

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



**Studium interakcí betrixabanu s antiretrovirotiky  
na modelu střevní bariéry**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Vokřál Ivan, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Ivana Lukáčová

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

V Hradci Králové

Ivana Lukáčová

Podakovanie:

Veľká vďaka patrí môjmu školiteľovi PharmDr. Ivanovi Vokřálovi, Ph.D za umožnenie vypracovania diplomovej práce na katedre farmakologie a toxikologie a jeho odborné vedenie, vecné rady a venovaný čas počas celého procesu experimentálnej časti i teoretického písania diplomovej práce.

Podakovanie patrí aj Mgr. Martinovi Huličiakovi, ktorý mi počas experimentálnej časti diplomovej práce poskytol mnoho užitočných rád a s trpezlivosťou vysvetlil každú moju otázku. Čas strávený v laboratóriu sa aj vďaka nemu niesol vždy v príjemnej atmosfére.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Ivana Lukáčová

Školitel: PharmDr. Vokřál Ivan, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Studium interakcií betrixabanu s antiretrovirotiky na modeli střevní bariéry

Perorálne užívanie liečivých prípravkov je pre pacienta praktickou a jednoduchou voľbou, ktorá zabezpečuje vysokú adhérenciu k liečbe a aj vďaka tomu je najčastejšie využívanou liekovou formou. V prevažnej väčšine tieto liečivá po perorálnom podaní prenikajú cez črevnú bariéru a práve v tomto mieste môže vznikáť mnoho klinicky významných liekových interakcií. Na to, či sa účinok prejaví alebo naopak nie, má dosah niekoľko determinantov vrátane membránových transportných systémov. Najviac pozorovaným a študovaným transportérom z nadrodiny ABC transportérov v tenkom čreve je bezpochyby P-glykoproteín (P-gp). Funguje ako efluxná pumpa zabraňujúca prestupu xenobiotík, vrátane liečiv, do systémového obehu, čím chráni organizmus a vytvára tak bariéru pred možným toxickým efektom látok. Priamo-pôsobiaci antikoagulans betrixaban je substrátom P-gp v črevnej bariére, a preto súčasné podanie s liečivami inhibujúcimi alebo indukujúcimi tento transportér, môže meniť jeho expozíciu v krvnom obehu i výsledný klinický efekt. K takýmto interakciám môže dochádzať aj u HIV pacientov, ktorí celoživotne užívajú antiretrovirálnu terapiu konkomitantne s tromboprolifaktickými antikoagulanciami z dôvodu vysokého rizika rozvoja venózneho trombozy.

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom interakcií antikoagulancia betrixabanu s antiretrovirotikom darunavirom (inhibítorom aj induktorom P-gp) zo skupiny proteázových inhibítorov na modeli črevnej bariéry, konkrétne využitím ultratenkých tkanivových rezov ľudského čreva pripravených z *jejuna*. Interakcie darunaviru a betrixabanu boli študované ako na úrovni inhibície, tak aj indukcie. Z výsledkov inhibičnej štúdie (dvojhodinová inkubácia rezov) vyplýva, že darunavir (100  $\mu\text{M}$ ) signifikantne inhibuje transport betrixabanu (10  $\mu\text{M}$ ) v tkanivových rezoch prostredníctvom efluxných transportérov cez črevnú bariéru. Nárast akumulácie betrixabanu bol oproti neinhibovanej kontrole v priemere takmer dvojnásobný

(208 %). Zaznamenaný inhibičný vplyv darunaviru bol ešte vyšší v porovnaní s použitím modelového inhibítora CP-100356 (2  $\mu\text{M}$ ), kde sme pozorovali zvýšenie akumulácie v priemere na 162 % v porovnaní s kontrolou. Oproti tomu, výsledky z indukčnej štúdie (24- a 48-hodinová expozícia rezov darunavirom (50  $\mu\text{M}$ )) neprinesli signifikantný pozorovateľný vplyv v podobe zvýšeného efluxu a zníženej koncentrácie betrixabanu v črevných rezoch. Pri dlhodobej expozícii liečivom darunavir, ktorá nastáva pri chronickom užívaní liečiv u HIV pacientov, sa nám indukčný potenciál darunaviru na expresiu P-gp na modeli ľudských tkanivových črevných rezov potvrdiť nepodarilo.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Ivana Lukáčová

Supervisor: PharmDr. Vokřál Ivan, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of interactions of betrixaban with antiretrovirals in an intestinal barrier model

Oral administration of drugs is a practical and simple choice for the patient, which ensures high adherence to the treatment, and thanks to that, it is the most frequently used dosage form. The vast majority of these drugs penetrate intestinal barrier after oral administration, and many clinically significant drug interactions can occur right in this place. Several determinants, including membrane transport systems, have an impact on whether or not the effect is manifested. The most observed and studied transporter from the superfamily of ABC transporters in the small intestine is undoubtedly P-glycoprotein (P-gp). It functions as an efflux pump preventing the transfer of xenobiotics, including drugs, into the systemic circulation, thereby protecting the organism and thus creating a barrier against the possible toxic effect of substances. The direct-acting anticoagulant betrixaban is a substrate of P-gp in the intestinal barrier, and therefore simultaneous administration with drugs inhibiting or inducing this transporter can change its exposure in the bloodstream and the resulting clinical effect. Such interactions may also occur in HIV patients who use lifelong antiretroviral therapy concomitantly with thromboprophylactic anticoagulants due to the high risk of developing venous thrombosis.

This diploma thesis deals with the study of interactions of anticoagulant betrixaban with antiretroviral drug darunavir (inhibitor and inducer of P-gp) from the group of protease inhibitors on the intestinal barrier model, specifically using human precision-cut intestinal slices prepared from the *jejunum*. Interactions between darunavir and betrixaban were studied both at the level of inhibition and induction. The results from the inhibition study (two-hour incubation of slices) show that darunavir (100  $\mu\text{M}$ ) significantly inhibits the transport of betrixaban (10  $\mu\text{M}$ ) across the intestinal barrier in tissue slices via efflux transporters. The increase in betrixaban accumulation compared to the non-inhibited control was on average

almost twofold higher (208%). The recorded inhibitory effect of darunavir was even higher compared to using the model inhibitor CP-100356 (2  $\mu$ M), where we observed an increase to 162% on average in accumulation compared to the control. In contrast, the results from the induction study (24- and 48-hour exposure of slices to darunavir (50  $\mu$ M)) did not bring a significant observable effect in the form of increased efflux and reduced concentration of betrixaban in the intestinal slices. During long-term exposure to the drug darunavir, which occurs during chronic use of drugs in HIV patients, we could not confirm the induction potential of darunavir on the expression of P gp in the model of human intestinal tissue slices.

# OBSAH

1.	ZOZNAM SKRATIEK .....	10
2.	ÚVOD .....	12
3.	TEORETICKÁ ČASŤ .....	14
3.1.	ČREVNÁ BARIÉRA .....	14
3.2.	ČREVNÉ TRANSPORTÉRY .....	15
3.3.	ATP-binding cassette transportéry .....	17
3.3.1.	P-glykoproteín.....	18
3.3.2.	Multidrug resistance-associated protein 2.....	19
3.3.3.	Breast cancer resistance protein .....	20
3.3.4.	Solute carrier transportéry .....	20
3.4.	HIV A JEHO SÚČASNÁ LIEČBA .....	21
3.5.	KOMORBIDITY SPOJENÉ S HIV INFEKCIOU .....	24
3.5.1.	ARTERIÁLNA TROMBÓZA .....	24
3.5.2.	VENÓZNY TROMBOEMBOLIZMUS .....	27
3.6.	TROMBOPROFYLAXIA U PACIENTOV S HIV .....	30
3.6.1.	BETRIXABAN .....	31
3.6.2.	INTERAKCIE BETRIXABANU A ANTIRETROVIROTÍK .....	32
4.	HYPOTÉZA A CIELE PRÁCE.....	34
5.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	35
5.1.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
5.2.	PRÍPRAVA ROZTOKOV .....	37
5.2.1.	Zásobný roztok Krebs-Henseleitov pufr .....	37
5.2.2.	Pracovný roztok Krebs-Henseleitov pufr.....	37
5.2.3.	Pracovný roztok inkubačného média Williams E medium (WME).....	37
5.2.4.	Sonifikačný roztok na stanovenia koncentrácie ATP .....	38
5.2.5.	Tris/EDTA pufr na stanovenie koncentrácie ATP .....	38
5.2.6.	Príprava 3 % roztoku agarózy .....	39
5.3.	METODIKA PRÁCE .....	39



5.3.1.	Human precision cut intestinal slices (hPCIS).....	39
5.3.2.	Stanovenie koncentrácie ATP .....	42
5.3.3.	Extrakcia vzoriek na HPLC/MS analýzu .....	43
5.3.4.	Rozpúšťanie extraktov vzoriek na meranie HPLC/MS.....	44
5.3.5.	HPLC/MS analýza .....	45
5.3.6.	BCA stanovenie proteínu .....	47
5.3.7.	Stanovenie Rhodaminu 123 – štúdium funkcie .....	48
5.3.8.	Štatistická analýza .....	49
6.	VÝSLEDKY .....	50
6.1.	INHIBIČNÁ ŠTÚDIA.....	50
6.1.1.	Overenie funkcie tkaniva .....	50
6.1.2.	Overenie vplyvu študovaných látok na viabilitu tkaniva.....	51
6.1.3.	Vplyv darunaviru na inhibíciu efluxu betrixabanu .....	52
6.2.	INDUKČNÁ ŠTÚDIA .....	54
6.2.1.	Overenie funkcie tkaniva .....	54
6.2.2.	Overenie viability tkaniva v priebehu inkubácie .....	56
6.2.3.	Vplyv darunaviru na indukciu efluxu betrixabanu a RHD123 .....	56
7.	DISKUSIA .....	59
8.	ZÁVER.....	62
9.	CITOVANÁ LITERATÚRA .....	63

# 1. ZOZNAM SKRATIEK

ABC	ATP-binding cassette
ATP	adenozín-trifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BCRP/ ABCG2	breast cancer resistance protein
CAR	konštitutívny androstanový receptor
CCR5	C-C chemokínový receptor typu E
CYP 450	cytochróm P450
DDI	drug-drug interaction
DOAC	direct oral anticoagulants
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV	human immuno-deficiency virus
hPCIS	human precision cut intestinal slices
HPLC/MS	high-performance liquid chromatography - mass spectrometry
HŽT	hlboká žilná trombóza
INI	inhibítor integrázy
KHB	Krebs-Henseleit buffer
MRP 2/ ABCC2	multidrug resistance associated protein 2
NBD	nukleotid-viažúca doména
NNRTI	nenukleosidový inhibítor reverznej transkriptázy
NRTI	nukleosidový/nukleotidový inhibítor reverznej transkriptázy
PE	pľúcna embólia
P-gp/ ABCB1	P-glykoproteín

PI	inhibitor proteázy
PXR	pregnanový X receptor
SLC	solute-carrier
SONOP	sonifikačný roztok
TECH	tromboembolická choroba
TMD	transmembránová doména
WME	Williams E medium

## 2. ÚVOD

Pohľad na ochorenie spôsobené infekciou HIV sa v priebehu posledných desaťročí zmenil z označenia akútneho a fatálneho ochorenia na chronické, a to hlavne vďaka súčasnej vysokoaktívnej antiretrovirálnej terapii (HAART), ktorá výrazne znížila mortalitu spojenú s HIV infekciou. Vďaka nej sa dožívajú HIV pacienti čoraz vyššieho veku a dokážu viesť oveľa kvalitnejší život podobný životu neinfikovaných osôb (Perkins et al., 2023). Terapia HIV so sebou však priniesla problémy v podobe komorbidít spojených so signifikantne zvýšeným výskytom kardiovaskulárnych ochorení. HIV infekcia je najčastejšie spätá so vznikom venóznej trombózy (hlboká žilná trombóza, pľúcna embólia) a arteriálnej trombózy spôsobujúcej infarkt myokardu alebo cievnu mozgovú príhodu (Perkins et al., 2023). Prítomnosť rizika vzniku venóznej trombózy u HIV pozitívnych pacientov je dôvodom nasadenia trombo-profylaktickej terapie. Antikoagulancia sa stávajú neodmysliteľnou súčasťou terapeutického režimu tvoreného kombináciou antiretrovirov. Preferovanou voľbou tromboprolaxie u HIV pozitívnych pacientov sú priame orálne antikoagulancia (DOAC) – inhibítory trombínu (dabigatran) a inhibítory faktoru Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban a betrixaban) (Sabourin et al., 2021). Liečba tromboembolickej choroby HIV pacientov môže byť náročná vzhľadom na možné neželané interakcie liečivo-liečivo (DDI) pri konkomitantnej liečbe antiretrovirovými a antikoagulantami. Vzájomné pôsobenie jednotlivých liečiv užívaných pacientmi môže meniť ich expozíciu v krvnom obehú (Sabourin et al., 2021). Tieto perorálne užívané liečivá podliehajú transportu cez črevnú bariéru a práve v tomto mieste môžu vznikáť aj liekové interakcie (Martinec et al., 2019).

Tenké črevo (*intestinum tenue*) predstavuje hlavný orgán absorpcie vody, živín a elektrolytov potrebných pre správne fungovanie ľudského organizmu. Je navyše najdôležitejším miestom absorpcie liečiv užívaných perorálne, ktoré predstavujú najčastejšiu liekovú formu vo farmaceutickom priemysle. Neodmysliteľnou funkciou tenkého čreva je jeho bariérová funkcia brániaca prechodu mnohých patogénov a xenobiotík, vrátane liečiv, ktorých orálna biodostupnosť sa tým výrazne zníži. (Julio-Pieper and Bravo, 2016; Oostendorp et al., 2009). Transport molekúl epitelom čriev prebieha prevažne pasívnou difúziou alebo prostredníctvom aktívneho transportu za pomoci transportných proteínov zabudovaných do membrány enterocytov tenkého čreva realizujúcich uptake alebo eflux molekúl (Estudante et al., 2013). Najviac pozorovaným a študovaným efluxným transportérom z nadrodiny ABC transportérov v tenkom čreve je bezpochyby P-gp. Funguje ako efluxná pumpa zabraňujúca

prestupu xenobiotík do systémového obehu. Chráni tým organizmus a vytvára tak bariéru pred možným toxickým efektom látok (Estudante et al., 2013; Oostendorp et al., 2009). Mnoho liečiv z rôznych terapeutických skupín s odlišným charakterom účinku a variabilnou štruktúrou, sa transportuje práve prostredníctvom tohto transportného systému (Oostendorp et al., 2009). Liečivá môžu byť nielen substrátmi P-gp, ale dokážu naň pôsobiť inhibične ako inhibítory alebo indukčne ako induktory (Amin, 2013; Estudante et al., 2013).

Vzhľadom na fakt, že liečivo betrixaban je substrátom P-gp, súčasné užitie so silnými inhibítormi tohto transportéru, ktorými sú napr. PI – darunavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir, atazanavir, môže zvýšiť jeho plazmatické koncentrácie a tým prispieť k prejavom nežiadúcich účinkov v podobe zvýšeného rizika krvácania, ktoré môže mať závažné až fatálne následky. Opačná situácia v podobe protrombotického stavu by mohla nastať pri podaní induktorov P-gp (napr. NNRTI - nevirapin, efavirenz) spolu s betrixabanom, čím by sa mohla zvýšiť jeho exkrécia a výsledkom by bolo zníženie plazmatickej koncentrácie antikoagulancia. Liečivo darunavir navyše vykazuje okrem krátkodobého inhibičného potenciálu na P-gp v črevnej bariére vplyv opačný, a teda indukčný avšak až pri dlhodobom pôsobení na tento transportér. Pred nasadením terapie je teda nutné vyhodnotiť pomer risk-benefit a upraviť dávkovanie jednotlivých liečiv alebo zväziť výber konkrétnych liečiv od počiatku terapie (Bentounes et al., 2023; Hradecká, 2024; Huličiak et al., 2022; Martinec et al., 2019; Sankatsing et al., 2004; Skelley et al., 2018).

## 3. TEORETICKÁ ČASŤ

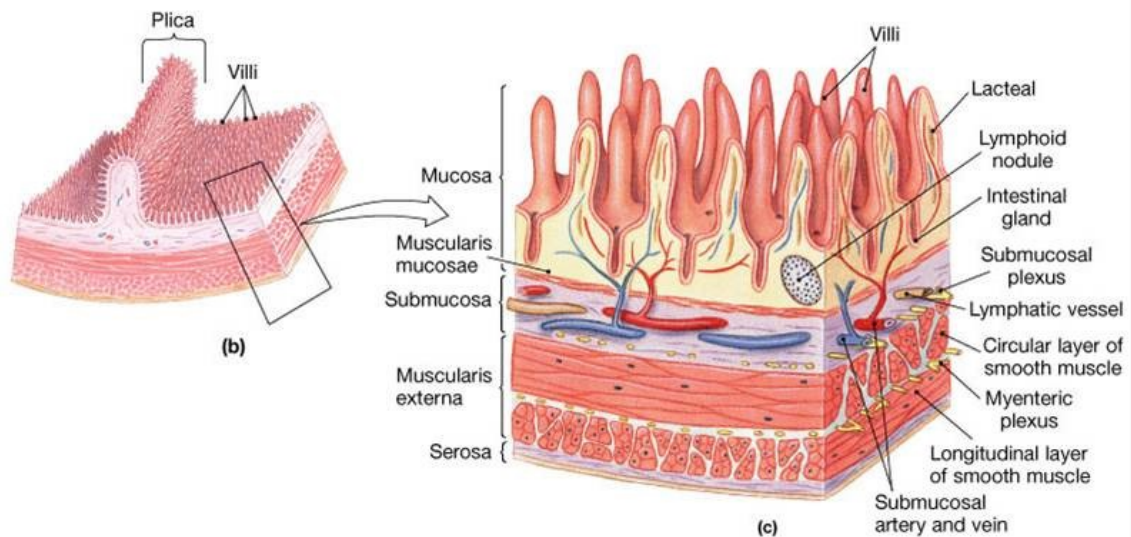
### 3.1. ČREVNÁ BARIÉRA

Tenké črevo (*intestinum tenue*) je orgánom gastrointestinálneho traktu. Predstavuje hlavný orgán absorpcie vody, živín a elektrolytov potrebných pre správne fungovanie ľudského organizmu. Je navyše najdôležitejším miestom absorpcie liečiv užívaných perorálne, ktoré predstavujú najčastejšiu liekovú formu vo farmaceutickom priemysle. Neodmysliteľnou funkciou tenkého čreva, podporujúcou obranyschopnosť tela, je jeho bariérová funkcia. Tvorí prirodzenú bariéru prestupu mnohých patogénov a xenobiôtík, vrátane liečiv, ktorých orálna biodostupnosť sa tým výrazne zníži (Julio-Pieper and Bravo, 2016; Oostendorp et al., 2009).

Tenké črevo je rozdelené do troch štrukturálnych častí – dvanástnik (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a bedrovník (*ileum*). Najkratším úsekom nadväzujúcim na žalúdok je *duodenum* s dĺžkou 20-25 centimetrov. Dôležitosť funkcie *duodena* nie je meraná jeho dĺžkou. Vďaka pankreatickým enzýmom sa tu uskutočňuje rozklad väčšiny bielkovín a žlč produkovaná v pečeni zabezpečuje emulgáciu tukov. Na *duodenum* nadväzuje *jejunum*, ktoré v našej štúdií poslúžilo ako biologický materiál pre experimenty. Je to úsek čreva dlhý 2,5 metra s primárnou funkciou absorpcie sacharidov, aminokyselín, mastných kyselín a z veľkej časti i liečiv. Konečným úsekom dlhým 3 metre je *ileum*. Všetky zvyšné živiny, ktoré sa neabsorbovali vo vyšších segmentoch, najmä vitamín B12 a žlčové kyseliny, sa absorbujú v tomto úseku tenkého čreva (Collins et al., 2023).

Histologicky je tenké črevo tvorené 4 vrstvami, (viď Obrázok 1) počnúc vonkajšou vrstvou serózou tvorenou z tenkej vrstvy buniek, vylučujúcej seróznou tekutinu a tenkej vrstvy spojivového tkaniva. *Tunica muscularis*, ako sám názov naznačuje, je oblasť tvorená hladkou svalovinou zodpovednou za peristaltický pohyb čriev. Susedí so submukózou, vrstvou spojivového tkaniva, ktoré slúži ako podpora pre sliznicu. Nazýva sa aj podslizničné väzivo. Je poprepletaná sieťou krvných a lymfatických ciev a nervovou pletňou. Sliznica, nazývaná aj mukóza, orientovaná do lumen čreva je najvnútornejšou vrstvou tenkého čreva. Štrukturálne ju tvoria klky. Tieto výbežky tvorené enterocytmi zväčšujú povrch čreva a tým maximalizujú proces absorpcie (Collins et al., 2023). Enterocyty sú navyše najdôležitejším extrahepatálnym miestom biotransformácie liečiv. Okrem absorpcie majú schopnosť metabolizovať perorálne podávané liečivá a iné xenobiôtiká (pre telo cudzorodé látky) ako aj endogénne látky prostredníctvom biotransformačných enzýmov fázy I a II. Konkrétnymi príkladmi sú

cytochróm P450 (CYP 3A4, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 2C19), glukuronyltransferáza, glutathion-S-transferáza, N-acetyltransferáza a ďalšie (Wolf and Paine, 2018; Zhang et al., 1999). Spolu s enzymatickou výbavou sa na enterocytoch tenkého čreva nachádzajú aj membránové transportné systémy riadiace pohyb látok cez črevnú membránu (Drozdik et al., 2020).



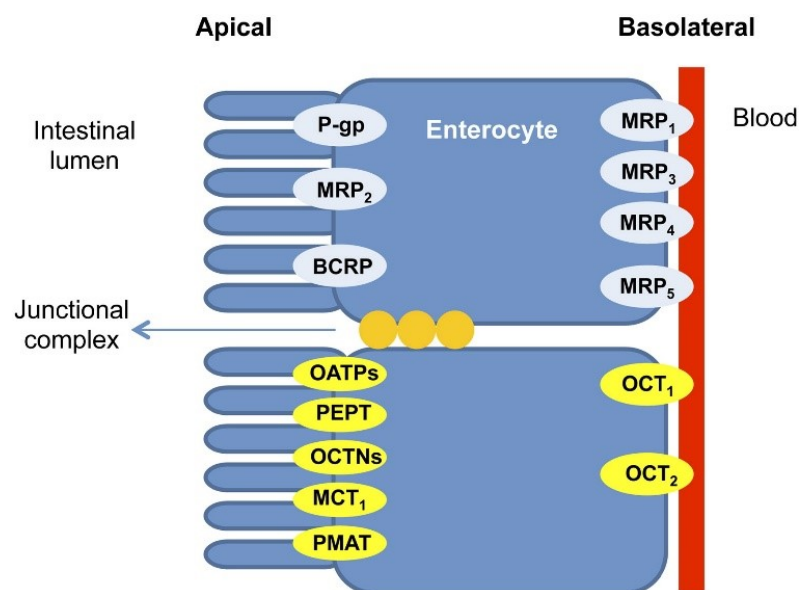
Obrázok 1: Znáznornenie jednotlivých vrstiev tenkého čreva. Prevzaté z (Austine Community College, 2008).

### 3.2. ČREVNÉ TRANSPORTÉRY

Perorálne užívané liečivé prípravky sú pre pacienta praktickou a jednoduchou voľbou, ktorá zabezpečuje vysokú adhérenciu k liečbe a aj vďaka tomu sú najčastejšie využívanou liekovou formou liečiv. Limitujúcim faktorom tejto liekovej formy môže byť biodostupnosť podávaného liečiva a z nej plynúci znížený klinický účinok. Na to, či sa účinok prejaví alebo naopak nie, má dosah niekoľko determinantov – fyzikálne-chemické vlastnosti liečiva (hydrofilita, lipofilita liečiva), farmaceutické faktory (lieková forma liečiva) a napokon aj fyziologické faktory (transportné systémy a aktivita enzýmových komplexov) (Oostendorp et al., 2009).

Podiel liečiva, ktoré v nezmenenej forme vstúpi do systémového obehu (biodostupnosť) je ovplyvnený jeho farmakokinetikou. Počiatočnou fázou farmakokinetiky je absorpcia na základe ktorej, je liečivo vstrebané do krvného obehu, ďalej distribuované do miesta účinku,

metabolizované a následne exkréciou vylúčené von z tela. Absorpcia po perorálnom podaní liečiva sa primárne uskutočňuje v tenkom čreve, z väčšej časti na enterocytoch horného úseku tenkého čreva s prihliadnutím na vlastnosti liečiva. Transport molekúl epitelom čriev prebieha prevažne pasívnou difúziou, prenášajúc molekuly cez cytoplazmatickú membránu v smere koncentračného gradientu alebo prostredníctvom aktívneho transportu za pomoci transportných proteínov. Tieto proteíny sú zabudované do membrány enterocytov a zabezpečujú aktívny transport, ktorý na rozdiel od pasívnej difúzie vyžaduje dodanie energie. Energia je najčastejšie získaná z hydrolýzy ATP molekuly alebo sprážením s prenosom inej molekuly, ktorá vytvorí gradient na prenesenie látky proti koncentračnému spádu. Transportéry sú exprimované na apikálnej (smerujúcej do lumen čreva) alebo bazolaterálnej membráne enterocytov podľa svojej funkcie (Estudante et al., 2013). V čreve prítomné transportéry môžeme podľa funkcie rozdeliť do dvoch tried – SLC transportéry (solute-carrier) realizujúce uptake a ABC transportéry (ATP-binding cassette) ako mediátory efluxu nielen liečiv, ale aj sacharidov, aminokyselín či nukleotidov (viď Obrázok 2) (Liu and Liu, 2013; Masaoka et al., 2006).

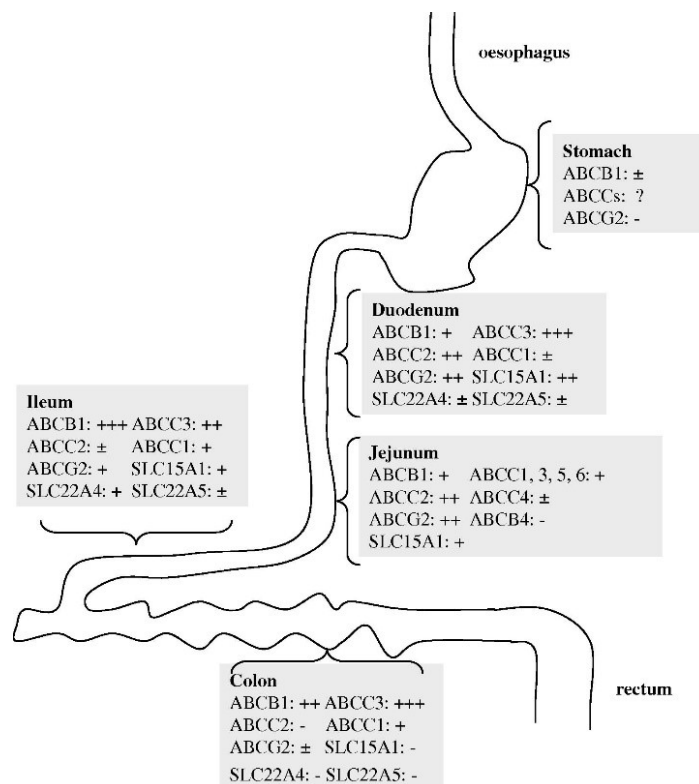


Obrázok 2: Expresia transportérov na enterocyte tenkého čreva. Uptake transportéry (znázornené žltou farbou) a efluxné transportéry (znázornené bielou farbou). P-glykoproteín (P-gp), multidrug resistance associated protein 2 (MRP2), breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated protein 1, 3, 4, 5 (MRP1, 3, 4, 5), organic anion transporting polypeptides (OATPs), peptide transporter protein (PEPT), carnitine/organic cation transporters (OCTNs), monocarboxylate transporter protein (MCT), plasma membrane monoamine transporter (PMAT), organic cation transporter 1 a 2 (OCT 1 a OCT 2). Prevzaté z (Estudante et al., 2013).



### 3.3. ATP-binding cassette transportéry

Do nadrodiny ABC efluxných transportérov lokalizovaných prevažne na apikálnej membráne enterocytov patrí 48 členov, klasifikovaných do 7 podrodín. Všeobecná štruktúra týchto transportérov obsahuje 2 transmembránové domény (TMD) a 2 domény viažúce nukleotidy (NBD). Naviazaním ATP molekuly na NBD sa uskutoční konformačná zmena v TMD, ktorá zabezpečí eflux naviazaných substrátov von z enterocytu do lumen čreva (viď Obrázok 4) (Chen et al., 2016). Tieto transportéry, ako už sám mechanizmus naznačuje, sú limitujúcim faktorom mnohých klinicky významných liečiv. Obmedzujú biodostupnosť liečiv zo skupiny antiretrovirotik (ritonavir, lopinavir, darunavir), imunosupresív (cyklosporín A, takrolimus) či antibiotík (klaritromycín, erytromycín). Deje sa tak v prípade, že sú tieto liečivá substrátmi jedného z ABC transportérov, ktoré vďaka energii čerpanej z hydrolyzy ATP aktívne pumpujú substráty proti koncentračnému gradientu a obmedzujú ich prestup do krvného obehu a ďalej do miesta účinku. Klinicky najvýznamnejšími z tejto nadrodiny transportérov sú P-glykoproteín (P-gp; MDR 1; ABCB1), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP 2; ABCC2) a breast cancer resistance protein (BCRP; ABCG2) (Estudante et al., 2013).



Obrázok 3: Znázornenie rôznorodej expresie transportérov ABC a SLC pozdĺž gastrointestinálneho traktu. Expresia ABCB1 (P-gp) vzostupne narastá, začínajúc od najmenej expresie v žalúdku (±) a duodene (+) po najväčšiu v ileu (+++) a kolone (++) . Expresia ABCC2 (MRP2) je najviac koncentrovaná v duodene (++)

a postupne sa znižuje smerom k ileu ( $\pm$ ) a kolonu (-). Najväčšia expresia ABCG2 (BCRP) je v duodenálnom (++) a jejunálnom (++) úseku a smerom k rektu sa znižuje. Zo zástupcov SLC transportérov má SLC15A1 (PEPT1) najvyššiu expresiu v duodene (++) , SLC22A4 (OCTN1) a SLC22A5 (OCTN2) v ileu (+/ $\pm$ ). Prevzaté z (Oostendorp et al., 2009).

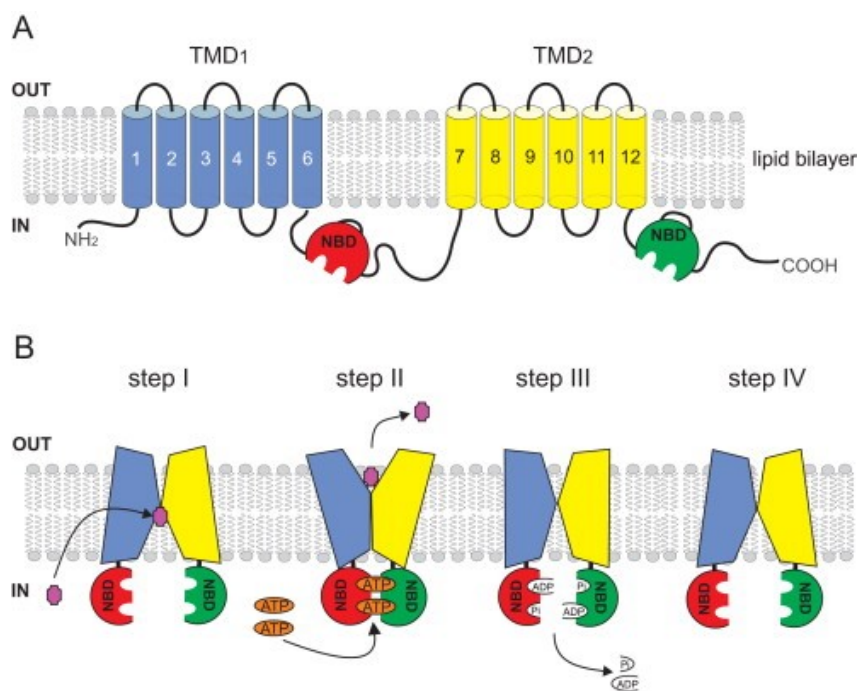
### 3.3.1. P-glykoproteín

Najviac pozorovaným a študovaným efluxným transportérom z nadrodiny ABC transportérov (ich štruktúra a princíp funkcie vid' Obrázok 4) v tenkom čreve je bezpochyby P-gp kódovaný génom *ABCB1*. Jeho objav je spojený s rezistenciou a zlyhaním protinádorovej terapie, pri ktorej bol prvýkrát izolovaný z rakovinových buniek. P-gp má prirodzenú bariérovú a exkretčnú funkciu a okrem rakovinových buniek je P-gp početne exprimovaný na apikálnej membráne epitelu čriev, obličiek, nadobličiek, pečene, placenty i hematoencefalickej bariéry. Funguje ako efluxná pumpa zamedzujúca prestupu xenobiotík do systémového obehu. Chráni tým organizmus a vytvára tak bariéru pred možným toxickým efektom látok. Expresia P-gp vzostupne narastá pozdĺž gastrointestinálneho traktu, začínajúc od najmenej expresie v žalúdku a duodene po najväčšiu v ileu a kolone (vid' Obrázok 3). Nerovnomernosť rozmiestnenia P-gp v rámci gastrointestinálneho traktu má vplyv na absorpciu a biodostupnosť liečiv po perorálnom podaní (Oostendorp et al., 2009).

Mnoho liečiv z rôznych terapeutických skupín s odlišným charakterom účinku a variabilnou štruktúrou, sa transportuje prostredníctvom tohto transportného systému (Oostendorp et al., 2009). Spoločným znakom pre P-gp substráty je ich lipofilita. Sice im ich štruktúra umožňuje jednoducho prestupovať epitelom pasívnou difúziou, P-gp uložený na apikálnej membráne enterocytu výrazne obmedzuje absorpciu a vylučuje látky späť do lumen čreva (Lin and Yamazaki, 2003). Substrátmi P-gp sú mnohé protinádorové liečivá (vinkristin, vinblastin, doxorubicin, daunorubicin), imunosupresíva (cyklosporín A, takrolimus), antiarytmiká (verapamil, digoxin) či antiretrovirotiká z triedy inhibítorov proteázy (ritonavir, lopinavir, darunavir) (Estudante et al., 2013; Liu and Liu, 2013; Martinec et al., 2019).

Liečivá môžu byť nielen substrátmi P-gp, ale dokážu naň pôsobiť inhibične ako inhibítory alebo indukčne ako induktory. Medzi inhibítory, liečivá znižujúce sekrečnú funkciu transportéra, sa radí napríklad verapamil, cyklosporín A, niektoré antiretrovirotiká zo skupiny inhibítorov proteáz alebo grapefruitová šťava. Táto inhibícia je najčastejšie dosiahnutá kompetitívnou alebo nekompetitívnou blokádou väzbového miesta substrátu. Do skupiny induktorov, ktoré naopak zvýšia efektivitu efluxu a môžu tak znížiť efektivitu liečby vedúcu až k jej zlyhaniu, patrí napríklad ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum*) alebo rifampicin

(Amin, 2013; Estudante et al., 2013). Podstata indukcie je riadená nukleárnymi receptormi konkrétne pregnanovým X receptorom (PXR) a konštitutívnym androstanovým receptorom (CAR). Oba receptory sú ligandom-indukovateľné transkripčné faktory, ktoré sú kľúčové pre zvýšenú expresiu P-gp. Niektoré látky dokážu týmto mechanizmom ovplyvňovať expresiu a aktivitu P-gp a navodiť tým zmenu v transporte látok (Chan et al., 2013; Haslam et al., 2008).



**Obrázok 4: Základná štruktúra a mechanizmus funkcie ABC-transportérov.** **A)** Znázorňuje štruktúru ABC-transportéra zloženého z dvoch TMD jednotiek (modrá a žltá) obsahujúcich šesť transmembránových segmentov a dvoch NBD jednotiek (červená a zelená). **B)** Znázorňuje mechanizmus funkcie ABC-transportéra začínajúci naviazaním substrátu (fialový) do miesta tvoreného jednotkami TMD (modrá a žltá). Následne nastane konformačná zmena v NBD jednotkách (zelená a červená), čím sa umožní väzba ATP molekuly (oranžová) a tvorba uzavretého NBD-diméru. Uzavretie NBD-diméru spôsobí konformačnú zmenu v TMD jednotkách, otvárajúcich sa smerom von, čím sa uskutoční eflux substrátu (krok II). Hydrolyza ATP iniciuje rozdelenie NBD diméru a konformačné zmeny TMD jednotiek (krok III). V poslednom kroku IV sa po uvoľnení fosfátu a ADP obnoví transportér do pôvodného stavu. Prevzaté z (Dermauw and Van Leeuwen, 2014).

### 3.3.2. Multidrug resistance-associated protein 2

Ďalším zástupcom z nadrodiny ABC efluxných transportérov lokalizovaných v tenkom čreve, pečeni, obličkách a placente je *ABCC2*, inak označovaný názvom MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2). Podobne ako P-gp je lokalizovaný na apikálnej membráne enterocytov, kde zohráva dôležitú úlohu pri eliminácii mnohých liečiv a konjugovaných (konjugáty glutathionu, glukuronidu a sulfátu) i nekonjugovaných xenobiotík (Chen et al., 2016). Podobnosť P-gp a MRP2 nie je iba v stavebnej štruktúre, mechanizme a lokalizácii na

apikálnej membráne. Ich substrátová špecifita sa navzájom prekrýva a predstavuje ešte náročnejší proces absorpcie liečiv. Prejavuje sa znásobením efluxu mnohých liečiv a endogénnych látok a v ich zníženej biodostupnosti. Substrátmi MRP2 sú napríklad liečivá zo skupiny antiretrovirotik (adefovir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir), antibiotík (ampicilin, azitromycin) či protinádorových liečiv (methotrexát, doxorubicin, vinblastin, vinkristin). Čím sa však výrazne líši od P-gp, je rozmiestnenie v gastrointestinálnom trakte. Expresia *ABCC2* je najviac koncentrovaná v duodene a postupne sa znižuje smerom k ileu a kolonu (viď Obrázok 3) (Estudante et al., 2013; Oostendorp et al., 2009).

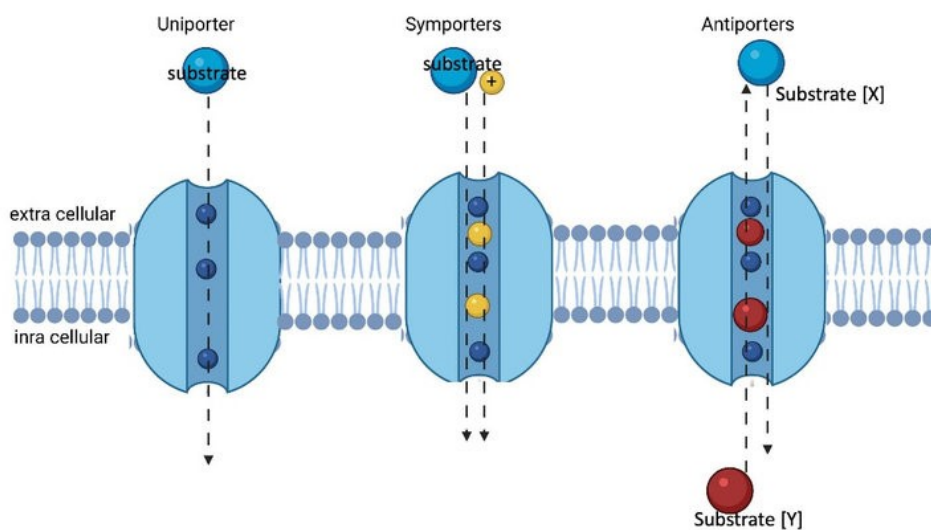
### 3.3.3. Breast cancer resistance protein

BCRP (breast cancer resistance protein) je ďalší významný efluxný transportér exprimovaný na apikálnej strane enterocytov patriaci spolu s P-gp a MRP2 do spomínanej nadrodiny ABC transportérov. Jeho názov je spojený s prvotnou izoláciou transportéru z ľudskej bunkovej línie rakoviny prsníka. Exprimovaný na apikálnej membráne enterocytov, podobne znižuje biodostupnosť mnohých liečiv (Estudante et al., 2013). Expresia BCRP pozdĺž gastrointestinálneho traktu nie je až tak premenlivá ako je to u P-gp. Najväčšia koncentrácia je pozorovaná v duodenálnom a jejunálnom úseku a smerom k rektu sa znižuje (viď Obrázok 3) (Oostendorp et al., 2009). Okrem gastrointestinálneho traktu je vo vysokej miere distribuovaný aj v placentе, pečeni, obličkách a mozgu. Prostredníctvom BCRP sú transportované substráty širokej škály, medzi ktoré patria napríklad antiretrovirotiká (nelfinavir, ritonavir) a imunosupresívum cyklosporín A (Estudante et al., 2013).

### 3.3.4. Solute carrier transportéry

Membránové transportéry z triedy SLC (solute carrier) schopné absorpcie aminokyselín, peptidov, sacharidov, vitamínov, žlčových kyselín, neurotransmitterov i liečiv sa v prevažnej väčšine nachádzajú opäť na apikálnej membráne enterocytov čreva. Bolo opísané množstvo rôznych intestinálnych SLC transportérov, najznámejšie z nich zohrávajúce významnú úlohu najmä pri absorpcii liečiv sú PEPT (peptide transporters), OCT (organic cation transporters), PMAT (plasma membrane monoamine transporters), OATP (organic anion transporters) a MCT (monocarboxylate transporter) (Estudante et al., 2013). Táto trieda transportérov nevyžaduje na rozdiel od ABC transportérov energiu ATP (Oostendorp et al.,

2009). Konkrétnym príkladom SCL transportu je uniporter, ktorý je ešte akosi formou pasívneho transportu prenášajúcou molekuly v smere koncentračného gradientu. Ďalšími sú tzv. aktívne kotransportéry symportu alebo antiportu, ktoré sprážujú transport dvoch molekúl v rovnakom smere alebo v protismere (vid' Obrázok 5). Generujú tým prostredie aktívneho transportu fungujúce na princípe koncentračného gradientu bez potreby využitia energie ATP a s výsledným presunom molekúl proti koncentračnému spádu. Využívajú energeticky nepriaznivú reakciu na podporu energeticky priaznivej a želanej reakcie (He et al., 2009; Oostendorp et al., 2009).



Obrázok 5: Znárodnenie troch typov SLC transportérov – uniporter, symport, antiport. Prevzaté z (Nielsen et al., 2021).

### 3.4. HIV A JEHO SÚČASNÁ LIEČBA

Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti, z angličtiny human immuno-deficiency virus (HIV), je retrovírus napádajúci imunitný systém človeka. S prevalenciou 39,0 miliónov nakazených osôb v roku 2022 je podľa WHO infekcia HIV celosvetovou epidémiou. Doteraz mu podľahlo už viac ako 40,4 miliónov pacientov. Vírus poškodzuje biele krvinky, konkrétne CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, ktoré využíva ako svoju hostiteľskú bunku na replikáciu. Následne sú CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty odsúdené na zánik a ich počet sa u nakazených rapídne znižuje, čím sa prehľbuje imunitná nedostatočnosť jedincov, ktorá môže vyústiť až do posledného štádia ochorenia AIDS. Toto infekčné ochorenie je prenášané krvou, a nechráneným pohlavným

stykom s HIV pozitívnou osobou alebo z infikovanej matky na dieťa počas tehotenstva, pôrodu a kojenia. Infekcia HIV je typická počiatočnou asymptomatickou fázou s postupnou deterioráciou imunitného systému ústiacej až do symptomatického a konečného štádia AIDS, pokiaľ nie je liečená účinnou antiretrovirálnou liečbou (Fragkou et al., 2023; “HIV and AIDS,” 2023; Vidya Vijayan et al., 2017).

Pohľad na ochorenie spôsobené infekciou HIV sa v priebehu posledných desaťročí zmenil z označenia akútneho a fatálneho ochorenia na chronické a to hlavne vďaka súčasnej vysokoaktívnej antiretrovirálnej terapii (HAART). HAART výrazne znížila mortalitu spojenú s HIV infekciou. Vďaka nej sa dožívajú HIV pacienti čoraz vyššieho veku a dokážu viesť oveľa kvalitnejší život podobný životu neinfikovaných osôb (Perkins et al., 2023).

Režim HAART je založený na kombinácii antiretrovirov, ktoré rôznym mechanizmom účinku zasahujú do odlišných krokov životného cyklu vírusu HIV. Takýmto režimom sa výrazne zvyšuje efektívnosť liečby (Pau and George, 2014). Najčastejšie používaná je kombinácia dvoch NRTI (nukleosidových/ nukleotidových inhibítorov reverznej transkriptázy) a jedného antiretrovirov z inej kategórie (NNRTI - nenukleosidový inhibítor reverznej transkriptázy, INI - inhibítor integrázy alebo PI - inhibítor proteázy posilnený ritonavírom). V terapii niektorých pacientov sa využíva režim dvojkombinácie liečiv dolutegravir (INI)/ lamivudin (NRTI) (Bentounes et al., 2023; “Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents With HIV,” 2022).

Prvou schválenou a do dnešného dňa veľmi dôležitou skupinou antiretrovirov sú NRTI. Nukleosidové inhibítory reverznej transkriptázy fungujú ako proliečivo, ktoré sa stane aktívnym až po intracelulárnej fosforylácii na difosfát alebo trifosfát. Ako sám názov naznačuje, mechanizmus účinku spočíva v inhibícii vírusového enzýmu reverznej transkriptázy. Blokováním sa naruší a ukončí premena vírusovej RNA na DNA a zastaví sa tým celá replikácia vírusu. Novší a menej toxickí zástupcovia NRTI sú tenofovir, lamivudin a abakavir (Holec et al., 2017; Pau and George, 2014).

Na prvý pohľad podobnou skupinou sú NNRTI (nenukleosidové inhibítory reverznej transkriptázy). Odlišujú sa tým, že nie je potrebná fosforylácia na ich aktiváciu. Mechanizmus spočíva v naviazaní a kompetitívnej inhibícii reverznej transkriptázy, čo vo výsledku prináša rovnako zastavenie replikácie vírusu. Veľkou nevýhodou NNRTI je ich metabolizmus prostredníctvom enzýmového komplexu CYP 450 a fakt, že sú jeho induktormi. Pri používaní so substrátmi CYP 450, ktorými sú aj samotné NNRTI, je prítomné riziko interakcii a zníženej

farmakologickej aktivity. Príkladom sú liečivá efavirenz a nevirapin (Pau and George, 2014). NNRTI sú zároveň schopné zvýšiť expresiu a indukciu P-gp a zvýšiť eflux mnohých substrátov, medzi ktoré NNRTI nepatria (Sankatsing et al., 2004).

Liečivá atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, ritonavir a saquinavir patria do skupiny inhibítorov proteázy (PI). Blokovaním enzýmu proteázy sa nabúra dozrievanie vírusu HIV. Slabou stránkou PI je častý výskyt nežiadúcich účinkov akými sú dyslipidémia, inzulínová rezistencia, lipodystrofia a rozvoj kardiovaskulárnych ochorení, čím prispievajú k rozvoju komorbidít spojených s HIV (Lv et al., 2015). V terapii sa štandardne využíva posilnenie účinku PI pomocou farmakokinetických boostrov, ktorými sú ritonavir (PI) a cobicistat (inhibítory CYP3A4). Využíva sa ich inhibičný potenciál na CYP3A4, čím sa zníži metabolizmus väčšiny PI a zvýši sa ich biodostupnosť. Umožní to nielen znížiť dávky PI, ale aj eliminovať spomínané nežiadúce účinky. Z toho vyplýva, že PI sú metabolizované cez cytochróm P450 (Pau and George, 2014). Štúdie ukázali, že niektoré z PI - lopinavir, ritonavir, saquinavir a atazanavir vykazujú aj významný inhibičný potenciál na P-gp v bunkách tenkého čreva (Martinec et al., 2019). P-glykoproteínom sprostredkovaný eflux, eliminujúci plazmatické koncentrácie liečiv, sa terapeuticky dá ovplyvniť použitím podobného mechanizmu ako pri inhibícii CYP3A4. Ritonavir i cobicistat vykazujú výrazný inhibičný efekt aj na tento transportér (Lepist et al., 2012; Robillard et al., 2014; Sankatsing et al., 2004).

Inhibítory integrázy (INI), dolutegravir a raltegravir, narušujú životný cyklus HIV iným mechanizmom blokujúcim enzým zodpovedný za inkorporovanie HIV DNA do DNA hostiteľskej CD4+ T bunky. Inhibíciou sa zastaví aj replikácia vírusu (Pau and George, 2014).

Ďalšie liečivo využívané v kombinovanej terapii HAART je antagonistu receptora CCR5 – maravirok (Pau and George, 2014). HIV vstupuje do buniek prostredníctvom väzby na chemokinový koreceptor CCR5 prítomný na povrchu CD4+ T buniek . Maravirok blokuje interakciu medzi HIV glykoproteínom a CCR5, čím sa podieľa na blokovaní vírusovej transmisie a replikácie (Xu et al., 2014). Keďže je substrátom CYP3A4 je potrebná opatrnosť pri koadministrácii s inhibítormi alebo induktormi enzýmového komplexu (Pau and George, 2014). Preukázala sa menšia inhibičná aktivita maraviroku na P-gp transportér a jeho interakčný potenciál, ale vo vysokých koncentráciach liečiva (Martinec et al., 2019). Z napísaného je teda zjavné, že mnohé vyššie vymenované antiretrovirotiká budú úzko spojené s problémom zvaným interakcie (Bentounes et al., 2023).

### **3.5. KOMORBIDITY SPOJENÉ S HIV INFEKCIOU**

Terapia HIV so sebou však priniesla nové problémy v podobe komorbidít spojených so signifikantne zvýšeným výskytom kardiovaskulárnych ochorení. Je to dané aj tým, že pacienti sa dožívajú čoraz vyššieho veku, čo prináša aj ďalšie zdravotné ťažkosti. Infekcia samotná je najčastejšie spätá so vznikom venózneho trombozy (hlboká žilná tromboza, pľúcna embólia) a arteriálnej trombozy spôsobujúcej infarkt myokardu alebo cievnú mozgovú príhodu (Perkins et al., 2023).

K bežným rizikovým faktorom rozvoja kardiovaskulárnych ochorení neinfikovanej populácie, ktorými sú hypertenzia, dyslipidémia, diabetes mellitus, rodinná anamnéza kardiovaskulárneho ochorenia, obezita či fajčenie, značne prispieva infekcia HIV odlišnými mechanizmami. Chronický zápal, nepretržitá imunitná aktivácia spôsobená replikáciou vírusu HIV, oportúnne infekcie, zmena črevného mikrobiómu a mnohé iné. Všetky tieto faktory vedú k poškodeniu endotelu ciev, vzniku aterosklerózy alebo k dysfunkcii koagulačného systému, ktoré prispievajú k rozvoju komorbidít. Kardiovaskulárne ochorenia u HIV pacientov vznikajú súhrou klasických rizikových faktorov, mechanizmov charakteristických pre HIV infekciu a toxicitou antiretrovirálnej terapie. Riziko rozvoja kardiovaskulárnych ochorení je u HIV pozitívnych pacientov v porovnaní s neinfikovanou populáciou až dvojnásobne vyššie a vplyvom stárnucej populácie HIV pacientov sa podiel kardiovaskulárnych ochorení v HIV populácii zvýšil z 0,36% v roku 1990 na 0,92%% v roku 2015 (Fragkou et al., 2023).

#### **3.5.1. ARTERIÁLNA TROMBÓZA**

Podkladom vzniku arteriálnej trombozy sú najčastejšie tromby vznikajúce pri erózii aterosklerotického plátu v arteriálnom riečisku (Previtali et al., 2011). Patogenéza aterosklerózy u HIV pacientov sa, až na malé odlišnosti, významne nelíši od neinfikovaných jedincov. Podkladom tvorby aterosklerotických plátov, ktoré sú u HIV pozitívnych pacientov prevažne nekalcifikované a tým pádom nestabilné, je dysfunkcia endotelialnej výstelky ciev, chronický zápal, transformácia makrofágov (premenené monocyty) na penové bunky a ich apoptóza. Mnohé mechanizmy charakteristické pre HIV infekciu, významne podporujú tvorbu aterosklerotických plátov (Fragkou et al., 2023).



- Chronický zápal a imunitná aktivácia

Infekcia HIV spôsobuje poruchy regulácie imunitného systému kontinuálnym napádaním CD4+ T-buniek. Vírus využíva tieto T-lymfocyty ako hostiteľské bunky na svoju replikáciu a na záver cyklu ich zničí, čím spôsobí ich vyčerpanie (Perkins et al., 2023). Neustála aktivácia imunitného systému prispievajúca k dysfunkcii cievneho endotelu môže byť faktorom rozvoja aterosklerózy (Fragkou et al., 2023). Ďalším faktorom prispievajúcim k rozvoju aterosklerózy je chronický zápal spôsobený spomínaným nedostatkom CD4+ T-buniek i pôsobením HIV proteínov (Tat, Nef, Env) vznikajúcich počas translácie mRNA v cytoplazme hostiteľskej bunky. Chronický zápal vedie k poškodeniu endotelu, ktorého prirodzenou funkciou je zabraňovať tvorbe krvných zrazenín prostredníctvom vylučovania antikoagulačných pôsobkov (oxid dusnatý, prostacyklín). Spojenie všetkých spomenutých faktorov vedie k aktivácii monocytov, ktoré exprimujú prozápalové markre - cytokíny ako je napríklad IL-6 (interleukín-6). Počiatočná fáza vírusovej replikácie (ramp-up-virémia) vyvoláva prozápalový výbuch cytokínov. Vznikajúci chronický zápal podporujú aj zvýšené hladiny C-reaktívneho proteínu (CRP), ktoré sú u HIV pacientov pozorované. Chronický zápal a imunitná aktivácia spoločne prispievajú k dysfunkcii endotelových buniek ciev, vzniku aterosklerotického plátu, jeho ruptúry a aktivácii krvných doštičiek, ktoré zvyšujú riziko vzniku arteriálnej trombózy (viď **Obrázok 6**) (Perkins et al., 2023).

- Zmena v tukovom tkanive a metabolizme tukov

Existuje priama súvislosť medzi tukovým tkanivom a HIV vírusom ako faktorom vzniku kardiovaskulárnych ochorení u HIV pacientov (Fragkou et al., 2023). Tukové tkanivo a zmena metabolizmu lipidov je čoraz častejšie spájaná s chronickým zápalom, ktorý je prítomný pri HIV infekcii (Wan et al., 2023). Tukové tkanivo funguje ako rezervoár vytvárajúci zápalové prostredie plné infikovaných CD4+ T-buniek a makrofágov. Proteíny vytvorené samotným vírusom (Tat, Nef, Env) sa zhromažďujú taktiež v tukovom tkanive, kde aktivujú adipocity a tie produkujú prozápalové pôsobky podporujúce kontinuitu chronického zápalu. Výsledkom zmeneného metabolizmu tukov sú zvýšené sérové hladiny VLDL (very-low-density-cholesterole) a TAG (triacylglyceoly), ktoré taktiež zvyšujú riziko vzniku arteriálnej trombózy (Fragkou et al., 2023).

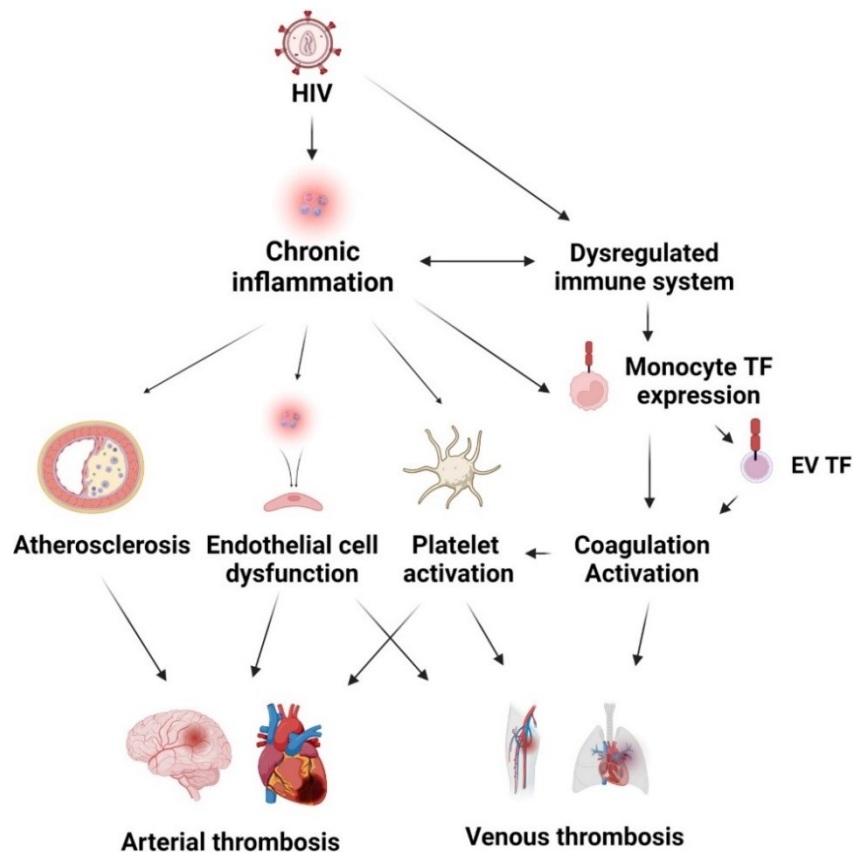
- Translokácia črevného mikrobiómu

Črevný mikrobióm zohráva veľmi dôležitú úlohu pri udržaní obranyschopnosti organizmu. HIV infekcia je spojená s rozvratom mikrobiómu v prospech patogénnych

mikrobiálnych druhov na úkor tých prospešných. Jeho poškodením sa naruší rovnováha dôležitej črevnej bariéry organizmu, čo vedie k zvýšenej permeabilite sliznice čreva. Toto poškodenie gastrointestinálneho traktu sa manifestuje zápalom slizničného epitelu, stratou fagocytárnej funkcie a poškodením enterocytov s narušením tesných spojov. Zmeny fyziologickej funkcie črevnej bariéry vedú k zvýšenému prechodu (translokácii) črevnej mikroflóry a mikrobiálnych produktov do krvného obehu, kde môžu spustiť aktiváciu imunitného systému a podporovať rozvoj chronickej imunitnej aktivácie sprevádzajúcej infekciu HIV. (MacCann et al., 2023; Marchetti et al., 2013). Nedá sa teda opomenúť faktom o translokácii črevného mikrobiómu do krvného obehu pacienta, ku ktorému u HIV pacientov pri akútnej infekcii i chronickej progresii ochorenia dochádza. Tento stav následne prispieva k poškodeniu endoteliálnej výstelky ciev a je spojený s hyperkoagulačným stavom vedúcim k vzniku krvných zrazenín a arteriálnej trombózy (Fragkou et al., 2023; Marchetti et al., 2013).

- Toxicita antiretrovirov

Chronické užívanie HAART prináša pacientom benefity v podobe lepšej prognózy života s nevyliciteľnou chorobou, ktorou HIV je. Efekt kumulatívnej dávky spojený s celoživotným užívaním kombinácie antiretrovirov so sebou však prináša i nepriaznivé účinky, ktorými je kardiotoxicita liečby (Vos and Venter, 2021). Vedľajšie účinky liečby sa prejavujú napríklad zmenou hladín cholesterolu v krvi a zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych ochorení. Na úkor terapie podstaty samotného ochorenia spôsobeného HIV vírusom sa navyše hromadia nežiadúce účinky spojené s farmakoterapiou (Wan et al., 2023).



**Obrázok 6:** Faktory prítomné u HIV pacientov podieľajúce sa na vzniku venózneho a arteriálneho tromboembolizmu. Prevzaté z (Perkins et al., 2023).

### 3.5.2. VENÓZNY TROMBOEMBOLIZMUS

Hlboká žilná trombóza (HŽT) a pľúcna embólia (PE) sú dva najčastejšie prejavy tromboembolickej choroby (TECH), ktoré sa často vyskytujú aj v HIV infikovanej populácii pacientov. Toto, mnohokrát podceňované ochorenie, je život-ohrozujúce s často fatálnymi následkami. Včas započatá prevencia je kľúčom k úspechu. Primárna prevencia spočíva v ovplyvnení rizikových faktorov vzniku ochorenia. Pokiaľ sa už tromboembolická choroba začala, cieľom je znížiť riziko klinických prejavov a zamedziť rozvoju ochorenia v rámci sekundárnej prevencie využitím tromboprolaxie (Lutsey and Zakai, 2023).

Patofyziológia venózneho tromboembolizmu je bežne charakterizovaná Virchowovou triádou, ktorá opisuje tri faktory podieľajúce sa na vzniku trombov vo vénach. Stáza krvi, hyperkoagulačný stav a poškodenie endotelu sa spoločne prekrývajú a prispievajú k zvýšenému riziku vzniku krvných zrazenín (Previtali et al., 2011).

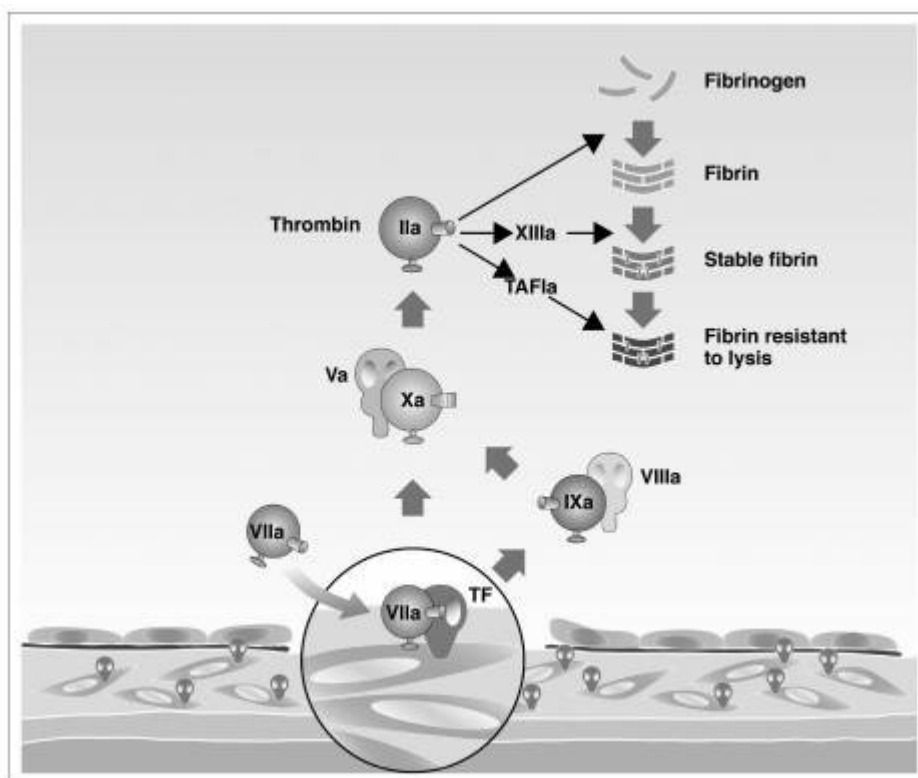
Súvislosti medzi HIV infekciou a protrombotickým stavom infikovaných pacientov boli dokázané mnohými štúdiami. Riziko vzniku tromboembolickej choroby v HIV populácii pacientov je podľa posledných štúdií 2 až 10-krát vyššie než v bežnej neinfikovanej populácii. Napriek tak vysokému riziku je povedomie o tomto fenoméne stále malé (Bibas et al., 2011). Chronickým zápalom a neustálou aktiváciou imunitného systému sú aktivované monocyty (biele krvinky). Tie okrem prozápalových faktorov poškodzujúcich endotel žíl, exprimujú prokoagulačný tkanivový faktor (TF). Ten je príčinou aktivácie koagulačného systému a následného vzniku žilnej trombózy (viď Obrázok 7). Aktiváciu koagulačného systému potvrdzujú zvýšené hladiny D-dimérov, ktoré sú detekovateľným ukazovateľom vzniknutých trombov (Perkins et al., 2023). Ako už bolo vyššie spomenuté v spojení s arteriálnou trombózou, zápalové cytokíny, zvýšené hladiny CRP či prítomnosť vírusových proteínov potencuje poškodenie endotelu ciev a jeho prestavbu, ktorá prispieva i k rozvoju venózneho tromboembolizmu (Bentounes et al., 2023).

Rizikové faktory vzniku venózneho tromboembolizmu spojené s HIV infekciou sa od klasických (vek, fajčenie, imobilita, genetická predispozícia) pomerne líšia. Zdá sa, že sa aj vo väčšej miere podieľajú na rozvoji tromboembolickej choroby (Crum-Cianflone et al., 2008).

Vek patrí medzi bežné rizikové faktory vzniku trombov. Jeho rizikovosť sa markantne zvyšuje u HIV infikovaných pacientov. Títo pacienti sú v skutočnosti starší ako je ich chronologický vek. Zažívajú predčasné starnutie, kvôli neustálej imunitnej nedostatočnosti (Bibas et al., 2011).

Významným rizikovým faktorom je hyperkoagulačný stav spôsobený endotelovou dysfunkciou a s ňou spojeným deficitom vazodilatačných a antikoagulačných látok (NO, prostacyklín); nedostatočnou tvorbou plazmatických proteínov S a C, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri inhibícii koagulácie; zvýšené hladiny tkanivového faktoru (princíp funkcie TF pri vzniku trombov viď Obrázok 7) a korelujúce hladiny D-dimérov ako ukazovateľa vzniku trombov (Bibas et al., 2011).

Vyššie riziko vzniku malignít u HIV pozitívnych pacientov súvisí aj s väčším rizikom vzniku tromboembolickej choroby kvôli už spomínanému hyperkoagulačnému stavu (Pastori et al., 2023). Nádorové bunky sú tiež schopné uvoľňovať tkanivový faktor, ktorý podporuje vznik trombu (princíp funkcie TF pri vzniku trombov viď Obrázok 7). Tumory navyše často utláčajú žily a kompresiou spôsobia stázu krvi, ktorá je jedným z faktorov podieľajúcim sa na vzniku trombov v žilách (Previtali et al., 2011).



Obrázok 7: Znázorňuje úlohu tkanivového faktoru (TF) a koagulačného faktoru VII na rozvoji koagulačného procesu a vzniku trombu. Prevzaté z (Previtali et al., 2011).

Infekcie ako také sú rizikovým faktorom tromboembolickej choroby aj u bežnej populácie. S HIV infekciou je spojená nízka obranyschopnosť organizmu a vyššia náchylnosť k oportúnnym infekciám spôsobených najmä patogénmi *Pneumocystis jirovecii*, *Cytomegalovirus* a *Mycobacterium avium*, ktoré majú svoj podiel na vzniku trombov (Bibas et al., 2011).

Samotná terapia antiretrovirotikami predlžuje a zlepšuje životy infikovaných. S predĺžením života sa však nesie riziko vzniku mnohých komorbidít. Kontroverznosť ďalšieho rizikového faktoru, ktorým je samotná terapia liečivami zo skupiny PI, spočíva v narušení regulácie tvorby proteínov krvného zrážania, ktoré vedie k vzniku trombóz (Bibas et al., 2011; Kann et al., 2021).

Gravidita žien patrí k rizikovým stavom z hľadiska vzniku trombov aj za bežných okolností a je spôsobená hyperkoagulačným stavom. Toto riziko je 157-krát vyššie u tehotných HIV pozitívnych žien ako u tehotných HIV negatívnych žien (Bibas et al., 2011; Previtali et al., 2011). Dôvodom je fyziologické zníženie antikoagulačných proteínov (proteín S) o 40-50% a hladiny antitrombínu o 20% (Pastori et al., 2023).

Intravenózne užívanie drog patrí k rizikovým faktorom často sa vyskytujúcim u HIV pacientov. Príčinou vzniku žilnej trombózy je najmä poškodenie žíl opakovaným aplikovaním drogy (Jain et al., 2021).

### 3.6. TROMBOPROFYLAXIA U PACIENTOV S HIV

Všetky spomínané rizikové faktory vzniku venózne trombózy sú dôvodom nasadenia trombo-profylaktickej terapie u HIV pozitívnych pacientov. Antikoagulancia sa stávajú neodmysliteľnou súčasťou terapeutického režimu tvoreného kombináciou antiretrovirotik (HAART). Preferovanou voľbou tromboproylaxie sú priame orálne antikoagulancia (DOAC) – inhibítory trombínu (dabigatran) a inhibítory faktoru Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban a betrixaban) (Sabourin et al., 2021). Počas tehotenstva je u HIV pacientiek bezpečnou voľbou antikoagulačná terapia nízko-molekulárnymi heparínmi, ktoré neprestupujú placentou a vykazujú bezpečnosť pre matku i plod v porovnaní s kontraindikovaným warfarinom a liečivami zo skupiny DOAC (James, 2009). Oproti warfarinu majú menší potenciál vzniku interakcii, nemajú tak prísne obmedzenia v stravovaní a nie je nutná pravidelná kontrola INR (international normalized ratio), ktoré má veľmi úzke rozpätie bezpečnosti nazývané aj terapeutické okno (2,0-3,0) (George et al., 2020). Terapeutické okno priamych antikoagulancií je širšie a farmakokinetika je predvídateľnejšia, čo umožňuje fixné dávkovanie v porovnaní s individuálnou titráciou dávok warfarinu. Dlhé obdobie bolo nevýhodou liečiv zo skupiny DOAC nemožnosť zvrátiť antikoagulačný efekt pomocou antidota, pretože neexistovalo. Jeho nedostupnosť bola veľkým nedostatkom liečby. Účinok warfarinu, inhibítora vitamínu K, sa dal jednoducho zvrátiť použitím antidota vitamínu K. Nedávno však FDA schválila aj antidotum pre dabigatran a inhibítory faktoru Xa. Idaricizumab je antagonistu účinku dabigatranu a andexanet alfa sa viaže na inhibítory faktoru Xa a zabraňuje ich antikoagulačnému účinku (Chaudhary et al., 2020).

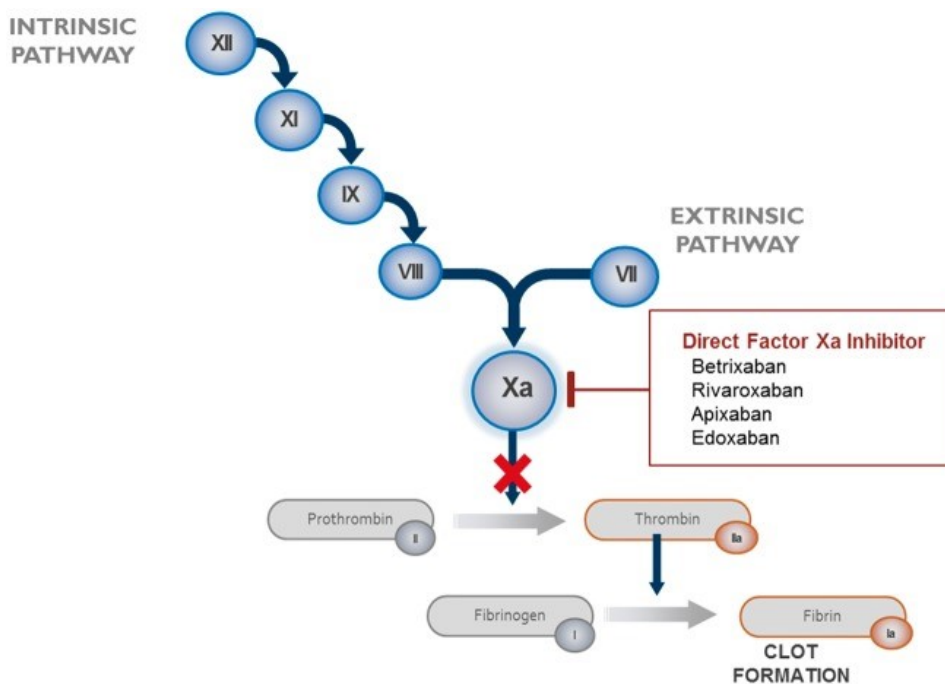
Liečba tromboembolickej choroby HIV pacientov môže byť náročná vzhľadom na možné neželané interakcie liečivo-liečivo (DDI) pri konkomitantnej liečbe antiretrovirotikami a antikoagulanciami. Vzájomné pôsobenie jednotlivých liečiv užívaných pacientmi môže meniť ich expozíciu v krvnom obeh (Sabourin et al., 2021). Niektoré antiretrovirotiká, konkrétne inhibítory proteázy sú silnými inhibítormi cytochrómu P450 (CYP3A4) i efluxného transportéru P-gp. Niektoré sú tzv. farmakokinetickými boosterami (ritonavir, kobicistat). Pri súčasnom používaní týchto liečiv je nutné pozorne zvážiť bezpečnosť interakcie, poprípade

redukciu dávok DOAC-u. Nemožnosť monitoringu liečby priamymi antikoagulanciami ako je kontrola INR u warfarinizovaných pacientov, je v otázke interakcii nevýhodná (George et al., 2020).

### 3.6.1. BETRIXABAN

Prvé orálne antikoagulans schválené FDA v roku 2017 v indikácii prevencie tromboembolickej choroby s mechanizmom účinku inhibície faktoru Xa (viď Obrázok 8) bolo liečivo betrixaban. Patrí do skupiny zvanej priame orálne antikoagulancia (DOAC – direct oral anticoagulants), s ktorou má v určitých parametroch mnoho podobností ale aj odlišností. Má dlhší plazmatický polčas ( $t_{1/2}=19-27$  h) a rýchlejší nástup účinku. Veľkou výhodou je maximálna plazmatická koncentrácia liečiva dosiahnutá v priebehu 3-4 hodín, čo znamená, že pacient je takmer okamžite pokrytý antikoagulačnou terapiou a nie je potrebné používať LMWH (nízko-molekulárne heparíny) na prekrytie obdobia nástupu účinku (Lekura and Kalus, 2018). Biodostupnosť po perorálnom užití betrixabanu je takmer 35% (Skelley et al., 2018).

Na rozdiel od ostatných DOAC-ov, hlavnou metabolickou cestou pre betrixaban nie je metabolizmus cez CYP 450. Táto skutočnosť naznačuje nízky potenciál cytochrómových interakcií (Lekura and Kalus, 2018). Veľkou nevýhodou sú interakcie na úrovni efluxného transportéru P-gp, ktorého substrátom je aj betrixaban. Z prevažnej časti (82-89%) prebieha exkrécia nezmeneného liečiva biliárnou sekréciou do čreva prostredníctvom tohto transportéru, kde sa intestinálnou reabsorpciou liečivo zúčastňuje enterohepatálnej cirkulácie. Kontrola hladín pri administrácii s inými liečivami, ktoré sú potenciálnymi inhibítormi alebo induktormi tohto transportéru je teda nutná (Murphy et al., 2018; Roberts et al., 2002; Skelley et al., 2018).



Obrázok 8: Znáznornenie mechanizmu účinku priamych orálnych antikoagulancií (DOAC) – inhibítorov faktoru Xa v koagulačnej kaskáde. Prevzaté z (Huisman and Klok, 2018).

Aj napriek pozitívnym výsledkom z APEX štúdie a efektívite nákladov bol v roku 2020 betrixaban výrobcom stiahnutý z trhu z nezávislých obchodných dôvodov. Táto štúdia bola randomizovaná, dvojito-zaslepená klinická štúdia porovnávajúca bezpečnosť a účinnosť predĺženej liečby betrixabanom so štandardnou krátkodobou liečbou enoxaparínom v rámci profylaxie venózneho tromboembolizmu u pacientov vo vysokom riziku jeho rozvoja (Lee et al., 2021).

Síce bolo liečivo betrixaban v roku 2017 schválené FDA a v roku 2020 stiahnuté z trhu, nikdy nedostalo povolenie na uvedenie na trh od spoločnosti EMA v Európe. Výsledky štúdie APEX, zhodnotila EMA ako nedostatočne-hodnotiace účinnosť liečiva. Významná výhrada voči schváleniu bolo zvýšené riziko epizód krvácania oproti pacientom liečeným porovnávaným liečivom (enoxaparín). Zhodnotenie pomeru risk-benefit prinieslo zamietnutie povolenia uviesť liečivo na trh (Daryabari et al., 2024).

### 3.6.2. INTERAKCIE BETRIXABANU A ANTIRETROVIROTÍK

Liečivá zo skupiny DOAC sa vyznačujú dobre predvídateľnou farmakokinetikou a širokým terapeutickým oknom. Napriek tomu existuje u HIV pacientov možnosť vzniku interakcii medzi antiretrovirotikami a priamymi orálnymi antikoagulanciami, vystavujú



pacienta riziku vzniku krvácania alebo opačného efektu vzniku trombov (Bentounes et al., 2023). Tieto perorálne užívané liečivá podliehajú transportu cez črevnú bariéru a práve v tomto mieste môžu vznikáť aj liekové interakcie (Martinec et al., 2019). Pri HAART je vyžadovaná vysoká adherencia pacientov k terapii, aby bol vírus dostatočne suprimovaný a nedochádzalo k rozvoju rezistencie na liečbu. Dôsledky non-adherencie liečby a odmietanie dodržiavať nastavený režim sa spájajú s nežiadúcimi účinkami sprevádzajúcimi terapiu samotného HIV a jeho komorbidít (Martinec et al., 2019; Robillard et al., 2014).

Vzhľadom na fakt, že betrixaban je substrátom P-gp, súčasné užitie so silnými inhibítormi tohto transportéru, ktorými sú najmä PI – darunavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir, atazanavir, môže zvýšiť jeho plazmatické koncentrácie a tým prispieť k prejavom nežiadúcich účinkov v podobe zvýšeného rizika krvácania, ktoré môže mať závažné až fatálne následky. Opačná situácia v podobe protrombotického stavu by mohla nastať pri podaní induktorov P-gp (NNRTI - nevirapin, efavirenz) spolu s betrixabanom, čím by sa zvýšila jeho exkrécia a výsledkom by bolo zníženie plazmatickej koncentrácie antikoagulancia. Liečivo darunavir navyše vykazuje okrem krátkodobého inhibičného potenciálu na P-gp v črevnej bariére vplyv opačný, a teda indukčný avšak pri dlhodobom pôsobení na tento transportér. Pred nasadením terapie je teda nutné vyhodnotiť pomer risk-benefit a upraviť dávkovanie jednotlivých liečiv alebo zväziť výber konkrétnych liečiv od počiatku terapie. Monitoring týchto pacientov je vhodnou formou kontroly nežiadúcich účinkov farmakoterapie (Bentounes et al., 2023; Hradecká, 2024; Huličiak et al., 2022; Martinec et al., 2019; Sankatsing et al., 2004; Skelley et al., 2018).

## 4. HYPOTÉZA A CIELE PRÁCE

Betrixaban je známym substrátom P-gp (Skelley et al., 2018). Pri súčasnom podaní s antiretrovirotikami inhibujúcimi P-gp predpokladáme, že sa zvýši jeho priechod črevnou bariérou. Naopak pri dlhodobom podávaní s antiretrovirotikami, ktoré majú indukčný potenciál na expresiu P-gp bude dochádzať k opačnému efektu a teda k zníženiu absorpcie z dôvodu zvýšeného efluxu. Darunavir je liečivo, ktoré vykazuje krátkodobý inhibičný potenciál na P-gp v črevnej bariére, avšak pri dlhodobom pôsobení môže mať na tento transportér vplyv opačný a teda indukčný (Hradecká, 2024; Huličiak et al., 2022). Z tohto dôvodu sme ho vybrali ako látku pre inhibičnú i pre indukčnú štúdiu.

Cieľom práce je štúdium interakcií priamo-pôsoiaceho antikoagulancia betrixabanu s antiretrovirotikom darunavirom zo skupiny proteázových inhibítorov za využitia ultratenkých tkanivových rezov z ľudského čreva. Interakcie budú študované na úrovni inhibície a indukcie.

## 5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

2-propranolol	(Sigma-Aldrich)
Acetonitril (ACN)	(VWR chemicals)
Agaróza low gelling typ VII-A	(Sigma-Aldrich)
Amfotericin B	(Sigma-Aldrich)
ATP - standard	(Sigma-Aldrich)
Betrixaban	(Sigma Aldrich)
Betrixaban D6	(MedChemExpress)
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	(Penta chemicals)
CP-100356 monohydrochlorid (CP)	(Sigma-Aldrich)
Darunavir	(Sigma-Aldrich)
D-glukóza	(Penta chemicals)
EDTA	(Sigma-Aldrich)
Ethanol 96%	(VWR chemicals)
Gentamycin	(Thermo Fisher Scientific)
HEPES	(Carl Roth)
KCl	(Pentachemicals)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Pentachemicals)
Kyselina mravčia pre LCMS	(VWR chemicals)
Luciferáza	(Thermo Fisher Scientific)
Methanol	(VWR chemicals)
MilliQ voda	(Millipore)

Mravčan amónny pre LCMS	(Sigma Aldrich)
NaCl	(Penta chemicals)
NaHCO <sub>3</sub>	(Penta chemicals)
NaOH	(Lachner)
Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit	(Thermo Fisher Scientific)
Rhodamin 123 (RHD123)	(Sigma-Aldrich)
Rifampicin	(Sigma-Aldrich)
Tris-HCl	(Sigma-Aldrich)
Williams E medium - GlutaMax <sup>TM</sup>	(Thermo Fisher Scientific)

## 5.2. PRÍPRAVA ROZTOKOV

### 5.2.1. Zásobný roztok Krebs-Henseleitov pufr

Po rozpustení všetkých zlúčenín podľa rozpisu vid' Tabuľka 1 je roztok prefiltrovaný cez sterilný filter (0,22 µm) a rozplnený do jednorázových sterilných kelímkov po 100 ml. Uchováva sa v chladničke do doby spotreby.

Tabuľka 1: Príprava zásobného roztoku Krebs-Henseleitovho pufru (KHB) – 10x koncentrovaný.

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
NaCl	69,0 g
KCl	3,73 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,63 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	2,71 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	3,67 g
Doplniť vodou do objemu	1000 ml

### 5.2.2. Pracovný roztok Krebs-Henseleitov pufr

Po rozpustení všetkých zlúčenín vid' Tabuľka 2 je roztok okyslíčený pomocou pneumoxidu (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 30 minút. Následne je upravené pH roztoku na 7,42 pomocou 5 M NaOH.

Tabuľka 2: Príprava pracovného roztoku Krebs-Henseleitovho pufru – 1x koncentrovaný.

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
NaHCO <sub>3</sub>	2,10 g
D-glukóza	4,95 g
HEPES	2,38 g
Zásobný roztok KHB	100 ml
Doplniť vodou do objemu	1000 ml

### 5.2.3. Pracovný roztok inkubačného média Williams E medium (WME)

Na prípravu pracovného roztoku inkubačného média je potrebné do komerčne zakúpeného WME média doplniť antibiotika, antimykotika a D-glukózu. Gentamycin a

Amfotericin B, vo forme sterilných roztokov, sú do média pipetované priamo podľa Tabuľka 3. D-glukóza je najskôr navážená v nesterilnom prostredí a následne je v laminárnom boxe rozpustená v malom množstve WME. Vzniknutý roztok je v laminárnom boxe prefiltrovaný cez sterilný filter (0,22  $\mu\text{m}$ ) a vrátený naspäť do zásobnej nádoby WME. Takto pripravené médium je ešte v deň experimentu zahriate na 37 °C na vodní lázni a rozpipetované do doštičiek. Prípadne je do média v medzikroku pridaná študovaná látka.

Tabuľka 3: Príprava inkubačného média WME na inkubáciu črevných rezov.

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
WME + L-glutamin	500 ml
Gentamycin (50 mg ml <sup>-1</sup> )	500 $\mu\text{l}$
Amfotericin B (250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	5 ml
D-glukóza	1,375 g

#### 5.2.4. Sonifikačný roztok na stanovenia koncentrácie ATP

Navážka EDTA (viď Tabuľka 4) je rozpustená v približne 100 ml vody a pH je upravené pomocou 5 M roztoku NaOH na hodnotu 10,9. Následne je pridaný ethanol (96 %) a objem doplnený v odmernej banke vodou do 500 ml.

Tabuľka 4: Príprava sonifikačného roztoku (SONOP) na stanovenie ATP (70 % (vol/vol) ethanol, 2 mM EDTA, pH 10,9).

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
EDTA	0,372 g
Ethanol 96 %	370 ml
NaOH (úprava pH)	podľa potreby
MilliQ voda	na doplnenie do 500 ml

#### 5.2.5. Tris/EDTA pufr na stanovenie koncentrácie ATP

EDTA a Tris HCl sú prvotne rozpustené v objeme približne 300 ml MilliQ vody. Následne je pH upravené pomocou HCl na hodnotu 7,6 a doplnená voda do objemu 500 ml v odmernej banke.

Tabuľka 5: Príprava Tris/EDTA pufru na analýzu hladiny ATP (100 mM TrisHCl, 2 mM EDTA, pH 7,6).

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
Tris HCl	6 g
EDTA	0,37 g
MilliQ voda	do 500 ml

### 5.2.6. Príprava 3 % roztoku agarózy

Jednotlivé zlúčeniny sú navážené podľa Tabuľka 6. Následne je pridaná voda a teflónové miešadlo, ktoré umožní zmiesiť roztok na magnetickej miešačke. Zmes je zahriata na teplotu približne 80 °C (musí byť vyššia ako 60 °C), čím je dosiahnuté rozpustenie agarózy. Takto pripravená agaróza je následne schladená na teplotu 37 °C (pri tejto teplote je agaróza kvapalná neobmedzenú dobu) a využitá v experimente alebo je uložená do chladničky na opätovné použitie neskôr. V chladničke agaróza zgelovatie (teplota zgelovania je 26°C) a je nutné ju opäť zahriať na teplotu vyššiu ako 60 °C, aby došlo k prevedeniu gélu opäť do tekutej formy.

Tabuľka 6: Príprava 3% agarózy pre fixáciu vzoriek čreva pred krájaním.

Zlúčenina	Navážka/ Množstvo
NaCl	0,9 g
Agaróza low gelling typ VII-A	3,0 g
MilliQ voda	do 100 ml

## 5.3. METODIKA PRÁCE

### 5.3.1. Human precision cut intestinal slices (hPCIS)

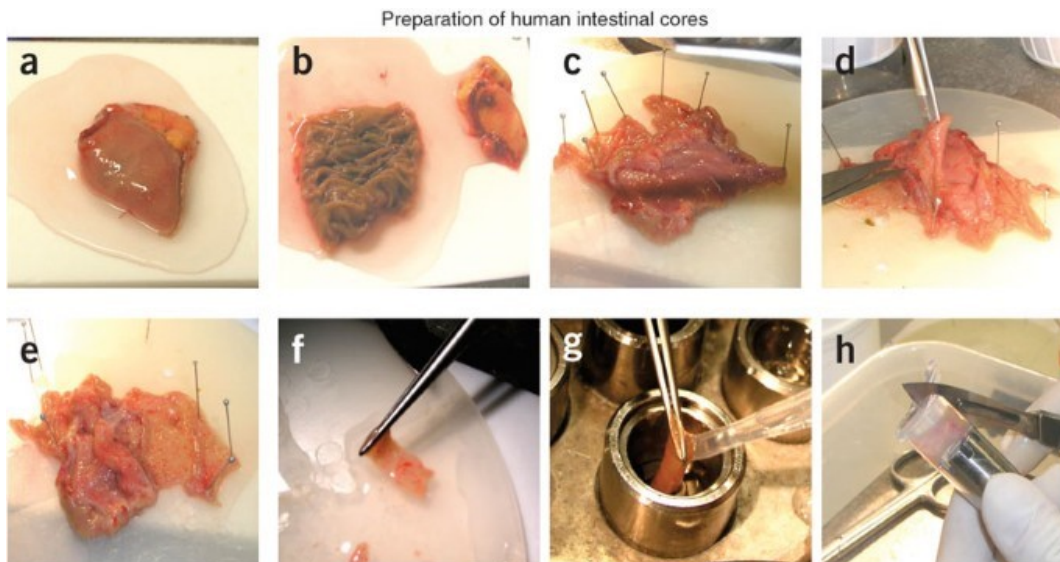
Ultratenké rezy ľudského čreva boli pripravované podľa protokolu vypracovaného de Graaf et al. (2010). Takto pripravené rezy sú *ex vivo* mini-modely čreva vhodné na mnohé experimenty hlavne svojou štruktúrou a zachovaním všetkých typov buniek črevného epitelu (de Graaf et al., 2010). Tkanivo na prípravu tkanivových rezov bolo získané v spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultnej nemocnice Hradec Králové od dobrovoľných anonymných darcov po podpísaní informovaného súhlasu. Experimenty boli schválené etickou komisiou pod číslom 202103 I67P.

### **Príprava hPCIS:**

Samotná príprava ultratenkých rezov a ich skladovanie si vyžaduje najprv prípravu roztoku KHB (Krebs-Henseleit buffer) podľa Tabuľka 2 . Ako inkubačné médium bolo využité Williams E medium (WME) doplnené o glukózu, antibiotikum a antimykotikum, ktoré si pripravíme podľa Tabuľka 3. Pripravené inkubačné médium rozpipetujeme do 24 - jamkovej doštičky a vložíme do inkubátora, aby sa doštičky predhriali a nasýtli kyslíkom a oxidom uhličitým (37 °C, 80 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). Do každej jamky napipetujeme 1,3 ml WME. Ultratenké rezy čreva, ktoré nie je štrukturálne pevným orgánom a práca s ním je o niečo náročnejšia, sme schopní pripraviť iba tak, že ho zalejeme do bloku agarózy. Pripravený 3% roztok agarózy podľa Tabuľka 6 zahrejeme vo vodnej lázni na 60°C, čím dosiahneme zmeny stavu z gélu na kvapalinu a následne ho schladíme vo vodnej lázni na 37°C. Pri tejto teplote je agaróza kvapalná neobmedzenú dobu. Ďalším krokom je zostavenie krájača Krumdieck typ MD 4000 (Alabama R&D, Munford, AL, USA) a jeho predchladenie na 4°C za pomoci chladeného termostatu s obehovým čerpadlom (Julabo<sup>®</sup>, F250).

Ľudský biologický materiál čreva odobraný počas operačného výkonu pankreatoduodenektómia je okamžite umiestnený do ľadového a okysličeného roztoku KHB, aby sa zabránilo teplej ischémii počas prevozu do laboratória na okamžité spracovanie. Nasledujúce kroky až do inkubácie musia byť kvôli zamedzeniu degradácie tkaniva vykonávané za chladenia na ľade (4°C). Zo zošitého ľudského čreva je najskôr potrebné odstrániť svorky a tukové tkanivo (viď Obrázok 9 a). Následne sa črevo pozdĺžne rozstrihne, odhalí sa jeho luminálna časť (viď Obrázok 9 b) a fekálne zvyšky, ktoré je potrebné odstrániť výplachom pomocou ľadového a okysličeného KHB roztoku. Vyčistené tkanivo upevníme na silikónovú podložku v Petriho miske použitím špendlíkov tak aby jeho luminálna membrána (mukóza) smerovala nadol (viď Obrázok 9 c). V ďalšom kroku črevo opäť opláchneme ľadovým a okysličeným roztokom KHB a pomocou chirurgických nožníc opatrne nastrihne hrubú muskulárnu vrstvu čreva a odstránime ju. Na podložke nám teda ostane črevná mukóza (viď Obrázok 9 d,e). Po odstránení muskulárnej vrstvy črevo narežeme na prúžky vo veľkosti 5 x 20 mm pomocou skalpela (viď Obrázok 9 f). Takto pripravené prúžky sú vhodné na samotnú prípravu hPCIS. Do vopred vychladenej valcovej formy umiestnenej na ľade si jednotlivu premiestnime prúžky čreva a pridržiujúc ich pinzetou vo zvislej polohe za 5 mm okraj (viď Obrázok 9 g) postupne naplníme pomocou Pasteurovej pipety tekutou agarózou (37°C) až kým nestuhne (viď Obrázok 9 h). Týmto krokom dosiahneme možnosť krájania ľudského čreva rovnakým spôsobom ako pevné orgány.





Obrázok 9: Znárodnenie prípravy hPCIS. Prevzaté z (de Graaf et al., 2010).

Vopred zostavený krájač Krumdieck typ MD 4000 (Alabama R&D, Munford, AL, USA) naplníme ľadovým a okysličeným roztokom KHB. Z valcovej formy vyberieme agarózový valec obsahujúci tkanivo ľudského čreva a vložíme ho priamo do krájača pripraveného na proces prípravy hPCIS. Krájanie ultratenkých rezov čreva prebieha pri 4°C pomocou chladeného termostatu s obehovým čerpadlom. Takto pripravené rezy zbierame do kadičky vypustením zo zbernej nádoby krájača a okamžite ich umiestnime na ľad. Vhodnosť rezov posudzujeme vizuálne. Rovnaké rezy s podobnou hrúbkou, farbou a hladkými okrajmi opatrne premiestnime do ľadového a okysličeného KHB roztoku chladeného ľadom.

Inkubácia pripravených hPCIS prebieha v inkubátore pri 37°C (80 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Črevné rezy by mali byť čo najskôr po príprave inkubované (optimalne dve hodiny o prípravy), pretože ich viabilita skladovaním klesá. Použitím entomologickej pinzety vložíme rezy podľa druhu experimentu do predhriatej a prekysličenej doštičky s WME a testovanými látkami a ihneď vložíme do inkubátora. Počas inkubácie je potrebné kontinuálne miešanie média na trepačke (90 RPM, Orbital shaker, Biosan<sup>®</sup>) a v 24-hodinových intervaloch jeho výmena. Doba inkubácie je individuálna podľa druhu experimentu, na ktorý sú rezy určené (inhibičné experimenty 150 min., indukčné 24 a 48 hod.). Vyžadovaný je aj pravidelný monitoring teploty inkubátora a kontrola pH média prostredníctvom sledovania jeho farby (žltá alebo fialová značí zmenu pH, ktoré nie je žiadúce).

Po inkubácii sú vzorky vložené do pripravených 2 ml skúmaviek so skrutkovacím uzáverom (Sarstedt<sup>®</sup>) s keramickými guľičkami o priemere cca 1,4-1,6 mm (objem cca 200 µl).

Na preukázanie viability rezov prostredníctvom stanovenia hladiny ATP sa vloží jeden rez do skúmavky vopred naplnenej sonifikačným roztokom SONOP (200 µl) pripraveného podľa rozpisu vid' Tabuľka 4. Takto pripravené skúmavky s hPCIS sú zmrazené ihneď na suchom ľade a skladované pri teplote -80°C, aby sa zamedzilo degradácii ATP. Vzorky na stanovenie koncentrácie RHD123 a betrixabanu sú taktiež odobrané do skúmaviek so skrutkovacím uzáverom a keramickými guľičkami ako vyššie v prípade vzoriek na stanovenie koncentrácie ATP.

### **5.3.2. Stanovenie koncentrácie ATP**

Či je tkanivo životaschopné sa dá zistiť rôznymi metódami. Metóda použitá na stanovenie životaschopnosti črevných rezov tejto práce je založená na meraní koncentrácie ATP. V tomto experimente sme na kontrolu viability rezov využili ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II od výrobcu Roche obsahujúci lyofilizovaný enzým Luciferázu a lyofilizovaný štandard ATP.

#### **Postup stanovenia koncentrácie ATP:**

Vopred pripravené skúmavky s rezmi ľudskeho čreva (hPCIS) boli z dôvodu prevencie degradácie ATP skladované pri teplote -80°C v 200 µl sonifikačného roztoku pripraveného podľa rozpisu v Tabuľka 4. Vzhľadom na labilnosť a krehkosť ATP molekuly v prítomnosti enzýmov v rezoch čreva, je nutné vykonávať všetky kroky stanovenia koncentrácie ATP opäť na ľade.

Každú skúmavku najskôr doplníme 800 µl roztoku SONOP na finálny objem 1 ml. Homogenizáciu pripravených hPCIS v SONOPe uskutočníme na homogenizátore FastPrep-24 5G (MP Biomedicals<sup>©</sup>) pri rýchlosti 6,0 m/s v dvoch cykloch trvajúcich 40 sekúnd s 20-sekundovou pauzou, čím docielime uvoľnenie ATP z tkaniva rezov čreva. Medzi jednotlivými homogenizáciami vzorky chladíme na ľade kvôli nežiadúcemu ohrevu spôsobenému homogenizáciou.

Ďalším krokom je centrifugácia vo vopred vychladenej centrifúge (4°C, Centrifúga Mikro 22 R, rotor 1195-A radius 87 mm, Hettich<sup>©</sup>) na 5 minút pri otáčkach 10000 rpm. Tým docielime oddelenie supernatantu obsahujúceho ATP od precipitovaného proteínu. Na pripravenú čiernu 96-jamkovú doštičku pipetujeme automatickou pipetou Eppendorf v duplikáte 5 µl supernatantu zo vzoriek i pozitívnej kontroly a 45 µl Tris/EDTA pufru

(pripraveného podľa Tabuľka 5) pomocou multikanálovej mikropipety (vzorky sú v tomto kroku zriedené pufrom 10x).

V ďalšom kroku si pripravíme kalibračnú krivku, ktorá bude tiež pipetovaná v duplikáte. Na zhotovenie kalibračnej krivky potrebujeme rozpustiť ATP štandard z ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II pomocou MilliQ vody na presnú koncentráciu 10 mg/ml, ktorý je následne ďalej riedený podľa rozpisu v Tabuľka 7. Kalibračné roztoky napipetujeme na doštičku v množstve 50  $\mu$ l. Lyofilizát luciferázy z ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II môžeme po 30 minútach zahriatia na izbovú teplotu použiť. Rozpustíme ho v 10 ml MilliQ vody a inkubujeme počas 5 minút pri izbovej teplote. V žiadnom prípade pripravený roztok luciferázy nevortexujeme, len jemne premiešame prevrátením nádoby.

Priamo pred samotným meraním sa do každej jamky na doštičke multikanálovou pipetou pridá 50  $\mu$ l pripraveného roztoku luciferázy. Pomocou luminometra TECAN 2304 zmeriame bioluminiscenciu jednotlivých vzoriek. Prítomnosť ATP sa prejaví svetelným zábleskom, ktorý vzniká prítomnosťou ATP energie využívanej luciferázou (lux = svetlo). Namerané hodnoty luminiscencie vyhodnotíme pomocou kalibračnej krivky a normalizujeme na množstvo proteínu jednotlivých hPCIS (viď Stanovenie proteínu pomocou BCA metódy).

Tabuľka 7: Roztoky na zhotovenie kalibračnej krivky pri stanovení koncentrácie ATP.

Riedenie A	Množstvo ( $\mu$ l)	Tris/EDTA pufr ( $\mu$ l)	Koncentrácia (M)
A	10 $\mu$ l ATP standard	990	$1,65 \times 10^{-4}$
1	10 $\mu$ l (A)	990	$1,65 \times 10^{-6}$
2	100 $\mu$ l (1)	400	$3,30 \times 10^{-7}$
3	50 $\mu$ l (1)	450	$1,65 \times 10^{-7}$
4	100 $\mu$ l (3)	400	$3,30 \times 10^{-8}$
5	50 $\mu$ l (3)	450	$1,65 \times 10^{-8}$

### 5.3.3. Extrakcia vzoriek na HPLC/MS analýzu

Aby sme mohli zmerať jednotlivé koncentrácie betrixabanu v rezoch, je potrebné ich v prvom rade z tkaniva extrahovať. Najjednoduchším spôsobom je homogenizácia s následnou precipitáciou proteínu, ktorý sme zvolili aj my. Aby sme eliminovali prípadné straty v priebehu

extrakcie a získali správne koncentrácie, využili sme taktiež interný štandard betrixaban-D6, ktorý sme pridávali v známej koncentrácii ku každému vzorku.

#### **Postup extrakcie vzoriek na HPLC/MS analýzu:**

Do skúmaviek s jednotlivými hPCISs pridáme pomocou automatickej pipety Eppendorf 600 µl roztoku ACN obsahujúceho vnútorný štandard (betrixaban-D6 o koncentrácii 125 nM – finálna koncentrácia po zakoncertovanie 250 nM). Využitím homogenzátora Fast Prep 24 – 5G (MP Biomedicals<sup>®</sup>) zhomogenizujeme vzorky pri nastavených podmienkach a rýchlosti 6,0 m/s v dvoch cykloch trvajúcich 40 sekúnd s 20-sekundovou pauzou medzi jednotlivými homogenizáciami. Ďalším krokom je centrifugácia vzoriek pri 10 000 rpm 10 minút na centrifuge Heraeus Biofuge pico (rotor 3328, polomer rotora = 85 mm, Heraeus<sup>®</sup>). Vďaka centrifugácii sa oddelí precipitovaný proteín od supernatantu. Po centrifugácii odoberieme 300 µl supernatantu z opačnej strany než kde sa nachádza peleta proteínu. Pracujeme veľmi opatrne, aby sme nenabrali proteín alebo neporušili samotnú peletu. Supernatant odoberáme do vopred označených sklenených vialiek s plochým dnom (objem 2 ml, Agilent<sup>®</sup>), ktoré následne uložíme do vákuovej odparky Eppendorf (Concentrator plus, Eppendorf<sup>®</sup>) a odparujeme počas 2 hodín, pri 30°C a programe V-AL. Takto odparené vzorky skladujeme pri teplote -20°C. Skúmavky s precipitovaným proteínom necháme odpariť v suchom termostate (TCH 100) pri teplote 37°C do odparenia, a následne stanovíme koncentráciu proteínu (viď kapitola BCA stanovenie proteínu).

#### **5.3.4. Rozpúšťanie extraktov vzoriek na meranie HPLC/MS**

Pred samotným meraním betrixabanu je potrebné odparené vzorky najprv rozpustiť v mobilnej fáze. Pripravíme si mobilnú fázu v pomere 5 (B) : 95 (A). Zmiešame mobilnú fázu A (H<sub>2</sub>O; 0,1% HCOOH; 5mM NH<sub>4</sub>COOH) a mobilnú fázu B (CH<sub>3</sub>OH; 0,1% HCOOH; 5mM NH<sub>4</sub>COOH). Ku každej vzorke v sklenenej vialke pridáme opakovacou pipetou (Eppendorf<sup>®</sup>) 150 µl pripravenej mobilnej fázy. Takto pripravené vzorky dáme rozpustiť do ultrazvuku na 10 minút. Následne vzorky dôkladne premiešame v špičke pipety a prepipetujeme celý obsah do jednotlivých injekčných striekačiek. Na injekčné striekačky nasadíme 0,22 µm filter o priemere 4 mm (LUT Syringe Filter PTFE, 4mm, 0,22µm, Labstore), cez ktorý vykonáme filtráciu. Pred samotnou filtráciou je nutné sklepať kvapalinu v striekačke smerom k filtru jemným pohybom. Na filtráciu si pripravíme sklenené vialky s vloženými sklenenými insertmi s objemom 250 µl (Agilent<sup>®</sup>), do ktorých budeme opatrne filtrovať naše vzorky. Filtrát púšťame po stene insertu

na jeho dno. Vialky uzavrieme viečkom tak, aby insert smeroval kolmo dolu. Takto pripravené vialky sú pripravené na meranie pomocou HPLC/MS.

### 5.3.5. HPLC/MS analýza

Koncentrácia betrixabanu v jednotlivých rezoch bola meraná pomocou techniky LC/MS (Liquid chromatography – mass spectrometry). Na meranie bol využitý interný štandard deuterovaný Betrixaban D6. Meranie bolo uskutočnené v móde Multiple Reaction Monitoring (MRM). Pre každú látku boli nastavené tri prechody – vid' Tabuľka 8. Dáta boli ďalej normalizované na koncentráciu proteínu vo vzorke zmeranej pomocou metódy BCA.

#### Základné parametre merania:

**HPLC:** Shimadzu Nexera v zložení: Degaser DGU-20A5, Autosampler SIL-AC30, Pumpa LC30-AD (2x), Kolónový termostat CTO-30A

**Hmotnostný spektrometer:** Shimadzu LCMS 8030 - trojitý kvadrupól

**Kolóna:** Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD 2.1x50 mm, 1.8 µm

**Predkolóna:** Agilent Zorbax Eclipse plus C18 2.1x5 mm, 1,8 µm

**Teplota kolónového termostatu:** 40 °C

**Mobilná fáza:** A: H<sub>2</sub>O, 5mM mravčan amonný, 0,1 % kyselina mravčia

B: MeOH, 5mM mravčan amonný, 0,1 % kyselina mravčia

Na meranie bola použitá gradientová elúcia – vid' Tabuľka 9

**Prietok mobilnej fázy:** 0,5 ml/min

**Objem nástreku vzorku:** 1 µl

**Rozsah kalibrácie:** 0; 10; 100; 200; 300; 500; 1000 nM

**Koncentrácia interného štandardu (betrixaban D6):** 250 nM

**Retenčný čas betrixabanu a betrixabanu D6:** 2,9 min (vid' Obrázok 10)

**Celková doba merania jednej vzorky:** 7:00 min

**Nastavenie detektoru MS a MRM prechodov:** vid' Tabuľka 9 a Tabuľka 10

Tabuľka 8: Nastavenie gradientu pre meranie betrixabanu.

Čas (min)	Konc. mobilnej fáze A:	Konc. mobilnej fáze B:
0:00	95 %	5 %
1:00	95 %	5 %
3:00	0 %	100 %
5:00	0 %	100 %

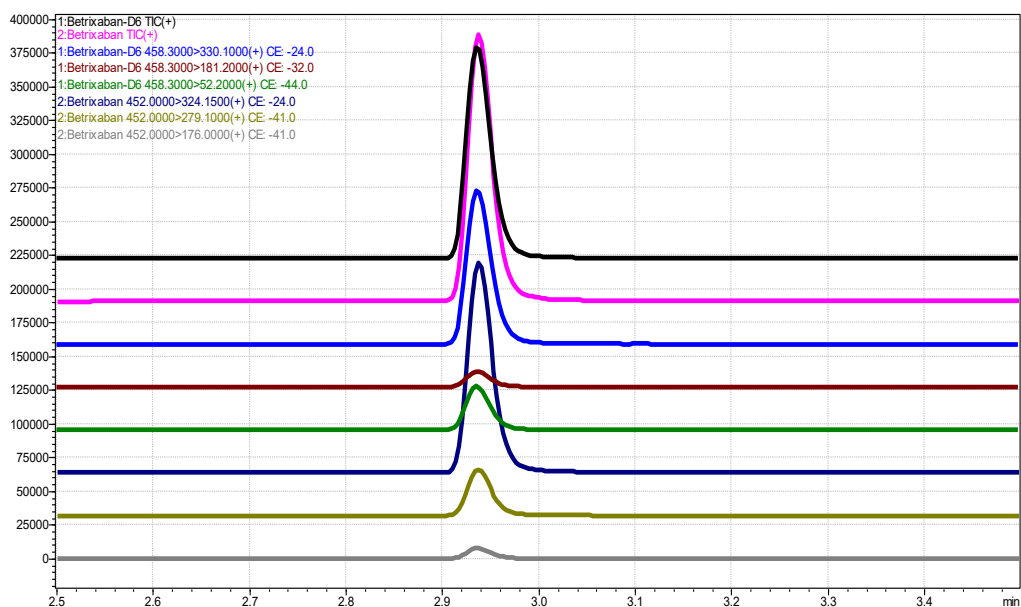
<b>5:10</b>	95 %	5 %
<b>7:00</b>	95 %	5 %

Tabuľka 9: Nastavenie MS detektoru Shimadzu LCMS 8030.

Parameter	Nastavenie
Ionizace	ESI positive
Sušiaci plyn	12 L/min
Sprejovací plyn	3 L/min
Teplota vyhrievacieho bloku	400 °C
DL teplota	250 °C

Tabuľka 10: MRM prechody pre analýzu koncentrácie betrixabanu.

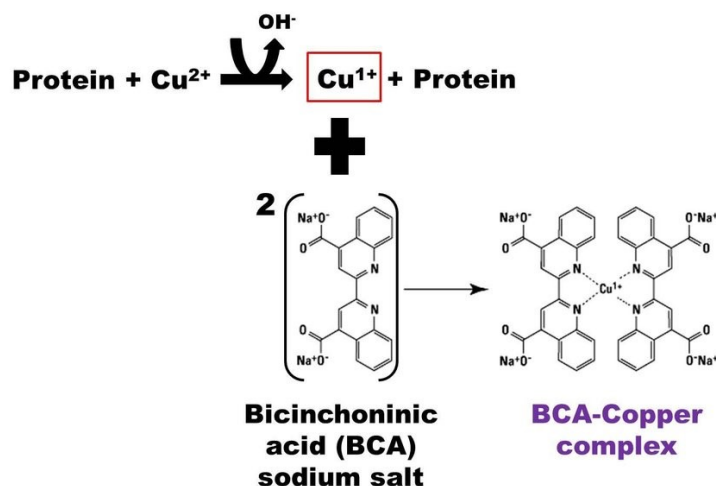
Analyzované látky	Prekursorový ión $m/z$	Produktové ióny $m/z$
<b>Betrixaban</b>	452.0	324,1; 279,1; 176
<b>Betrixaban D6</b>	458.3	330,1; 181,2; 52,2



Obrázok 10: Vzorový chromatogram merania betrixabanu a deuterovaného vnútorného štandardu betrixabanu D6 vrátane jednotlivých MRM prechodov.

### 5.3.6. BCA stanovenie proteínu

Svojou citlivosťou a jednoduchosťou prevedenia sa metóda stanovenia proteínu pomocou bicinchoninovej kyseliny (BCA) stala najviac preferovanou. Je založená na princípe redoxnej reakcie proteínov s  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickom prostredí ( $\text{pH}=10$ ), ktoré sú peptidovými väzbami redukované na  $\text{Cu}^+$ . Reakciou  $\text{Cu}^+$  a 2 molekúl BCA vzniká stabilný modro-fialový komplex, ktorý sme následne schopní vyhodnotiť meraním absorpcie (viď Obrázok 11). V alkalických podmienkach má komplex absorpčné maximum pri 562 nm, pri ktorom sa meria absorbanca vzniknutého komplexu. Intenzita zafarbenia je priamo úmerná množstvu bielkoviny (Cortés-Ríos et al., 2020). Stanovenie proteínu sme vykonali použitím Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ktorý obsahuje všetky potrebné reagenty.



Obrázok 11: Znázorňuje princíp redoxnej reakcie proteínov s  $\text{Cu}^{2+}$ , ktoré sú redukované na  $\text{Cu}^+$ . Následne reakciou  $\text{Cu}^+$  s 2 molekulami BCA vzniká stabilný modro-fialový komplex.

#### Postup BCA stanovenia proteínu:

V predchádzajúcich krokoch boli vzorky odparené do sucha (TCH 100, Laboratorní přístroje Praha) pri  $37^\circ\text{C}$  a na dne každej skúmavky sa sformovala peleta proteínu. Najprv je nutné proteín v týchto vzorkách zlyzovať. Ku všetkým vzorkám preto pridáme 200  $\mu\text{l}$  5M NaOH, ktorý sme si vopred pripravili. Následne uzavrieme skúmavky a inkubujeme 30 minút za stáleho miešania (300 rpm, Orbital shaker PSU-10i, Biosan®) pri  $37^\circ\text{C}$  použitím trepačky vloženej do suchého inkubátora TCH 100. Po uplynutí inkubácie sa ku každej vzorke pridá 800  $\mu\text{l}$  MilliQ vody, čím sa vzorky nariedia na finálnu koncentráciu 1M NaOH. V ďalšom kroku vzorky zhomogenizujeme pomocou homogenizátora Fast-Prep 24 5G (MP Biomedicals®) pri rýchlosti 6,0 m/s v dvoch cykloch trvajúcich 40 sekúnd s 20-sekundovou pauzou. Pripravíme

si 96-jamkovú priehľadnú mikrotitračnú doštičku (Sarstedt<sup>®</sup>), do ktorej z každej zhomogenizovanej vzorky nanesieme v duplikáte 10 µl supernatantu. Pred nanesením na doštičku je potrebné každú skúmavku dôkladne premiešať pomocou trepačky vortex (Vortex-Genie<sup>®</sup> 2 mixer, Scientific Industries), aby boli vzorky homogénne. Podľa Tabuľka 11 si pripravíme roztoky na zhotovenie kalibračnej krivky ako štandardu využitím 0,2% štandardu hovädzieho sérového albumínu (BSA) a napipetujeme na doštičku 10 µl v duplikáte. Na záver nanesieme multikanálovou pipetou do každej jamky 200 µl roztoku C (zelená farba) pripraveného priamo tesne pred použitím zmiešaním číreho roztoku A (NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BCA v 0,1M NaOH) a modrého roztoku B (4% CuSO<sub>4</sub> \* 6H<sub>2</sub>O) v pomere 50 (A) : 1 (B). Po nanesení roztoku C doštičku inkubujeme opäť v suchom inkubátore 30 minút pri 37°C na trepačke tentokrát pri otáčkach 100 rpm. Výsledné hodnoty získame okamžite po inkubácii meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 562 nm použitím doštičkovom readeri (Hidex 2404, Hidex Oy<sup>®</sup>). Meraním intezity vzniknutého modro-fialového zafarbenia dokážeme priamo úmerne vyhodnotiť koncentráciu proteínu v našich vzorkách extrapoláciou z kalibračnej krivky.

Tabuľka 11: Roztoky na zhotovenie kalibračnej krivky pri stanovení proteínu.

Č. kal. roztoku	Finálna koncentrácia proteínu	0,1% roztok BSA v 1M NaOH	Čistý 1M NaOH
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	100 µg/ml	10 µl	90 µl
3	200 µg/ml	20 µl	80 µl
4	300 µg/ml	30 µl	70 µl
5	400 µg/ml	40 µl	60 µl
6	600 µg/ml	60 µl	40 µl

### 5.3.7. Stanovenie Rhodaminu 123 – štúdium funkcie

Fluorescenčné farbivo Rhodamin 123 (RHD123) je modelovým substrátom efluxného transportéra P-gp (Martinec et al., 2019). Prostredníctvom tohto experimentu zisťujeme prítomnosť, aktivitu a funkčnosť tohto transportéru v ľudských črevných rezoch podľa merania akumulácie RHD123. Rôzne liečivá, či modelové inhibítory (napr. nami použitý CP-100356)



sú schopné P-gp inhibovať a zvyšovať tak intracelulárnu koncentráciu RHD123. Zvýšená expresia P-gp naopak intracelulárnu koncentráciu RHD123 bude znižovať.

### **Postup stanovenia Rhodaminu 123:**

V skúmavkách s objemom 2 ml (Sarstedt<sup>®</sup>) sú uložené vzorky s ľudskými rezmi čreva spoločne s keramickými guľičkami potrebnými na homogenizáciu vzoriek. Do každej skúmavky pridáme opakovacou pipetou (Eppendorf<sup>®</sup>) 600 µl roztoku ACN vo vode v pomere 2:1, ktorý si vopred pripravíme v množstve potrebnom na zodpovedajúci počet vzoriek. Následne zhomogenizujeme vzorky použitím homogenizátora FastPrep-24 5G (MP Biomedicals<sup>®</sup>) pri rýchlosti 6,0 m/s v dvoch cykloch trvajúcich 40 sekúnd s 20-sekundovou pauzou medzi jednotlivými homogenizáciami. Vizuálne skontrolujeme výsledok homogenizácie a opakujeme ak neprebehla dôkladne. Po homogenizácii skúmavky umiestnime do centrifúgy Heraeus Biofuge pico (rotor 3328, polomer rotora = 85 mm, Heraeus<sup>®</sup>) a stočíme na 10 000 rpm po dobu 10 minút, čím sa vytvorí peleta zrazeného proteínu na stene skúmavky. V ďalšom kroku opatrne odoberieme z každej vzorky 150 µl supernatantu a nanesieme v duplikáte na priehľadnú 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku (Sarstedt<sup>®</sup>), tak aby sme nenabrali peletu proteínu. Skúmavky s peletou proteínu necháme odpariť do sucha v termostate TCH-100 pri 37°C, ktoré použijeme na stanovenie proteínu (viď BCA stanovenie proteínu) potrebného na vyhodnotenie tohto experimentu. Pre správne meranie koncentrácie RHD123 je potrebné zhotoviť kalibračnú krivku. Na tento účel si pripravíme kalibračné roztoky s koncentraciami 0 µM; 0,0625 µM; 0,125 µM; 0,25 µM; 0,5 µM a 1,0 µM zo zásobného roztoku RHD123 (10 mM) riedením pomocou rovnakého roztoku ACN vo vode ako sme používali pri príprave vzoriek. V objeme 150 µl nanesieme kalibračné roztoky na doštičku takisto v duplikáte. Na čítačke doštičiek Tecan infinite spektrofluorometricky zmeriame pripravenú doštičku pri excitačnej vlnovej dĺžke 485 nm a emisnej vlnovej dĺžke 530 nm. Pomocou zostrojenej kalibračnej krivky vyhodnotíme namerané hodnoty normalizované na množstvo proteínu (viď BCA stanovenie proteínu).

### **5.3.8. Štatistická analýza**

Všetky dáta sú prezentované ako priemery  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD). Pre hodnotenie viability tkaniva a výsledky inhibičnej aj indukčnej štúdie bol použitý one-way ANOVA test s následným Dunnetovým post-hoc multiple comparisons testom. Na hodnotenie funkcie tkaniva s využitím modelového substrátu RHD123 a betrixabanu v rámci inhibičnej a indukčnej štúdie bol použitý Studentov two-tailed t test.

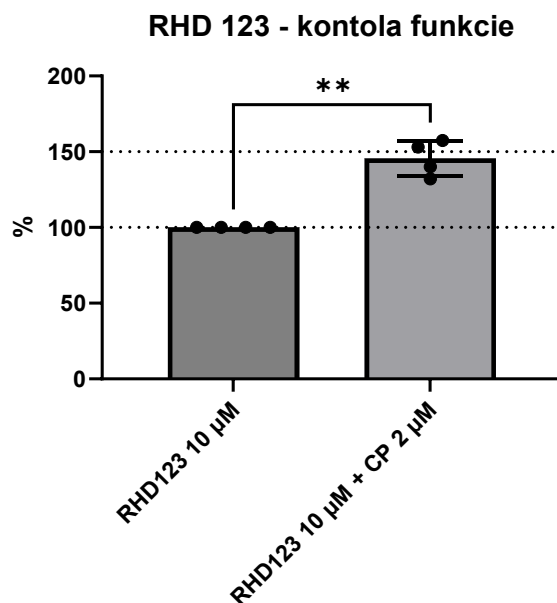
## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. INHIBIČNÁ ŠTÚDIA

Princípom inhibičnej štúdie bolo popísať, či dochádza k inhibícii efluxu betrixabanu prostredníctvom P-gp za prítomnosti modelového inhibítora CP-100356 (špecifický inhibítor P-gp) a antiretrovirotika darunaviru. Inhibičná štúdia bola vykonaná na vzorkách od štyroch dobrovoľných anonymných darcov podstupujúcich operáciu typu pankreatoduodenektómia ( $n = 4$ ). Tkanivo pre experimenty tak pochádzalo z črevného úseku jejuna. V priebehu experimentov sme okrem inhibičnej štúdie so samotným betrixabanom overovali aj vplyv testovaných látok na viabilitu tkaniva a samotnú funkciu P-gp v tkanive za použitia modelového substrátu RHD123 a modelového inhibítora P-gp.

#### 6.1.1. Overenie funkcie tkaniva

Princípom tohto testu je overenie schopnosti vzorky tkaniva transportovať vybraný modelový substrát P-gp a preverenie, či je tento transport inhibovateľný. Jedná sa o test založený na štúdiu publikovanej (Li et al., 2015), kde bol ako modelový substrát použitý RHD123 o koncentrácii 10  $\mu\text{M}$  a ako modelový inhibítor CP o koncentrácii 2  $\mu\text{M}$ . Vzorky boli najskôr 30 minút preinkubované s modelovým inhibítorom (polovica vzoriek). Následne bol ku vzorkám pridaný substrát RHD123. Po dvoj-hodinové inkubácii boli vzorky odobrané a v rezoch bola zmeraná koncentrácia RHD123 (viď kapitola 5.3.7.). V inhibovaných vzorkách by koncentrácia substrátu mala narásť približne 1,5-násobne. Naše vzorky tento predpoklad splnili (viď Obrázok 12).

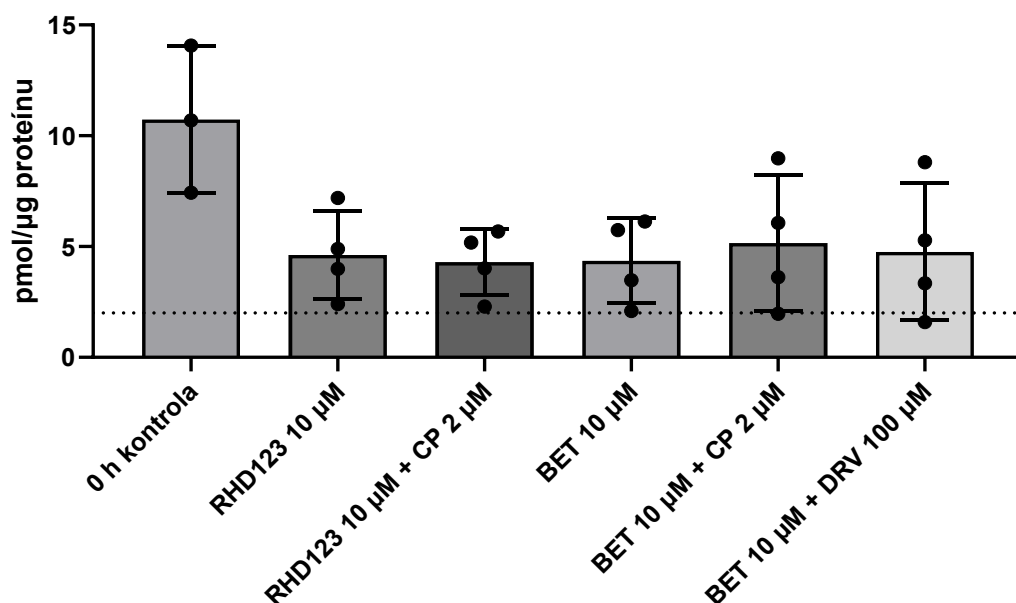


Obrázok 12: Overenie funkcie P-gp v črevnom tkanive – vzorky použité pre inhibičnú štúdiu. Bodkované čiary značia hladinu 100 % (kontrola) a 150 % (predpokladaný nárast po inhibícii P-gp). Dáta ( $n = 4$ ) sú prepočítané na percento kontroly u jednotlivých experimentov a prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná použitím Studentovho two-tailed  $t$  testu. Signifikantné rozdiely sú vyznačené nasledovne: \*\*,  $P < 0,01$ . RHD123 = rhodamin 123; CP = CP-100356.

### 6.1.2. Overenie vplyvu študovaných látok na viabilitu tkaniva

V priebehu inkubácie môže mať študovaná látka alebo kombinácia látok vplyv na viabilitu tkaniva. Z tohto dôvodu je potrebné overiť aj to, či je v priebehu experimentu viabilita tkaniva konštantná. Pokiaľ by životaschopnosť tkaniva počas experimentu klesala, mohli by tým pádom byť aj získané výsledky skreslené. Pri overení viability tkaniva sme použili metódu stanovenie koncentrácie ATP odporúčanú pre tkanivové rezy (viď kapitola 5.3.2) (Li et al., 2015). Ľudské črevo dosahuje koncentráciu ATP okolo 2.5–3 pmol/ $\mu$ g proteínu po 3 hodinách od krájania. Následne môže hladina klesať nižšie a po 24 hodinách býva okolo 2 pmol/ $\mu$ g. Tkanivo rezu sa považuje za životaschopné, pokiaľ je hladina ATP okolo 2 pmol/ $\mu$ g proteínu podľa publikácie De Graaf et al. 2010 (de Graaf et al., 2010). Tkanivo ihneď po odbere má koncentráciu ATP vyššiu. To je viditeľné aj z našich výsledkov, kde kontrolné vzorky v čase 0, teda ihneď po krájaní rezov, majú vyššie hladiny ATP ako vzorky inkubované po dobu 2 hodín (viď Obrázok 13). V jednom z experimentov boli hladiny ATP celkovo nižšie a pohybovali sa okolo koncentrácie 2 pmol/ $\mu$ g. Pravdepodobne sa však nejedná o vplyv študovanej latky.

### Vplyv študovaných látok na životnosť tkaniva - koncentrácia ATP

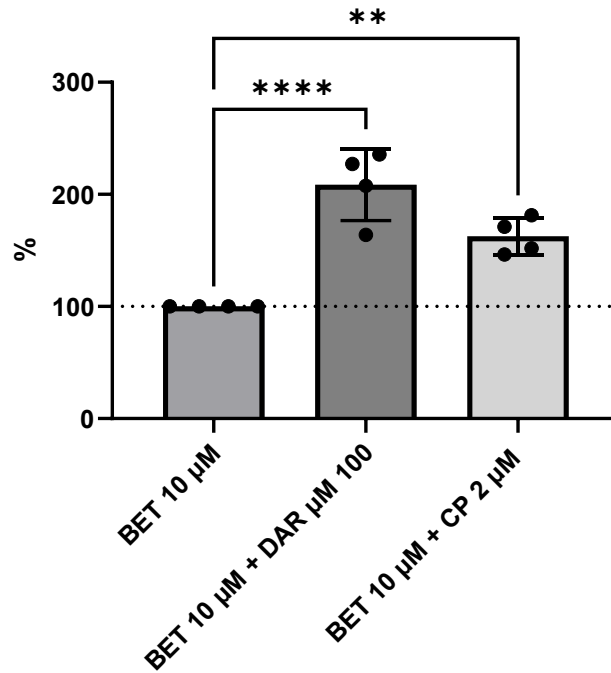


Obrázok 13: Graf znázorňujúci vplyv študovaných látok na viabilitu tkaniva počas inhibičnej štúdie a obsah ATP v čistom tkanive bez inkubácie (0 h kontrola). Z minulých štúdií je známe, že RHD123 nemá vplyv na viabilitu črevných rezov, a preto tu slúži aj ako negatívna kontrola v priebehu inkubácie (Huličiak et al., 2022; Li et al., 2015). Bodkovaná čiarka znázorňuje limit 2 pmol/μg proteínu, čo je hladina ATP ktorá stále značí vitálne tkanivo (de Graaf et al., 2010). Dáta sú prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná prostredníctvom ordinary one-way ANOVA testu s následným Dunnetovým post-hoc multiple comparisons testom. Žiadne štatisticky významne rozdiely neboli pozorované.  $n = 4$ . BET = betrixaban; DRV = darunavir; RHD123 = rhodamin 123; CP = CP-100356.

#### 6.1.3. Vplyv darunaviru na inhibíciu efluxu betrixabanu

Vlastný vplyv darunaviru na inhibíciu efluxu betrixabanu bol testovaný obdobne ako v štúdií na overenie funkcie tkaniva, avšak namiesto substrátu RHD123 bol použitý betrixaban v koncentrácii 10 μM. Darunavir, ako inhibítor P-gp bol v preinkubácii použitý v koncentrácii 100 μM. Táto koncentrácia vychádza z predchádzajúcej štúdie (Huličiak et al., 2022). Jedná sa aj o najvyššiu koncentráciu, akú môže darunavir v roztoku dosiahnuť (limit rozpustnosti). Ako pozitívna kontrola bol použitý špecifický P-gp inhibítor CP v koncentrácii 2 μM. Vzorky boli opäť inkubované po dobu dvoch hodín a následne bola stanovená hladina betrixabanu (viď kapitoly 5.3.3, 5.3.4 a 5.3.5). Z výsledkov (viď Obrázok 14) je zjavné, že ako darunavir, tak aj CP signifikantne inhibovali eflux betrixabanu. Pre darunavir bola táto inhibícia vyššia.

### Betrixaban - inhibična štúdia



Obrázok 14: Výsledky inhibičnej štúdie vplyvu darunaviru a CP na inhibíciu efluxu betrixabanu v črevných rezoch ( $n = 4$ ). Dáta sú prepočítané na percento kontroly u jednotlivých experimentov a prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou ordinary one-way ANOVA testu s následným Dunnetovým post-hoc multiple comparisons testom. Signifikantné rozdiely sú vyznačené nasledovne: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ). BET = betrixaban; DRV = darunavir; CP = CP-100356.

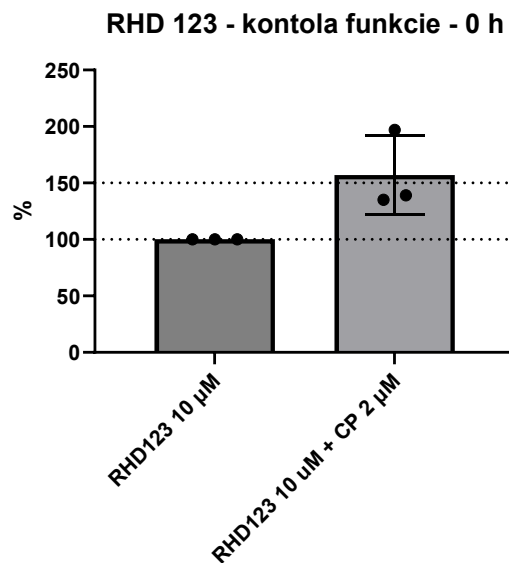
## 6.2. INDUKČNÁ ŠTÚDIA

Na rozdiel od inhibičnej štúdie pri indukčnej štúdie predpokladáme, že liečivo darunavir bude zvyšovať expresiu P-gp a vďaka tomu bude betrixaban rýchlejšie transportovaný z tkaniva črevného rezu smerom von. Samotná indukčná štúdia bola vykonaná na tkanive získanom od troch ( $n = 3$ ) dobrovoľných darcov (iných, ako v prípade inhibičnej štúdie) podstupujúcich operáciu typu pankreatoduodenektomia. Opäť sa teda jednalo o tkanivo reprezentujúce jejunum. Pretože išlo o iného darcu, aj tu bolo potrebné overiť, že tkanivo je na úrovni efluxu funkčné a jeho životaschopnosť je dostatočná. Toto overenie bolo vykonané použitím modelového substrátu P-gp RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ) a tiež nami študovaného substrátu betrixabanu (10  $\mu\text{M}$ ). V oboch prípadoch sme ako modelový inhibítor použili CP-100356 (2  $\mu\text{M}$ ).

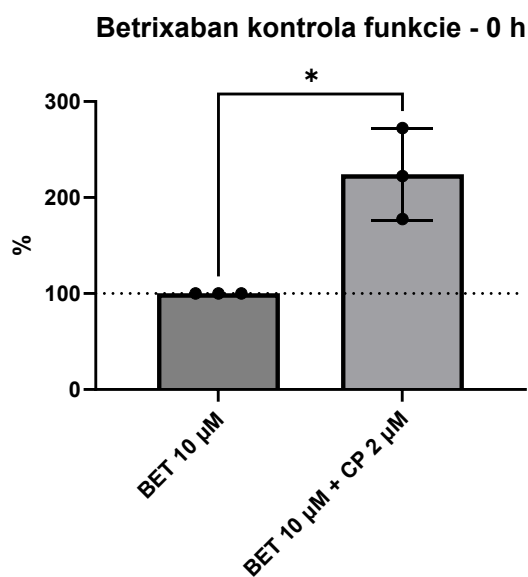
Samotná indukčná štúdia bola uskutočnená s darunavirom (50  $\mu\text{M}$ ) a rifampicinom (30  $\mu\text{M}$ ), ktorý je známym induktorom P-gp (Martinec et al., 2021). Po 24 a 48 hodinách boli vzorky otestované s modelovým substrátom P-gp RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ) a betrixabanom (10  $\mu\text{M}$ ). Pred pridaním substrátov boli vzorky ponechané 30 minút v čistom médiu WME, aby sa eliminoval prípadný inhibičný vplyv darunaviru. V čase 24 a 48 hodín bola zároveň meraná koncentrácia ATP a za pomoci inhibítora CP (2  $\mu\text{M}$ ) testované, či je tkanivo stále schopné efluxej funkcie.

### 6.2.1. Overenie funkcie tkaniva

Transportná funkcia tkaniva bola testovaná za pomoci modelového substrátu P-gp RHD123 a modelového inhibítora P-gp CP v čase  $t = 0$  (viď Obrázok 15). Princíp testu je rovnaký ako v prípade testovania v inhibičnej štúdií. Zároveň bol na vzorkách vykonaný v čase  $t = 0$  aj experiment s betrixabanom a modelovým inhibítorom CP (viď Obrázok 16). Pri teste s RHD123 bol pozorovaný nárast koncentrácie v rezoch podľa očakávaní. Pri teste s betrixabanom sa funkcia tkaniva potvrdila tiež. Tkanivo tak bolo overené ako funkčné a vhodné pre ďalšie experimenty.



Obrázok 15: Overenie funkcie P-gp v črevnom tkanive – vzorky použité pre indukčnú štúdiu. Bodkované čiary označujú hladinu 100 % (kontrola) a 150 % (predpokladaný nárast po inhibícii P-gp). Dáta ( $n = 3$ ) sú prepočítané na percento kontroly u jednotlivých experimentov a prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná použitím Studentovho two-tailed t testu. RHD123 = rhodamin 123; CP = CP-100356.

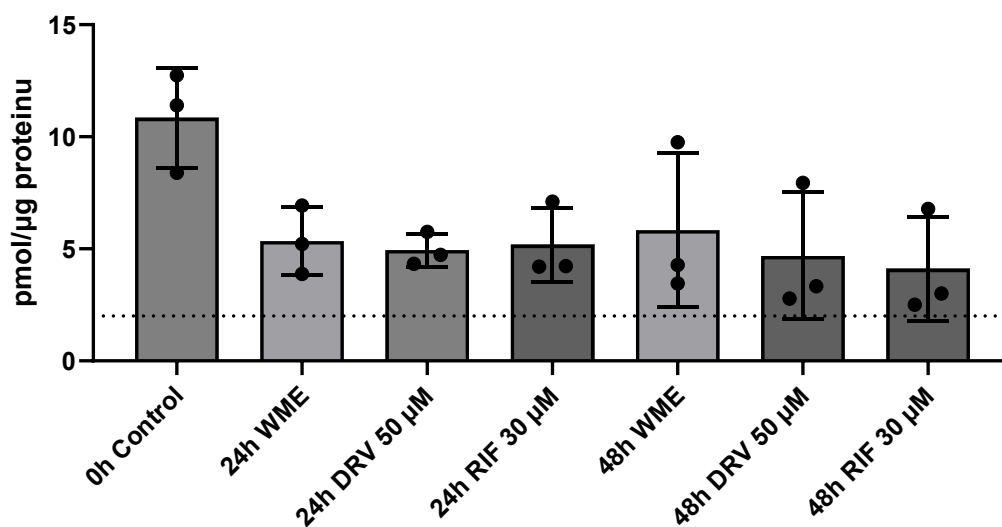


Obrázok 16: Overenie funkcie P-gp v črevnom tkanive za pomoci betrixabanu – vzorky použité pre indukčnú štúdiu. Bodkovaná čiara označuje hladinu 100 % (kontrola). Dáta ( $n = 3$ ) sú prepočítane na percento kontroly u jednotlivých experimentov a sú prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná použitím Studentovho two-tailed t testu. Signifikantné rozdiely sú vyznačené nasledovne: \*,  $P < 0,05$ .

## 6.2.2. Overenie viability tkaniva v priebehu inkubácie

Viabilita tkaniva bola testovaná v čase  $t = 0$  (čerstvé tkanivo), 24 a 48 hodín. Neboli už testované kombinácie so substrátmi, pretože tie sme overovali v priebehu inhibičnej štúdie. Viabilita bola testovaná rovnako ako v prípade inhibičnej štúdie teda stanovením koncentrácie ATP (viď 5.3.2). Tkanivo rezu sa podľa publikácie De Graaf et al. (2010) považuje za životaschopné, pokiaľ je hladina ATP okolo  $2 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  proteínu (de Graaf et al., 2010). Z výsledkov vyplýva, že tkanivo malo na počiatku dostatočnú hladinu ATP a v priebehu 24 a 48 hodinovej inkubácie nebol pozorovaný negatívny vplyv na hladiny ATP ani v čistom médiu, ani v médiu s pridanými induktormi (viď Obrázok 17).

### Vplyv študovaných látok na životnosť črevných rezov - koncentrácia ATP



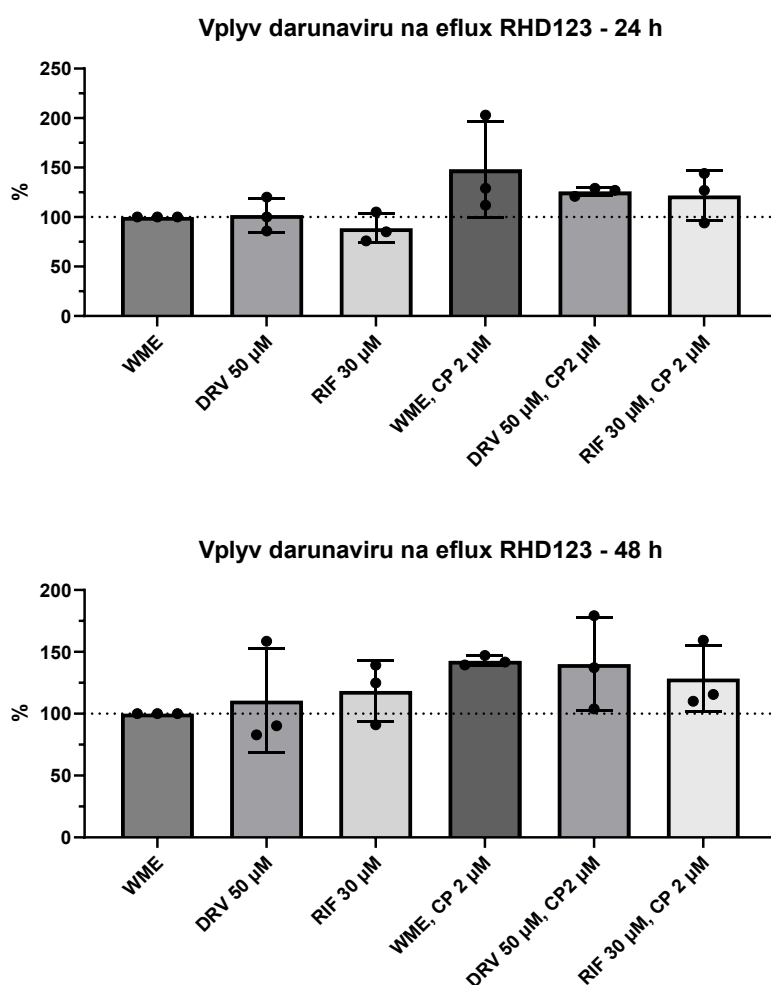
Obrázok 17: Vplyv dlhodobej inkubácie študovaných látok na viabilitu tkaniva a obsah ATP v čistom tkanive bez inkubácie (0 h kontrola). Bodkovaná čiarka znázorňuje limit  $2 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  proteínu, čo je hladina ATP ktorá stále značí vitálne tkanivo (de Graaf et al., 2010). Dáta ( $n = 3$ ) sú prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou ordinary one-way ANOVA testu s následným Dunnetovým post-hoc multiple comparisons testom. Na porovnanie ako kontrola slúžilo čisté médium WME v danom čase. Žiadne štatisticky významne rozdiely v rámci 24-hodinovej a 48-hodinovej inkubácie neboli pozorované. WME = Wiliam's E medium; DRV = darunavir; RIF = rifampicin.

## 6.2.3. Vplyv darunaviru na indukciu efluxu betrixabanu a RHD123

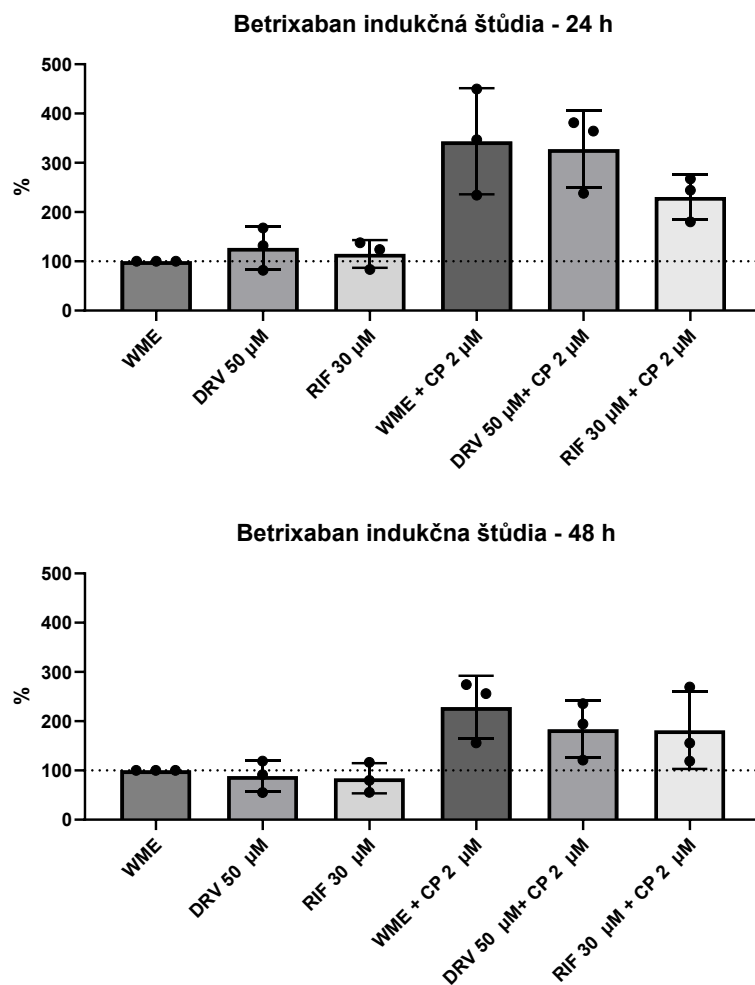
V tomto experimente bol študovaný vplyv dlhodobej (24 a 48 hodín) expozície tkaniva darunavirom  $50 \mu\text{M}$ . Koncentrácia vychádza zo štúdie (Hradecká, 2024), kde  $50 \mu\text{M}$  darunavir indukoval expresiu P-gp na úrovni mRNA približne dvojnásobne. Ďalšia látka, známa ako induktor P-gp, bol použitý rifampicin o koncentrácii  $30 \mu\text{M}$ . Ako substráty sme použili



betrixaban (10  $\mu\text{M}$ ) a RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ). V priebehu experimentov nebol zistený žiadny signifikantný vplyv na zvýšenie efluxu RHD123 (viď Obrázok 18) alebo betrixabanu (viď Obrázok 19). Len v niektorých individuálnych experimentoch bola pozorovaná zvýšená aktivita efluxu ako pre RHD123, tak pre betrixaban a to najmä v 48-hodinovej inkubácii. V oboch časových bodoch bola ďalej overená funkčnosť efluxu za použitia CP, ktorý je modelovým inhibítorom P-gp. Aj tu bola pozorovaná významná interindividualná variabilita medzi jednotlivými vzorkami (viď Obrázok 18, Obrázok 19).



Obrázok 18: Vplyv dlhodobej inkubácie tkaniva s darunavírom (50  $\mu\text{M}$ ) na eflux RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ) a kontrola funkcie tkaniva za použitia špecifického inhibítora P-gp CP (2  $\mu\text{M}$ ). Dáta ( $n = 3$ ) sú prepočítané na percento kontroly (WME) u jednotlivých experimentov a prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodkovaná čiara značí hladinu 100 % (kontrola). Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou ordinary one-way ANOVA testu s následným Dunnetovým post-hoc multiple comparisons testom. Na porovnanie ako kontrola slúžilo čisté médium WME v danom čase. Žiadne štatisticky významne rozdiely v rámci 24-hodinovej a 48-hodinovej inkubácie neboli pozorované. WME = Wiliam's E medium; DRV = darunavir; RIF = rifamipicin; CP = CP-100356.



Obrázok 19: Vplyv dlhodobej inkubácie tkaniva s darunavirom (50  $\mu\text{M}$ ) na eflux betrixabanu (10  $\mu\text{M}$ ) a kontrola funkcie tkaniva za použitia špecifického inhibítora P-gp CP (2  $\mu\text{M}$ ). Dáta ( $n = 3$ ) sú prepočítané na percento kontroly (WME) u jednotlivých experimentov a prezentované ako priemery  $\pm$  SD. Bodkovaná čiara značí hladinu 100 % (kontrola). Bodky značia údaje z individuálnych vzoriek. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou ordinary one-way ANOVA testu s následným Dunnettovým post-hoc multiple comparisons testom. Na porovnanie ako kontrola slúžilo čisté médium WME v danom čase. Žiadne štatisticky významné rozdiely v rámci 24-hodinovej a 48-hodinovej inkubácie neboli pozorované. WME = Wiliam's E medium; DRV = darunavir; RIF = rifampicin; CP = CP-100356.

## 7. DISKUSIA

Absorpcia po perorálnom podaní liečiva sa primárne uskutočňuje v tenkom čreve, z väčšej časti na enterocytoch horného úseku tenkého čreva s prihliadnutím na vlastnosti absorbovaného liečiva (Estudante et al., 2013). Spolu s enzymatickou výbavou sa na enterocytoch tenkého čreva nachádzajú aj membránové transportné systémy riadiace pohyb látok cez črevnú membránu (Drozdziak et al., 2020). Intestinálny transportér P-gp z nadrodiny ABC transportérov funguje ako efluxná pumpa. Bráni prestupu xenobiótík, vrátane liečiv, do systémového obehu, pričom ich aktívne prenáša naspäť do lumen čreva a mení ich klinický účinok (Estudante et al., 2013; Oostendorp et al., 2009). Mnohé perorálne užívané liečivá podliehajú transportu cez črevnú bariéru a práve v tomto mieste často vznikajú aj liekové interakcie (Martinec et al., 2019). K takýmto interakciám môže dochádzať u HIV pacientov. Práve oni sú rizikovou skupinou náchylnou k vzniku liekových interakcií kvôli chronickému celoživotnému užívaniu antiretrovirálnej terapie. Z dôvodu vysokého rizika rozvoja venózneho trombozy, spojenej s HIV infekciou, je potrebná aj konkomitantná liečba tromboprolifaktickými antikoagulanciami.

V tejto diplomovej práci boli študované interakcie antikoagulancia betrixabanu s antiretrovirotikom darunavirom na modeli črevnej bariéry prostredníctvom inhibičnej a indukčnej štúdie. Všetky experimenty boli vykonané na vzorkách tkaniva, konkrétne jejuna, získaného od dobrovoľných anonymných darcov podstupujúcich operáciu typu pankreatoduodenektómia. Prostredníctvom *ex vivo* metódy, využívajúcej ultratenké rezy ľudského čreva (hPCIS) pripravených podľa protokolu vypracovaného de Graaf et al. (2010), sme mohli hodnotiť efekt krátkodobého a dlhodobého efektu liečiva darunaviru na transportné funkcie P-gp v tomto tkanive.

Pred samotnou inhibičnou aj indukčnou štúdiou bolo prostredníctvom príslušných experimentov potrebné overiť, že tkanivo je na úrovni efluxu funkčné a jeho životaschopnosť je dostatočná. Funkčnosť a prítomnosť P-gp v tkanive bola potvrdená prostredníctvom modelového substrátu P-gp, ktorým je RHD123 (10  $\mu$ M) a to v kombinácii so špecifickým inhibítorom P-gp, ktorým je CP. Pri porovnaní inhibovaných a neinhibovaných vzoriek sme pozorovali nárast akumulácie RHD123 v prítomnosti inhibítora približne na úrovni priemeru 150 % (viď Obrázok 12 a Obrázok 15). Tento nárast je v súlade s experimentami publikovanými pre náš model (Li et al., 2015).

Prostredníctvom stanovenia koncentrácie ATP, ktorého hladina bola v rozmedzí považovanom za viabilné, bola potvrdená životaschopnosť jednotlivých rezov tkaniva. Za limit viability je podľa publikácie de Graaf et al., (2010) považovaná hladina 2 pmol/ $\mu$ g proteínu (de Graaf et al., 2010). Zároveň bol za pomoci stanovenia koncentrácie ATP vylúčený negatívny vplyv nami študovaných látok na viabilitu rezov v priebehu indukčných aj inhibičných štúdií (vid' Obrázok 13 a Obrázok 17).

Liečivo betrixaban je známym substrátom P-gp (Skelley et al., 2018). Patrí do skupiny zvanaj priame orálne antikoagulancia (DOAC – direct oral anticoagulants) (Lekura and Kalus, 2018). Vzhľadom na fakt, že betrixaban je substrátom P-gp, súčasné užitie so silnými inhibítormi tohto transportéru, môže zvýšiť plazmatické koncentrácie antikoagulancia a tým prispieť k prejavom nežiadúcich účinkov v podobe zvýšeného rizika krvácania. Inhibítormi P-gp sú aj PI (darunavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir, atazanavir) užívané v rámci režimu HAART u HIV pozitívnych pacientov (Bentounes et al., 2023; Martinec et al., 2019; Sankatsing et al., 2004; Skelley et al., 2018). V rámci experimentálnej časti sme testovali inhibičný vplyv vybraného PI, ktorým bol darunavir v koncentrácii 100  $\mu$ M, na P-gp transport betrixabanu. Ako pozitívnu kontrolu sme použili špecifický P-gp inhibítor CP v koncentrácii 2  $\mu$ M. Predpokladaná zvýšená akumulácia betrixabanu v črevných rezoch po podaní darunaviru bola významná. V porovnaní s neinhibovanou kontrolou vzrástla koncentrácia betrixabanu v rezoch v priemere na 208 %. Akumulácia v rezoch bola dokonca vyššia pri použití darunaviru ako pri samotnom použití modelového inhibítora P-gp, CP (vid' Obrázok 14), kde akumulácia betrixabanu vzrástla iba o 162 % v porovnaní s kontrolou. Tento výsledok svedčí o silnom inhibičnom efekte darunaviru na membránový transportér P-gp. Otázne je, či je darunavir špecifickým inhibítorom konkrétne pre transportný systém P-gp alebo inhibuje aj iné transportéry prítomné v črevnej bariére, ktorých substrátom by bol aj betrixaban, čím by sa mohol vysvetliť tak silný inhibičný potenciál darunaviru. Darunavir je okrem P-gp potvrdeným inhibítorom efluxného transportéra MRP2, ktorý sa v čreve taktiež nachádza a okrem toho je aj slabým inhibítorom BCRP, ktorý je taktiež v čreve zastúpený (Fujimoto et al., 2009; König et al., 2010). O tom, či je betrixaban okrem P-gp aj substrátom iného efluxného transportéra nie je zatiaľ nič známe, avšak u obdobného liečiva zo skupiny DOAC, apixabanu, bol transport prostredníctvom BCRP potvrdený (Foerster et al., 2020). Napriek tomu je to len špekulácia, pretože na základe našich výsledkov prítomnosť interakcie na úrovni ďalšieho transportéra nejde ani vyvrátiť ani potvrdiť.

Opačná situácia v podobe protrombotického stavu by mohla nastať pri podaní induktorov P-gp spolu s betrixabanom, čím by sa zvýšila jeho exkrécia a výsledkom by bolo zníženie plazmatickej koncentrácie antikoagulantu (Bentounes et al., 2023; Sankatsing et al., 2004; Skelley et al., 2018). To sme sa snažili potvrdiť v rámci indukčnej štúdie dlhodobou (24- a 48-hodinovou) expozíciou rezov črevného tkaniva darunavirom v koncentrácii 50  $\mu\text{M}$ . Táto koncentrácia v predošlých štúdiách (Hradecká, 2024) vykazovala približne dvojnásobný indukčný efekt na expresiu P-gp na úrovni mRNA. Ako pozitívnu kontrolu sme použili známy induktor P-gp rifampicin (30  $\mu\text{M}$ ), ktorý na modeli črevných rezov taktiež zvyšuje expresiu P-gp (Martinec et al., 2021). Indukčný potenciál sme študovali na substrátoch P-gp, ktorými sú betrixaban (10  $\mu\text{M}$ ) a RHD123 (10  $\mu\text{M}$ ). Dlhodobá expozícia induktormi P-gp však nepriniesla jednoznačné závery. Experimenty nevykazujú signifikantný pozorovateľný vplyv v podobe zvýšeného efluxu a zníženej koncentrácie substrátov P-gp. Pri 24-hodinovej expozícii tkaniva darunavirom sú dáta veľmi variabilné medzi jednotlivými vzorkami a nenaznačujú priamu indukciu ani v prípade substrátu RHD123 ani v prípade substrátu betrixabanu (viď Obrázok 18 a Obrázok 19). Výsledky z 48-hodinovej expozície tkaniva darunavirom v prípade substrátu RHD123 pri dvoch experimentoch vykazujú pozitívny trend, avšak nedá sa hovoriť jednoznačne o zvýšenom efluxe (viď Obrázok 18). Ani dlhodobá inkubácia so známym induktorom P-gp rifampicinom nepriniesla jednoznačné závery a variabilita v efluxe bola ako pri 24-hodinovej tak pri 48-hodinovej indukčnej štúdii (viď Obrázok 18 a Obrázok 19). V oboch časových bodoch bola overená aj funkčnosť tkaniva a teda aj P-gp pridaním inhibítora CP, ktorý vo všetkých vzorkách síce zaznamenal nárast, ale aj tu bola pozorovaná významná interindividuálna variabilita medzi jednotlivými vzorkami. Dáta z jednotlivých experimentov naznačujú, že v našich vzorkách pravdepodobne nedochádzalo k signifikantnej indukcii. Nepodarilo sa nám teda potvrdiť hypotézu indukčného potenciálu darunaviru, ktorý by mohol nastať pri chronickom užívaní liečiva u HIV pacientov.

## 8. ZÁVER

V rámci tejto diplomovej práce bola hodnotená interakcia medzi betrixabanom a antiretrovirotikom darunavirom použitím ultratenkých tkaninových rezov tenkého čreva. Takto pripravené rezy sú *ex vivo* mini-modely čreva vhodné na mnohé experimenty, vrátane štúdií interakcii. V našej štúdií boli využité tieto rezy na štúdium interakcii na úrovni inhibície a indukcie. Výsledky z jednotlivých experimentov dokazujú výrazný inhibičný potenciál antiretrovirotika darunaviru na membránový transportný systém P-gp, čím môže pri konkomitantnej liečbe so substrátom P-gp betrixabanom dochádzať ku zvýšenému riziku krvácania pri nedostatočnom monitoringu a nesprávne zvolenej dávke liečiv. Naopak pri dlhodobom pôsobení, kedy darunavir môže vykazovať indukčný potenciál na expresiu P-gp, sme nepozorovali zvýšený eflux betrixabanu, ktorý by mohol v terapii spôsobovať znížené plazmatické hladiny tohto antikoagulancia. Hypotézu indukčného potenciálu pri dlhodobej expozícii liečivom darunavir, ktorá by mohla nastať pri chronickom užívaní u HIV pacientov sa nám v experimentálnej časti potvrdiť nepodarilo.

## 9. CITOVANÁ LITERATÚRA

Amin, Md.L., 2013. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 7, 27–34. <https://doi.org/10.4137/DTI.S12519>

Austine Community College, 2008. Associate Degree Nursing Physiology Review [WWW Document]. URL <https://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Digestive.html> (accessed 4.5.24).

Bentounes, N.K., Le Hingrat, Q., Planquette, B., Darnige, L., Khider, L., Sanchez, O., et al., 2023. Modalités du traitement de la maladie veineuse thromboembolique du patient VIH par les anticoagulants oraux directs. *Rev. Médecine Interne* 44, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2023.01.006>

Bibas, M., Biava, G., Antinori, A., 2011. HIV-Associated Venous Thromboembolism. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 3. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2011.030>

Chan, G.N.Y., Patel, R., Cummins, C.L., Bendayan, R., 2013. Induction of P-Glycoprotein by Antiretroviral Drugs in Human Brain Microvessel Endothelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4481–4488. <https://doi.org/10.1128/AAC.00486-13>

Chaudhary, R., Sharma, T., Garg, J., Sukhi, A., Bliden, K., Tantry, U., Turagam, M., Lakkireddy, D., Gurbel, P., 2020. Direct oral anticoagulants: a review on the current role and scope of reversal agents. *J. Thromb. Thrombolysis* 49, 271–286. <https://doi.org/10.1007/s11239-019-01954-2>

Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L., Li, J., 2016. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 370, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>

Collins, J.T., Nguyen, A., Badireddy, M., 2023. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Cortés-Ríos, J., Zárate, A.M., Figueroa, J.D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., et al., 2020. Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Anal. Biochem.* 608, 113904. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>

Crum-Cianflone, N.F., Weekes, J., Bavaro, M., 2008. Thromboses among HIV-Infected Patients during the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *AIDS Patient Care STDs* 22, 771–778. <https://doi.org/10.1089/apc.2008.0010>

Daryabari, Y., Amreek, F., Moghadamnia, A.A., Tayebi, P., 2024. An Update on Betrixaban, The Challenging Anticoagulant Agent for Extended Venous Thromboembolism Prophylaxis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 83, 134–143. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001485>

de Graaf, I.A.M., Olinga, P., de Jager, M.H., Merema, M.T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E.G., et al., 2010. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat. Protoc.* 5, 1540–1551. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.111>

Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 89–110. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>

Drozdziak, M., Czekawy, I., Oswald, S., Drozdziak, A., 2020. Intestinal drug transporters in pathological states: an overview. *Pharmacol. Rep.* 72, 1173–1194. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00139-6>

Estudante, M., Morais, J.G., Soveral, G., Benet, L.Z., 2013. Intestinal drug transporters: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev., EDITOR'S COLLECTION* 2013 65, 1340–1356. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.042>

Foerster, K.I., Hermann, S., Mikus, G., Haefeli, W.E., 2020. Drug–Drug Interactions with Direct Oral Anticoagulants. *Clin. Pharmacokinet.* 59, 967–980. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00879-x>

Fragkou, P.C., Moschopoulos, C.D., Dimopoulou, D., Triantafyllidi, H., Birmpa, D., Benas, D., Tsiodras, S., Kavatha, D., Antoniadou, A., Papadopoulos, A., 2023. Cardiovascular disease and risk assessment in people living with HIV: Current practices and novel perspectives. *Hellenic J. Cardiol.* 71, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2022.12.013>

Fujimoto, H., Higuchi, M., Watanabe, H., Koh, Y., Ghosh, A.K., Mitsuya, 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. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1588–1593. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1588>



George, J.M., Kuriakose, S.S., Monroe, A., Hou, Q., Byrne, M., Pau, A.K., et al., 2020. Utilization of Direct Oral Anticoagulants in People Living with Human Immunodeficiency Virus: Observational Data from the District of Columbia Cohort. *Clin. Infect. Dis.* 71, e604–e613. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa284>

Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents With HIV [WWW Document], 2022. URL <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-arv/intro-and-overview> (accessed 4.15.24).

Haslam, I.S., Jones, K., Coleman, T., Simmons, N.L., 2008. Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84). *Biochem. Pharmacol.* 76, 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.020>

He, L., Vasiliou, K., Nebert, D.W., 2009. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum. Genomics* 3, 195–205. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-2-195>

HIV and AIDS [WWW Document], 2023. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (accessed 4.22.24).

Holec, A.D., Mandal, S., Prathipati, P.K., Destache, C.J., 2017. Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Thorough Review, Present Status and Future Perspective as HIV Therapeutics. *Curr. HIV Res.* 15, 411–421. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666171120110145>

Hradecká, T., 2024. Vliv darunaviru a atazanaviru na expresi ABCB1 a CYP3A4 v tkáňových řezech z lidského střeva. Diplomová Práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové.

Huisman, M.V., Klok, F.A., 2018. Pharmacological properties of betrixaban. *Eur. Heart J. Suppl. J. Eur. Soc. Cardiol.* 20, E12–E15. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suy016>

Huličiak, M., Vokřál, I., Holas, O., Martinec, O., Štaud, F., Červený, L., 2022. Evaluation of the Potency of Anti-HIV and Anti-HCV Drugs to Inhibit P-Glycoprotein Mediated Efflux of Digoxin in Caco-2 Cell Line and Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Pharmaceuticals* 15, 242. <https://doi.org/10.3390/ph15020242>

Jain, N., Avanthika, C., Singh, A., Jhaveri, S., De la Hoz, I., Hassen, G., Camacho L, G.P., Carrera, K.G., 2021. Deep Vein Thrombosis in Intravenous Drug Users: An Invisible Global Health Burden. *Cureus* 13, e18457. <https://doi.org/10.7759/cureus.18457>

James, A.H., 2009. Venous Thromboembolism in Pregnancy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 326–331. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.184127>

Julio-Pieper, M., Bravo, J.A., 2016. Chapter Six - Intestinal Barrier and Behavior, in: Cryan, J.F., Clarke, G. (Eds.), *International Review of Neurobiology, Gut Microbiome and Behavior*. Academic Press, pp. 127–141. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.006>

Kann, G., Owasil, J., Kuczka, K., Haberl, A., Wolf, T., Khaykin, P., Harder, S., Stephan, C., von Hentig, N., 2021. Evaluation of Platelet Activation by HIV Protease Inhibitors – The HIV-PLA II Study. *HIVAIDS Auckl. NZ* 13, 789–800. <https://doi.org/10.2147/HIV.S262282>

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. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2319–2328. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq324>

Lee, J.J., Memar Montazerin, S., Shojaei, F., Chi, G., 2021. Current Opinion on the use of Direct Oral Anticoagulants for the Prophylaxis of Venous Thromboembolism among Medical Inpatients. *Ther. Clin. Risk Manag.* 17, 471–487. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S271439>

Lekura, J., Kalus, J.S., 2018. Overview of betrixaban and its role in clinical practice. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 75, 1095–1102. <https://doi.org/10.2146/ajhp170785>

Lepist, E.-I., Phan, T.K., Roy, A., Tong, L., MacLennan, K., Murray, B., Ray, A.S., 2012. Cobicistat Boosts the Intestinal Absorption of Transport Substrates, Including HIV Protease Inhibitors and GS-7340, In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5409–5413. <https://doi.org/10.1128/AAC.01089-12>

Li, M., de Graaf, I.A.M., de Jager, M.H., Groothuis, G.M.M., 2015. Rat precision-cut intestinal slices to study P-gp activity and the potency of its inhibitors *ex vivo*. *Toxicol. In Vitro* 29, 1070–1078. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.011>

Lin, J.H., Yamazaki, M., 2003. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 59–98. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342010-00003>

Liu, Z., Liu, K., 2013. The transporters of intestinal tract and techniques applied to evaluate interactions between drugs and transporters. *Asian J. Pharm. Sci.* 8, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.020>

Lutsey, P.L., Zakai, N.A., 2023. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol.* 20, 248–262. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00787-6>

Lv, Z., Chu, Y., Wang, Y., 2015. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS Auckl. NZ* 7, 95–104. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956>

MacCann, R., Landay, A.L., Mallon, P.W.G., 2023. HIV and Comorbidities – the importance of Gut Inflammation and the Kynurenine Pathway. *Curr. Opin. HIV AIDS* 18, 102–110. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000782>

Marchetti, G., Tincati, C., Silvestri, G., 2013. Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 2–18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-12>

Martinec, O., Biel, C., de Graaf, I.A.M., Huliciak, M., de Jong, K.P., Staud, F., Cecka, F., Olinga, P., Vokral, I., Cerveny, L., 2021. Rifampicin Induces Gene, Protein, and Activity of P-Glycoprotein (ABCB1) in Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Front. Pharmacol.* 12, 684156. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.684156>

Martinec, O., Huliciak, 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63. <https://doi.org/10.1128/AAC.00910-19>

Masaoka, Y., Tanaka, Y., Kataoka, M., Sakuma, S., Yamashita, S., 2006. Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Sci., Current State of SLC and ABC Tran* 29, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.06.004>

Murphy, G., Grace, Y., Chaudry, S., Chamoun, R., 2018. Betrixaban: A Novel Oral Anticoagulant With a New Niche. *J. Pharm. Technol. JPT Off. Publ. Assoc. Pharm. Tech.* 34, 123–133. <https://doi.org/10.1177/8755122518759765>

Nielsen, M.M.K., Aryal, E., Safari, E., Mojsoska, B., Jenssen, H., Prabhala, B.K., 2021. Current State of SLC and ABC Transporters in the Skin and Their Relation to Sweat Metabolites and Skin Diseases. *Proteomes* 9. <https://doi.org/10.3390/proteomes9020023>

Oostendorp, R.L., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2009. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. *Cancer Treat. Rev.* 35, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.09.004>

Pastori, D., Cormaci, V.M., Marucci, S., Franchino, G., Del Sole, F., Capozza, A., et al., 2023. A Comprehensive Review of Risk Factors for Venous Thromboembolism: From Epidemiology to Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms24043169>

Pau, A.K., George, J.M., 2014. Antiretroviral Therapy: Current Drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28, 371–402. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.06.001>

Perkins, M.V., Joseph, S.B., Dittmer, D.P., Mackman, N., 2023. Cardiovascular Disease and Thrombosis in HIV Infection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 43, 175–191. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318232>

Previtali, E., Bucciarelli, P., Passamonti, S.M., Martinelli, I., 2011. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 9, 120–138. <https://doi.org/10.2450/2010.0066-10>

Roberts, M.S., Magnusson, B.M., Burczynski, F.J., Weiss, M., 2002. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 751–790. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00005>

Robillard, K.R., Chan, G.N.Y., Zhang, G., la Porte, C., Cameron, W., Bendayan, R., 2014. Role of P-Glycoprotein in the Distribution of the HIV Protease Inhibitor Atazanavir in the Brain and Male Genital Tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1713–1722. <https://doi.org/10.1128/AAC.02031-13>

Sabourin, A.A., Patel, T., Saad, S., Renner, E., Moulard, E., Adie, S., Ha, N.B., 2021. Management of anticoagulation in patients with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency virus. *Thromb. Res.* 200, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2021.01.020>

Sankatsing, S.U.C., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H., Lange, J.M.A., Prins, J.M., 2004. P Glycoprotein in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1073–1081. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1073-1081.2004>

Skelley, J.W., Thomason, A.R., Nolen, J.C., Candidate, P., 2018. Betrixaban (Bevyxxa). *Pharm. Ther.* 43, 85–120.

Vidya Vijayan, K.K., Karthigeyan, K.P., Tripathi, S.P., Hanna, L.E., 2017. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front. Immunol.* 8, 580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>

Vos, A.G., Venter, W.D.F., 2021. Cardiovascular toxicity of contemporary antiretroviral therapy. *Curr. Opin. HIV AIDS* 16, 286. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000702>

Wan, Z., Dai, B., Zhu, X., Huang, Y., Zhu, B., 2023. HIV-associated dyslipidemia: pathogenesis and its management. *Chin. Med. J. (Engl.)* 136, 2732–2734. <https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000002879>

Wolf, K.K., Paine, M.F., 2018. Metabolic Barrier of the Gastrointestinal Tract☆, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*. Elsevier, Oxford, pp. 74–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95671-X>

Xu, G.G., Guo, J., Wu, Y., 2014. Chemokine Receptor CCR5 Antagonist Maraviroc: Medicinal Chemistry and Clinical Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 14, 1504–1514.

Zhang, Q.-Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J., Kaminsky, L.S., 1999. Characterization of Human Small Intestinal Cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.* 27, 804–809.