadministraci těchto léčiv s DRV/r či DRV/c není u řady těchto léčiv třeba upravovat dávku, nicméně některá léčiva jsou pro společné podávání s DRV/r či DRV/c kontraindikována (Clinical info HIV.gov 2019a).

Jedním z léčiv určených k terapii HCV je asunaprevir (ASV). Jedná se o inhibitor proteáz, schválený k léčbě HCV v kombinaci s daklatasvirem v Japonsku (Eley et al. 2015). Aktuálně se nejedná o léčivo schválené FDA (Drugs@FDA 2021). Mosure et al. (2015) ukazuje na transportu digoxinu přes Caco-2 monovrstvu na inhibiční vliv ASV na ABCB1. Dále ve svých experimentech na myších ukazuje na ASV také jako na substrát ABCB1.

3.3. STŘEVO JAKO HLAVNÍ MÍSTO ABSORPCE

3.3.1. Tenké střevo a střevní bariéra

Tenké střevo má délku okolo 3 metrů a dělí se na 3 části: duodenum, jejunum a ileum (Valentin 2002). Je považováno za hlavní místo absorpce vzhledem k přítomnosti klků a mikroklků nejvíce zastoupených v duodenu a jejunu, které významně zvětšují střevní povrch (Doherty a Pang 1997). Dominantními buňkami střevních klků jsou enterocyty, zodpovědné za digesci a absorpci léčiv a nutrientů, obsahující efluxní transportéry a metabolické enzymy včetně rodiny CYP (Thelen a Dressman 2009, Kato 2008).

Povrch střevní bariéry zaujímá okolo 400 m², chrání organismus před ztrátou vody a elektrolytů a vstupem antigenů a mikroorganismů do těla. Umožňuje výměnu molekul mezi organismem a prostředím a absorpci nutrientů z potravy (Bischoff et al. 2014).

3.3.2. Absorpce léčiv

Rozsah lékové absorpce je velmi závislý na rozsahu first-pass metabolismu a popisuje frakci podané dávky, která z místa podání dosáhne systémové cirkulace (Doherty a Pang 1997). Pro její vyjádření se užívá biodostupnost, čili poměr oblasti pod křivkou (AUC = area under the curve) extravaskulárně podaného léčiva k AUC intravaskulárně podaného léčiva (Pond a Tozer 1984).

Léčivo je po perorálním podání nejprve vystaveno působení žaludeční tekutiny. Dochází zde k destrukci, a tím i ke snížení biodostupnosti acidolabilních léčiv. Obsah dále pokračuje do tenkého střeva, kde dochází k absorpci většiny léčiv pomocí enterocytů (zde může dojít také

k metabolismu některých molekul). Lécivo pokračuje převážně přes *venu portae* do jater a odtud do systémové cirkulace, případně přímo do lymfatického systému (Ipatova et al. 2010). Role kolonu v lékové absorpci je obecně malá (Oostendorp et al. 2009).

Lékový transport v tenkém střevě probíhá paracelulární nebo transcelulární cestou. Paracelulární transport je možný pouze pro malé molekuly a je obecně málo častý vzhledem k přítomnosti pevných mezibuněčných spojů. Transcelulární transport z lumen střeva vyžaduje přechod molekuly přes apikální membránu, cytosol a basolaterální membránu do krve. Probíhá buď pasivní difuzí, endocytózou nebo přenašečem zprostředkovaným transportem (Oostendorp et al. 2009).

Absorpce léčiv zprostředkovaná přenašečovými proteiny je typicky saturovatelná a inhibovatelná. Přenašečové proteiny jsou součástí jak facilitovaného (nevyžadujícího energii), tak aktivního transportu (vyžadujícího přísun energie). Nejběžnějším způsobem lékové absorpce je pasivní difuze skrz střevní stěnu, po koncentračním gradientu (Doherty a Pang 1997). Aktivní transport se podílí na transferu substrátů do lumen střeva proti koncentračnímu gradientu a představuje tak jeden z nástrojů protekce organismu proti potenciálně škodlivým xenobiotikům (Oostendorp et al. 2009).

3.3.3. Presystémová eliminace

Presystémová eliminace je děj, při kterém je perorálně podané léčivo metabolizováno při jeho průchodu ze střevní lumen do systémové cirkulace (Routledge a Shand 1979). Klinicky je first-pass metabolismus významný především v případě, že se do systémové cirkulace dostane velmi malá frakce podané dávky léčiva (Pond a Tozer 1984). Ke snížení biodostupnosti léčiv může v případě acidolabilních léčiv přispívat také působení žaludeční tekutiny (Ipatova et al. 2010). Další vliv na sníženou absorpci mají efluxní transportéry (Doherty a Pang 1997).

- **Kyselá hydrolýza**

Zvýšená expozice žaludeční tekutině je asociována s vyšším stupněm degradace, a tím snížení biodostupnosti acidolabilních léčiv (např. ampicilinu) (Ipatova et al. 2010).

- **Jaterní a střevní first-pass metabolismus**

Játra jsou jakožto hlavní metabolizující orgán považovány za hlavní místo first-pass metabolismu. Jeho rozsah je ovlivněn mnoha fyziologickými faktory, především enzymatickou aktivitou, krevním průtokem, vazbou léčiva na plazmatické bílkoviny a gastrointestinální motilitou, která ovlivňuje míru dodaného léčiva játrům (Pond a Tozer 1984). Střeva hrají významnou roli v presystémové eliminaci dvěma způsoby: jakožto absorpční tkáň regulují

přítok substrátu léčiva k dalším orgánům (tedy hlavně játrům) a kromě toho dochází k metabolismu také uvnitř střevních buněk (Doherty a Pang 1997).

- **Efluxní transportéry ve střevních buňkách**

Kromě enzymatické aktivity obsahují enterocyty také efluxní transportéry snižující absorpci léčiv, významný je zejména ABCB1 transportér. Substráty CYP3A4 jsou často také substráty ABCB1 transportéru, proto mnohdy není zcela jasné, který z těchto mechanismů u daného substrátu převládá (Kato 2008).

3.4. EFLUXNÍ TRANSPORTÉRY

3.4.1. Charakteristika transportérů a rozdělení

Transportéry jsou membránově vázané proteiny nacházející se s různým zastoupením v membránách buněk většiny tkání. Transportují jak endogenní, tak exogenní substráty (například léčiva či jejich metabolity) dovnitř do buňky či opačným směrem. Existuje více než 400 membránových transportérů patřících do dvou hlavních rodin: ATP-binding cassette (ABC) a solute carrier (SLC) transportéry (Li et al. 2019). SLC transportéry přispívají k transportu různorodých substrátů – např. iontů, aminokyselin, mastných kyselin, neurotransmiterů a sacharidů, využívají kotransportu či umožňují facilitovanou difuzi (Zhang et al. 2019).

Změny v přenašečové funkci či expresi mohou významně změnit farmakokinetiku léčiva, a tím i jeho účinnost či toxicitu. Indukce či inhibice transportérů může být způsobena současně podávanými léčivy, čímž dochází k lékovým interakcím (Li et al. 2019).

3.4.2. ABC transportéry

ABC rodina transportérů využívá k transportu molekul přes membránu energii uvolněnou z hydrolýzy ATP (Leslie et al. 2005, Li et al. 2019, Sharom 2008). Vzhledem ke schopnosti transportovat různé strukturálně odlišné molekuly nejsou stále známé přesné substráty většiny ABC transportérů (Lefèvre a Boutry 2018).

ABC transportéry se dle Dean et al. (2001) dělí na 7 podrodin:

- ABCA (ABC1)
- ABCB (MDR = multidrug resistance, TAP)
- ABCC (MRP, CFTR)
- ABCD (ALD)
- ABCE (OABP)

- ABCF (GCN20)
- ABCG (white)

Eukaryotní ABC transportéry se narodil od těch prokaryotních chovají pouze jako transportéry efluxní (Lefèvre a Boutry 2018, Sharom 2008). Hrají roli při ochraně organismu před toxicitou endogenních i exogenních molekul (Sharom 2008). Hlavními intestinálními efluxními transportéry jsou ABCB1 (P-glykoprotein), ABCC2 (MRP2) a ABCG2 (BCRP) (Li et al. 2019).

Expres transportérů v lidském střevě se mezi jednotlivými částmi střeva liší. Expres proteinu ABCB1 a ABCG2 stoupá od duodena směrem k ileu, v kolonu je však jejich expres signifikantně nižší. Proteinová expres ABCC2 je v kolonu naopak vyšší než v ostatních částech střeva. Celkové zastoupení efluxních transportérů v tenkém střevě klesá ve směru $ABCC2 > ABCB1 > ABCC3 > ABCG2$ (Drozdik et al. 2014).

- **ABCB1 (P-glykoprotein, MDR1)**

ABCB1 byl jakožto efluxní transportér poprvé objeven v lékově rezistentních tumorových buňkách (Doherty a Pang 1997). Jedná se o nejvíce prostudovaný efluxní transportér s širokou substrátovou specifikou zodpovědný za mnoho lékových interakcí. ABCB1 je exprimován ve střevech, játrech, ledvinách, mozku a placentě (Li et al. 2019). Nachází se také v plicích, nadledvinách a v některých krevních buňkách (Zakeri-milani a Valizadeh 2014). Vzhledem k jeho anatomické lokalizaci funguje ABCB1 v ochraně před potenciálně škodlivými xenobiotiky několika způsoby. V enterocytech brání vstupu xenobiotik do těla, v hepatocytech a ledvinách zvyšuje eliminaci xenobiotika do žluči či moči, v případě výskytu xenobiotika v systémové cirkulaci chrání před jeho vstupem do citlivých tkání jako je mozek, plod či varlata (Fromm 2004). Kromě toho je ABCB1 zodpovědný za lékovou rezistenci tumorových buněk (Li et al. 2019).

Intestinální ABCB1 zprostředkovává eflux některých molekul a snižuje tak jejich absorpci (Doherty a Pang 1997). V případě inhibice ABCB1 se zvyšuje biodostupnost jeho substrátů, v případě indukce je tomu naopak. Substráty ABCB1 jsou často také substráty cytochromů (Li et al. 2019).

Inhibitory ABCB1 se dělí na 3 až 4 generace, v závislosti na jejich specifitě a afinitě. První generací jsou farmakologicky aktivní substance s klinickým použitím pro jiné indikace, které ale zároveň blokují ABCB1. Patří sem např. verapamil. Tyto látky však mohou mít mnoho nežádoucích účinků. S dalšími generacemi se postupně snižuje množství vedlejších účinků,

zvyšuje se specifita a snižuje se koncentrace inhibitoru nezbytná k potentní inihibici tohoto transportéru (Zakeri-milani a Valizadeh 2014).

- **ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP)**

ABCG2 je ve velkém množství exprimován například ve střevě, ledvinách, játrech, varlatech a mozku. Je modulován progesteronovým a estrogenovým receptorem (Li et al. 2019). Exprese ABCG2 je významně indukovaná v mléčné žláze během těhotenství a laktace. Jako hlavní fyziologická úloha se předpokládá ochrana tkání před toxiny, hraje roli při prostupu látek do mozku a přes placentu. Stejně jako ABCB1 je ABCG2 lékový transportér s rozsáhlou substrátovou specifitou. Množství jeho známých substrátů se neustále rozšiřuje a mnoho substrátů se prolíná se substráty ABCB1 (Sharom 2008). Substrátem tohoto efluxního transportéru je také kyselina močová (Woodward et al. 2009). V apikální membráně střevních buněk přispívá k efluxu léčiv zpět do lumen střev a snižuje tak jejich absorpci (Oostendorp et al. 2009).

- **ABCC2 (Multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)**

ABCC2 je lokalizován v apikální membráně epiteliálních buněk tenkého střeva, kde přispívá k sekreci léčiv zpět do lumen střev. Substrátová specifita se do určité míry prolíná s ABCB1 (Oostendorp et al. 2009).

3.5. LÉKOVÉ INTERAKCE

Lékové interakce jsou závažným klinickým problémem, který nabývá důležitosti zejména při současném užívání většího počtu léčiv. Polymorbidita a z toho plynoucí polyfarmakoterapie je běžná zejména se zvyšujícím se věkem. Lékové interakce mohou být jak farmakodynamické, tak farmakokinetické. Farmakokinetické interakce zahrnují kromě role efluxních transportérů také tvorbu komplexů, indukci či inihibici metabolismu a v některých případech také kompetici o uptake pomocí transportérů (Cascorbi 2012).

Nežádoucí lékové události jsou významnou příčinou návštěv pohotovostních oddělení, mortality a hospitalizací, přičemž lékové interakce jsou jedním z důležitých přispívajících faktorů. Předpokládá se, že přibližně 2,8 % hospitalizací je způsobeno lékovými interakcemi, což by v USA mohlo znamenat přibližně 250 000 hospitalizací ročně, s ekonomickým dopadem na zdravotní systém okolo 1,3 miliardy dolarů (Nikolic et al. 2014). Více než polovina případů, kdy pacienti navštívili pohotovost v důsledku lékových interakcí navíc skončila hospitalizací (Raschetti et al. 1999).

V případě HIV pozitivních pacientů je třeba lékové interakce pečlivě sledovat ze dvou důvodů. Prvním důvodem je samotná kombinovaná antiretrovirální léčba – cART. Druhým důvodem je častá přítomnost další farmakoterapie zahrnující prevenci či léčbu oportunistických infekcí, léčbu dalších přidružených stavů, a také management vedlejších účinků cART (Ruela Corrêa et al. 2012).

Vzhledem k tomu, že lékové interakce mohou ovlivnit systémovou expozici léčivu, která vyúsťuje v rozličné odpovědi organismu na ko-administrovaná léčiva, vedoucí k toxicitě či ke ztrátě účinku, je potřeba tyto potenciální lékové interakce znát. FDA proto poskytuje guideliny k rozpoznání a studování lékových interakcí. Nověji je vzhledem ke zvyšujícím se znalostem o roli transportérů v lékových interakcích kladen důraz také na studium interakcí s těmito transportéry (FDA 2018). Na důležitost lékových interakcí s transportéry upozorňuje také Mezinárodní transportérové konsorcium (The International Transporter Consortium), které pro tyto účely vypracovalo dokument zabývající se studiem lékových interakcí s membránovými transportéry (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010).

3.6. METODY STUDIA INTERAKCÍ S EFLUXNÍMI TRANSPORTÉRY A LÉKOVÝCH INTERAKCÍ

3.6.1. *In vitro* buněčné metody

In vitro metody jsou obecně méně manipulačně a finančně náročnými metodami v porovnání s *in vivo* zvířecími studii. Nevýhodou je nemožnost inkorporovat fyziologické faktory do výsledné interpretace dat (Balimane et al. 2000).

Experimentálně užívané buněčné linie byly vyvinuty tak, aby korelovaly s lékovým transportem přes humánní intestinální mukózu a byly tak užitečné v predikci lékové absorpce (Volpe 2011). Buněčné linie napodobující *in vivo* lidský intestinální epitel na rozdíl od enterocytů rychle narůstají do monovrstvy s charakteristickými znaky epitelálních buněk. Buněčné kultury jsou tak ideální systém pro rychlé zhodnocení intestinální permeability léčiv (Balimane a Chong 2005).

- **Caco-2 buněčná linie**

Model Caco-2 buněk je jedním z nejužívanějších a nejpopsanějších buněčných modelů ve studiích lékové permeability. Jedná se o buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu (Balimane a Chong 2005, Alqahtani et al. 2013). Na polykarbonátové membráně insertu vytváří polarizovanou epitelální monovrstvu složenou z cylindrických buněk s mikrokly tvořících

kartáčový lem na apikální membráně a pevnými spoji mezi sousedícími buňkami (Sun et al. 2008, Sambuy et al. 2005, Volpe 2008, Volpe 2011, Bohets et al. 2001). Výhodou Caco-2 buněk je přítomnost pasivního i aktivního mechanismu transportu. Jsou tak důležitým buněčným modelem pro studium střevní permeability a interakcí léčiv se střevními transportéry (Volpe 2011).

Stejně jako ve střevě jsou v Caco-2 linii exprimovány efluxní transportéry ABCB1, ABCC2 a ABCG2. Expres těchto transportérů v Caco-2 buňkách se může od exprese transportérů ve střevě lišit, kvantitativně se zastoupení jednotlivých transportérů v Caco-2 linii může lišit také napříč laboratořemi (Brück et al. 2017, Vaessen et al. 2017, Uchida et al. 2015, Harwood et al. 2016, Drozdziak et al. 2014). ABCB1, ABCC2 i ABCG2 transportéry jsou lokalizovány v apikální membráně a snižují vstup svých substrátů do buňky v apikálně-basolaterálním směru. Caco-2 exprimují některé metabolické enzymy, nicméně exprese CYP3A4 je nízká (Sun et al. 2008).

Přestože jsou tyto buňky nejužívanějším modelem, mají své limity (Balimane a Chong 2005, Alqahtani et al. 2013). Monovrstvu Caco-2 buněk je nutné kultivovat 21 dní. To je nevýhodné jednak z důvodů zvýšeného rizika kontaminace, ale také z pohledu časového a finančního (Balimane a Chong 2005). Další nevýhodou je možná odlišnost výstupů mezi laboratořemi, což je způsobeno citlivostí těchto buněk i na malé změny v kultivačních a experimentálních podmínkách, či rozdílným stářím buněk (Balimane a Chong 2005, Artursson et al. 2001). V porovnání s lidskými enterocyty mají Caco-2 buňky pevnější mezibuněčné spoje, což snižuje míru paracelulárního transportu (Alqahtani et al. 2013).

- **MDCK buněčná linie**

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) buňky jsou taktéž užívané jako model pro studium přestupu látek přes biologické membrány. Na polykarbonátové membráně tvoří polarizovanou monovrstvu buněk s pevnými mezibuněčnými spoji. Jsou získávány ze psích ledvinných buněk. Jejich hlavní výhodou oproti Caco-2 je kratší doba kultivace (3-5 dnů) (Balimane et al. 2000, Balimane a Chong 2005, Quan et al. 2012, Volpe 2008).

Za určitou nevýhodu lze považovat psí původ těchto buněk (Dukes et al. 2011) a s tím související přítomnost endogenní exprese genů kódujících ABC transportéry zahrnující *ABCB1* či *ABCC2*, ale i další transportéry, jejichž funkce není zcela známá (Quan et al. 2012). Interakce léčiv s endogenními transportéry může představovat komplikující faktor při interpretaci získaných výsledků (Kuteykin-Teplyakov 2010, Gartzke a Fricker 2014). MDCK buňky

produkující lidský ABCB1 (MDCK-ABCB1) jsou užívaným modelem pro identifikaci substrátů a inhibitorů tohoto efluxního transportéru (Gartzke a Fricker 2014). Kromě MDCK-ABCB1, se užívají také MDCK geneticky modifikované pro produkci lidského ABCC1, ABCC2 a ABCG2 (Alqahtani et al. 2013).

- **Další buněčné linie**

Dalšími užívanými buněčnými liniemi jsou LLC-PK1 (prasečí ledvinné epiteliální buňky), TC-7 (subklon Caco-2 buněk) a HT-29 (původem z lidského kolonu). Buněčná linie 2/4/A1, původem krysí fetální intestinální epiteliální buňky, se zdá být vhodným modelem především pro studium paracelulárního transportu vzhledem k mezibuněčným spojům, které jsou v této linii na rozdíl od Caco-2 srovnatelné s lidskými intestinálními mezibuněčnými spoji (Balimane a Chong 2005).

3.6.2. Další metody

Dalšími užívanými experimentálními možnostmi pro studium lékové absorpce a interakcí s/na efluxních transportérech mohou být *ex vivo* metody, do kterých patří např. Ussingova komora (Ussing chamber) nebo metoda invertního střeva (Everted intestinal sac) (Alqahtani et al. 2013).

Mohou být využity i *in situ* modely, které díky krevnímu zásobení, nervovému systému a kompletní expresi membránových transportérů a enzymů nejlépe napodobují *in vivo* podmínky a vedou tak k dobré predikci absorpce a metabolizace léčiv (Alqahtani et al. 2013, Balimane et al. 2000).

Posledními užívanými modely jsou *in vivo* modely. Srovnáním AUC (plocha pod křivkou) po perorálním a intravenózním podání dávají informaci o biodostupnosti (Bohets et al. 2001, Alqahtani et al. 2013). V případě užívání zvířecích modelů je při extrapolaci výsledných dat na člověka vždy nutno brát v potaz mezidruhové rozdíly (Alqahtani et al. 2013, Balimane et al. 2000).

4. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA

Užívání DRV je zatíženo nežádoucími účinky v podobě gastrointestinální intolerance, vyrážky a bolesti hlavy. Převážně v případech již existujících jaterních onemocnění je zde riziko hepatotoxicity. Dále se mohou vyskytnout metabolické nežádoucí účinky jako je hyperlipidémie a hyperglykémie, kumulativní užívání DRV/r je také asociováno se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem (Clinical info HIV.gov 2019b, Clinical info HIV.gov 2019c, Ryom et al. 2018). Četnost nežádoucích účinků je navíc poměrně častá. Minimálně jeden nežádoucí účinek se objevil alespoň u poloviny subjektů klinického hodnocení (Prezista® 2020).

Terapeutické režimy založené na farmakokineticky potencovaných PI jsou doporučovanými počátečními režimy pouze v určitých klinických situacích, vzhledem k vyššímu potenciálu k lékovým interakcím ve srovnání s dalšími antiretrovirálními léčivy (Clinical info HIV.gov 2019b). V případech již léčených pacientů je výběr léčby komplexní, potencované PI (včetně DRV) jsou v mnoha případech vhodnou a doporučovanou terapií (Clinical info HIV.gov 2019d).

Také DRV je léčivo s vysokým potenciálem k lékovým interakcím, vzhledem k tomu, že se jedná o substrát CYP3A4 a ABCB1 (Clinical info HIV.gov 2019c, Fujimoto et al. 2009, König et al. 2010). Riziko lékových interakcí je navíc u HIV pacientů obecně vysoké vzhledem k užívání kombinace antiretrovirálních léčiv, ale také z hlediska další užívané farmakoterapie, která je u těchto pacientů běžná vzhledem k dalším častým komorbiditám (Ruela Corrêa et al. 2012).

RTV je užíván pro zvýšení biodostupnosti DRV (Clinical info HIV.gov 2019b). Současné podávání DRV/r s LPV/r není doporučeno (Prezista® 2020, Back et al. 2008). Vzhledem k tomu, že HCV je přenášen podobnými cestami jako HIV, dochází často ke koinfekci těmito onemocněními (Yu et al. 2020, Platt et al. 2016). Z tohoto důvodu je zkoumána také interakce DRV s ASV, léčiva s anti-HCV aktivitou, který je v současné době ve třetí fázi klinického hodnocení v kombinaci s daklatasvirem v terapii hepatitidy C, nicméně v některých státech je už v této indikaci schválen.

Znalost lékových interakcí a optimalizace dávkování je s ohledem také na četnost nežádoucích účinků při užívání DRV nezbytná pro bezpečnou terapii. Identifikací lékových interakcí, které vedou ke zvýšené biodostupnosti DRV, by mohlo navíc dojít ke snížení četnosti administrace DRV, a tím také ke zlevnění terapie. Cílem této práce je přispět k popisu molekulárního mechanismu lékových interakcí DRV.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Chemikálie, jejich původ

- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- FBS - fetální hovězí sérum (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- P/S – Penicilin/Streptomycin (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific; Rockford, Illinois, USA)
- FITC-dextran - molekulární hmotnost 10,000 (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- PBS – fosfátový tlumivý roztok (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- SDS – sodium dodecyl sulfate (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA) – 0,02 %
- Inhibitory ABC transportérů:
 - Ko143 (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
 - Ly335979 (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
 - GF120918 (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- Antivirotika:
 - Ritonavir (MedChemExpress; Monmouth Junction, New Jersey, USA)
 - Lopinavir (MedChemExpress; Monmouth Junction, New Jersey, USA)
 - Asunaprevir (MedChemExpress; Monmouth Junction, New Jersey, USA)
 - Darunavir – radioaktivně značený [¹⁴C] (MC 2569; Moravek Biochemicals; Brea, California, USA)
- DMSO - dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich; St. Luis, Missouri, USA)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)
- NaHCO₃
- HEPES (pufr)
- Scintilační roztok (Ultima-Gold) – (PerkinElmer, Inc.; Waltham, Massachusetts, USA)

5.2. Buněčné linie

5.2.1. MDCKII

MDCKII buňky byly získány z Netherland Cancer Institut v Amsterdamu (Holandsko). V experimentu byly využity MDCKII parentní, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2. Všechny typy MDCKII buněk byly kultivovány za stejných podmínek, experimenty probíhaly současně na buňkách parentních a buňkách geneticky modifikovaných

pro produkci lidského transportéru. Kultivace probíhala v DMEM s přidavkem 10 % FBS v 5% CO₂ při 37°C. Buňky byly nasazeny na inserty s polykarbonátovou membránou (Transwell 3402, průměr inzertu 12 mm, velikost pórů 3,0 μm) v množství 5×10⁵ buněk na jamku. Kultivace na transwellu trvala 3-4 dny s pravidelnou výměnou média obohaceného o 1% P/S do vytvoření konfluentní vrstvy.

Konflunce monovrstvy MDCKII buněk byla hodnocena pomocí analýzy FITC-dextranu. Laboratorně bylo zjištěno, že FITC-dextran nijak neinteraguje se scintilací v průběhu kvantifikace radioizotopu [¹⁴C]-DRV, proto byl součástí inkubačních roztoků aplikovaných do apikálního kompartmentu a byl tedy přítomen po celou dobu testování. Dává tak informaci o reálném stavu monovrstvy v průběhu celého experimentu. Prostup FITC-dextranu byl hodnocen pomocí přístroje TECAN Infinite M200. Přípustné hodnoty byly do 1 % prostupu za jednu hodinu.

5.2.2. CACO-2

Caco-2 buněčná linie byla získána z American Type Culture Collection. Kultivace probíhala v DMEM s přidavkem 10 % FBS, a 1 % neesenciálních aminokyselin v 5% CO₂ při 37°C. Buňky byly nasazeny na inserty s polykarbonátovou membránou (Transwell 3401, průměr inzertu 12 mm, velikost pórů 0,4 μm) v množství 3x10⁵ buněk na jamku. Kultivace na transwellu probíhala po dobu 21 dní do vytvoření konfluentní vrstvy s výměnou média obsahujícího navíc 1 % P/S co 2-3 dny. Integrita monovrstvy byla hodnocena pomocí TEER (transepithelial electrical resistance) za využití Millipore Milli-Cell Electrical Resistance System (ERS). Využívá dvou elektrod, z nichž jedna je ponořena do basolaterální části a jedna do apikální části insertu. V experimentu byly použity buňky s rozsahem TEER 1100-2100 Ω · cm².

5.3. Postup experimentu

V práci byla využita metoda obousměrného transportu, ve které je léčivo o určité koncentraci aplikováno do apikálního (A) nebo basolaterálního (B) kompartmentu. Při měření průchodu léčiva přes monovrstvu buněk ve směru A-B je léčivo aplikováno do apikálního kompartmentu a vzorky v daných časech jsou odebírány z basolaterálního kompartmentu. V případě prostupu léčiva ve směru B-A je tomu naopak.

Před začátkem experimentu bylo z obou kompartmentů odsáto médium a inserty byly omyty PBS predehřátým na 37°C. Po odsátí PBS byly na inserty přidány předem připravené a na 37°C predehřáté preinkubační roztoky; 0,5 ml do apikálního a 1,5 ml do basolaterálního

kompartimentu. Preinkubační roztoky byly v případě MDCKII buněk připraveny pomocí redukovaného bezsérového media OptiMEM s nebo bez přídavku inhibitoru/antivirotik; v případě Caco-2 buněk byly tvořeny HBSS médiem s přídavkem NaHCO₃ a pufru HEPES pro dosažení hodnoty pH 7,4 na obou stranách s nebo bez přídavku inhibitoru/antivirotik. Preinkubace probíhala po dobu 30 minut při 37°C. Poté došlo k odsátí všech roztoků a byly přidány předeštěné inkubační roztoky. V případě MDCKII buněk byly inkubační roztoky tvořeny OptiMEM s nebo bez přídavku inhibitoru/antivirotik; medium aplikované do donorových kompartmentů obsahovalo 0,12 µCi [¹⁴C]-DRV, což odpovídá koncentraci 2 µmol/l. Inkubační roztoky aplikované na apikální stranu obsahovaly navíc FITC-dextran o koncentraci 0,5 mg/ml. V případě Caco-2 buněk inkubační roztoky aplikované do donorových kompartmentů obsahovaly 0,12 µCi [¹⁴C]-DRV odpovídající koncentraci 2 µmol/l. Inkubace probíhala v obou případech při 37°C.

V první části experimentu na MDCKII parentních, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2 probíhaly odběry v čase 0,5 h, 2 h a 4 h (v případě MDCKII-ABCC2 byly odběry již pouze v čase 0,5 h a 2 h). Experiment byl proveden v technickém triplikátu v počtu měření n = 1. Další experimenty na MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buňkách byly provedeny v technickém triplikátu s odběry v čase 0,5 h a 1 h, počty měření jsou uvedeny u jednotlivých experimentů a jsou v rozmezí n = 1 - 2. Z akceptorového kompartmentu bylo vždy odebráno 50 µl media. V případě Caco-2 buněk byly odběry prováděny v čase 1 h a 2 h. Experiment probíhal v technickém triplikátu, počty měření jsou uvedeny u jednotlivých experimentů a jsou v rozmezí n = 1 – 2. K odebraným vzorkům včetně kontrolních roztoků bylo přidáno 0,5 ml scintilačního roztoku a koncentrace přítomné radioaktivity byla stanovena přístrojem Beta Counter - TriCarb 2009 TR Perkin Elmer.

Byly využity tři modelové inhibitory efluxních transportérů. V případě MDCKII buněk byl jako kontrolní inhibitor využit 2µM elacridar (GF120918), což je inhibitor ABCB1 (Hyafil et. al 1993, De Bruin et al. 1999) a ABCG2 transportérů (De Bruin et al. 1999). V případě Caco-2 buněk byl využit specifický inhibitor ABCG2 – 2µM Ko143 (Allen et al. 2002) a specifický inhibitor ABCB1 - 1µM Ly335979 (Shepard et al. 2003).

Po skončení experimentu byly všechny membrány omyty ledovým PBS. Poté byly vyřezány a lyzovány v 0,02 % SDS (A-B směry v 0,5 ml, B-A směry v 1,5 ml SDS). Po 24 hodinách lyzování bylo z roztoku odebráno 50 µl vzorku a po přidání 0,5 ml scintilačního roztoku bylo stanoveno množství přítomného radioizotopu pomocí Beta Counter - TriCarb 2009 TR

PerkinElmer. Záchyt v membránách byl hodnocen pro všechny testované látky jak při experimentech na MDCKII, tak při experimentech na Caco-2 linii.

5.4. Vyhodnocení experimentu

Výsledky byly vyhodnoceny a graficky zpracovány v programu GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA). Pro daný experiment je vždy uveden počet biologických replikátů (n). V případě $n = 1$ jsou výsledky prezentovány jako průměr tří technických replikátů \pm směrodatná odchylka. V případě $n = 2$ jsou výsledky prezentovány jako průměr dvou biologických opakování \pm směrodatná odchylka. Statistické zhodnocení nebylo vzhledem k počtu biologických replikátů ($n < 3$) provedeno.

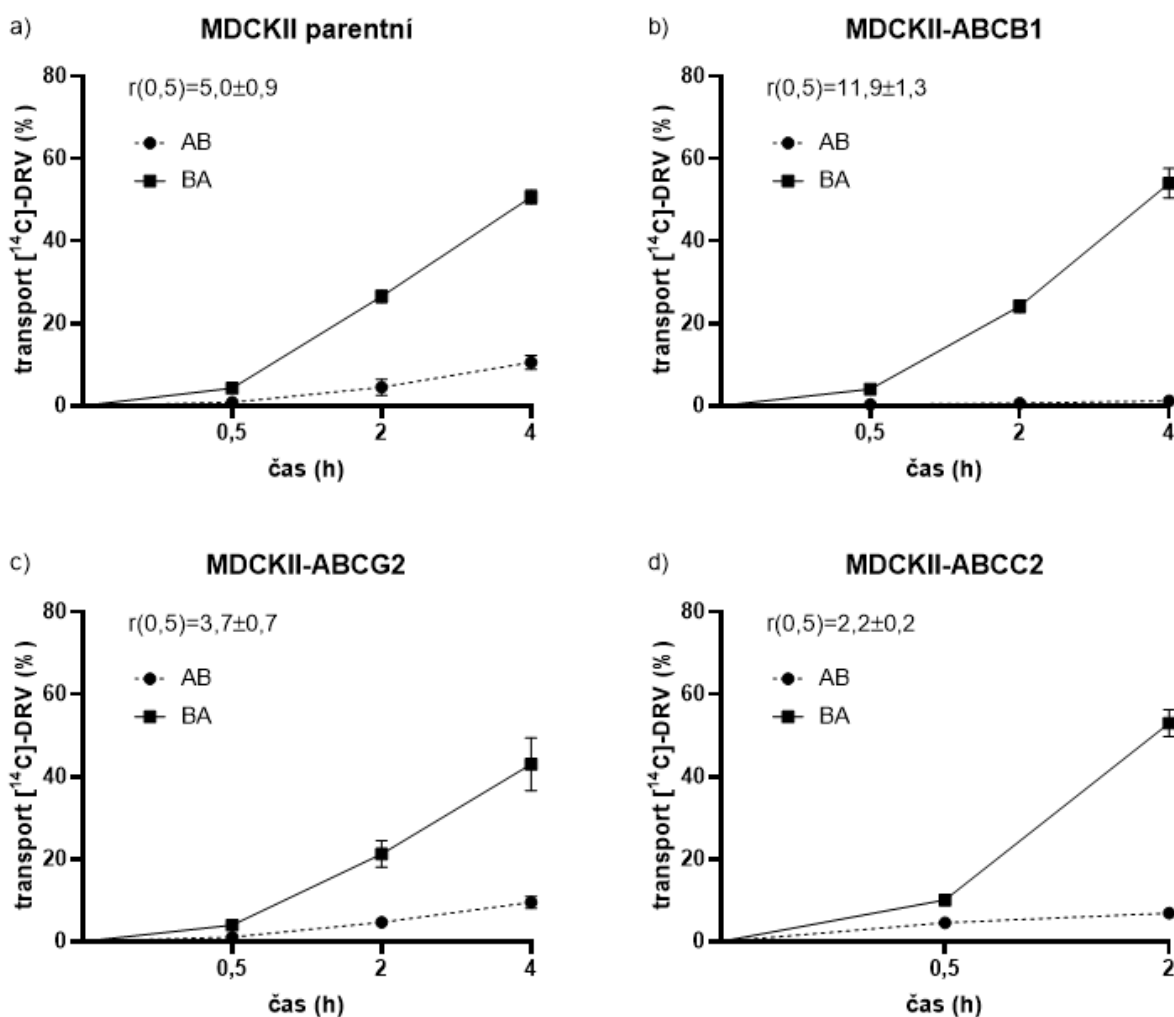
Prostup [^{14}C]-DRV přes monovrstvu buněk je vyjádřen jako procentuální transport, který uvádí procento léčiva z celkové koncentrace roztoku, které přejde přes membránu z donorového kompartmentu do akceptorového. V případě prostupu léčiva ve směru AB je to procento léčiva nacházející se v basolaterálním kompartmentu, v případě prostupu ve směru BA se jedná o procento léčiva nacházející se v kompartmentu apikálním. Zapojení efluxního transportéru bylo analyzováno pomocí efluxního poměru (r), který jsme vypočítali jako poměr prostupu [^{14}C]-DRV ve směru BA ku prostupu ve směru AB v daném čase (v lineární fázi transportu).

V případě MDCKII buněk byla vzhledem k zapojení endogenních transportérů do transferu [^{14}C]-DRV vypočítávána hodnota „net efflux ratio“, čili poměr efluxního poměru (BA/AB) buněk obsahujících navíc lidský transportér ku efluxnímu poměru (BA/AB) buněk parentních. V případě experimentu za přítomnosti inhibitorů/antivirotik je inhibiční efekt na efluxní transportér (dále označen I_e) vyjádřen jako poměr ($r_{\text{ABCB1}}/r_{\text{parentní}}$) neinhibovaného transportu ku ($r_{\text{ABCB1}}/r_{\text{parentní}}$) inhibovaného transportu. Inhibice efluxu nastává v případě, že $I_e > 1$. Pokles efluxního poměru o 50 % nastává v případě, že $I_e \geq 2$.

6. VÝSLEDKY

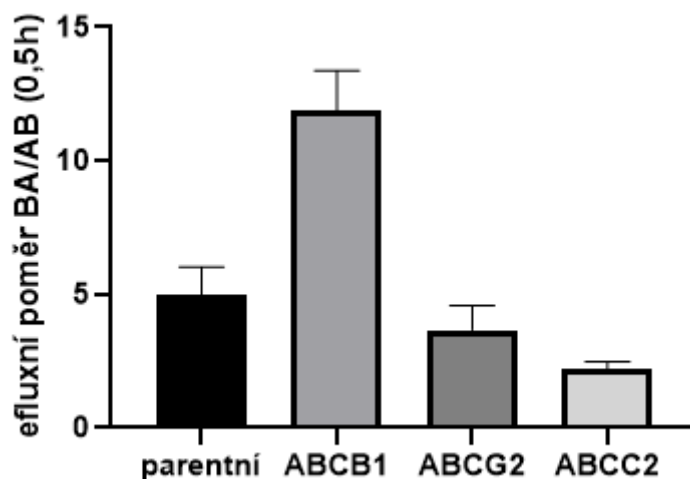
6.1. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2 buněk

Nejprve byl testován přestup $[^{14}\text{C}]$ -DRV ($2\ \mu\text{mol/l}$) přes monovrstvy MDCKII buněk. Jednalo se o parentní buňky a buňky MDCKII-ABCB1, -ABCG2 a -ABCC2. Průběh transportu $[^{14}\text{C}]$ -DRV je znázorněn na obrázku 1 včetně hodnot efluxních poměrů (r). Hodnoty „net efflux ratio“ měřených v čase 0,5 h jsou $2,4\pm 0,3$ pro MDCKII-ABCB1, $0,7\pm 0,1$ pro MDCKII-ABCG2 a $0,4\pm 0,1$ pro MDCKII-ABCC2.



Obrázek 1: Grafické znázornění transportu $2\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a), MDCKII-ABCB1 (b), MDCKII-ABCG2 (c) a MDCKII-ABCC2 (d) včetně uvedených hodnot efluxních poměrů (r) v čase 0,5 h vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro všechna uvedená měření platí $n = 1$.

Grafické porovnání efluxních poměrů (r) získaných pro MDCKII-parentní, MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2 je znázorněno na obrázku 2.



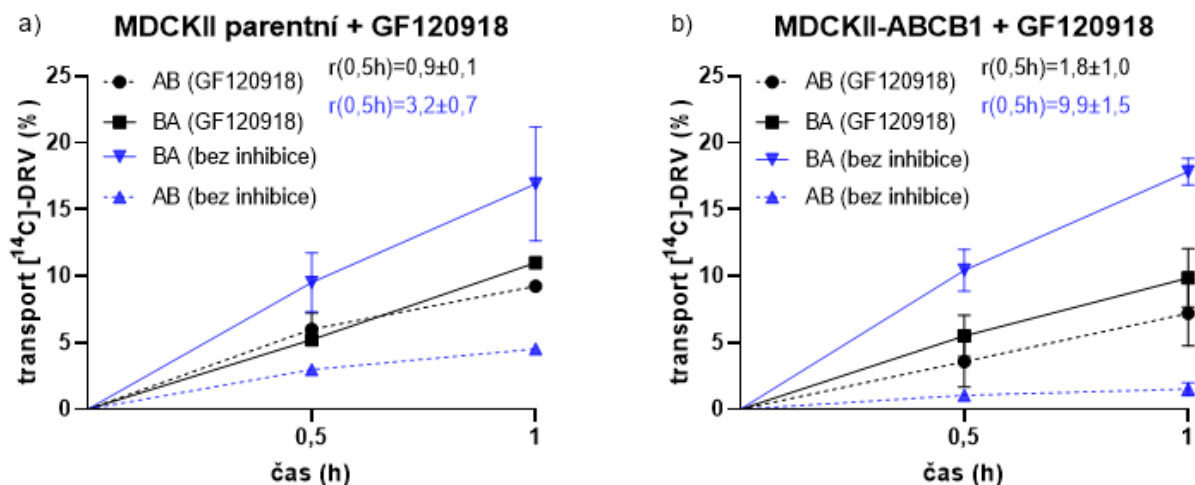
Obrázek 2: Grafické porovnání efluxních poměrů (r) získaných z transportu $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ u jednotlivých typů MDCKII buněk v čase 0,5 h ($n=1$).

Aby byla látka považována za substrát efluxního transportéru musí hodnota „net efflux ratio“ nabývat hodnoty 2 a více (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010). Dle této definice se DRV jeví pouze jako substrát ABCB1, a proto byly další experimenty prováděny pouze na MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buňkách.

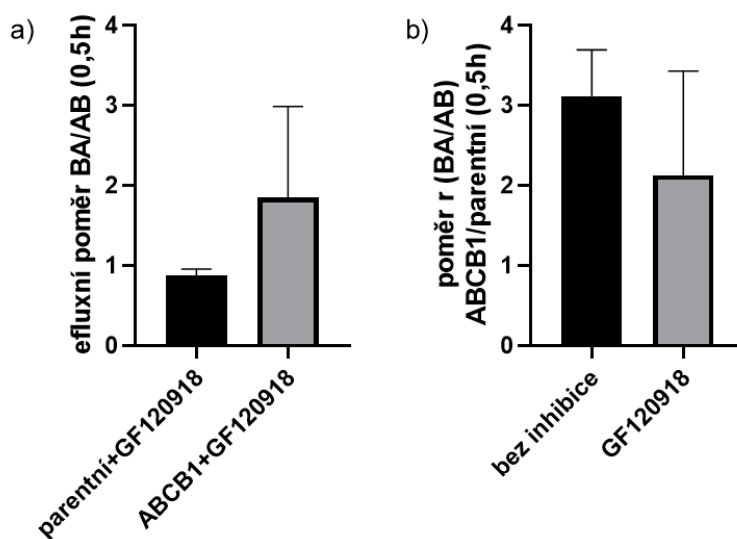
6.2. Transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1 v přítomnosti inhibitorů a antivirotik

6.2.1. Transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ v přítomnosti $2\mu\text{M}$ GF120918

Nejprve bylo zkoumáno působení $2\mu\text{M}$ GF120918 na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1. Průběh transportu $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ je znázorněn na obrázku 3 včetně srovnání s hodnotami neinhibovaného transportu. Hodnota „net efflux ratio“ pro neinhibovaný transport činí $3,1\pm 0,5$, v přítomnosti GF120918 činí $2,1\pm 1,2$. Inhibiční efekt (I_e) GF120918 na eflux $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ zprostředkovaný ABCB1 transportérem nabývá hodnoty 1,5. V přítomnosti tohoto inhibitoru tedy nedochází k poklesu hodnoty „net efflux ratio“ o 50 %. Dle Mezinárodního transportérového konsorcia (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010) tedy nebyla prokázána specifita transportu ABCB1. Grafické porovnání efluxních poměrů (r) a „net efflux ratio“ je viditelné na obrázku 4.



Obrázek 3: Grafické znázornění průběhu transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 buněk (b) v přítomnosti $2\mu\text{M}$ GF120918 včetně hodnot efluxních poměrů (r) v čase 0,5 h v přítomnosti a bez přítomnosti inhibitoru vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Počet měření v přítomnosti GF120918 je $n = 1$ pro MDCKII parentní, $n = 2$ pro MDCKII-ABCB1, pro neinhibovaný transport platí $n = 1$ pro parentní i MDCKII-ABCB1 buňky.

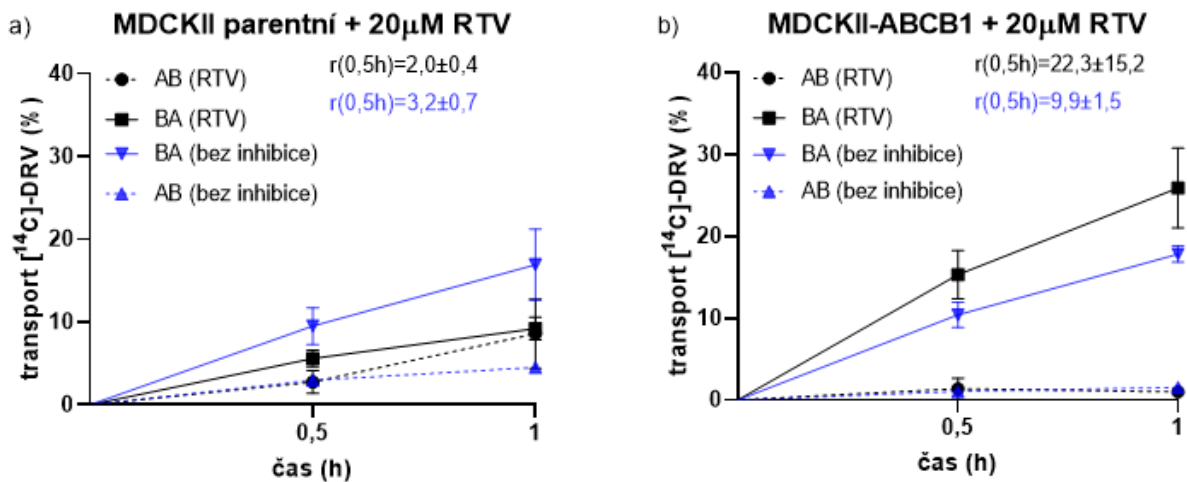


Obrázek 4: a) Grafické porovnání efluxních poměrů (r) MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk v čase 0,5 h v přítomnosti $2\mu\text{M}$ inhibitoru GF120918. b) Grafické porovnání „net efflux ratio“ (r ABCB1/ r parentní) v přítomnosti a bez přítomnosti $2\mu\text{M}$ inhibitoru GF120918. Počet měření v přítomnosti GF120918 je $n = 1$ pro MDCKII parentní, $n = 2$ pro MDCKII-ABCB1, pro neinhibovaný transport platí $n = 1$ pro parentní i MDCKII-ABCB1 buňky.

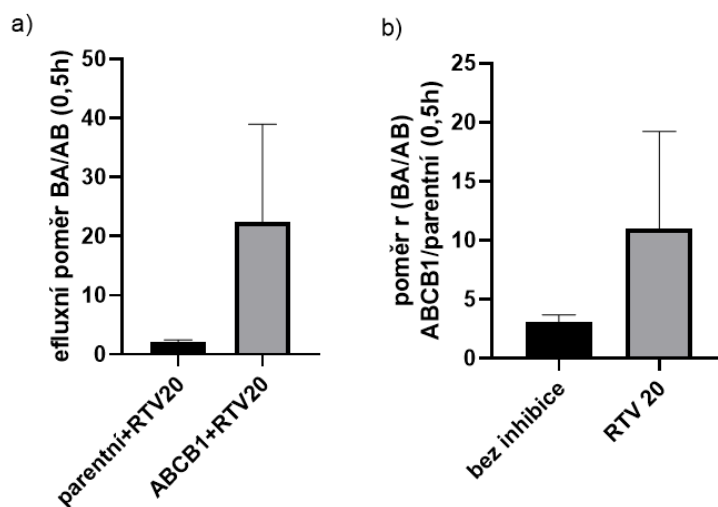
Z naměřených dat je viditelné, že GF120918 kromě inhibice ABCB1 inhibuje také endogenní transportéry MDCKII buněk a není tak zcela vhodnou kontrolou, protože jeho efekt na ABCB1 transportér není snadno zaznamatelný. Přestože se MDCKII buňky nezdají být vhodným modelem, pokusili jsme se otestovat vliv vybraných antivirotik na transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$. Antivirotika byla vybrána na základě publikace Martince et al. (2019) a výsledků s digoxinem, které jsou připravovány k publikaci.

6.2.2. Transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV

Prvním testovaným antiretrovirotikem pro zjištění jeho vlivu na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1 byl RTV v koncentraci $20\mu\text{mol/l}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 5 včetně srovnání s neinhibovaným transportem. Hodnota „net efflux ratio“ pro neinhibovaný transport činí $3,1\pm 0,5$, v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV činí $11,0\pm 7,5$. Inhibiční efekt $20\mu\text{M}$ RTV na eflux $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ zprostředkovaný ABCB1 transportérem nebyl pozorován. Paradoxně došlo k opačnému jevu a hodnota I_e byla $0,3$. Grafické porovnání efluxních poměrů (r) a „net efflux ratio“ je viditelné na obrázku 6.



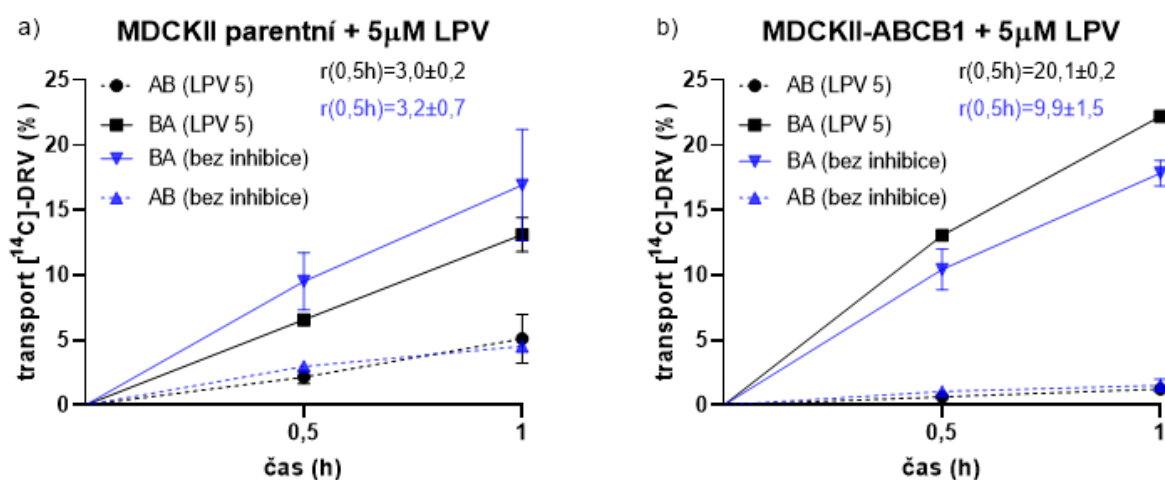
Obrázek 5: Grafické znázornění transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 (b) v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV včetně hodnot efluxních poměrů (r) v čase $0,5$ h vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Počet měření v přítomnosti RTV je $n = 1$ pro MDCKII parentní, $n = 2$ pro MDCKII-ABCB1, pro neinhibovaný transport platí $n = 1$ pro parentní i MDCKII-ABCB1 buňky.



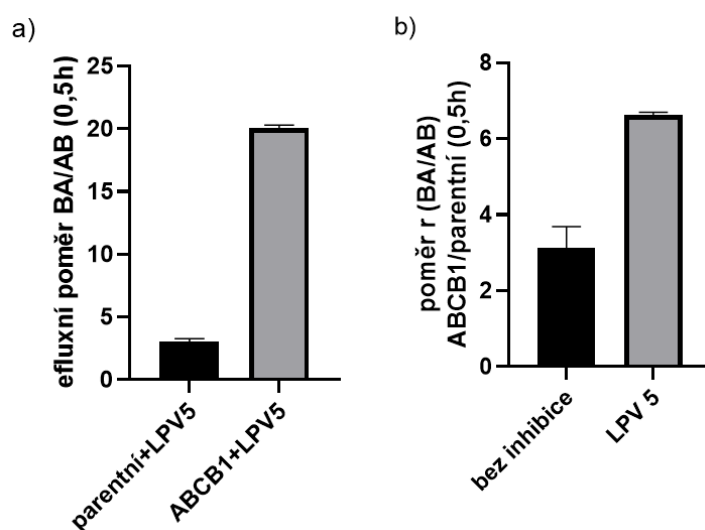
Obrázek 6: a) Grafické porovnání efluxních poměrů (r) MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk v čase $0,5$ h v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV. b) Grafické porovnání „net efflux ratio“ (r ABCB1/ r parentní) v přítomnosti a bez přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV. Počet měření v přítomnosti RTV je $n = 1$ pro MDCKII parentní, $n = 2$ pro MDCKII-ABCB1, pro neinhibovaný transport platí $n = 1$ pro parentní i MDCKII-ABCB1 buňky.

6.2.3. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV

Dalším testovaným antiretrovirotikem pro zjištění jeho vlivu na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1 byl LPV v koncentraci $5\mu\text{mol/l}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 7 včetně srovnání s neinhibovaným transportem. Hodnota „net efflux ratio“ pro neinhibovaný transport činí $3,1\pm 0,5$, v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV činí $6,6\pm 0,1$. Inhibiční efekt $5\mu\text{M}$ LPV na eflux $[^{14}\text{C}]$ -DRV zprostředkovaný ABCB1 transportérem tedy nebyl pozorován. Paradoxně došlo k opačnému jevu a hodnota I_e byla $0,5$. Grafické porovnání efluxních poměrů (r) a „net efflux ratio“ je viditelné na obrázku 8.



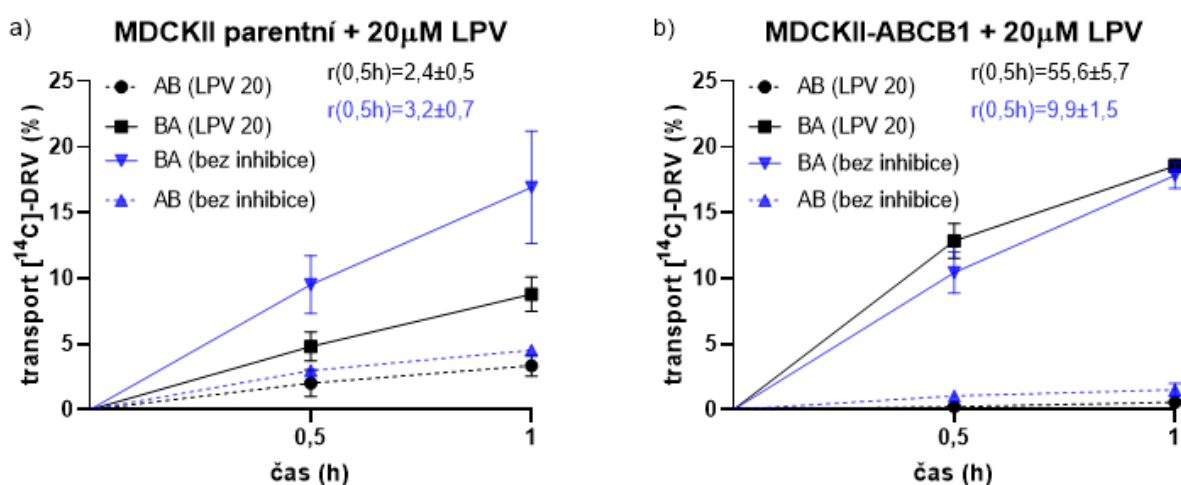
Obrázek 7: Grafické znázornění transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 (b) v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV včetně hodnot efluxních poměrů (r) v čase $0,5$ h vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti LPV platí $n = 1$.



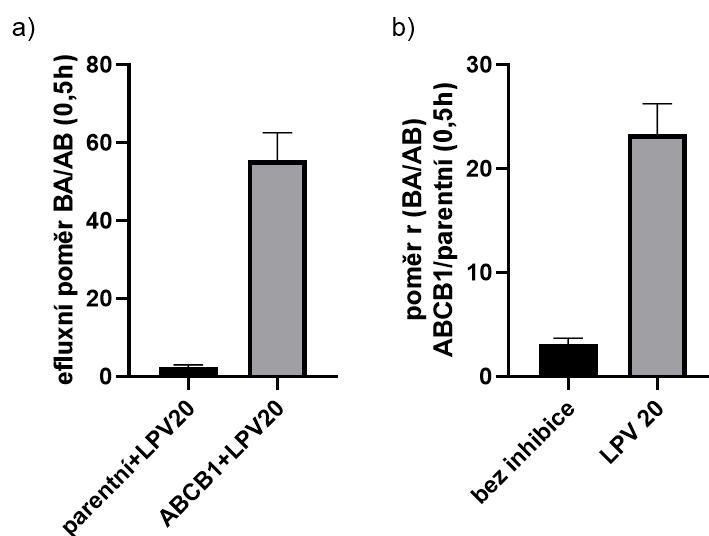
Obrázek 8: a) Grafické porovnání efluxních poměrů (r) MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk v čase $0,5$ h v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV. b) Grafické porovnání „net efflux ratio“ (r ABCB1/ r parentní) v přítomnosti a bez přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti LPV platí $n = 1$.

6.2.4. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV

Dále byl zjišťován vliv LPV na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1 ve vyšší koncentraci, tedy $20\mu\text{mol/l}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 9 včetně srovnání s neinhibovaným transportem. Hodnota „net efflux ratio“ pro neinhibovaný transport činí $3,1\pm 0,5$, v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV činí $23,3\pm 2,4$. Inhibiční efekt $20\mu\text{M}$ LPV na eflux $[^{14}\text{C}]$ -DRV zprostředkovaný ABCB1 transportérem tedy nebyl pozorován. Paradoxně došlo k opačnému jevu a hodnota I_e byla 0,1. Grafické porovnání efluxních poměrů a „net efflux ratio“ je viditelné na obrázku 10.



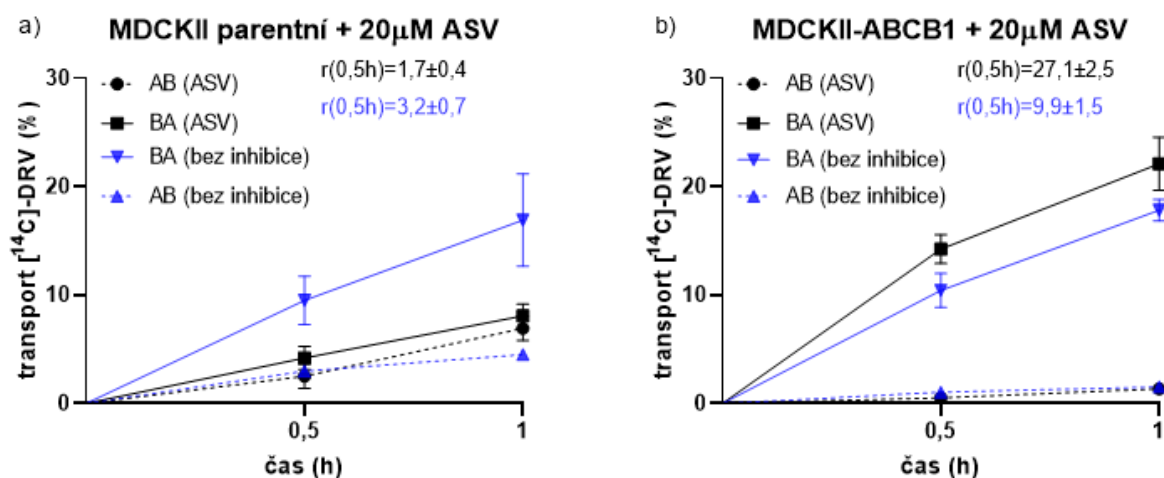
Obrázek 9: Grafické znázornění transportu $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 (b) v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV včetně hodnot efluxních poměrů (r) v čase 0,5 h vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti LPV platí $n = 1$.



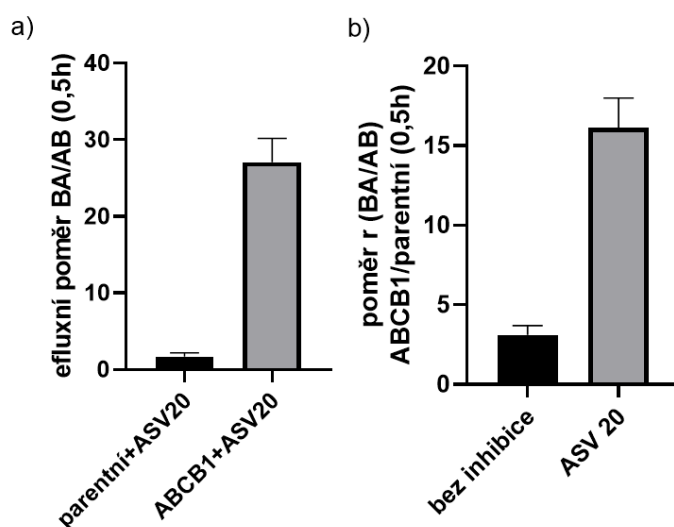
Obrázek 10: a) Grafické porovnání efluxních poměrů (r) MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk v čase 0,5 h v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV. b) Grafické porovnání „net efflux ratio“ (r ABCB1/ r parentní) v přítomnosti a bez přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti LPV platí $n = 1$.

6.2.5. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $20\mu\text{M}$ ASV

Posledním testovaným antivirotikem pro zjištění jeho vlivu na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk a MDCKII-ABCB1 byl ASV v koncentraci $20\mu\text{mol/l}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 11 včetně srovnání s neinhibovaným transportem. Hodnota „net efflux ratio“ pro neinhibovaný transport činí $3,1\pm 0,5$, v přítomnosti $20\mu\text{M}$ ASV činí $16,1\pm 1,5$. Inhibiční efekt $20\mu\text{M}$ ASV na eflux $[^{14}\text{C}]$ -DRV zprostředkovaný ABCB1 transportérem nebyl pozorován. Paradoxně došlo k opačnému jevu a hodnota I_e byla $0,2$. Grafické porovnání efluxních poměrů (r) a „net efflux ratio“ je viditelné na obrázku 12.



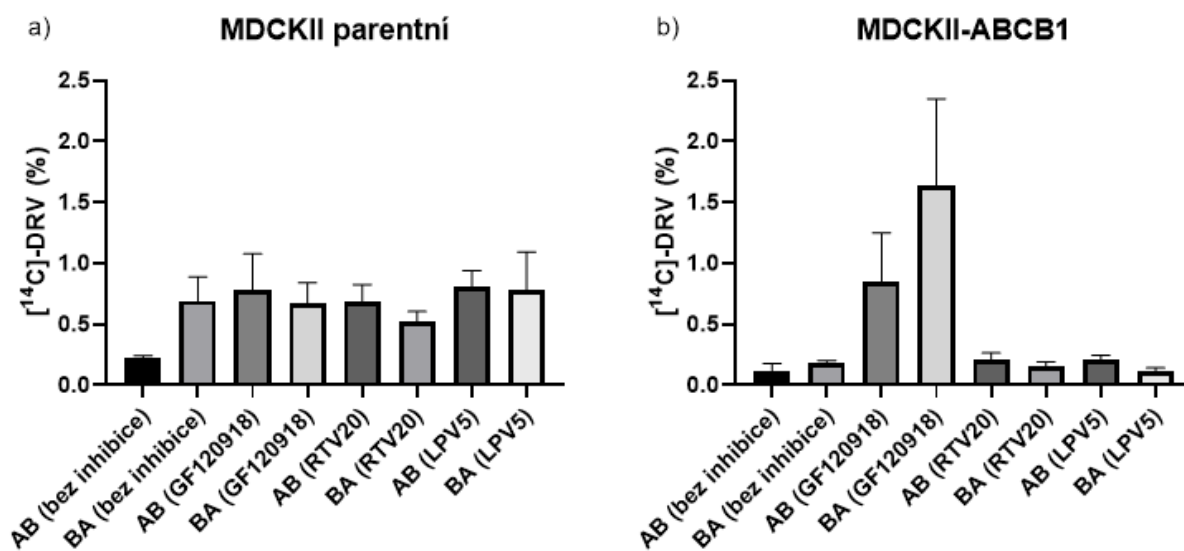
Obrázek 11: Grafické znázornění transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvy MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 (b) v přítomnosti $20\mu\text{M}$ ASV včetně hodnot efluxních poměrů (r) v čase $0,5\text{ h}$ vyjádřených jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti ASV platí $n = 1$.



Obrázek 12: a) Grafické porovnání efluxních poměrů (r) MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk v čase $0,5\text{ h}$ v přítomnosti $20\mu\text{M}$ ASV. b) Grafické porovnání „net efflux ratio“ (r ABCB1/ r parentní) v přítomnosti a bez přítomnosti $20\mu\text{M}$ ASV. Pro MDCKII parentní i MDCKII-ABCB1 v přítomnosti i bez přítomnosti ASV platí $n = 1$.

6.3. Záchyt [¹⁴C]-DRV v membránách insertů MDCKII parentních a MDCKII-ABCB1 buněk

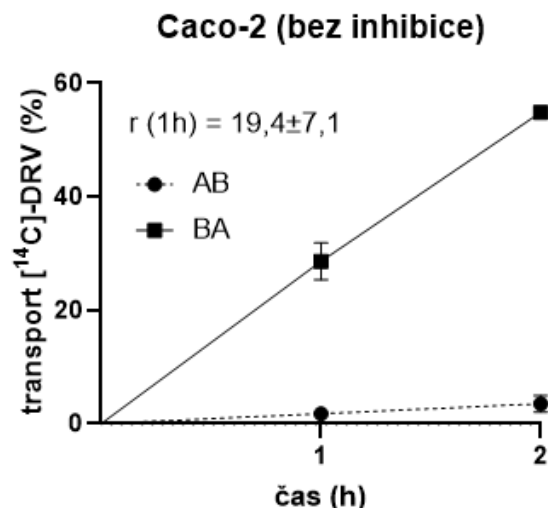
Kromě transportu [¹⁴C]-DRV mezi apikálním a basolaterálním kompartmentem byl zkoumán také jeho záchyt v buněčné monovrstvě. Záchyt vyjádřený jako procento [¹⁴C]-DRV z celkové koncentrace aplikované do odpovídajícího kompartmentu je viditelný v grafu na obrázku 13. Průměrný záchyt v membránách byl u všech experimentů v rozmezí 0,1-1,6 %.



Obrázek 13: Grafické porovnání záchytu 2 μ M [¹⁴C]-DRV v membránách insertů MDCKII parentních buněk (a) a MDCKII-ABCB1 (b) v přítomnosti jednotlivých inhibitorů a antivirotik při průchodu [¹⁴C]-DRV ve směru AB a BA. Záchyt je vyjádřen jako % z celkové koncentrace [¹⁴C]-DRV. V případě MDCKII parentních buněk (a) platí pro všechny transporty $n = 1$, v případě MDCKII-ABCB1 (b) platí pro neinhibovaný transport a transport v přítomnosti LPV $n = 1$, pro transporty v přítomnosti GF120918 a RTV platí $n = 2$.

6.4. Transport [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie bez přítomnosti inhibitoru

Podobně jako experimenty na MDCKII buňkách probíhaly experimenty i na Caco-2 buněčné linii. Nejprve byl opět testován přestup 2 μ M [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk bez přítomnosti inhibitoru. Odběry probíhaly v časech 1 h a 2 h. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 14. Efluxní poměr (r) v čase 1 h dosahoval hodnoty 19,4 \pm 7,1.

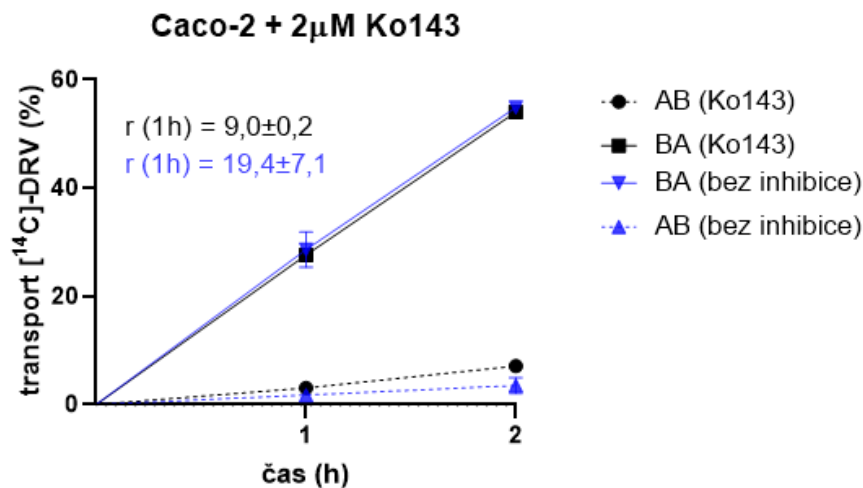


Obrázek 14: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvu Caco-2 buněk bez přítomnosti inhibitoru včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h ($n=2$).

6.5. Transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti inhibitorů a antivirotik

6.5.1. Transport $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ v přítomnosti $2\mu\text{M}$ Ko143

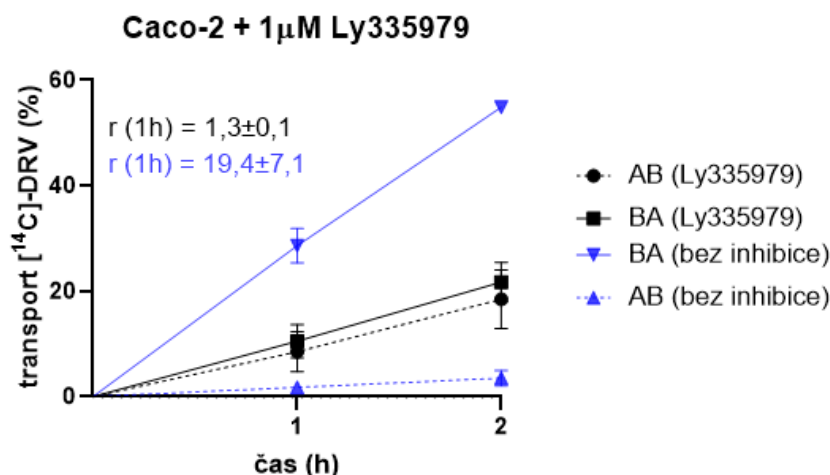
Průběh transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti $2\mu\text{M}$ Ko143 je znázorněn na obrázku 15 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty $9,0\pm 0,2$.



Obrázek 15: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]\text{-DRV}$ přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti $2\mu\text{M}$ Ko143 včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n=1$). Pro neinhibovaný transport platí $n = 2$.

6.5.2. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $1\mu\text{M}$ Ly335979

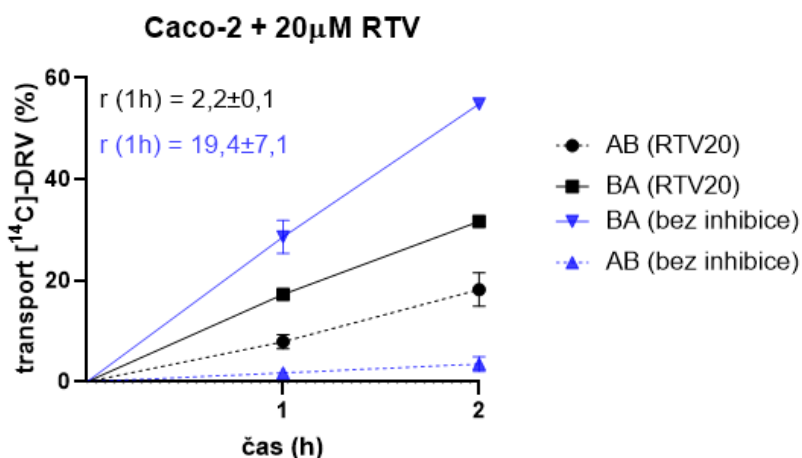
Průběh transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti $1\mu\text{M}$ Ly335979 je znázorněn na obrázku 16 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty $1,3\pm 0,1$.



Obrázek 16: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti $1\mu\text{M}$ Ly335979 včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n=2$). Pro neinhibovaný transport platí $n = 2$.

6.5.3. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV

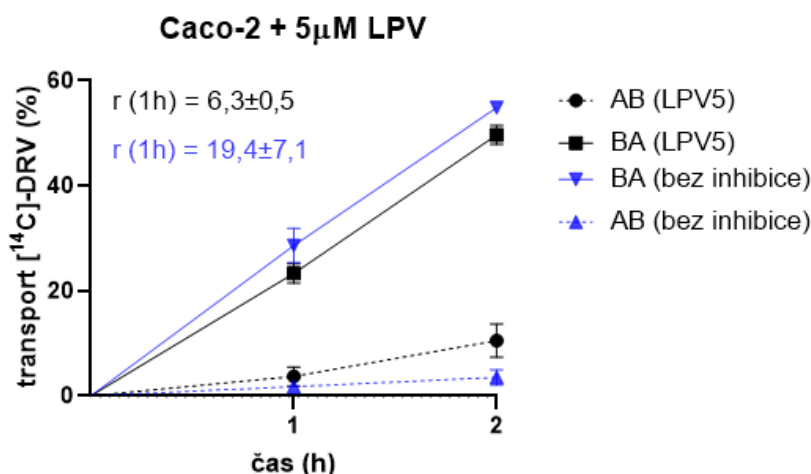
Po testování specifických inhibitorů transportérů následovalo testování vybraných antivirotik. Nejprve byl testován vliv $20\mu\text{M}$ RTV na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 17 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty $2,2\pm 0,1$.



Obrázek 17: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti $20\mu\text{M}$ RTV včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n=1$). Pro neinhibovaný transport platí $n = 2$.

6.5.4. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV

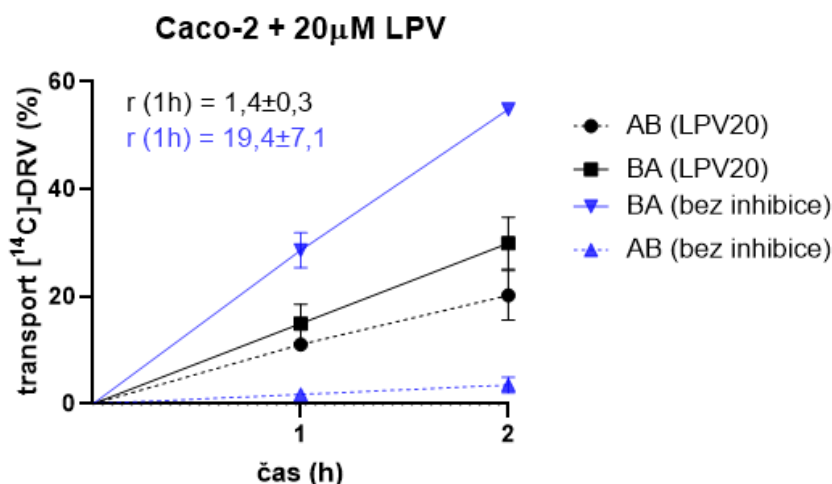
Průběh transportu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV je znázorněn na obrázku 18 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty $6,3\pm 0,5$.



Obrázek 18: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti $5\mu\text{M}$ LPV včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n=1$). Pro neinhibovaný transport platí $n = 2$.

6.5.5. Transport $[^{14}\text{C}]$ -DRV v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV

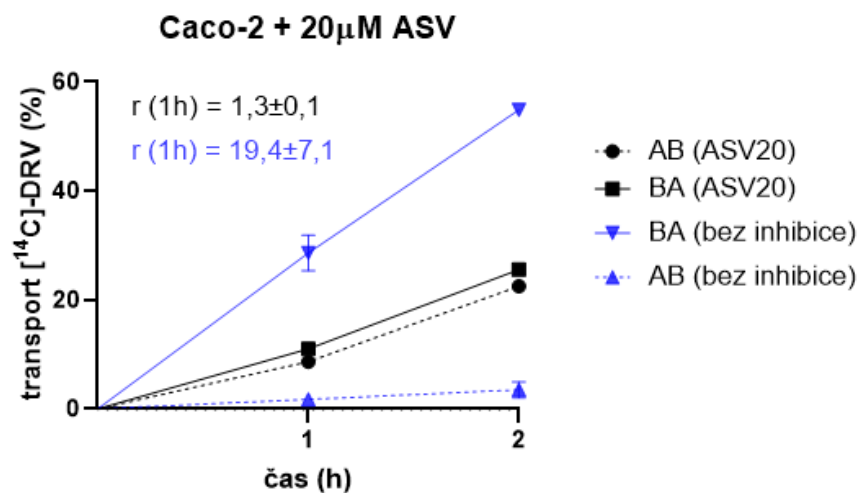
Vliv LPV na transport $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV byl testován také ve vyšší koncentraci $20\mu\text{M}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 19 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty $1,4\pm 0,3$.



Obrázek 19: Grafické znázornění průchodu $2\mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti $20\mu\text{M}$ LPV včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n=1$). Pro neinhibovaný transport platí $n = 2$.

6.5.6. Transport [¹⁴C]-DRV v přítomnosti 20μM ASV

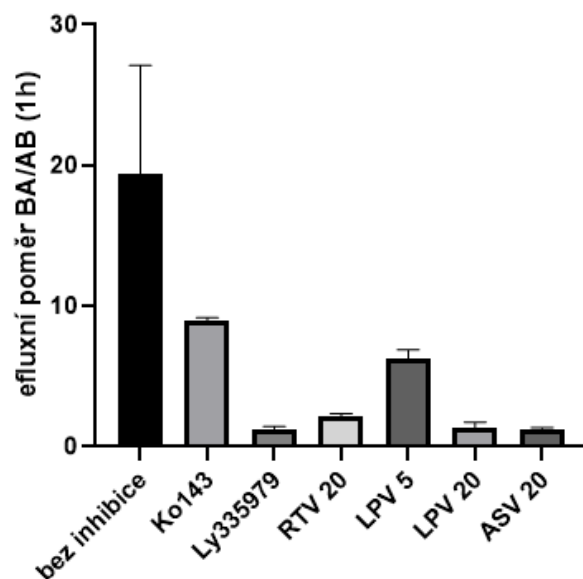
Jako poslední byl testován průchod 2μM [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie v přítomnosti 20μM ASV. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 20 včetně porovnání s neinhibovaným transportem. Efluxní poměr (r) v čase 1 h nabývá hodnoty 1,3±0,1.



Obrázek 20: Grafické znázornění průchodu 2μM [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk v přítomnosti 20μM ASV včetně hodnoty efluxního poměru (r) v čase 1 h vyjádřeného jako průměr ± směrodatná odchylka (n=1). Pro neinhibovaný transport platí n = 2.

6.5.7. Porovnání hodnot efluxních poměrů získaných z transportu [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněčné linie

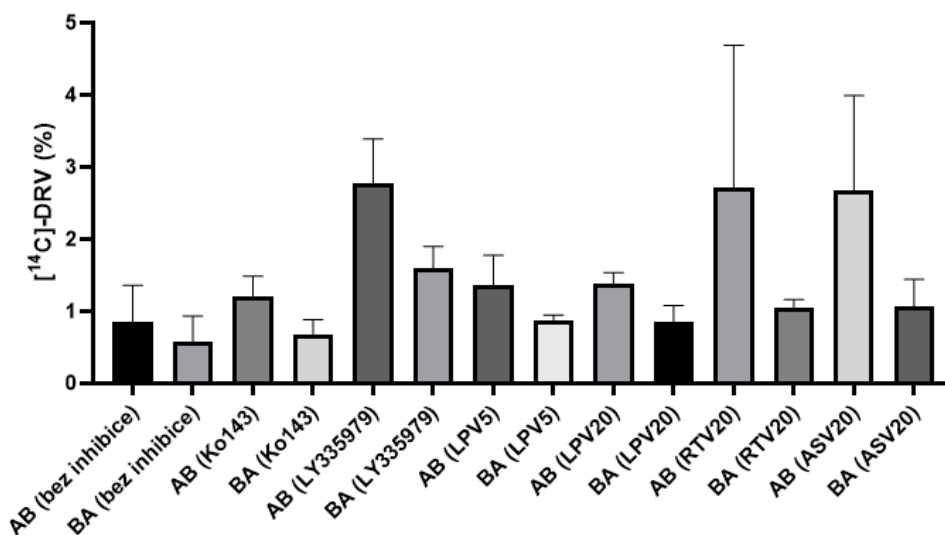
Všechny získané hodnoty efluxních poměrů (r) získané měřením transportu [¹⁴C]-DRV přes monovrstvy Caco-2 buněk v čase 1 h bez přítomnosti inhibitoru a v přítomnosti 2μM Ko143, 1μM Ly335979, 20μM RTV, 5μM LPV, 20μM LPV a 20μM ASV jsou porovnány a graficky znázorněny na obrázku 21.



Obrázek 21: Grafické porovnání efluxních poměrů (r) získaných z transportu $[^{14}\text{C}]$ -DRV za přítomnosti inhibitorů/antivirotik a neinhibovaného transportu v čase 1 h. Pro neinhibovaný transport a transport v přítomnosti Ly335979 platí $n = 2$, pro transporty v přítomnosti Ko143, RTV, LPV (5 i 20 μM) a ASV platí $n = 1$.

6.6. Záchyt $[^{14}\text{C}]$ -DRV v membránách insertů Caco-2 buněk

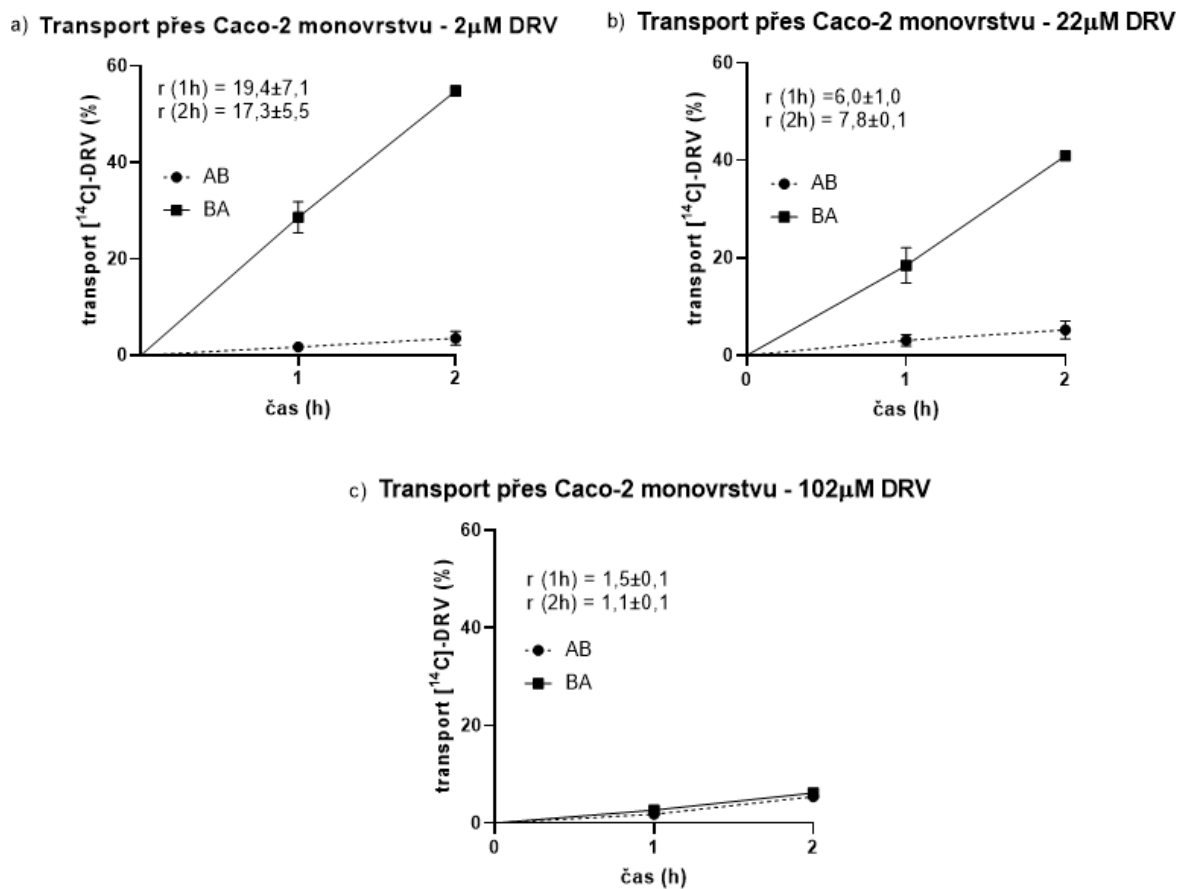
Analogicky s experimenty na MDCKII buňkách byl testován také záchyt $[^{14}\text{C}]$ -DRV v buněčně monovrstvě při experimentech na Caco-2. Záchyt vyjádřený jako procento $[^{14}\text{C}]$ -DRV z celkové koncentrace aplikované do příslušného kompartmentu je vyjádřen na obrázku 22. Průměrný záchyt byl u všech experimentů v rozmezí 0,6-2,8 %.



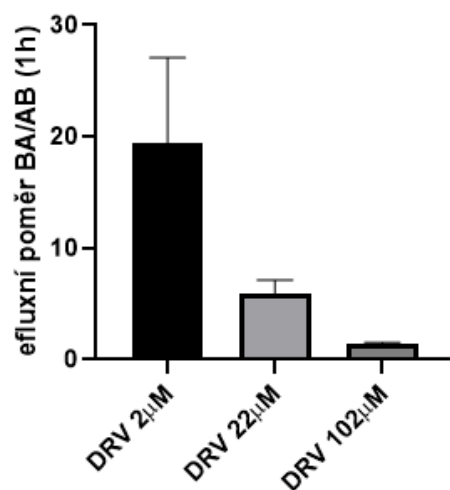
Obrázek 22: Grafické porovnání záchytu $[^{14}\text{C}]$ -DRV v membránách insertů Caco-2 buněk v přítomnosti jednotlivých inhibitorů a antivirotik při průchodu $[^{14}\text{C}]$ -DRV ve směru AB a BA. Záchyt je vyjádřen jako % z celkové koncentrace $[^{14}\text{C}]$ -DRV. Pro neinhibovaný transport a transport v přítomnosti Ly335979 platí $n = 2$, pro transporty v přítomnosti Ko143, RTV, LPV (5 i 20 μM) a ASV platí $n = 1$.

6.7. Saturace efluxních transportérů Caco-2 buněčné linie při zvyšující se koncentraci DRV

Pro zjištění koncentrace DRV, při které dochází k saturaci transportérů byl testován průchod $2\mu\text{M}$ [^{14}C]-DRV při zvyšující se koncentraci DRV bez radioaktivního značení. Výsledné testované koncentrace DRV jsou $2\mu\text{mol/l}$, $22\mu\text{mol/l}$ a $102\mu\text{mol/l}$. Průběh transportu je znázorněn na obrázku 23. Efluxní poměr (r) v čase 1 h je při koncentraci DRV $2\mu\text{mol/l}$ $19,4\pm 7,1$, při koncentraci DRV $22\mu\text{mol/l}$ $6,0\pm 1,0$ a při koncentraci DRV $102\mu\text{mol/l}$ $1,5\pm 0,1$. Grafické porovnání získaných efluxních poměrů je znázorněno na obrázku 24.



Obrázek 23: Grafické znázornění průběhu transportu [^{14}C]-DRV přes monovrstvy Caco-2 buněk při zvyšující se koncentraci DRV – a) $2\mu\text{M}$ DRV ($n = 2$), b) $22\mu\text{M}$ DRV ($n = 1$), c) $102\mu\text{M}$ DRV ($n = 1$). Jsou uvedeny také hodnoty efluxních poměrů (r) v čase 1 h a 2 h vyjádřené jako průměr \pm směrodatná odchylka.



Obrázek 24: Grafické porovnání efluxních poměrů (r) získaných z transportu [^{14}C]-DRV přes monovrstvy Caco-2 buněk v čase 1 h při zvyšující se koncentraci DRV. Počet měření je v případě koncentrace $2\mu\text{M}$ DRV $n = 2$, v případě $22\mu\text{M}$ a $102\mu\text{M}$ DRV $n = 1$.

7. DISKUZE

Infekce virem HIV je jedním z hlavních globálních zdravotních problémů a její léčba zahrnuje kombinaci několika antiretrovirálních léčiv (WHO 2020). DRV je nejnovějším zástupcem PI s vysokou genetickou bariérou proti rozvoji rezistence (Deeks 2014, Ruela Corrêa et al. 2012). Je substrátem ABCB1 (Fujimoto et al. 2009, König et al. 2010) a zdá se, že k jeho efluxu přispívá také ABCC transportér, pravděpodobně ABCC2 (Fujimoto et al. 2009).

Práce se zabývá studiem lékových interakcí DRV na ABC transportérech za využití dvou buněčných linií – Caco-2 a MDCKII. Caco-2 linie je narozdíl od MDCKII lidského původu (Balimane a Chong 2005, Alqahtani et al. 2013). Mezi její nevýhody patří delší kultivační doba a citlivost buněk i k malým změnám v kultivačních a experimentálních podmínkách (Balimane a Chong 2005, Artursson et al. 2001). Vzhledem k pevnějším mezibuněčným spojům v porovnání s lidskými enterocyty je zde nižší míra paracelulárního transportu (Alqahtani et al. 2013). Exprese a funkce efluxních transportérů v Caco-2 může být kromě jiného ovlivněna také stupněm diferenciací buněk a číslem pasáže (Siissalo et al. 2007).

MDCK buňky jsou taktéž užívané jako model pro studium přestupu látek přes biologické membrány. Jejich hlavní výhodou oproti Caco-2 je kratší doba kultivace na polykarbonátové membráně (Balimane et al. 2000, Balimane a Chong 2005, Quan et al. 2012, Volpe 2008). Tato buněčná linie je dlouhodobě využívána pro studium interakcí léčiv včetně antivirotik (Patel et al. 2004, Horita a Doi 2014, Zha et al. 2013). K rozpoznávání substrátů a inhibitorů ABCB1 (analogicky ABCG2 či ABCC) jsou využívány MDCKII-ABCB1 (MDCKII-ABCG2, MDCKII-ABCC2). Efluxní poměr (r) nabývající hodnoty 2 a více ($r \geq 2$) ukazuje na potenciálně klinicky významnou roli ABCB1 (analogicky i ABCG2 a ABCC2) ve farmakokinetice léčiv. Dalším ukazatelem je pokles efluxního poměru (r) v přítomnosti inhibitoru daného transportéru o 50 % oproti hodnotě (r) neinhibovaného transportu (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010).

Za určitou nevýhodu MDCKII buněk lze považovat jejich psí původ (Dukes et al. 2011) a s tím související endogenní expresi transportérů, jejichž interakce s testovanou látkou může být komplikujícím faktorem při interpretaci výsledných dat (Kuteykin-Teplyakov 2010, Gartzke a Fricker 2014, Goh et al. 2002, Quan et al. 2012). Endogenní transportéry MDCKII buněk mohou totiž ovlivňovat výsledný transportní poměr (r) v MDCKII produkujících humánní transportéry. Proto musí být dle FDA Center for Drug Evaluation and Research (2020)

v případě MDCKII buněk hodnocen tzv. „net efflux ratio“, čili podíl efluxních poměrů (r) získaných na buňkách produkujících lidský transportér a buňkách parentních.

Detekce pomocí radioaktivně značeného [^{14}C]-DRV byla zvolena z důvodu vysoké citlivosti metody, která umožňuje testovat i nižší koncentrace, a jednoduššímu analytickému stanovení (nezávislému na HPLC metodě).

Experimenty s DRV jsme započali na kultivačně jednodušším modelu, tj. na MDCKII buněčné linii. Transporty [^{14}C]-DRV byly provedeny přes monovrstvy parentních MDCKII buněk a MDCKII buněk produkujících lidské transportéry (MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2). Pouze v případě transportu přes MDCKII-ABCB1 jsme pozorovali „net efflux ratio“ (The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010) ≥ 2 , což naznačuje, že DRV by měl být substrátem ABCB1 a jejich interakce klinicky relevantní. Při srovnání se studií Fujimoto et al. (2009) se naše výsledky shodují s interakcí DRV na ABCB1. V této studii navíc na Caco-2 ukázali na příspěvek ABCC transportérů k efluxu DRV s předpokladem interakce na ABCC2, který se v našem případě na MDCKII-ABCC2 nepotvrdil.

V případě transportů přes MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC2 byl čistý transportní poměr < 1 . To by mohlo být vysvětleno vlivem, který má genetická modifikace na endogenní expresi transportérů MDCKII buňkami. Li et al. (2013) prokázali, že MDCK-ABCB1 linie má nižší endogenní expresi *ABCB1* mRNA oproti MDCK parentní linii. Kuteykin-Teplyakov et al. (2010) popsali, že MDCKII-ABCB1 mají kromě nižší exprese endogenní *ABCB1* mRNA, také nižší expresi ABCC2, a to jak mRNA, tak i proteinu. Tato data naznačují, že genetická modifikace může ovlivnit množství endogenních transportérů MDCK buněk a interferovat takto s výsledky.

Vzhledem k dosaženým výsledkům další experimenty probíhaly pouze na MDCKII-ABCB1 a MDCKII parentních buňkách jako kontrolní linii. S ohledem na vysoké hodnoty transportu pozorované v BA směru jsme se navíc rozhodli pro zkrácení doby experimentu na 1 h, s odběry v čase 0,5 h a 1 h, aby naše metodika odpovídala maximálnímu doporučenému přestupu (10 %, odpovídá lineární fázi přestupu) z donorového do akceptorového kompartmentu (Hubatsch et al. 2007).

V přítomnosti modelového inhibitoru ABCB1 a ABCG2, GF120918 (2 μM) (Hyafil et al. 1993, De Bruin et al. 1999), došlo ke snížení efluxního poměru (r) získaného z transportu [^{14}C]-DRV jak v MDCKII-ABCB1, tak v MDCKII parentní linii, což značí kromě inhibice humánního

ABCB1 také inhibici endogenních transportérů MDCKII buněk. Z tohoto důvodu nedošlo k poklesu „net efflux ratio“ o 50 % a dle definice The International Transporter Consortium; Giacomini et al. (2010) tedy nebyla prokázána specifita transportu, v tomto případě lidským ABCB1.

I přesto, že endogenní aktivita naznačovala nevhodnost MDCKII buněk jako modelu pro tento experiment, jsme se pokusili otestovat vliv vybraných antivirotik na transport [¹⁴C]-DRV. Testovanými antivirotiky byly 20μM RTV, 5μM a 20μM LPV a 20μM ASV. Látky a jejich koncentrace byly zvoleny s ohledem na předchozí studie, kde byla potvrzena jejich schopnost inhibice ABCB1 (Storch et al. 2007, Martinec et al. 2019, Drewe et al. 1999, Bachmeier et al. 2005, Mosure et al. 2015, Bierman et al. 2010). Bylo klinicky prokázáno, že kombinace s RTV zvyšuje biodostupnost substrátů ABCB1 (a také CYP3A) (Cattaneo et al. 2019). Léková interakce s ASV je možná vzhledem k rozdílné indikaci oproti DRV, zatímco léková interakce DRV a LPV je pouze hypotetická (obě léčiva patří do skupiny PI a nejsou doporučována v kombinaci) a LPV zde byl vybrán pouze jako známý silný inhibitor ABCB1 (Storch et al. 2007, Martinec et al. 2019, Bierman et al. 2010). Nicméně ani jedna z těchto látek nevykazovala inhibiční efekt na eflux [¹⁴C]-DRV pomocí ABCB1 transportéru. Paradoxně došlo k opačnému jevu a získané efluxní poměry (r) v přítomnosti antivirotik dosahovaly vyšších hodnot než efluxní poměr (r) neinhibovaného transportu. Tyto vysoké hodnoty efluxních poměrů (r) byly zřejmě zapříčiněny velmi nízkými a variabilními hodnotami transportu [¹⁴C]-DRV v AB směru.

Z výše zmíněných důvodů jsme také díky finanční a časové náročnosti experimentů testování na MDCKII buňkách ukončili. Vzhledem k faktu, že byly experimenty provedeny v jednom, maximálně dvou biologických replikátech, nejsou získané výsledky statisticky hodnoceny.

V dalším kroku jsme se rozhodli testovat vliv vybraných antivirotik na transport [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2. Jak již bylo zmíněno, Caco-2 jsou buňky lidského kolorektálního adenokarcinomu (Balimane a Chong 2005, Alqahtani et al. 2013). V Caco-2 buněčné linii byly na proteinové úrovni funkčně popsány efluxní transportéry ABCB1, ABCC2 i ABCG2 (Brück et al. 2017, Vaessen et al. 2017, Uchida et al. 2015). Exprese těchto transportérů v Caco-2 buňkách se může od exprese transportérů ve střevě lišit, kvantitativně se zastoupení jednotlivých transportérů v Caco-2 linii může lišit také napříč laboratořemi (Brück et al. 2017, Vaessen et al. 2017, Uchida et al. 2015, Harwood et al. 2016, Drozdik et al. 2014). Vzhledem k přítomnosti více typů efluxních transportérů jsme pro rozlišení jejich vlivu využili modelové inhibitory. Přestup [¹⁴C]-DRV byl nejprve testován v časech 0,5 h a 1 h, nicméně hodnoty AB

směru v čase 0,5 h hraničily s hodnotami backgroundu, a proto byl experiment dále prováděn v časech 1 h a 2 h. Vyhodnocení jsme však nakonec provedli pro čas inkubace 1 h, protože tento čas a jemu odpovídající transporty lépe odpovídaly kritériím definovaným v publikaci Hubatsch et al. (2007).

Experiment na Caco-2 opět započal analýzou neinhibovaného transportu [¹⁴C]-DRV. Naměřený efluxní poměr (r) byl roven 19,4±7,1, což naznačuje zapojení aktivních transportérů na apikální membráně Caco-2 do přestupu [¹⁴C]-DRV (The International Transporter Consortium; Giacomini et al., 2010). Oba zvolené modelové inhibitory způsobily snížení efluxního poměru (r), specifický inhibitor ABCB1 Ly335979 (1 μM) (Shepard et al. 2003) snížil (r) na hodnotu 1,3±0,1 a specifický inhibitor ABCG2 Ko143 (2 μM) (Allen et al. 2002) na hodnotu 9,0±0,2. Došlo tedy ke snížení o 50 %, což naznačuje, že DRV je substrátem ABCB1 i ABCG2. Interakce s ABCB1 koreluje s výsledky získanými na MDCKII buňkách, a také s již dříve proběhlými studii (Fujimoto et al. 2009, König et al. 2010), zatímco transport zprostředkovaný ABCG2 je v rozporu s našimi daty získanými na MDCKII buněčné linii a také dříve publikovanou studií Fujimoto et al. (2009), která probíhala na Caco-2 linii a při inhibici ABCG2 pomocí novobiocinu nedošlo k inhibici efluxu DRV. Aby bylo možné v tomto případě udělat nějaké závěry, je potřeba provést rozsáhlejší analýzu s větším počtem opakování případně využít nějaký další experimentální model.

RTV, LPV a ASV snížily efluxní poměry (r) transportu [¹⁴C]-DRV přes monovrstvu Caco-2 buněk. Na základě těchto zjištění lze udělat závěr, že testované látky inhibují v monovrstvě Caco-2 eflux [¹⁴C]-DRV zprostředkovaný ABCB1. To koreluje s dříve provedenými studii zabývajícími se inhibicí ABCB1 těmito antiviroty (Storch et al. 2007, Martinec et al. 2019, Drewe et al. 1999, Bachmeier et al. 2005, Mosure et al. 2015). Výsledky získané na Caco-2 linii korelují také s tvrzením Fujimoto et al. (2009) získaným z transportu DRV přes Caco-2 a LLC-PK1-ABCB1 linie, že RTV inhibicí ABCB1 snižuje eflux DRV. V případě LPV a RTV nelze vyloučit inhibici také ABCG2 (Weiss et al. 2007, Gupta et al. 2004). Z finančních důvodů a množství [¹⁴C]-DRV, kterým jsme disponovali, nebyly transportní experimenty na Caco-2 monovrstvách provedeny v biologickém triplicátu, a proto zde také není hodnocena statistická významnost naměřených dat.

Míra transportu testované substance může být ovlivněna také záchytem substance buňkami, případně adsorpcí substance k *in vitro* aparátu (Krishna et al. 2001). Retence testované látky buňkami může mít zásadní vliv zejména u lipofilních látek (Youdim et al. 2003). Proto jsme kromě samotného průchodu [¹⁴C]-DRV u obou buněčných linií hodnotili i tento jev. V případě

MDCKII buněk průměrný záchyt nepřekročil 1,6 % a byl porovnatelný v obou směrech. Vzhledem k minimálním hodnotám naměřených při transportu [¹⁴C]-DRV v AB směru je možné, že výsledný efluxní poměr (r) je kvantitativně tímto záchytem ovlivněn, nicméně vnesená chyba se zdá být obdobná napříč všemi experimenty. V případě Caco-2 byl maximální průměrný záchyt do 2,8 % a ve všech případech byly hodnoty záchyty v AB směru vyšší než ve směru opačném. Hodnoty záchyty byly vyšší v porovnání s MDCKII buňkami a vzhledem k tendenci většího záchyty ve směru AB by také mohly mít vliv na výsledné hodnoty efluxních poměrů (r).

Na závěr byl zkoumán vliv zvyšující se koncentrace DRV na efluxní poměr (r) získaný z transportu [¹⁴C]-DRV. Efluxní poměr (r) byl při 102 μM koncentraci DRV po jedné hodině snížen na hodnotu 1,5±0,1, což dokládá saturaci aktivních transportéru v Caco-2 buněčné linii již při této koncentraci. Teoretická koncentrace ve střevě při podání 600 mg DRV vypočítaná jako poměr podané dávky [mol] ku 250 ml dosahuje hodnoty 4382 μmol/l (Elsby et al. 2016), což je koncentrace mnohonásobně vyšší, než je předpokládaná koncentrace potřebná k saturaci transportérů. Lze se tedy domnívat, že střevní ABCB1 zřejmě nebude hrát zásadní roli ve snížení absorpce DRV a v jeho lékových interakcích, jak bylo původně zamýšleno. Protože je třeba brát v úvahu také rozdílnou expresi transportérů mezi námi testovanou buněčnou linií Caco-2 a expresí transportérů ve střevě, jak již bylo výše popsáno (Drozdik et al. 2014, Brück et al. 2017, Vaessen et al. 2017, Uchida et al. 2015), není možné dělat definitivní závěry.

Vzhledem k tomu, že i) plazmatická koncentrace DRV je řádově mnohem nižší a pohybuje se okolo 7,5 μmol/l (nevázaná frakce se pohybuje okolo 1 μmol/l) (Croteau et al. 2013), což jsou hodnoty blízké našim testovaným koncentracím, a ii) MDCKII-ABCB1 a Caco-2 buňky vzhledem k expresi ABCB1 slouží jako model pro studium interakcí s tímto transportérem (FDA Center for Drug Evaluation and Research 2020, The International Transporter Consortium; Giacomini et al. 2010), je možné naše výsledky alespoň částečně na biologické bariéry exprimující ABCB1 extrapolovat, konkrétně na hematotestikulární, hematoencefalickou bariéru a hepatocyty (Leslie et al. 2005). Vzhledem k tomu, že je DRV přibližně z 95 % vázán na plazmatické bílkoviny v krvi (Ruela Corrêa et al. 2012) nebude role ABCB1 zásadní ani při prostupu DRV přes hematotestikulární a hematoencefalickou bariéru. Naše výsledky by však mohly být relevantní pro studium hepatální exkrece. Přítomnost efluxních transportérů, včetně ABCB1, přispívá k sekreci substrátů do žluči, což vede k jejich zvýšenému vylučování (Leslie et al. 2005). Okolo 49 % DRV se při současném podání s RTV vylučuje v nezměněné podobě (41 % játry). V případě užívání samotného DRV je to

pouze 7 % (Rittweger a Arastéh 2007, Prezista® 2020). Dle Elsby et al. (2016) je teoretická maximální koncentrace DRV v hepatocytech přibližně 1,3 $\mu\text{mol/l}$, což je opět hodnota přibližně odpovídající námi testované koncentraci DRV. Na základě našich zjištění lze tedy předpokládat, že lékové interakce na ABCB1 v hepatocytech hrají důležitou roli ve farmakokinetice DRV. Nicméně tuto hypotézu je nutné prokázat pomocí *in vitro* modelů jaterní tkáně, např. ultratenkých řezů nebo sféroidů.

8. ZÁVĚR

Naše studie je pilotní studií rozsáhlejšího výzkumu, ve kterém budou testovány lékové interakce širší palety antiretrovirálních léčiv a DAA s DRV. Součástí bude také testování indukce ABCB1 ve střevě vlivem DRV, která by mohla mít vliv na farmakokinetiku současně podaných substrátů. V této práci jsme se zabývali studiem lékových interakcí DRV na ABC transportérech pomocí *in vitro* metod na Caco-2 a MDCKII buněčných liniích. Nejprve jsme zjišťovali, které efluxní transportéry zasahují do transportu DRV, poté jsme zkoumali interakce DRV s jednotlivými antivirotiky (RTV, LPV a ASV).

Na MDCKII jsme nejprve zjistili, že DRV je substrátem ABCB1, nikoliv ABCG2 a ABCC2 transportérů. Toto se nám ovšem nepodařilo zcela ověřit při testování s inhibítozem GF120918, protože nedošlo k 50% poklesu „net efflux ratio“ při této inhibici, což bylo pravděpodobně zapříčiněno současnou inhibicí endogenních transportérů MDCKII buněk. Testovaná antivirotika nevykazovala žádnou inhibiční aktivitu na ABCB1 a na eflux DRV a vzhledem k nekonzistentnosti výsledků a finanční náročnosti nebyl experiment dokončen v biologickém triplikátu. MDCKII buňky se tak vzhledem k endogenní aktivitě transportérů a malému transportu DRV ve směru AB zdají být nevhodným modelem pro studium lékových interakcí DRV.

V experimentu jsme dále pokračovali na Caco-2 linii, kde jsme potvrdili, že DRV je substrátem ABCB1 a v menší míře také možným substrátem ABCG2. Všechna testovaná antivirotika inhibovala eflux DRV, což se projevilo snížením hodnot efluxních poměrů. Předpokládaným mechanismem této interakce je inhibice ABCB1, případně také ABCG2 danými antivirotiky.

Testováním saturace transportérů bylo zjištěno, že vliv těchto efluxních transportérů na absorpci DRV bude vzhledem k vysoké koncentraci DRV ve střevě pravděpodobně zanedbatelný, ale výsledky je možné využít pro další výzkum, zejména pro studium lékových interakcí DRV na ABCB1/ABCG2 na úrovni hepatální exkrece.

Získané výsledky je třeba dále ověřit provedením dalších experimentů pro získání dostatečného množství biologických replikátů umožňujících hodnocení statistické významnosti naměřených dat a je třeba provést studie lékových interakcí na modelu hepatální exkrece.

9. LITERATURA

Allen, J. D. et al. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(6), 417–425.

Alqahtani, S., Mohamed, L. A., & Kaddoumi, A. (2013). Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9(10), 1241–1254. <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.802772>

Artursson, P., Palm, K., & Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 27–43. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.005>

Back, D., Sekar, V., & Hoetelmans, R. M. W. (2008). Darunavir: pharmacokinetics and drug interactions. *Antiviral Therapy*, 13(1), 1–13.

Bachmeier, C. J., Spitzenberger, T. J., Elmquist, W. F., & Miller, D. W. (2005). Quantitative assessment of HIV-1 protease inhibitor interactions with drug efflux transporters in the blood-brain barrier. *Pharmaceutical Research*, 22(8), 1259–1268. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-5271-y>

Balimane, P. V, Chong, S., & Morrison, R. A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 301–312. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00113-1](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00113-1)

Balimane, P. V., & Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today*, 10(5), 335–343. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03354-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03354-9)

Bierman, W. F. W. et al. (2010). Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1672–1680. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq209>

Bischoff, S. C. et al. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14:189, 1–25. [https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-](https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7)

7

Bohets, H. et al. (2001). Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(5), 367–383. <https://doi.org/10.2174/1568026013394886>

Brück, S., Strohmeier, J., Busch, D., Drozdik, M., & Oswald, S. (2017). Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 38(2), 115–126. <https://doi.org/10.1002/bdd.2025>

Cascorbi, I. (2012). Drug Interactions - Principles, Examples and Clinical Consequences. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(33–34), 546–556. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0546>

Cattaneo, D., Cossu, M. V., & Rizzardini, G. (2019). Pharmacokinetic drug evaluation of ritonavir (versus cobicistat) as adjunctive therapy in the treatment of HIV. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 15(11), 927–935. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1685495>

Croteau, D. et al. (2013). Darunavir is predominantly unbound to protein in cerebrospinal fluid and concentrations exceed the wild-type HIV-1 median 90% inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 684–689. <https://doi.org/10.1093/jac/dks441>

De Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., & Bates, S. E. (1999). Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Letters*, 146(2), 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(99\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(99)00182-2)

Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>

Deeks, E. D. (2014). Darunavir: A review of its use in the management of HIV-1 infection. *Drugs*, 74(1), 99–125. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0159-3>

Doherty, M. M., & Pang, K. S. (1997). First-pass effect: Significance of the intestine for absorption and metabolism. *Drug and Chemical Toxicology*, 20(4), 329–344. <https://doi.org/10.3109/01480549709003891>

Drewe, J., Gutmann, H., Fricker, G., Török, M., Beglinger, C., & Huwylar, J. (1999). HIV protease inhibitor ritonavir: A more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833. *Biochemical Pharmacology*, 57(10), 1147–1152. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00026-X)

Drozdik, M. et al. (2014). Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), 3547–3555. <https://doi.org/10.1021/mp500330y>

Dukes, J. D., Whitley, P., & Chalmers, A. D. (2011). The MDCK variety pack: Choosing the right strain. *BMC Cell Biology*, 12:43. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>

Eley, T., Garimella, T., Li, W., & Bertz, R. J. (2015). Asunaprevir: A Review of Preclinical and Clinical Pharmacokinetics and Drug–Drug Interactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 54(12), 1205–1222. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0299-6>

Elsby, R., Martin, P., Surry, D., Sharma, P., & Fenner, K. (2016). Solitary Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Efflux Transporter Results in a Clinically Significant Drug-Drug Interaction with Rosuvastatin by Causing up to a Two-Fold Increase in Statin Exposure. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(3), 398–408. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.066795>

Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligo, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità*, 46(1), 5–14. https://doi.org/10.4415/ANN_10_01_02

Fromm, M. F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(8), 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.002>

Fujimoto, H. et al. (2009). P-glycoprotein mediates efflux transport of Darunavir in human intestinal Caco-2 and ABCB1 gene-transfected renal LLC-PK1 cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1588–1593. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1588>

Gartzke, D., & Fricker, G. (2014). Establishment of Optimized MDCK Cell Lines for Reliable Efflux Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(4), 1298–1304. <https://doi.org/10.1002/jps.23901>

- German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut; Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood’) (2016).** Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
- Goh, L. B. et al. (2002).** Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. *Biochemical Pharmacology*, 64(11), 1569–1578. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01355-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01355-2)
- Gupta, A., Zhang, Y., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2004).** HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1), 334–341. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065342>
- Harwood, M. D. et al. (2016).** In vitro-in vivo extrapolation scaling factors for intestinal P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: Part I: A cross-laboratory comparison of transporter-protein abundances and relative expression factors in human intestine and Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(3), 297–307. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.067371>
- Horita, Y., & Doi, N. (2014).** Comparative study of the effects of antituberculosis drugs and antiretroviral drugs on Cytochrome P450 3A4 and P-Glycoprotein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6), 3168–3176. <https://doi.org/10.1128/AAC.02278-13>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007).** Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Hyafil, F., Vergely, C., Du Vignaud, P., & Grand-Perret, T. (1993).** In Vitro and in Vivo Reversal of Multidrug Resistance by GF120918, an Acridonecarboxamide Derivative. *Cancer Research*, 53(19), 4595–4602.
- Ipatova, O. M. et al. (2010).** Bioavailability of oral drugs and the methods for its improvement. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 4(1), 82–94. <https://doi.org/10.1134/S1990750810010117>
- Kato, M. (2008).** Intestinal first-pass metabolism of CYP3A4 substrates. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(2), 87–94. <https://doi.org/10.2133/dmpk.23.87>

- König, S. K., Herzog, M., Theile, D., Zembruski, N., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2010).** Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(11), 2319–2328. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq324>
- Krishna, G., Chen, K. J., Lin, C. C., & Nomeir, A. A. (2001).** Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2. *International Journal of Pharmaceutics*, 222(1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00698-6)
- Kuteykin-Teplyakov, K., Luna-Tortós, C., Ambroziak, K., & Löscher, W. (2010).** Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1453–1463. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00801.x>
- Lefèvre, F., & Boutry, M. (2018).** Towards identification of the substrates of ATP-binding cassette transporters. *Plant Physiology*, 178(1), 18–39. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00325>
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005).** Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–237. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>
- Li, J., Wang, Y., & Hidalgo, I. J. (2013).** Kinetic Analysis of Human and Canine P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport in MDR1–MDCK Cell Model: Approaches to Reduce False-Negative Substrate Classification. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(9), 3436–3446. <https://doi.org/10.1002/jps.23523>
- Li, Y. et al. (2019).** Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(6), 1113–1144. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.10.001>
- Maeda, K., Das, D., Kobayakawa, T., Tamamura, H., & Takeuchi, H. (2019).** Discovery and Development of Anti-HIV Therapeutic Agents: Progress Towards Improved HIV Medication. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(18), 1621–1649. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190712204603>
- Martinec, O., Hulciak, M., Staud, F., Cecka, F., Vokral, I., & Cerveny, L. (2019).** 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e00910-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00910-19>

- Mosure, K. W. et al. (2015).** Preclinical Pharmacokinetics and in Vitro Metabolism of Asunaprevir (BMS-650032), a Potent Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9), 2813–2823. <https://doi.org/10.1002/jps.24356>
- Nikolic, B., Jankovic, S., Stojanov, O., & Popovic, J. (2014).** Prevalence and predictors of potential drug-drug interactions. *Central European Journal of Medicine*, 9(2), 348–356. <https://doi.org/10.2478/s11536-013-0272-4>
- Oostendorp, R. L., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2009).** The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treatment Reviews*, 35(2), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.09.004>
- Patel, J., Buddha, B., Dey, S., Pal, D., & Mitra, A. K. (2004).** In vitro interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: Changes in P-gp and CYP3A4 activity. *American Journal of Therapeutics*, 11(4), 262–277. <https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000101827.94820.22>
- Platt, L. et al. (2016).** Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: A global systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), 797–808. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00485-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00485-5)
- Pond, S. M., & Tozer, T. N. (1984).** First-Pass Elimination Basic Concepts and Clinical Consequences. *Clinical Pharmacokinetics*, 9(1), 1–25. <https://doi.org/10.2165/00003088-198409010-00001>
- Quan, Y. et al. (2012).** Expression profile of drug and nutrient absorption related genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells grown under differentiation conditions. *Pharmaceutics*, 4(2), 314–333. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4020314>
- Raschetti, R. et al. (1999).** Suspected adverse drug events requiring emergency department visits or hospital admissions. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 54(12), 959–963. <https://doi.org/10.1007/s002280050582>
- Rittweger, M., & Arastéh, K. (2007).** Clinical Pharmacokinetics of Darunavir. *Clinical Pharmacokinetics*, 46(9), 739–756. <https://doi.org/10.2165/00003088-200746090-00002>
- Routledge, P. A., & Shand, D. G. (1979).** Presystemic Drug Elimination. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 19, 447–468. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.19.040179.002311>

- Ruela Corrêa, J. C., D'Arcy, D. M., Dos Reis Serra, C. H., & Nunes Salgado, H. R. (2012).** Darunavir: A critical review of its properties, use and drug interactions. *Pharmacology*, *90*(1-2), 102–109. <https://doi.org/10.1159/000339862>
- Ryom, L. et al. (2018).** Cardiovascular disease and use of contemporary protease inhibitors: the D:A:D international prospective multicohort study. *The Lancet HIV*, *5*(6), e291–e300. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(18\)30043-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(18)30043-2)
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005).** 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*, *21*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Sharom, F. J. (2008).** ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, *9*(1), 105–127. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>
- Shepard, R. L., Cao, J., Starling, J. J., & Dantzig, A. H. (2003).** Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *International Journal of Cancer*, *103*(1), 121–125. <https://doi.org/10.1002/ijc.10792>
- Siissalo, S. et al. (2007).** Effect of cell differentiation and passage number on the expression of efflux proteins in wild type and vinblastine-induced Caco-2 cell lines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *67*(2), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.03.017>
- Stekler, J., & Collier, A. C. (2004).** Primary HIV Infection. *Current HIV/AIDS Reports*, *1*(2), 68–73. <https://doi.org/10.1007/s11904-004-0010-2>
- Storch, C. H., Theile, D., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2007).** Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology*, *73*(10), 1573–1581. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.027>
- Sun, H., Chow, E. C. Y., Liu, S., Du, Y., & Pang, K. S. (2008).** The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *4*(4), 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>

The International Transporter Consortium; Giacomini, K. M. et al. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>

Thelen, K., & Dressman, J. B. (2009). Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(5), 541–558. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.05.0002>

Uchida, Y., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Ohmine, K., Iwase, R., & Terasaki, T. (2015). Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(2), 205–208. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.11.002>

Vaessen, S. F. C., Van Lipzig, M. M. H., Pieters, R. H. H., Krul, C. A. M., Wortelboer, H. M., & Van De Steeg, E. (2017). Regional expression levels of drug transporters and metabolizing enzymes along the pig and human intestinal tract and comparison with Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(4), 353–360. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.072231>

Vajpayee, M., Negi, N., & Kurapati, S. (2013). The enduring tale of T cells in HIV immunopathogenesis. *Indian Journal of Medical Research*, 138(5), 682–699.

Valentin, J. (2002). Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: Reference values: ICRP Publication 89. *Annals of the ICRP*, 32(3–4), 1–277. [https://doi.org/10.1016/S0146-6453\(03\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6453(03)00002-2)

Volpe, D. A. (2008). Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 712–725. <https://doi.org/10.1002/jps>

Volpe, D. A. (2011). Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Medicinal Chemistry*, 3(16), 2063–2077. <https://doi.org/10.4155/FMC.11.149>

Weiss, J. et al. (2007). Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 238–245. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl474>

Woodward, O. M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B., & Köttgen, M. (2009). Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10338–10342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901249106>

Youdim, K. A., Avdeef, A., & Abbott, N. J. (2003). In vitro trans-monolayer permeability calculations: Often forgotten assumptions. *Drug Discovery Today*, 8(21), 997–1003. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02873-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02873-3)

Yu, S., Yu, C., Li, J., Liu, S., Wang, H., & Deng, M. (2020). Hepatitis B and hepatitis C prevalence among people living with HIV/AIDS in China: A systematic review and Meta-analysis. *Virology Journal*, 17:127, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01404-z>

Zakeri-milani, P., & Valizadeh, H. (2014). Intestinal Transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 10(6), 859–871. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.905543>

Zha, W. et al. (2013). Inhibition of P-Glycoprotein by HIV Protease Inhibitors Increases Intracellular Accumulation of Berberine in Murine and Human Macrophages. *PLOS ONE*, 8(1), e54349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054349>

Zhang, Y., Zhang, Y., Sun, K., Meng, Z., & Chen, L. (2019). The SLC transporter in nutrient and metabolic sensing, regulation, and drug development. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy052>

Elektronické zdroje:

AIDSinfo (2019). HIV/AIDS: The Basics. In: *aidsinfo.nih.gov*. 3. 7. 2019. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/45/hiv-aids--the-basics>. Přístup: 2. 9. 2020

AIDSinfo a UNAIDS (2020). Global factsheets 2019. In: *aidsinfo.unaids.org*. 2020. Dostupné na URL: <https://aidsinfo.unaids.org/>. Přístup: 14. 2. 2021

AVERT (2019). The Science of HIV and AIDS – Overview. In: *avert.org*. 10. 10. 2019. Dostupné na URL: https://www.avert.org/professionals/hiv-science/overview#footnote5_gsekknb. Přístup: 3. 9. 2020

Centers for Diseases Control and Prevention (2020). About HIV. In: *cdc.gov*. 14. 7. 2020. Dostupné na URL: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>. Přístup: 4. 9. 2020

Clinical info HIV.gov (2015). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV: Management of the Treatment-Experienced Patient. In: *Clinical info HIV.gov*. 8. 4. 2015. Dostupné na URL: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/discontinuation-or-interruption-antiretroviral-therapy?view=full>. Přístup: 25. 4. 2021

Clinical info HIV.gov (2019a). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV: Drug-Drug Interactions. In: *Clinical info HIV.gov*. 18. 12. 2019. Dostupné na URL: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/drug-interactions-between-protease-inhibitors-and-other-drugs?view=full>. Přístup: 22. 2. 2021

Clinical info HIV.gov (2019b). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV: What to Start: Initial Combination Regimens for the Antiretroviral-Naive Patient. In: *Clinical info HIV.gov*. 18. 12. 2019. Dostupné na URL: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/what-start-initial-combination-regimens-antiretroviral-naive?view=full>. Přístup: 15. 4. 2021

Clinical info HIV.gov (2019c). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV: Appendix B: Drug Characteristics Tables. In: *Clinical info HIV.gov*. 18. 12. 2019. Dostupné na URL: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/characteristics-protease-inhibitors?view=full>. Přístup: 15. 4. 2021

Clinical info HIV.gov (2019d). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV: Management of the Treatment-Experienced Patient. In: *HIV.gov*. 18.12.2019. Dostupné na URL: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv/virologic-failure?view=full>. Přístup: 15. 4. 2021

Drugs@FDA (2021): FDA-Approved Drugs. In: *U.S. Food and Drug Administration*. Dostupné na URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>. Přístup: 18. 2. 2021

European AIDS Clinical Society (2020). EACS Guidelines 10.1. In: *EACS European AIDS Clinical Society*. 10/2020. Dostupné na URL: https://www.eacsociety.org/files/guidelines-10.1_30032021_1.pdf. Přístup: 15. 4. 2021

FDA Center for Drug Evaluation and Research (2020). In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. In: *U.S. Food & Drug Administration*. 1/2020. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>. Přístup: 25. 2. 2021

FDA (2018). Drug Development and Drug Interactions. In: *U.S Food & Drug Administration*. 13.6.2018. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions>. Přístup: 15.4.2021

HIV.gov (2019). How is HIV transmitted?. In: *HIV.gov*. 24. 6. 2019. Dostupné na URL: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/how-is-hiv-transmitted>. Přístup: 3. 9. 2020

HIV.gov (2020a). What are HIV and AIDS?. In: *HIV.gov*. 5. 6. 2020. Dostupné na URL: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids>. Přístup: 2. 9. 2020

HIV.gov (2020b). Symptoms of HIV. In: *HIV.gov*. 1. 7. 2020. Dostupné na URL: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/symptoms-of-hiv>. Přístup: 4. 9. 2020

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2018). Antiretroviral Drug Discovery and Development. In: *niaid.nih.gov*. 26. 11. 2018. Dostupné na URL: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/antiretroviral-drug-development>. Přístup: 7. 9. 2020

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2020). HIV/AIDS. In: *niaid.nih.gov*. 29. 6. 2020. Dostupné na URL: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hivaids>. Přístup: 3. 9. 2020

Prezista® (2020). Summary of product characteristics. In: *ema.europa.eu*. 13. 10. 2020. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prezista-epar-product-information_en.pdf. Přístup: 26. 2. 2021

WHO (2020). HIV/AIDS. In: *WHO.int*. 6. 7. 2020. Dostupné na URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Přístup: 4. 9. 2020