

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM INTERAKCÍ ANTIVIRÁLNÍCH LÁTEK S
INTESTINÁLNÍMI LÉKOVÝMI EFLUXNÍMI ABC
TRANSPORTÉRY**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Martin Huličiak

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

V Hradci Králové

Podpis:

.....

Pod'akovanie

Rád by som sa pod'akoval PharmDr. Lukášovi Červenému, Ph.D. za odborné vedenie, rady, pripomienky a čas, ktorý mi počas spracovania diplomovej práce venoval. Pod'akovať by som sa chcel aj Mgr. Ondřejovi Martincovi za pomoc s experimentálnou časťou diplomovej práce, odborné rady a trpezlivosť. Ďakujem aj celej skupine Experimentálnej farmakológie a liekových interakcií za príjemnú atmosféru pri vypracovávaní diplomovej práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študent: Martin Huličiak

Školiteľ: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Studium interakcií antivirálných látok s intestinálnymi
lékovými efluxnými ABC transportéry

P-gp, MRP2 a BCRP sú efluxné transportéry, ktoré sú členmi rodiny ATP binding cassette (ABC) transportérov. Tieto transportéry sú lokalizované na apikálnej membráne črevného epitelu, kde môžu obmedziť absorpciu orálne podávaných liekov. Štúdium liekových interakcií s/na črevných efluxných transportéroch je potrebné na zabezpečenie bezpečnej a účinnej liečby. Bunková línia caco-2 je FDA odporúčaný *in vitro* model intestinálnej bariéry a používa sa na obojsmerné testovanie substrátov a inhibítorov ABC transportérov v predklinickom výskume. Avšak táto metodika má niekoľko nedostatkov, takže potreba zavedenia nových experimentálnych modelov sa zvyšuje a metóda *ex vivo* založená na ľudskom alebo potkaňom čreve je sľubnou možnosťou. Precision-cut intestinal slices (PCIS) predstavujú mini-model orgánu a obsahujú všetky typy buniek tkaniva. Použili sme *in vitro* model s využitím monovrstiev caco-2 buniek pre štúdium transportu liečiv a novo zavedenú *ex vivo* metódu PCIS pre akumuláciu štúdiu a rhodamín123 (RHD123) ako modelový substrát P-gp. Analyzovali sme interakcie vybraných inhibítorov proteázy (saquinavir, atazanavir) a nukleozidových inhibítorov reverznej transkriptázy (zidovudín, tenofovir dizoproxil fumarát) na tomto efluxnom transportéri s následným porovnaním oboch metód. Z testovaných antiretrovirov saquinavir a atazanavir spôsobili koncentračne závislý pokles efluxného pomeru a zvýšenie *ex vivo* akumulácie RHD123 v experimentoch *in vitro*, respektíve *ex vivo*. Na záver sme potvrdili, že saquinavir a atazanavir môžu inhibovať intestinálny P-gp a tým zvýšiť absorpciu substrátov P-gp. Dôležité je, že sme preukázali, že potkanie PCIS poskytujú porovnateľné výsledky s výsledkami získanými použitím modelu caco-2. Preto potkanie PCIS môžu predstavovať viac fyziologickú alternatívu k súčasne preferovanej metóde *in vitro* a zavedenie ľudských PCIS by bolo ďalším krokom bližšie k skutočnému klinickému prostrediu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Martin Huličiak

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D

Title of diploma thesis: Study of interactions of antiviral drugs with intestinal drug efflux ABC transporters

P-gp, MRP2 and BCRP are efflux transporters, members of the family of ATP binding cassette (ABC) transporters. These transporters are located on the apical membrane of the intestinal epithelium, where they may limit absorption of orally administered drugs. Study of drug interactions with/on intestinal efflux transporters is necessary to provide safe and effective treatment. The Caco-2 cell line is FDA recommended *in vitro* model of intestinal barrier and it is used for bidirectional testing of substrates and inhibitors of ABC transporters in preclinical research. However, this methodology has several shortcomings, so the need of introduction of new experimental models is increasing and the *ex vivo* method based on human or rat intestine is a promising option. Precision-cut intestinal slices (PCIS) represent a mini-model of the organ and contain all types of cells of the tissue. We used both *in vitro* model using Caco-2 cell monolayers for drug transport study and in our lab established *ex vivo* method of PCIS for accumulation study and rhodamine123 (RHD123) as a model substrate of P-gp. We analyzed interactions of selected protease inhibitors (saquinavir, atazanavir) and nucleoside reverse transcriptase inhibitors (zidovudine, tenofovir disoproxil fumarate) on this efflux transporter with subsequent comparison of both methods. Of tested antiretrovirals, saquinavir, and atazanavir caused concentration dependent decrease in the efflux ratio and increase in *ex vivo* accumulation of RHD123 in *in vitro* and *ex vivo* experiments, respectively. In conclusion, we confirmed that saquinavir, and atazanavir might inhibit intestinal P-gp and thus increase the absorption of P-gp substrates. Importantly, we demonstrated that rat PCIS provide comparable results with those obtained using Caco-2 model. Therefore, rat PCIS may represent more physiological alternative to currently preferred *in vitro* method and the establishing of human PCIS would be an additional step closer to real clinical environment.

OBSAH

1	Zoznam skratiek	7
2	Úvod	9
3	Teoretická časť	10
3.1	Terapia HIV	10
3.1.1	Komorbidity HIV a interakcie liečiv s antiretrovirotikami	11
3.2	Črevná bariéra	11
3.3	Efluxné ABC liekové transportéry v črevnej bariére	12
3.3.1	P-glykoproteín (ABCB1)	13
3.3.2	MRP2 (ABCC2)	14
3.3.3	BCRP (ABCG2)	15
3.4	Liekové interakcie na úrovni transportérov	16
3.5	Modely štúdia črevnej absorpcie	17
3.5.1	<i>In vitro</i> Caco-2 model	17
3.5.2	<i>Ex vivo</i> model ultratenkých intestinálnych rezov	19
4	Hypotéza	21
5	Cieľ práce	21
6	Experimentálna časť	22
6.1	Chemikálie	22
6.2	Transportné štúdie <i>in vitro</i>	23
6.2.1	Kultivácia buniek	23
6.2.2	Meranie transepitelárnej elektrickej rezistencie (TEER)	23
6.2.3	Postup experimentu	24
6.2.4	Výpočet efluxného pomeru	25
6.3	Akumulačné štúdie <i>ex vivo</i>	25
6.3.1	Príprava intestinálnych rezov PCIS (Precision-cut intestinal slices)	25
6.3.2	Akumulácie s využitím PCIS	27

6.3.3	Stanovenie proteínu	28
6.4	Štatistické spracovanie dát	28
7	Výsledky.....	29
7.1	Transportné štúdie RHD123 cez monovrstvu buniek Caco-2.....	29
7.2	Akumulačné štúdie RHD123 s použitím PCIS	34
8	Diskusia	36
9	Záver.....	40
10	Bibliografia.....	41

1 ZOZNAM SKRATIEK

ABC – ATP-binding cassette

AIDS – syndróm získanej imunitnej nedostatočnosti (z angl. Acquired Immunodeficiency Syndrome)

ART – antiretrovirálna terapia

ARV – antiretrovirotiká

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – adenzíntrifosfát

BCRP/ABCG2 – breast cancer resistance protein

DDIs – liekové interakcie (z angl. drug-drug interactions)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium, (kultivačné médium)

DMSO – Dimethyl sulfoxid

FBS – fetálne hovädzie sérum (z angl. Fetal Bovine Serum)

FDA – Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (z angl. Food and Drug Administration)

HBSS – Hanks' Balanced Salt solution

HCV – vírus hepatitídy C

HAART – vysokoúčinná antiretrovirálna terapia (z angl. Highly Active Antiretroviral Therapy)

HIV – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (z angl. Human Immunodeficiency Virus)

IAS-USA – International Antiviral Society-USA

INSTI – inhibítory integrázy (z angl. integrase strand transfer inhibitor)

KHP – Krebs-Henseleit pufo

LLC-PK1 – Lewis lung carcinoma-porcine kidney 1, (bunková línia)

MDCK – Madin-Darby canine kidney, (bunková línia)

MRP - multidrug resistance-associated proteins

NEAA – neesenciálne aminokyseliny (z angl. Non-essential Amino Acid)

NBD – nukleotid viažuca doména (z angl. nucleotide-binding domain)

NNRTI – nenukleozidové inhibítory reverznej transkriptázy

NRTI – nukleozidové inhibítory reverznej transkriptázy

NtRTI – nukleotidové inhibítory reverznej transkriptázy

P_{app} – permabilný koeficient

PBS – fosfátový pufo (z angl. Phosphate-buffered saline)

PCIS – ultratenké intestinálne rezy (z angl. Precision-cut intestinal slices)

P-gp/ABCB1 – P-glykoproteín

PI – inhibitory proteázy

P/S – Penicilin/Streptomycin

rP_{app} – pomer permabilných koeficientov

TMD – transmembránová doména

Tenofovir DF – tenofovir dizoproxil fumarát

WHO – Svetová zdravotnícka organizácia (z angl. World Health Organization)

WME - Williams medium E, (inkubačné médium)

2 ÚVOD

Štandardom v liečbe HIV (human immunodeficiency virus) pozitívnych pacientov je kombináčn antiretrovirálna terapia, pozostávajúca z minimálne 3 antiretrovirotik patriacich do 2 odlišných farmakologických skupín. HIV vírus ni a oslabuje funkciu imunitného systému a nakazen jedinci sa stávajú náchylnejší k dalším infekciám (WHO, 2016, 2017). Mnohé kombinácie antiretrovirlnych liečiv sú spojen s významnými liekovými interakcimi (DDIs) (Kis *et al.*, 2010). Perorálne podávanie predstavuje najpohodlnejší spôsob aplikácie liečiva, je pomerne lacn, neinvazívne a pre pacientov prijateln. Takto prijat liečivá sa absorbujú hlavne v tenkomreve, ktor tvori vznamn bariéru medzi vonkajším a vnútorným prostredím (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Schinkel and Jonker, 2012).revn bariéra obsahuje ABC (ATP-binding cassette) transportéry, ktor aktívne prenášajú substráty a zohrávajú dležit úlohu vo farmakokinetike liečiv. Rovnako predstavujú potenciálne miesto pre vznik DDIs (Mller and Fromm, 2011). Efluxn transportéry ako P-glykoproteín (P-gp) a breast cancer resistant protein (BCRP), nachádzajúce sa v apikálnej membráne enterocytov, môžu znižovať biodostupnosť perorálne užitch substrátov. Bolo dokzan, že inhibíciou týchto transportérov súbežne užívanými liečivami došlo k zvršeniu biodostupnosti substrátov (Konig, Muller and Fromm, 2013; Chen *et al.*, 2016). Z toho vyplýva, že interakcie na úrovni ABC transportérov môžu mať za následok zvršen (toxick) alebo znížené (subterapeutick) plazmatick koncentracie liečiv. Poznanie mechanizmu interakcií je dležit pre zabezpečenie účinnej a bezpečnej farmakoterapie (Giacomini *et al.*, 2010). Boli vyvinut viacer modely *in vivo* a *in vitro* štdirevn absorpcie, avšak ich použitie mať urit limitácie. FDA (Food and Drug Administration) odporúča *in vitro* model bunkovej línie caco-2 pre štdiumrevn absorpcie a na predikciu DDIs s ABC transportérmi. Alterntvnu možnosť štdia transportu cezrevn bariéru nm poskytuje *ex vivo* metóda ultratenkých intestinálnych rezov (Li, de Graaf and Groothuis, 2016; FDA, 2017), avšak tto metóda si vyžaduje dalšie testovanie a porovnanie s caco-2 bunkami, aby ju bolo možné plne etablovať.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Terapia HIV

Human Immunodeficiency Virus (HIV) sa zameriava na imunitný systém ľudí a oslabuje obranyschopnosť proti infekciám a niektorým druhom rakoviny. Keď vírus ničí a narúša funkciu imunitných buniek, nakazení jedinci sa postupne stávajú imunodeficientnými. Imunitná funkcia sa zvyčajne meria počtom CD4⁺ T-lymfocytov. Najpokročilejšie štádium HIV infekcie je Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (WHO, 2017). Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) uvádza približne 36,7 miliónov pacientov infikovaných HIV ku koncu roku 2016. Z toho 54 % dospelých a 43 % detských pacientov trpiacich HIV dostáva antiretrovirálnu terapiu (ART). V polovici roku 2017 to bolo 20,9 miliónov pacientov užívajúcich antiretrovirovú terapiu (ARV) (WHO, 2017). Jednotlivé ARV môžeme zaradiť podľa mechanizmu účinku a chemickej štruktúry do 5 skupín: nukleozidové a nukleotidové inhibítory reverznej transkriptázy (NRTI/NtRTI), nenukleozidové inhibítory reverznej transkriptázy (NNRTI), inhibítory proteázy (PI), inhibítory integrázy (INSTI) a inhibítory vstupu HIV do bunky. Poslednú skupinu môžeme rozdeliť na dve podskupiny a to: inhibítory fúzie a CCR5 antagonisti (Barbaro *et al.*, 2005; Arts and Hazuda, 2012). ART predstavuje použitie minimálne troch ARV z dvoch liekových skupín na liečbu HIV infekcie. Táto terapia je celoživotná a môže sa nazývať aj kombinačná ART alebo highly active ART (HAART) (Warnke, Barreto and Temesgen, 2007; WHO, 2016). Podľa odporúčaní WHO a International Antiviral Society-USA (IAS-USA) má iniciačná terapia obsahovať dve ARV zo skupiny NRTI/NtRTI a jedno liečivo zo skupiny INSTI, NNRTI alebo PI (WHO, 2016; Volberding, 2017). HAART potláča replikáciu vírusu a znižuje plazmatickú koncentráciu HIV-1 (virálnu nálož), zvyšuje množstvo CD4⁺ T-lymfocytov a predchádza vývoju rezistencie voči ARV (Arts and Hazuda, 2012). Klinické štúdie a pozorovania preukázali výrazné zníženie mortality (50 %) a morbiditu u pacientov infikovaných vírusom HIV v dôsledku kombinovanej ART (The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008; HIV-CAUSAL Collaboration *et al.*, 2010). FDA uvádza 26 schválených ARV používaných na liečbu HIV (United States Food and Drug Administration, 2018) a počet možných kombinácií liečiv je obrovský. Avšak mnohé kombinácie ARV vedú k významným DDIs, čo môže spôsobiť zlyhanie liečby alebo toxicitu vyvolanú liekmi. Významnú úlohu v interakciách medzi ARV hrajú aj ABC transportéry (Kis *et al.*, 2010; Alam *et al.*, 2016). Pre úspešný výsledok liečby je rozhodujúce pochopenie, ako tieto

lieky fungujú a ako interagujú medzi sebou, rovnako aj s inými súbežne podávanými liekmi (Warnke, Barreto and Temesgen, 2007).

3.1.1 Komorbidity HIV a interakcie liečiv s antiretrovirotikami

Znížená obranyschopnosť HIV pozitívnych pacientov, zvyšuje možnosť nástupu ďalších ochorení. HIV infekcia je výrazný rizikový faktor tuberkulózy. Zvyšuje riziko reaktivácie latentnej infekcie *Mycobacterium tuberculosis* a urýchľuje rozvoj tuberkulózy, ktorá je jednou z najčastejších príčin smrti u HIV pozitívnych dospelých pacientov v rozvojových krajinách (Corbett *et al.*, 2003; WHO, 2017). HAART znižuje riziko oportunistických infekcií, vrátane tuberkulózy a mala by byť nastavená s ohľadom na minimálne liekové interakcie s antituberkulóznou terapiou. Štandardom antituberkulózneho liečenia je rifampicín, ktorý má významné farmakokinetické DDI s mnohými ARV. Rifampicín indukuje expresiu P-glykoproteínu (P-gp) a niektorých metabolických enzýmov, čo má za následok zníženie plazmatickej koncentrácie nevirapínu, efavirenzu, delavirdínu a všetkých PI. Zvýšenie dávok PI viedlo k výraznej hepatotoxicite a intolerancii liečby (McIlleron *et al.*, 2007; Manosuthi, Wiboonchutikul and Sungkanuparph, 2016).

Infekcia vírusom hepatitídy C (HCV) sa u HIV-pozitívnych jedincov vyskytuje vďaka spoločnej ceste prenosu. Medzi nové liečivá používané na terapiu HCV patria perorálne užívané priamo-účinkujúce antivirotiká. Potenciálne interakcie by mali byť zvážené pri súbežnom užívaní ARV a priamo-účinkujúcich antivirotik, pretože niektoré liečivá z oboch skupín sú popísanými substrátmi a inhibítormi P-gp, alebo sú metabolizované rovnakými enzýmami (Alter, 2006; Karageorgopoulos *et al.*, 2014).

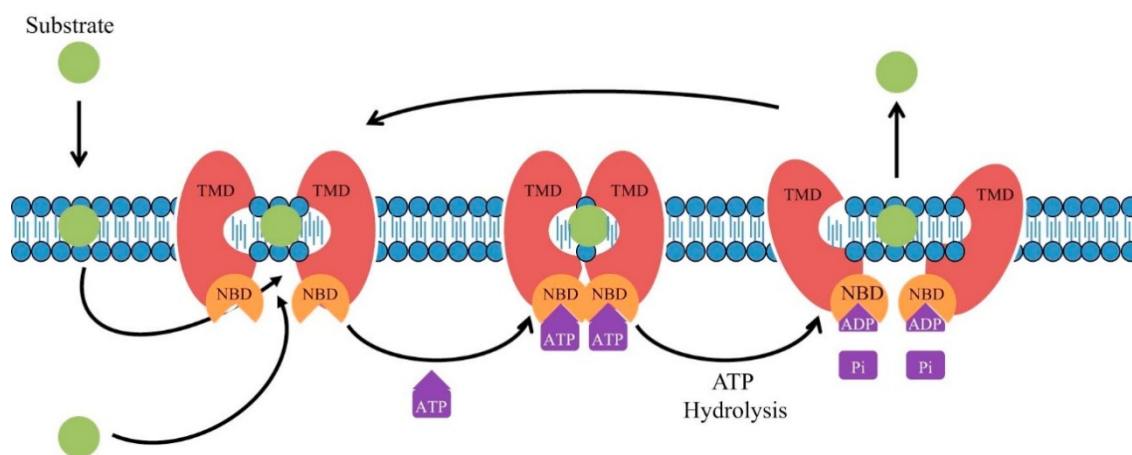
3.2 Črevná bariéra

Črevná bariéra vytvára v ľudskom tele povrch s plochou asi 400 m² a spotrebuje na svoju správnu funkciu približne 40 % celkového energetického výdaja (Bischoff *et al.*, 2014), oddeľuje vonkajšie prostredie od vnútorného a je dôležitá pre ľudské zdravie. Ide o vrstvu mucínu spolu s vrstvou polarizovaných enterocytov pospájaných pevnými spojmi (Keita and Söderholm, 2010). Intestinálna bariéra zabraňuje stratám vody a elektrolytov a bráni vstupu mikroorganizmov, zatiaľ čo umožňuje absorpciu nutričov a výmenu molekúl medzi vonkajším a vnútorným prostredím (Bischoff *et al.*, 2014). Transport liečiv cez

črevnú membránu je komplexný a dynamický proces, ktorý zahŕňa paralelný prechod zlúčenín cez niekoľko funkčných ciest. Pasívny transport prebieha cez bunkovú membránu enterocytov (transcelulárne) alebo cez tesné spoje medzi enterocytmi (paracelulárne). Existujú rôzne funkčné influxné a efluxné mechanizmy (prostredníctvom transportérov), ktoré určujú priepustnosť zlúčenín (Balimane and Chong, 2005). Väčšina perorálne podávaných liečiv je lipofilných a prechádzajú cez membránu enterocytov pasívne. Látky, ktoré prestúpia do enterocytu, môžu byť substráty pre apikálne efluxné transportéry, ktoré ich aktívne vylúčia späť do lumen čreva a tým ovplyvňujú ich biodostupnosť (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Pal *et al.*, 2011; König, Müller and Fromm, 2013).

3.3 Efluxné ABC liekové transportéry v črevnej bariére

Ľudské ABC transportéry tvoria veľkú rodinu 51 transmembránových proteínov rozdelených do siedmych podrodín, prenášajúce rozmanité množstvo substrátov vrátane peptidov, aminokyselín, cukrov a aj veľkého množstva hydrofóbných zlúčenín a metabolitov cez cytoplazmatickú membránu. Transport týchto zlúčenín je ATP-závislý, saturovateľný a môže prebiehať proti koncentračnému spádu. Energiu na tento proces poskytuje hydrolýza ATP (Vasiliou, Vasiliou and Nebert, 2008; Schinkel and Jonker, 2012; Zakeri-Milani and Valizadeh, 2014). ABC transportéry obsahujú nukleotid-viažuce domény (NBD) a transmembránové domény (TMD). Po naviazaní ATP na NBD dôjde ku konformačnej zmene TMD, čo umožní transport substrátov von z bunky (Pal *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016). Schematické znázornenie transportu je na Obr. 1. Medzi ABC transportéry zaraďujeme jedny z najdôležitejších efluxných transportérov ovplyvňujúcich črevnú absorpciu u človeka. Z nich treba spomenúť klinicky významné P-glykoproteín (P-gp, ABCB1, MDR1), multidrug resistance-associated proteins (MRP, ABCC) a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2), ktoré sú exprimované na apikálnej strane tenkého čreva a transportujú látky z enterocytu do lumen čreva (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Brand *et al.*, 2006; Schinkel and Jonker, 2012).



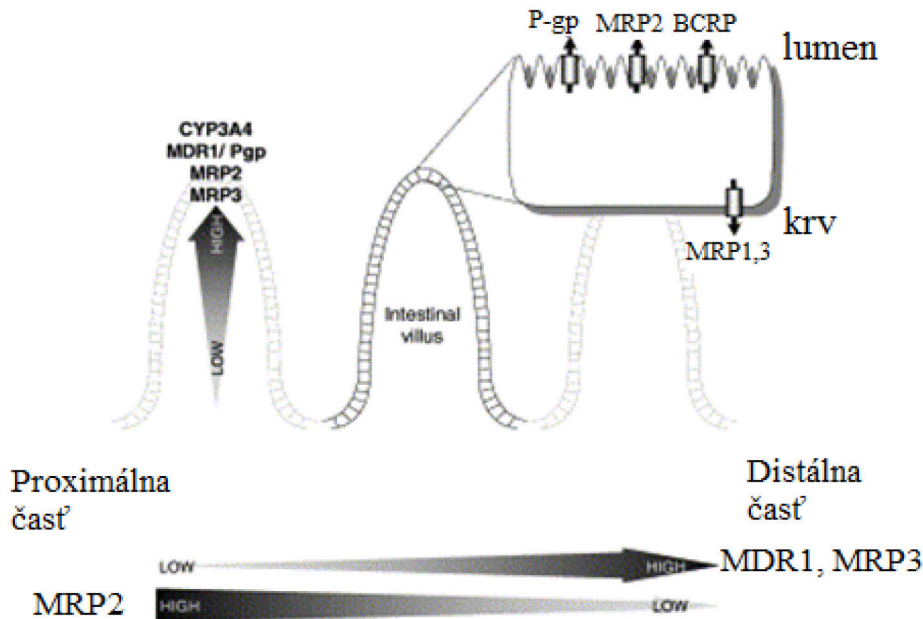
Obrázok 1: Schematické znázornenie molekulárneho mechanizmu ABC transportéru. TMD – transmembránová doména; NBD – nukleotid-viažuca doména; ATP – adenozíntrifosfát. Prevzaté z (Chen *et al.*, 2016).

3.3.1 P-glykoproteín (ABCB1)

Juliano a Ling v roku 1976 ako prví charakterizovali P-gp ako efluxný transportér na bunkách vaječníkov čínskeho škrečka rezistentných na kolchicín (Juliano and Ling, 1976). Tento transportér sa však nachádza v apikálnej membráne mnohých epitelových buniek, vrátane buniek ľadviny, pečene, pľúc, nadobličkovej žľazy, mozgu, tenkého i hrubého čreva, placenty a zohráva dôležitú fyziologickú úlohou v absorpcii, distribúcií a exkrécii xenobiotík (Sharom, 2008; Bansal *et al.*, 2009; Zakeri-Milani and Valizadeh, 2014). V tenkom čreve sa nachádza hlavne na špičke klkov a jeho množstvo narastá z proximálnej časti ku distálnej, vid' Obr. 2 (Dietrich, 2003; Lin, 2003; Chan, Lowes and Hirst, 2004).

P-gp je 170kDa proteín, produkt génu pre mnohopočetnú liekovú rezistenciu (*ABCB1*), zložený z dvoch pseudosymetrických polovic. Každá obsahuje NBD a TMD, ktorá obsahuje 6 transmembránových segmentov; vid' Obr. 3. (Pal *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2013). P-gp transportuje štruktúrne rozmanité substráty, najmä hydrofóbne amfipatické molekuly s veľkosťou 100 – 4000 Da. Avšak medzi jeho substráty patria aj neutrálne zlúčeniny, negatívne nabité molekuly a aj hydrofilné látky (Zakeri-Milani and Valizadeh, 2014). P-gp sprostredkováva transport antiretrovirotik zo skupiny NRTI/NtRTI ako tenofovir dizoproxil fumarát (tenofovir DF) a abakavir. Bola pozorovaná inhibícia

aktivity P-gp vplyvom inhibítorov proteázy (PI), ako sú ritonavir, lopinavir, tipranavir a nelfinavir (Kis *et al.*, 2010).

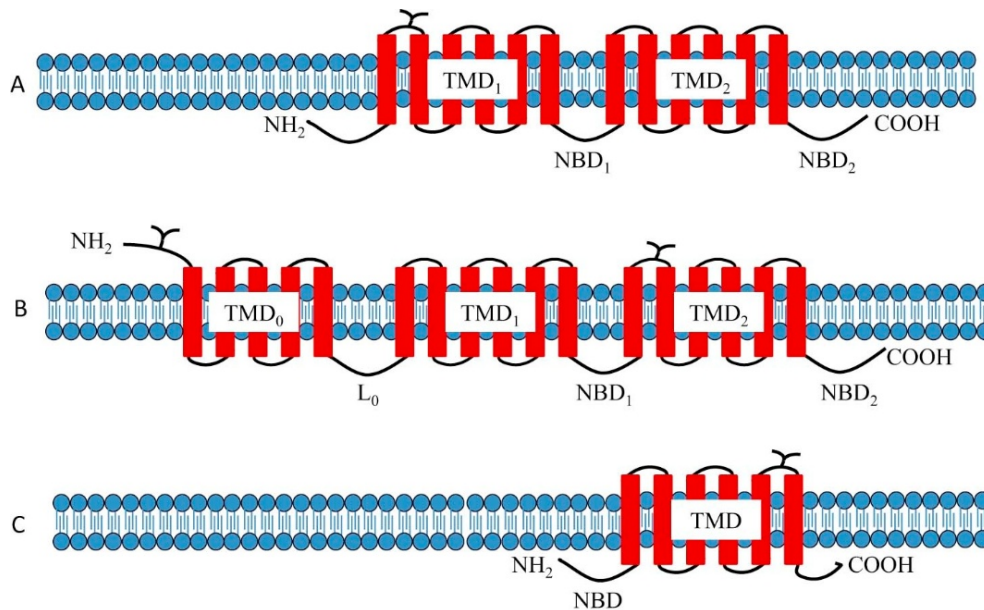


Obrázok 2: Znázornenie rôznorodej expresie transportérov v proximálnej časti tenkého čreva ku distálnej časti, ako aj v rámci kľku. Lokalizácia transportérov v membránach enterocytov. Prevzaté a upravené z (Chan, Lowes and Hirst, 2004).

3.3.2 MRP2 (ABCC2)

MRP2 je 190kDa multišpecifický transportér pre organické anióny a podobne ako P-gp sa nachádza v apikálnej membráne buniek v ktorých je exprimovaný, a to hlavne v membránach hepatocytov, v luminálnej membráne črevného epitelu a v luminálnej membráne proximálnych tubulov obličiek (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Schinkel and Jonker, 2012; Bugde *et al.*, 2017). Transportuje množstvo endogénnych látok a xenobiotík, hlavne ich konjugáty s glukuronidom, glutatiónom a sulfátom (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Jemnitz *et al.*, 2010), ale aj nemodifikované liečivá, napr. PI (ritonavir, lopinavir, atazanavir, saquinavir, a indinavir) a medzi jeho substráty patrí aj tenofovir DF (Kis *et al.*, 2010). Polymorfizmus *MRP2* 24 C>T je spojený s rýchlejšou clearance indinaviru až o 24 % (Anderson *et al.*, 2006). Expresia *MRP2* génu sa v čreve znižuje v smere od duodena k ileu, vid' Obr. 2 (Dietrich, 2003).

P-gp a MRP2 zdieľajú niektoré substráty, rovnako ako inhibítory, čo môže viesť k rozsiahlejším interakciám a zmene orálnej biodostupnosti liekov (Dietrich, 2003).



Obrázok 3: Model sekundárnej štruktúry efluxných ABC transportérov; (A) P-gp/ABCB1, (B) MRP2/ABCC2, (C) BCRP/ABCG2, TMD – transmembránová doména, NBD – nukleotid-viažuca doména. Prevzaté z (Chen et al., 2016).

3.3.3 BCRP (ABCG2)

ABCG2 bol pôvodne objavený v troch nezávislých laboratóriách a dostal aj rôzne názvy: Breast cancer resistance protein (BCRP) objavený v rakovinových bunkách pŕs rezistentných na doxorubicín, ABC transportér v placente (ABCP), Mitoxantrone resistance-associated gene (MXR). BCRP je 72kDa molekula, ktorá obsahuje jednu NBD doménu a 6 segmentov TMD (Obr. 3C). Je teda označovaný ako polovičný transportér a funkčnosť nadobúda homodimerizáciou (Doyle and Ross, 2003; Moitra, Lou and Dean, 2011; Schinkel and Jonker, 2012; Li and Paxton, 2013). Má relatívne široké zastúpenie v tkanivách, vo vysokej miere je *BCRP* gén exprimovaný v placente, následne v kapilárach hematoencefalickej bariéry, v prsiach, vo vaječníkoch, v tenkom čreve, pečeni, pľúcach, obličkách a potných žľazách (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Li and Paxton, 2013). Expresia *BCRP* spolu s *MRP2* v ľudskom jejunu je vyššia ako ostatných ABC transportérov, vrátane P-gp (Taipalensuu et al., 2001). Rovnako ako P-gp a MRP2, BCRP prenáša široké množstvo štruktúrne a funkčne rozmanitých substrátov ako napr.

antivirotiká, antibiotiká a protirakovinové liečivá. Aj keď je substrátová špecifickosť BCRP odlišná od P-gp alebo MRP2, majú tieto tri transportéry aj značné množstvo spoločných substrátov (Bugde *et al.*, 2017). Bunky exprimujúce BCRP vykazujú zníženie akumulácie zidovudínu a abakaviru oproti wild-type bunkám a tento efekt je zoslabený vplyvom selektívnych inhibítorov BCRP (Pan, Giri and Elmquist, 2007). Niektoré PI (lopinavir, nelfinavir, atazanavir) a NNRTI (delavirdin, efavirenz) nie sú substrátmi BCRP ale majú inhibičný potenciál na tento transportér v klinicky relevantných koncentráciách (Kis *et al.*, 2010).

3.4 Liekové interakcie na úrovni transportérov

Ak sa dve liečivá vzájomne ovplyvňujú a dôjde k zmene účinkov jedného z liekov hovoríme o liekovej interakcii (DDI) (Baxter, 2010). V staršiej spoločnosti sa DDIs stávajú dôležitou otázkou. Starší pacienti sú vystavení zložitej medikácii a so zvyšujúcim počtom liekov sa zvyšuje aj riziko závažných liekových interakcií (Montanari and Ecker, 2015). Membránové transportéry majú klinický význam vo farmakokinetike liečiv, tým že ovplyvňujú ich absorpciu, distribúciu a elimináciu. Avšak niektoré látky môžu modulovať expresiu alebo aktivitu transportérov, čo má za následok zmenu prenosu endogénnych a exogénnych látok. (Giacomini *et al.*, 2010; Giacomini and Huang, 2013). Membránové transportéry sú tak častým miestom farmakokinetických DDIs. Boli popísané dva hlavné mechanizmy transportérmi sprostredkovaných DDIs a to indukcia a inhibícia. Vplyvom indukcie črevného P-gp sa môže znížiť orálna biodostupnosť substrátov daného transportéru. Naopak inhibícia môže spôsobiť zvýšenie orálnej biodostupnosti liečiv, ktoré sú substrátmi P-gp (Müller and Fromm, 2011). Je vhodné vedieť, či je dané liečivo substrátom, inhibítorom alebo induktorom konkrétnych transportérov, aby bolo možné predpokladať DDIs. Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) odporúča sadu štandardizovaných experimentov na odhadnutie pravdepodobnosti, či je látka substrát, inhibítor alebo induktor P-gp a BCRP (Montanari and Ecker, 2015; FDA, 2017).

Bolo popísaných viacero DDIs zahŕňajúcich ARV. Transport sprostredkovaný P-gp je náchylný k inhibíciám mnohými PI a NNRTI. Chronické užívanie niektorých ARV môže spôsobiť indukciu P-gp. V *in vitro* štúdií PI, konkrétne ritonavir, amprenavir, nelfinavir,

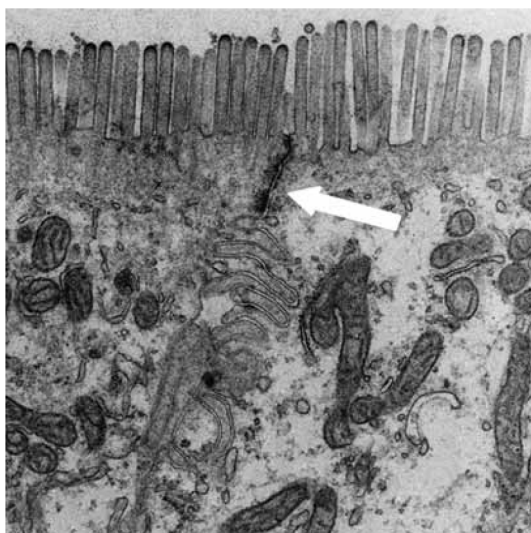
lopinavir, atazanavir a saquinavir, spôsobili indukciu P-gp v klinicky relevantných koncentráciách (Kis *et al.*, 2010, 2013).

3.5 Modely štúdia črevnej absorpcie

Pre štúdium prestupu látok cez črevnú bariéru sa používajú viaceré modely. Najviac používané sú: *in vitro* modely založené na bunkových líniách alebo zvieracích tkanivách s využitím Ussingovej komory, *in vivo* zvieracie modely, *in situ* perfúzne metódy a postupne vyvíjané *ex vivo* modely (Balimane and Chong, 2005; Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Pre *in vitro* štúdium bolo vyvinutých viacero bunkových línií napodobňujúcich *in vivo* intestinálny epitel, napríklad MDCK (Madin-Darby canine kidney), TC-7, LLC-PK1 (Lewis lung carcinoma-porcine kidney 1), HT-29, 2/4/A1 a najviac používané caco-2. Výhodou oproti enterocytom je, že imortalizované (nádorové) bunky rýchlo rastú do konfluentnej monovrstvy a nadobúdajú niektoré vlastnosti diferencovaných epiteliálnych buniek (Balimane and Chong, 2005).

3.5.1 *In vitro* Caco-2 model

Caco-2 je bunková línia vyvinutá z ľudského adenokarcinómu hrubého čreva, podliehajúca spontánnej enterocytickej diferenciacii. Predstavuje jednoduchý „high throughput“ model pre štúdium permeability liečiv cez črevnú bariéru. Na polykarbonátovej membráne vytvára po 6 – 7 dňoch monovrstvu buniek, ktoré v priebehu ďalšej kultivácie diferencujú na cylindrické polarizované bunky pospájané tesnými spojmi a na apikálnej strane nadobúdajú štruktúru podobnú mikrokľkom (Obr. 4). Táto diferencácia trvá cca 21 dní (Hidalgo, Raub and Borchardt, 1989; Yamashita *et al.*, 2000; Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007; Sun *et al.*, 2008).



Obrázok 4: Snímka z elektrónového mikroskopu zachycujúca apikálnu časť dvoch buniek *caco-2* kultivovaných na polykarbonátovej membráne počas 21 dní. Viditeľné sú dobre diferencované mikrovilky na povrchu buniek a tesný spoj tzv. „tight junction“ medzi bunkami (biela šípka). Prevzaté z (Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007).

Monovrstvy *caco-2* sa používajú na štúdium pasívneho transcelulárneho, paracelulárneho a vezikulárneho transportu. *Caco-2* bunková línia má nielen morfológickú podobnosť s epitelovými bunkami tenkého čreva, podobá sa aj v expresii typických intestinálnych transportných systémov, čo umožňuje používať tento model i na štúdium aktívneho transportu v dvoch smeroch (apikálne-bazolaterálnom a bazolaterálne-apikálnom) (Artursson, Palm and Luthman, 2001; Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007; Sun *et al.*, 2008; Giacomini *et al.*, 2010). Testovanie obojsmerného transportu na bunkách *caco-2* patrí medzi preferované *in vitro* metódy hodnotenia substrátov a inhibítorov ABC transportérov (FDA, 2017).

Avšak táto metóda má určité nedostatky, ktoré limitujú presnosť predikcie *in vivo*. Bunkové kultúry neodrážajú 3D štruktúru tkaniva ani jeho mnohobunkový charakter (Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Podobnosť expresie transportérov medzi bunkami *caco-2* a jednotlivými časťami ľudského tenkého čreva bola skúmaná. Výrazne nižšia expresia *BCRP* bola pozorovaná u *caco-2* v porovnaní s ľudským ileom (Englund *et al.*, 2006) a jejunom (Brück *et al.*, 2017). Rovnako aj ostatné farmaceuticky významné transportéry a enzýmy sú exprimované v inej miere ako v ľudskom čreve a ich miera expresie závisí aj od dĺžky kultivácie (Balimane and Chong, 2005; Sambuy *et al.*, 2005; van de Kerkhof, de Graaf and Groothuis, 2007; Brück *et al.*, 2017). *Caco-2* model viac pripomína epitel

hrubého čreva vďaka dobre vyvinutým tesným spojom (tight junctions), čo dokazuje podobnosť transepitelárnej elektrickej rezistencie (TEER) caco-2 buniek s hodnotami nadobudnutými v hrubom čreve, ktoré sú vyššie ako tie v tenkom čreve. Ďalšou nevýhodou je nepohyblivá vodná vrstva, ktorá môže pôsobiť ako bariéra pre transport lipofilných liečiv (Hillgren, Kato and Borchardt, 1995; Srinivasan *et al.*, 2015).

3.5.2 *Ex vivo* model ultratenkých intestinálnych rezov

Model tkanivových rezov bol prvýkrát vynájdený v roku 1923 Ottom Warburgom a neskôr preskúmaný Hansom Krebsom na štúdium metabolizmu v rôznych orgánoch. Vylepšenie metódy prišlo v roku 1980, kedy Carlos Krumdieck vyvinul nový poloautomatický prístroj Krumdieck tissue slicer, ktorý dokázal vytvárať rezy s presne definovanou hrúbkou. Ďalej bola táto metóda vylepšovaná a v súčasnosti sa skúma aj jej uplatnenie v testovaní transportu a interakcií liečiv (Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Najskôr bola technika tenkých rezov používaná hlavne na pevné orgány ako pečeň a obličky. Techniku tenkých intestinálnych rezov predstavil až v roku 2005 De Kanter *et al.*, ktorý črevo vyplnil agarózou a umožnil krájanie pomocou prístroja Krumdieck tissue slicer (De Kanter *et al.*, 2005). Metódu tenkých intestinálnych rezov (PCIS) možno použiť na črevo pokusných zvierat ako aj na ľudské črevo, a tým odstrániť bariéru medzidruhových rozdielov. Dostupnosť ľudského tkaniva je však obmedzená, preto sa častejšie používa potkanie črevo (De Graaf *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016).

PCIS sú pripravované priečnym krájaním čreva, po vyplnení a zaliatí agarózou, pomocou prístroja Krumdieck tissue slicer, ktorý umožňuje rýchle poloautomatické krájanie. PCIS predstavujú *ex vivo* mini-model čreva, ktorý obsahuje všetky typy buniek intestinálneho epitelu v prirodzenom prostredí. Črevo je heterogénny orgán s charakteristickými rozdielmi v jednotlivých segmentoch, vrátane expresie transportérov a metabolických enzýmov. Výhodou PCIS je možnosť štúdia regionálneho gradientu aktivity enzýmov a transportérov. V rámci jedného experimentu je možné pripraviť viac ako 100 rezov z každého segmentu, čo umožňuje vykonať viac ako 100 testov a potreba experimentálnych zvierat sa znižuje (De Graaf *et al.*, 2010; Niu, de Graaf and Groothuis, 2013; Li *et al.*, 2015; Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Nevýhodou metódy je vystavenie slizničnej a seróznej strany rovnakému médiu, v dôsledku toho nie je možné s PCIS

skúmať vektorový transport liečiv cez črevnú stenu. Ďalšou limitáciou je pomerne nízka životaschopnosť tkaniva (8 hodín tenké črevo a 24 hodín hrubé črevo) a možnosť morfológického poškodenia v priebehu prípravy (De Graaf *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016).

4 HYPOTÉZA

Súbežné podávanie antiretrovirov v terapii HIV predstavuje vyššie riziko interakcií na úrovni absorpcie, pretože množstvo liečiv z tejto skupiny sú popísanými substrátmi alebo inhibítormi ABC efluxných transportérov. Riziko týchto interakcií sa zvyšuje s rastúcim počtom farmakoterapie na liečbu prípadných komorbidít. Pochopenie ako antiretrovirov interagujú s ABC transportérmi a aj s inými súbežne podávanými liečivami je rozhodujúce pre úspešný výsledok liečby. Súčasný odporúčaný model pre štúdium črevnej absorpcie *caco-2* má určité limitácie, takže je vhodné hľadanie alternatívnych modelov, ktoré by reálnejšie predstavovali *in vivo* systém.

5 CIEĽ PRÁCE

Zavedenie *ex vivo* metodiky ultratenkých potkaních intestinálnych rezov na štúdium transportu pomocou modelového substrátu P-gp RHD123. Analýza inhibičného potenciálu vybraných antiretrovirov s P-gp *in vitro* a *ex vivo*. Porovnanie výsledkov z oboch modelov.

6 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

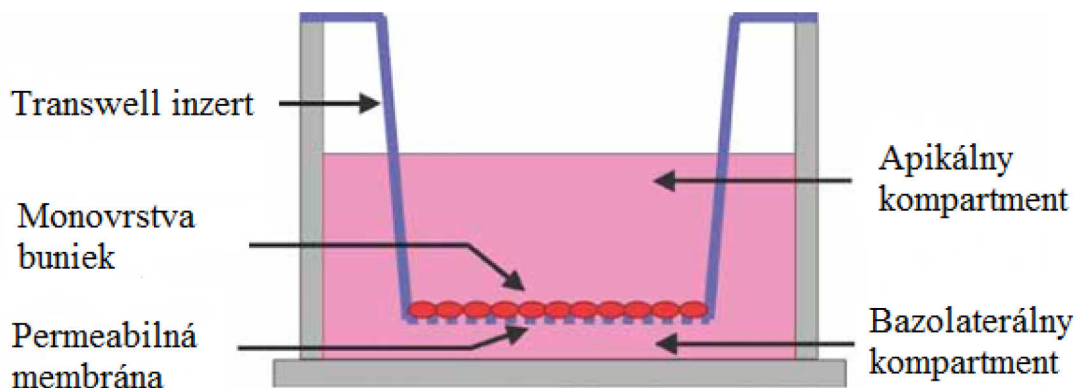
6.1 Chemikálie

- Rhodamin 123 (RHD123)
- Saquinavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Atazanavir (NIH AIDS Reagent Program)
- Tenofovir Disoproxil Fumarat (Tenofovir DF; NIH AIDS Reagent Program)
- Zidovudin (NIH AIDS Reagent Program)
- DMSO (Dimethyl sulfoxid; Sigma-Aldrich)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich)
- FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma-Aldrich)
- NEAA (Non-essential Amino Acid)
- P/S (Penicilin/Streptomycin)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Trypsin/EDTA
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)
- Hovädzí sérový albumín (Sigma-Aldrich)
- NaHCO₃
- HEPES
- Metánsulfónová kyselina (MsOH)
- KHP (Krebs-Henseleit pufr) pH = 7,42
- Williams medium E (WME, s obsahom l-glutamínu; Invitrogen, cat. no. 32551)
- Agaróza (Low-gelling-temperature agarose type VII; Sigma-Aldrich, cat. no. A0701)
- ACN
- NaOH
- Éter

6.2 Transportné štúdie *in vitro*

6.2.1 Kultivácia buniek

Caco-2 bunková línia bola obdržaná od organizácie ATCC (American Type Culture Collection). Bunky boli udržiavané v sterilnom prostredí pri teplote 37 °C v kultivačnom médiu DMEM obohatenom o 10 % fetálneho hovädzieho séra (FBS), 1 % neesenciálnych aminokyselín (NEAA) a 1 % Penicilín/Streptomycínu (P/S) v atmosfére s obsahom 5 % CO₂ a 90% relatívnou vlhkosťou. Bunky rástli v 75cm² kultivačných fľašiach a boli pasážované každých 5 dní v rozdeľovacom pomere 1:5. Pre experimenty boli bunky nasadené na Transwell® inzerty s mikroporóznou polykarbonátovou membránou (Transwell® Permeable Support, Corning Incorporated; Cat. No. 3401) v koncentrácií 300 000 buniek/membránu. Plocha membrány je 1,12 cm² a veľkosť pórov je 0,4 μm. Výmena média (1,5 ml v bazolaterálnom kompartmente a 0,5 ml v apikálnom kompartmente, vid' Obr. 5) prebiehala každý druhý deň. Kultivácia a diferenciácia buniek prebiehala 21 dní a počas tejto doby bola kontrolovaná integrita monovrstvy buniek pomocou TEER.

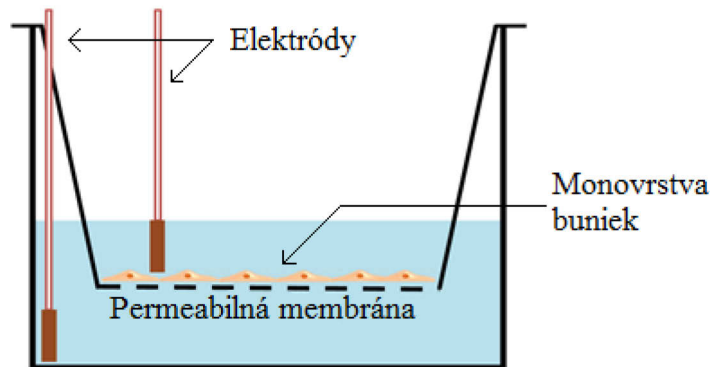


Obrázok 5: Schematické znázornenie jamky s inzertom prevzaté a upravené z <http://media.wiley.com/wires/WNAN/WNAN53/mfig003.jpg> s prístupom 13.2.2018

6.2.2 Meranie transepitelárnej elektrickej rezistencie (TEER)

TEER slúži ako indikátor integrity monovrstvy buniek na membráne a reprezentuje pevnosť bunkových spojov (Yamashita *et al.*, 2000; Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007). TEER bola meraná pomocou Millipore Milli-Cell Electrical Resistance System (ERS). Tento systém obsahuje dve elektródy rôznej dĺžky, aby presne sedela dlhšia elektróda do bazolaterálnej časti a kratšia do apikálnej časti transwellu, vid' Obr. 6.

Táto metóda je závislá na teplote, preto boli elektródy inkubované cca. 30 minút pri teplote 37 °C pokiaľ nedosiahli rovnakú teplotu ako médium a bunky na transwelloch. Medzi ďalšie faktory ovplyvňujúce meranie TEER patrí zloženie média, číslo pasáže a čas od nasadenia buniek (Srinivasan *et al.*, 2015). Elektródy boli sterilizované v 70% (v/v) etanole a oplachované DMEM medzi meraniami jednotlivých jamiek. Pri poruche integrity monovrstvy by dochádzalo k poklesu TEER pod 165 Ω cm² (Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007).



Obrázok 6: Schematické znázornenie merania TEER prevzaté a upravené z (Srinivasan *et al.*, 2015)

6.2.3 Postup experimentu

Rhodamín 123 (RHD123) bol použitý ako modelový substrát P-gp. Jeho transport cez monovrstvu caco-2 buniek bol skúmaný v smere apikálne-bazolaterálnom (A-B) a bazolaterálne-apikálnom (B-A). Kultivačné médium bolo vymenené 12 – 24 hodín pred experimentom, aby mali bunky dostatok esenciálnych nutrientov (Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007). Tesne pred uskutočnením experimentu boli zmerané hodnoty TEER a následne bolo odsaté kultivačné médium. Potom boli bunky premyté predhriatym fosfátovým pufrom (PBS, 37 °C). V ďalšej fáze experimentu bola vykonaná preinkubácia (30 min) v médiu HBSS s/bez prítomnosti modelového inhibítora (elacridar) alebo skúmaných látok (saquinavir, atazanavir, zidovudin alebo tenofovir DF) s upraveným pH pre apikálny kompartment pH=6,5 a pre bazolaterálny kompartment pH=7,4. Úprava pH bola vykonaná pomocou HEPES puftru a MsOH. Následne boli preinkubačné roztoky nahradené inkubačnými roztokmi s obsahom 1 μ M RHD123 v donorovom kompartmente a akceptorový kompartment obsahoval roztok HBSS s 1 % hovädzieho sérového albumínu; pH roztokov v apikálnom a bazolaterálnom

kompartmente bolo upravené ako v pre-inkubácií. Po 60 a 120 minútach boli odoberané vzorky s objemom 200 μl z akceptorového kompartmentu. Odobrané množstvo po 60 minútach bolo nahradzované príslušnými roztokmi. Koncentrácia RHD123 bola stanovená meraním fluorescencie pomocou prístroja TECAN Infinite M200 (excitácia: 485 nm, emisia: 529 nm) a získané údaje spracované v programe GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) a použité na výpočet permabilných koeficientov a efluxných pomerov.

6.2.4 Výpočet efluxného pomeru

Účasť aktívneho transportu sa dá odhadnúť pomocou efluxného pomeru rP_{app} , ktorý vypočítame ako pomer permabilných koeficientov P_{app} [$\text{cm}\times\text{s}^{-1}$] v smere bazolaterálne-apikálnom (B-A) a apikálne-bazolaterálnom (A-B) (Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007; Tong *et al.*, 2007). FDA uvádza, že látka je substrátom P-gp, ak je jej efluxný pomer väčší ako 2 a vplyvom známeho inhibítora P-gp sa efluxný pomer zníži aspoň o 50 % (Brouwer *et al.*, 2013; FDA, 2017).

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V_r}{A \times C_0}$$

$$rP_{app} = \frac{P_{app}(BA)}{P_{app}(AB)}$$

Kde dC/dt je zmena koncentrácie v čase [$\text{nM}\times\text{s}^{-1}$] meraná v 60 a 120 minúte; V_r je objem akceptorového kompartmentu [cm^3]; A je plocha monovrstvy buniek [cm^2] a C_0 predstavuje počiatočnú koncentráciu [nM] (Hubatsch, Ragnarsson and Artursson, 2007; Tong *et al.*, 2007).

6.3 Akumulačné štúdie *ex vivo*

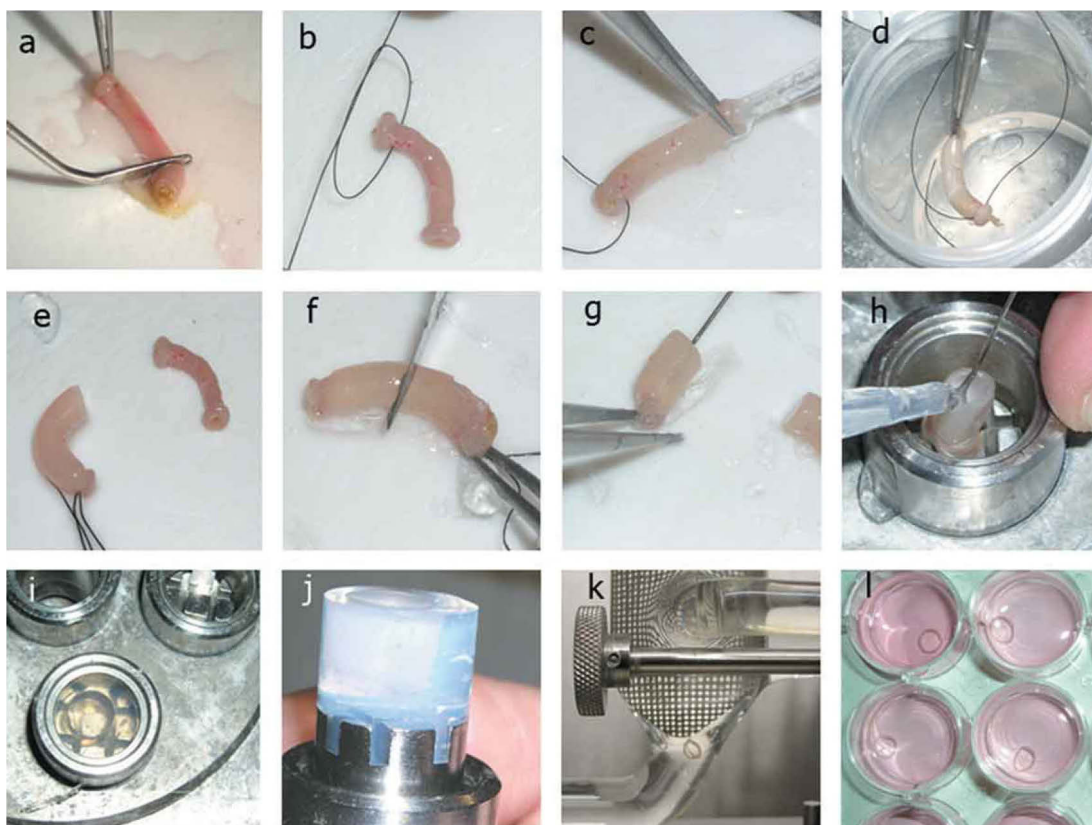
6.3.1 Príprava intestinálnych rezov PCIS (Precision-cut intestinal slices)

Na experimenty boli použité potkany kmeňa Wistar. Potkan (samec; váha: 240 – 560 g) bol uvedený inhaláciou éteru do celkovej anestézie a následne bol usmrtený zlomením väzu a vykŕvený prerušením karotíd. Experiment bol povolený Odbornou komisiou pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat a to pod čísлом MSMT-8358/2016-14. Odobrané črevo bolo urýchlene vložené do ochladeného (4°C) Krebs-

Henseleit pufri (KHP), ktorý bol okysličený prebublaním pneumoxidom (95 % O₂, 5 % CO₂) po dobu 30 minút. Zloženie KHP je uvedené v tab. 1. Počas celej doby prípravy rezu bolo črevné tkanivo udržiavané pri 4 °C a premývané KHP kvôli jeho citlivosti na teplo (De Graaf *et al.*, 2010). Spracovanie čreva je zobrazené na obr. 7. Na ľadom chladenej podložke bolo pomocou skalpelu oddelené ileum. Opatrne bol odstránený obsah čreva a tukové tkanivo (obr. 7a). Ileum bolo rozdelené na časti s dĺžkou 4 cm a následne umiestnené do KHP (4 °C). Jednotlivé časti ilea boli niekoľkokrát premyté KHP a na jednom konci uzavreté chirurgickým vláknom a naplnené 37°C agarózou (obr. 7b – c). Takto pripravený segment ilea bol urýchlene vložený do 4°C KHP (obr.7d). Po 1 minúte, keď agaróza stuhla na flexibilný gél, boli segmenty ilea rozdelené na dve polovice, vložené do valčeka a zaliate agarózou a po stuhnutí vložené do krájača Krumdieck Tissue Slicer MD4000 napojeného na chladiaci okruh a vychladeného na 4 °C (obr. 7e – k). Prístroj krájal črevo v prostredí KHP na ultratenké rezy s hrúbkou 250 µm, ktoré boli odoberané do kadičky a chladené na ľade.

Tabuľka 1: Zloženie Krebs-Henseleit pufri

Zloženie KHP	koncentrácia [mM]
NaCl	5
KCl	118
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.1
KH ₂ PO ₄	1.1
NaHCO ₃	25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.1
D-glukóza	25
HEPES	9



Obrázok 7: Preparácia a inkubácia potkaních intestinálnych rezov. Po odstránení obsahu čreva (a), bola jedna strana uzavretá vláknom (b). Segment sa naplnil 37°C agarózou (c) a schladil (d). Vytvoril sa valček asi 5 mm hrubý (e), ktorý bol rozdelený na dve polovice (f). Pomocou špendlíka (g) bol segment ukotvený v predchladenej valcovej forme (h) a zaliaty agarózou (i). Vzniknutý valček (j) bol premiestnený do krájača a rezaný na ultratenké rezy (k), ktoré boli následne inkubované v 24-jamkovej doštičke. Prevzaté z (De Graaf et al., 2010).

6.3.2 Akumulácie s využitím PCIS

Neporušené ultratenké rezy boli zbavené agarózy a vložené do 500 μ l WME (Williams medium E) predhriateho na 37 °C a nasýteného pneumoxidom (95 % O₂, 5 % CO₂) s/bez prítomnosti skúmaných látok (saquinavir, atazanavir, zidovudin alebo tenofovir DF). Pracovalo sa na vyhrievanej podložke s teplotou 37 °C. Následne prebiehala pre-inkubácia s modelovým inhibítorom elakridarom alebo testovanou látkou po dobu 30 minút v atmosfére 95 % O₂ a 5 % CO₂ pri teplote 37 °C na horizontálnej trepačke s frekvenciou 90 kmitov za sekundu. Po pre-inkubácii boli rezy premiestnené do 500 μ l inkubačného WME média s obsahom modelového substrátu P-gp RHD123

v koncentrácii 10 μ M a modelového inhibítora/prísľušnej skúmanej látky. Doba inkubácie bola 120 minút a prebiehala za rovnakých podmienok ako pre-inkubácia. Po inkubácií sa každý rez premyl v KHP (4 °C) a vložil do mikroskúmavky so sklenenými guľčkami. K jednotlivým rezom bolo pridaných 600 μ l ACN : H₂O (2 : 1) a potom bolo tkanivo zhomogenizované dvakrát po dobu 40 sekúnd v homogenizátore FastPrep-24™ 5G Instrument. V ďalšom kroku bol homogenizát vložený do centrifúgy na 10 minút pri 10000 r.p.m. Zo supernatantu bolo odobraných 200 μ l, z ktorých bola stanovená koncentrácia RHD123 meraním fluorescence pomocou prístroja TECAN Infinite M200 (excitácia: 485 nm, emisia: 529 nm).

6.3.3 Stanovenie proteínu

Nameraná fluorescence RHD123 bola normalizovaná na množstvo proteínu v každom reze. Z mikroskúmavky sa nechal roztok ACN : H₂O (2 : 1) odpariť a k tkanivu sa pridalo 200 μ l 5M NaOH. Po rozpustení tkaniva bola pridaná voda, aby sa dosiahla finálna koncentrácia 1 M NaOH potrebná na analýzu. Obsah proteínu sa stanovil s využitím Pierce BCA Protein Assay Kit s kalibračnou krivkou pripravenou zo sérového hovädzieho albumínu.

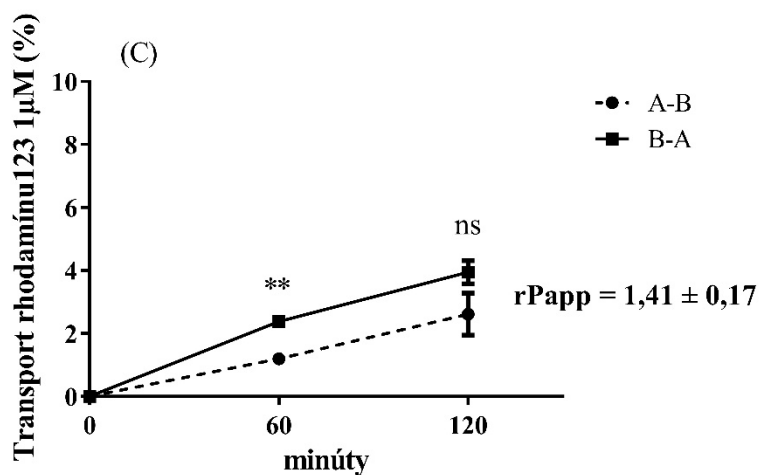
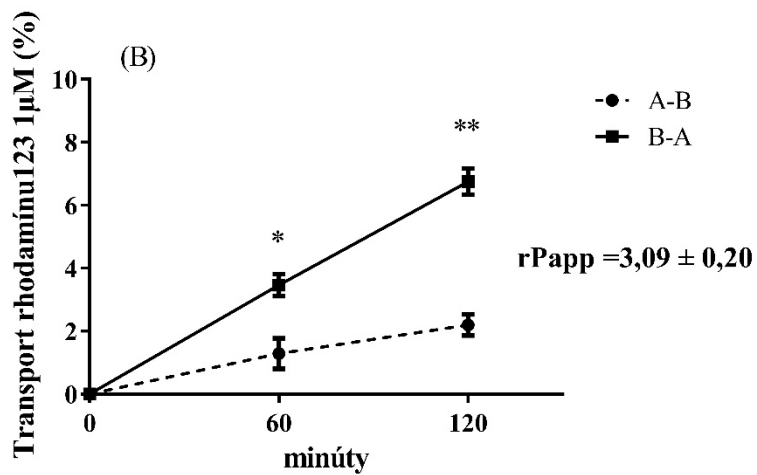
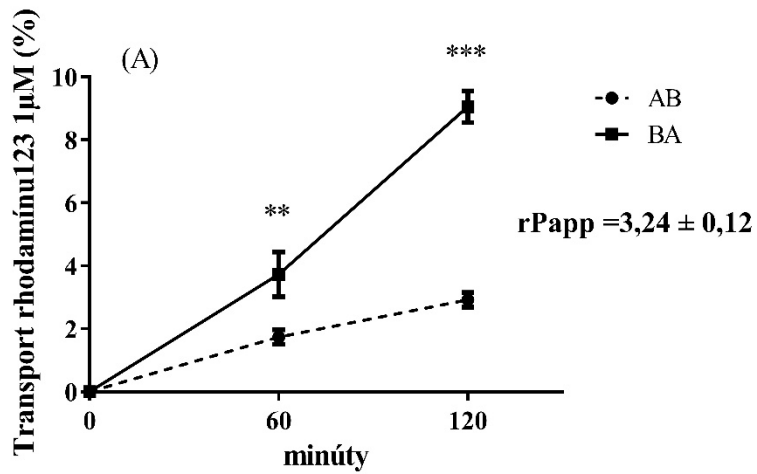
6.4 Štatistické spracovanie dát

Štatistická analýza a grafické vyjadrenie výsledkov boli spracované pomocou programu GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Pre zhodnotenie vplyvu testovaných látok v *in vitro* transportných štúdiách boli použité testy one-way ANOVA s *post hoc* Dunnett testom a parametrický two-tailed Student's *t*-test. Druhý spomenutý test bol použitý aj pre porovnanie rozdielov transportu v smere A-B a B-A. Pozorovanie zmeny akumulácie v *ex vivo* metóde bolo vyhodnotené pomocou Mann-Whitney testu a Kruskal-Wallis testu s *post hoc* Dunn's testom. Štatistická významnosť bola označená ns pre $P > 0.05$; * pre $p \leq 0,05$; ** pre $p \leq 0,01$ a *** pre $p \leq 0,001$.

7 VÝSLEDKY

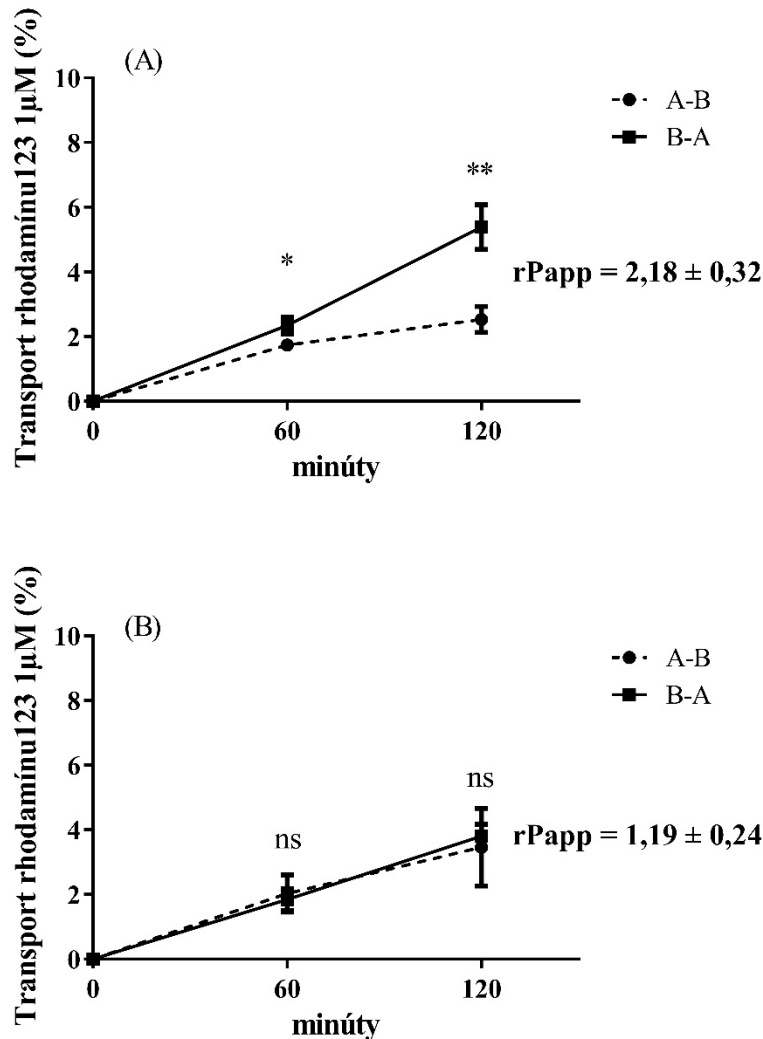
7.1 Transportné štúdie RHD123 cez monovrstvu buniek Caco-2

Študovali sme obojsmerný transport $1\mu\text{M}$ RHD123 cez monovrstvu caco-2 bez/s prítomnosťou inhibítorov proteázy saquinaviru (Obr. 8) a atazanaviru (Obr. 9) a nukleozidových inhibítorov reverznej transkriptázy zidovudínu a tenofoviru DF (Obr. 10). Prestup RHD123 cez vrstvu caco-2 buniek bol meraný v čase inkubácie 60 a 120 minút a vyjadrený ako percento koncentrácie, ktoré prestúpilo z donorového do akceptorového kompartmentu. Asymetria obojsmerného transportu bola kvantifikovaná pomocou efluxného pomeru (rP_{app} ; Obr. 11) v čase 120 minút. Transport RHD123 bol významne vyšší v smere bazolaterálne-apikálnom (B-A) ako v smere apikálne-bazolaterálnom (A-B); $rP_{app} = 3,24 \pm 0,12$ (Obr. 8A, 11). Modelový inhibítor P-gp/BCRP elacridar ($2\mu\text{M}$) spôsobil zníženie efluxného pomeru na hodnotu $rP_{app} = 1,02 \pm 0,16$ (graf nie je prezentovaný). Saquinavir ($5\mu\text{M}$) neovplyvnil asymetriu transportu $rP_{app} = 3,09 \pm 0,20$ (Obr. 8B, 11), zatiaľ čo $20\mu\text{M}$ saquinavir mal signifikantný inhibičný efekt; $rP_{app} = 1,41 \pm 0,17$ (Obr. 8C, 11). Obe testované koncentrácie atazanaviru $20\mu\text{M}$ a $50\mu\text{M}$ signifikantne inhibovali transport RHD123; $rP_{app} = 2,18 \pm 0,32$ (Obr. 9A, 11), respektíve; $rP_{app} = 1,19 \pm 0,24$ (Obr. 9B, 11). Z dôvodu zníženia efluxného pomeru vplyvom $20\mu\text{M}$ saquinaviru, $20\mu\text{M}$ a $50\mu\text{M}$ atazanaviru môžeme predpokladať inhibičný potenciál týchto látok na transport sprostredkovaný P-gp. Zidovudín a tenofovir DF v koncentráciách $100\mu\text{M}$ nemali signifikantný vplyv na transport RHD123 cez monovrstvu caco-2 o čom svedčia hodnoty $rP_{app} = 3,11 \pm 0,46$; $rP_{app} = 3,30 \pm 0,13$ v uvedenom poradí (Obr. 10, 11).

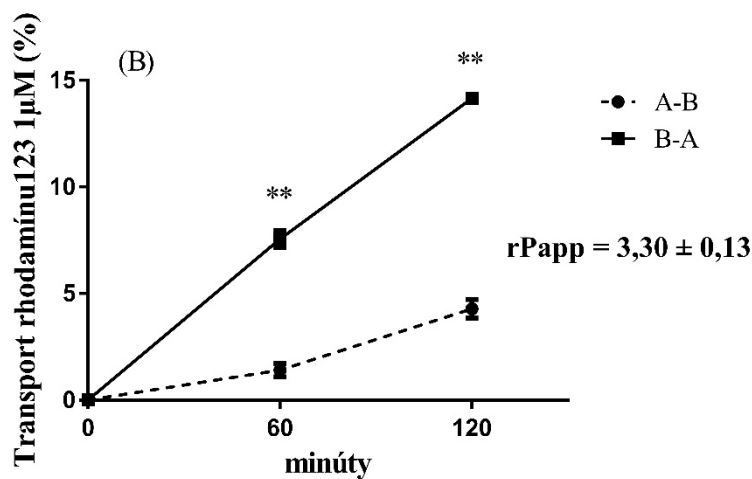
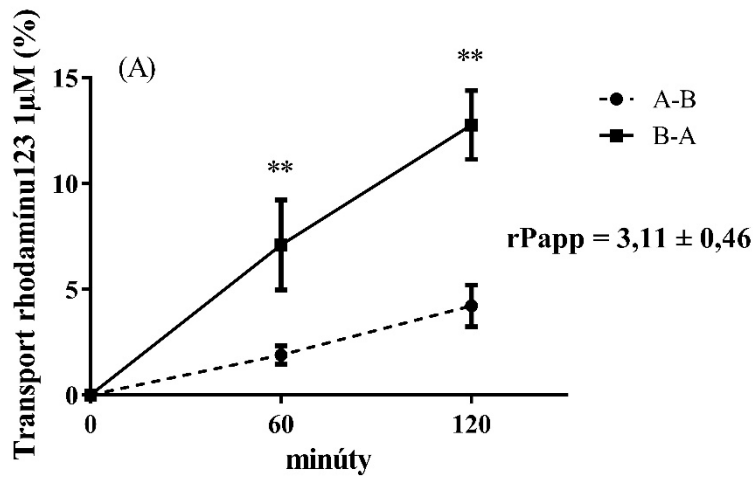


Obrázok 8: Grafy zobrazujú časovú závislosť transportu RHD123 (1 μ M) v smere apikálne-bazolaterálnom (A-B) a bazolaterálne-apikálnom (B-A) bez skúmaných látok (A) a v prítomnosti 5 μ M saquinaviru (B) a 20 μ M saquinaviru, (C). Transport je

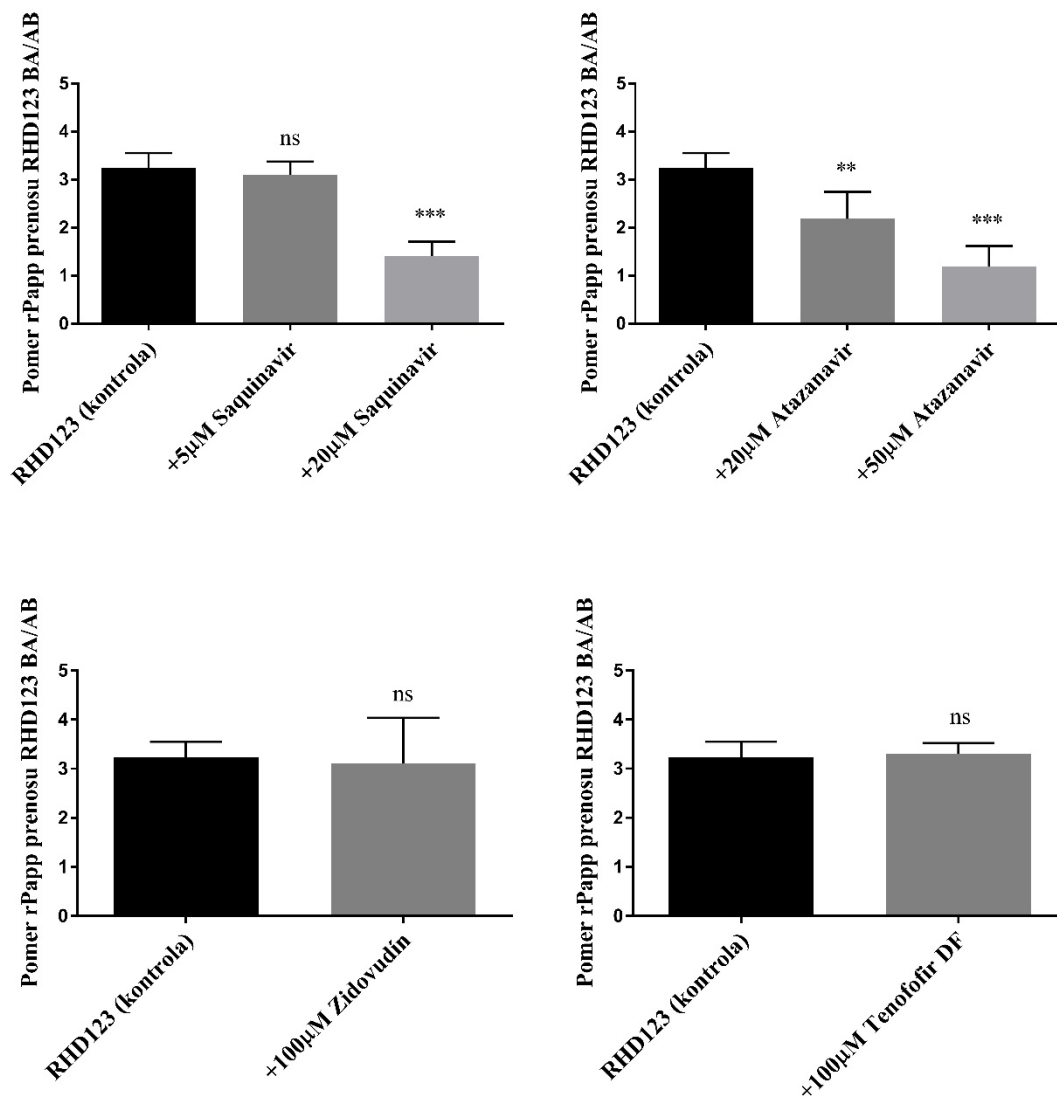
vyjadrený ako percento koncentrácie modelového substrátu, ktorý prestúpil cez monovrstvu *caco-2* buniek z donorového kompartmentu. Namerané hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka z troch nezávislých experimentov vykonaných v triplikátoch. Štatistická významnosť bola posudzovaná pomocou *t*-testu s hladinami významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$



Obrázok 9: Grafy zobrazujú časovú závislosť transportu RHD123 (1 μM) v smere apikálne-bazolaterálnom (A-B) a bazolaterálne-apikálnom (B-A) v prítomnosti 20 μM atazanaviru (A) a 50 μM atazanaviru (B). Transport je vyjadrený ako percento koncentrácie modelového substrátu, ktorý prestúpil cez monovrstvu *caco-2* buniek z donorového kompartmentu. Namerané hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka z troch nezávislých experimentov vykonaných v triplikátoch. Štatistická významnosť bola posudzovaná pomocou *t*-testu s hladinami významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$



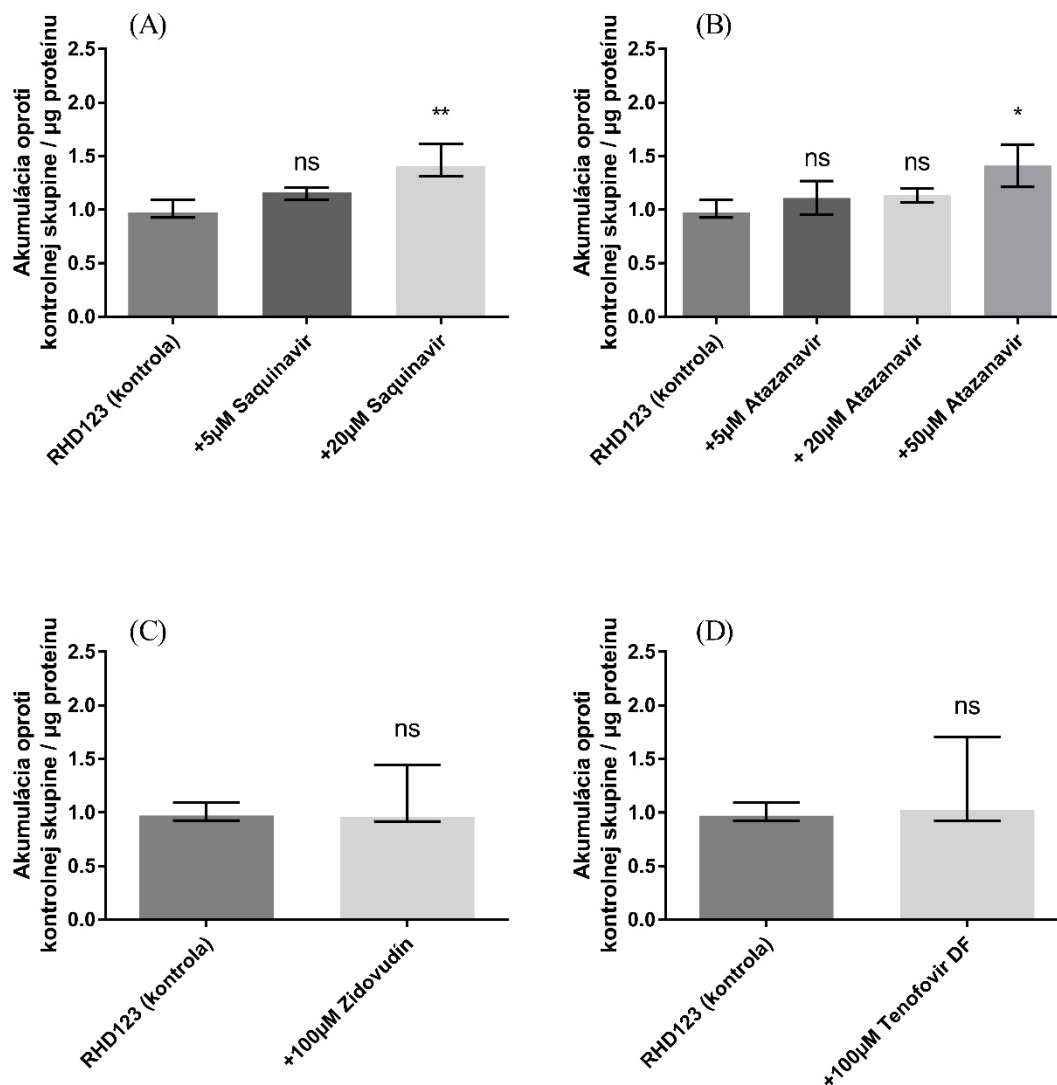
Obrázok 10: Grafy zobrazujú časovú závislosť transportu RHD123 (1μM) v smere apikálne-bazolaterálnom (A-B) a bazolaterálne-apikálnom (B-A) v prítomnosti 100μM zidovudínu (A) a 100μM tenofoviru DF (B). Transport je vyjadrený ako percento koncentrácie modelového substrátu, ktorý prestúpil cez monovrstvu *caco-2* buniek z donorového kompartmentu. Namerané hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka z troch nezávislých experimentov vykonaných v triplikátoch. Štatistická významnosť bola posudzovaná pomocou t-testu s hladinami významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$



Obrázok 11: Vyjadrenie vplyvu testovaných látok na obojsmerný transport RHD123 ($1\mu\text{M}$) cez monovrstvu *caco-2* pomocou pomeru permabilných koeficientov v smere B-A a A-B (rPapp) po 2 hodinách inkubácie. Uvedené hodnoty rPapp sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka z troch nezávislých experimentov vykonaných v triplikátoch. Kontrola obsahuje dáta zo 7 experimentov. Štatistická významnosť bola posudzovaná pomocou one-way ANOVA s post hoc Dunnett testom a pomocou t-testu s hladinami významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

7.2 Akumulačné štúdie RHD123 s použitím PCIS

Skúmali sme zmeny akumulácie modelového substrátu P-gp rhodamínu (10 μM) v potkaních PCIS ilea vplyvom saquinaviru (5 μM a 20 μM), atazanaviru (5 μM , 20 μM a 50 μM), zidovudínu (100 μM) a tenofoviru DF (100 μM). Množstvo akumulovaného RHD123 v rezoch sme normalizovali na proteín a vyjadrili ako pomer voči kontrole, ktorú predstavoval RHD123 bez testovaných látok. Elacridar (2 μM) spôsobil zvýšenie akumulácie RHD123 (10 μM) v PCIS 2,06-krát (graf nie je prezentovaný). Akumulácia RHD123 v PCIS sa vplyvom 20 μM saquinaviru a 50 μM atazanaviru zvýšila 1,40, respektíve 1,41-krát (Obr. 12A,B). Saquinavir v koncentrácií 5 μM nespôsobil signifikantné zvýšenie akumulácie RHD123 v PCIS (1,16-krát) (Obr. 12A). Rovnako nedošlo k štatisticky významnému zvýšeniu akumulácie RHD123 (1,11-krát) účinkom 5 μM atazanaviru a 20 μM atazanaviru (1,13-krát) (Obr. 12B). Maximálne testované koncentrácie zidovudínu a tenofoviru DF nespôsobili signifikantné zvýšenie akumulácie RHD123 v PCIS (0,96, respektíve 1,03-krát) (Obr. 12C,D).



Obrázok 12: Vplyv testovaných látok saquinaviru (A), atazanaviru (B), zidovudínu (C) a tenofoviru DF (D) na dvojhodinovú akumuláciu 10µM RHD123 v rezoch ilea. Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako medián na proteín normalizovaných hodnôt vzťahnutých ku kontrole s medzikvartilovým rozpätím z troch nezávislých biologických experimentov vykonaných v hexaplikátoch. Kontrola obsahuje dáta z 9 biologických replikátov. Štatistická významnosť bola analyzovaná pomocou testu Kruskal-Wallis s post hoc Dunn's testom Hladiny významnosti: ns $P > 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

8 DISKUSIA

Intestinálne transportéry hrajú významnú úlohu v absorpcii liečiv, a teda môžu ovplyvňovať ich účinnosť a bezpečnosť. Znížená črevná absorpcia môže byť spôsobená aktivitou efluxných ABC transportérov, ktoré aktívne prenášajú substráty z enterocytov späť do lumen čreva. Taktiež predstavujú miesto možného výskytu DDIs, kedy súbežné perorálne podávanie viacerých látok môže ovplyvniť ich dosiahnuté plazmatické koncentrácie a ich lokálnu koncentráciu v črevnom epiteli (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Pal *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). Rizikovú skupinu náchylnú k DDIs predstavujú HIV pozitívni pacienti s chronickým užívaním kombinácií liečiv. Mnohé ARV sú popísanými substrátmi a/alebo inhibítormi ABC transportérov (Kis *et al.*, 2010, 2013). Štúdium transportérmi sprostredkovaných interakcií je súčasťou predklinického výskumu liečiv. FDA odporúča *in vitro* caco-2 model pre štúdium obojsmerného transportu cez črevnú bariéru (Giacomini *et al.*, 2010; FDA, 2017). Výskumy dokazujú, že expresia transportérov v bunkovej línii caco-2 sa líši od fyziologických hladín v ľudskom čreve (Sun *et al.*, 2002; Englund *et al.*, 2006; Brück *et al.*, 2017), a preto sa hľadajú metódy nové či komplementárne (Li, de Graaf and Groothuis, 2016).

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na zavedenie alternatívnej *ex vivo* metódy ultratenkých intestinálnych rezov (PCIS), ako reálnejšieho „high throughput“ modelu črevnej bariéry, pre štúdium interakcii liečiv na/s črevnými efluxnými transportérmi. V posledných desaťročiach bol vyvíjaný model PCIS na štúdium metabolizmu a toxicity liečiv a v posledných rokoch aj na štúdium transportu s využitím modelových látok (De Kanter *et al.*, 2005; Martignoni, Groothuis and de Kanter, 2006; Van De Kerkhof *et al.*, 2006; De Graaf *et al.*, 2010; Niu, de Graaf and Groothuis, 2013; Li *et al.*, 2015). My sme pomocou tohto modelu testovali inhibičný vplyv vybraných PI (saquinaviru a atazanaviru) a NRTI (zidovudínu a tenofoviru DF) v rôznych koncentráciách na transport modelového substrátu P-gp RHD123. Maximálne koncentrácie antiretrovirotík boli limitované rozpustnosťou v inkubačnom médiu. Rovnaké látky sme testovali aj pomocou odporúčaného *in vitro* modelu caco-2 a výsledky porovnali. RDH123 je selektívny substrát P-gp, ktorý je fluorescenčne detekovateľný (Troutman and Thakker, 2003; Mandracchia *et al.*, 2017). Nami zmeraný efluxný pomer RHD123 ($rP_{app} = 3,24 \pm 0,12$) (Obr. 8A, 11) je porovnateľný s publikáciami, ktoré uvádzajú hodnoty 2,3 až 11,4 (Troutman and Thakker, 2003; Mandracchia *et al.*, 2017) Koncentrácie substrátu boli zvolené s ohľadom na saturabilitu transportéru a schopnosť detegovať fluorescenciu vo

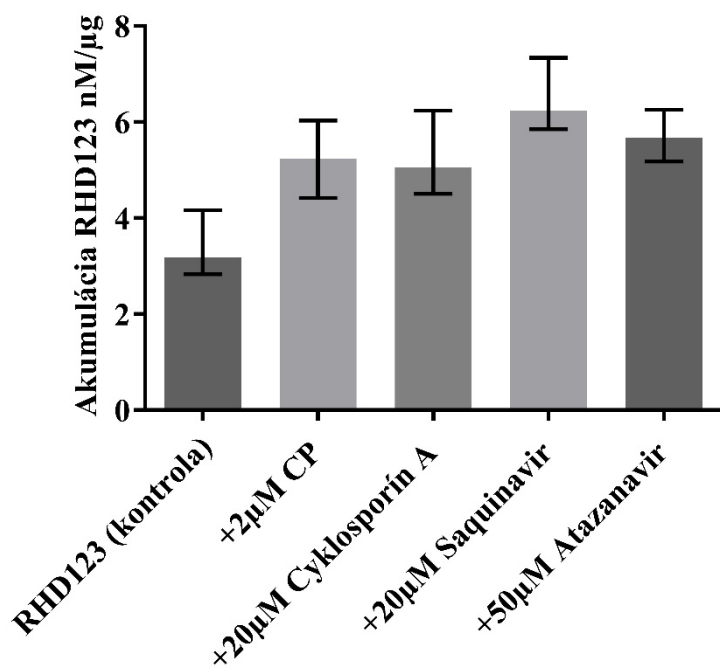
vzorkách a to na hodnotu 1 μM u *in vitro* metódy caco-2 a 10 μM u metódy PCIS. Použité koncentrácie sú v súlade s literatúrou (Yumoto *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2015). Špecifickosť transportu RHD123 cez monovrstvu caco-2 a membránu potkaních enterocytov sme overili pomocou modelového inhibítora P-gp/BCRP elakridaru. Jeho použitie potvrdilo selektívnosť transportu RHD123 sprostredkovanú P-gp, čo potvrdzujú aj ďalšie publikácie (Chan, Lowes and Hirst, 2004; Chen *et al.*, 2016).

Pomocou *in vitro* modelu caco-2 a *ex vivo* modelu PCIS sme potvrdili, že saquinavir a atazanavir majú potenciál zvýšiť intestinálnu absorpciu substrátov P-gp, z dôvodu inhibície tohto transportéru (Obr.11,12). Literatúra uvádza hodnoty IC_{50} (saquinavir) = $12,5 \pm 3,0 \mu\text{M}$ a IC_{50} (atazanavir) = $24,9 \pm 5,6 \mu\text{M}$ na bunkách P388/dx s použitím RHD123 ako modelového substrátu (Storch *et al.*, 2007). Zidovudín a tenofovir DF aj v koncentrácií 100 μM nepreukázali zmenu v transporte RHD123 cez monovrstvu caco-2 buniek a ani zmenu v akumulácií v potkaních PCIS (Obr.11,12). Tenofovir DF je síce popísaným substrátom a možným inhibítom P-gp, ale jeho IC_{50} je odhadovaná na $> 500 \mu\text{M}$. Túto koncentráciu však nebolo možné určiť z dôvodu limitujúcej rozpustnosti a/alebo toxicite DMSO, v ktorom sú testované látky rozpustené (Kis *et al.*, 2010). DDIs saquinaviru a atazanaviru na intestinálnom P-gp môžu byť príčinou zmeny farmakokinetiky podaných liečiv. Saquinavir spôsobil 90% zvýšenie akumulácie atazanaviru v bunkách caco-2 (Kis *et al.*, 2013). Ďalšia štúdia preukázala zvýšenie permeability tenofovuru DF cez monovrstvu caco-2 v smere A-B a zníženie efluxu vplyvom saquinaviru a atazanaviru (Tong *et al.*, 2007). V klinickej štúdií súbežné podávanie známeho substrátu P-gp sofosbuviru a kombinácie ARV (atazanavir potenciovaný ritonavírom, emtricitabín a tenofovir DF) viedlo k zvýšeniu maximálnej plazmatickej koncentrácie sofosbuviru o 109 % a plochy pod krivkou koncentrácie za čas o 342 % v porovnaní so samostatným podávaním sofosbuviru (Rodriguez-Torres *et al.*, 2015).

Ex vivo model PCIS predstavuje fyziologicky bližší model črevnej bariéry. Na rozdiel od *in vitro* modelu caco-2, ktorý je založený na rakovinových bunkách hrubého čreva, obsahuje všetky typy buniek intestinálnej bariéry a odráža jej reálnu 3D štruktúru. Rezy sú pripravené z čerstvého tkaniva, tak aj miera expresie metabolických enzýmov a transportérov je na fyziologickej hladine (Hidalgo, Raub and Borchardt, 1989; Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Navyše, počas jedného experimentu sme schopní vykonať stovky testov, tak aj potreba experimentálnych zvierat je pomerne nízka. Na druhej strane, črevo je vysoko citlivé na ischémiu a rýchlo stráca životaschopnosť. Z toho dôvodu sa

tkanivo uchováva a krája v KHP a udržuje pri teplote 4 °C. Rezy môžu byť uchovávané v KHP až po dobu 5 hodín a životnosť si zachovávajú do 8 hodín inkubácie (De Graaf *et al.*, 2010; Li, de Graaf and Groothuis, 2016). Životaschopnosť rezov za týchto podmienok bola hodnotená pomocou obsahu ATP, ktorého množstvo sa po 5 hodinách inkubácie v porovnaní s čerstvým rezom mierne znížilo, nie však signifikantne (Li *et al.*, 2015). Teplota agarózy pri plnení čreva nesmie presiahnuť 37 °C, aby tepelne nepoškodila slizničný epitel. Dôležité je aj nastavenie hrúbky rezu. U príliš hrubých rezov by mohla stredná časť rezu podliehať nekróze z dôvodu nedostatočnej difúzie živín a kyslíku, a naopak u príliš tenkých rezov by mohol byť pomer poškodených buniek na okraji rezu a zdravých buniek veľmi vysoký. Publikácie odporúčajú hrúbku intestinálnych rezov v rozmedzí 150 – 450 µm (De Graaf *et al.*, 2010), preto sme si zvolili rezy s hrúbkou 250 µm. Pre štúdium transportu bolo zvolené ileum, ako segment s najvyššou aktivitou P-gp (Li *et al.*, 2015). Keďže saquinavir v koncentrácii 5 µM nespôsobil signifikantnú zmenu v akumulácii RHD123 (1,16-krát), bola otestovaná vyššia koncentrácia saquinaviru (20 µM), ktorá významne zvýšila akumuláciu RHD123 v PCIS a to 1,40-krát (Obr. 12A). Na rozdiel od *in vitro*, štatisticky signifikantné zvýšenie akumulácie RHD123 spôsobil až 50 µM atazanavir (1,41-krát) (Obr. 12B). Tento rozdiel môže byť spôsobený odlišnou expresiou transportéru, medzidruhovou variabilitou alebo 3D mnohvrstvom charakterom rezov oproti monovrstvovej *caco-2* metóde. Nižšie koncentrácie atazanaviru (5µM a 20 µM), ako aj zidovudín (100 µM) a tenofovir DF (100 µM) nemali vplyv na akumuláciu RHD123 v PCIS (Obr.12). Ako prví sme otestovali akumuláciu RHD123 vplyvom uvedených ARV, preto uvedené hodnoty pomeru akumulácie nebolo možné porovnať so súčasnou literatúrou. Použité koncentrácie ARV boli rovnaké ako na modeli *caco-2*, je však možné, že klinicky relevantné koncentrácie v lumen čreva sú vyššie.

Aby sme sa priblížili k reálnejšiemu klinickému prostrediu a odstránili nevýhodu medzidruhovej variability, otestovali sme vybrané látky na PCIS s využitím ľudského čreva (jejunum, časť čreva, ktorú sme schopní získať z chirurgických operácii behom pankreatoduodenektomie). Pilotný experiment poskytol porovnateľné dáta (Obr. 13) s metódou potkaních intestinálnych rezov, avšak ich potvrdenie si vyžaduje viac opakovaní.



Obrázok 13: Dvojhodinová akumulácia 10μM RHD123 v rezoch ľudskeho jejuna bez/s prítomnosťou modelového inhibítora P-gp CP100356 (2 μM), známeho inhibítora P-gp cyklosporínu A (20 μM), saquinaviru (20μM) a atazanaviru (50 μM). Uvedené hodnoty sú vyjadrené ako medián na proteín normalizovaných hodnôt s medzikvartilovým rozpätím z jedného experimentu vykonaného v hexaplikáte.

9 ZÁVER

Táto práca prispela k zavedeniu alternatívnej *ex vivo* metódy potkaních PCIS pre štúdium interakcií liečiv s črevnými efluxnými ABC transportérmi s využitím modelového substrátu P-gp RHD123. Pre porovnanie bola použitá aj FDA odporúčaná *in vitro* metóda pre štúdium interakcií na úrovni transportérov, založená na bunkovej línii caco-2. Testované liečiva boli zvolené zo skupiny ARV a to: zidovudín, tenofovir DF, saquinavir a atazanavir. Pomocou oboch metód bolo dokázané, že saquinavir a atazanavir majú potenciál ovplyvniť črevnú absorpciu modelového substrátu P-gp RHD123. Testovanie popísaných substrátov/inhibítorov zo skupiny ARV ukázalo, že *ex vivo* metóda PCIS a *in vitro* metóda caco-2 poskytujú porovnateľné výsledky. Naše výsledky tak môžu prispieť k vysvetleniu zmien farmakokinetiky liečiv pri súčasnom podaní s atazanavirom alebo saquinavirom. Akumulačné štúdie na intestinálnych rezoch potkana predstavujú fyziologicky bližšiu alternatívu testovania liekových interakcií na črevnej bariére. Aby bola odstránená nevýhoda medzidruhovej variability, je snaha zdokonaľiť *ex vivo* metódu ultratenkých rezov ľudského čreva, ktorá by predstavovala ďalší krok bližšie k reálnemu klinickému prostrediu.

10 BIBLIOGRAFIA

- Alam, C. *et al.* (2016) 'Role and modulation of drug transporters in HIV-1 therapy', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 103, pp. 121–143. doi: 10.1016/j.addr.2016.05.001.
- Alter, M. J. (2006) 'Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection', *Journal of Hepatology*, 44(SUPPL. 1), pp. S6–S9. doi: 10.1016/j.jhep.2005.11.004.
- Anderson, P. L. *et al.* (2006) 'Pharmacogenetic Characteristics of Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine Therapy in HIV-Infected Adults', *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 42(4), pp. 441–449. doi: 10.1097/01.qai.0000225013.53568.69.
- Arts, E. J. and Hazuda, D. J. (2012) 'HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4), pp. a007161–a007161. doi: 10.1101/cshperspect.a007161.
- Artursson, P., Palm, K. and Luthman, K. (2001) 'Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), pp. 27–43. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00128-9.
- Balimane, P. V. and Chong, S. (2005) 'Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique', *Drug Discovery Today*, 10(5), pp. 335–343. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03354-9.
- Bansal, T. *et al.* (2009) 'Emerging Significance of Flavonoids as P-Glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy', *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 12(1), p. 46. doi: 10.18433/J3RC77.
- Barbaro, G. *et al.* (2005) 'Highly Active Antiretroviral Therapy: Current State of the Art, New Agents and Their Pharmacological Interactions Useful for Improving Therapeutic Outcome', *Current Pharmaceutical Design*, 11(14), pp. 1805–1843. doi: 10.2174/1381612053764869.
- Baxter, K. (2010) *Stockley's Drug Interactions*. Ninth edit, *Pharmaceutical Press*. Ninth edit. Edited by K. Baxter *et al.* London: Pharmaceutical Press.
- Bischoff, S. C. *et al.* (2014) 'Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy', *BMC Gastroenterology*, p. 189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7.

Brand, W. *et al.* (2006) 'Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), pp. 508–519. doi: 10.1016/j.biopha.2006.07.081.

Brouwer, K. L. R. *et al.* (2013) 'In Vitro Methods to Support Transporter Evaluation in Drug Discovery and Development', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(1), pp. 95–112. doi: 10.1038/clpt.2013.81.

Brück, S. *et al.* (2017) 'Caco-2 cells – expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue', *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 38(2), pp. 115–126. doi: 10.1002/bdd.2025.

Bugde, P. *et al.* (2017) 'The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Taylor & Francis, 21(5), pp. 511–530. doi: 10.1080/14728222.2017.1310841.

Corbett, E. L. *et al.* (2003) 'The Growing Burden of Tuberculosis', *Archives of Internal Medicine*, 163(9), p. 1009. doi: 10.1001/archinte.163.9.1009.

Dietrich, C. G. (2003) 'ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut', *Gut*, 52(12), pp. 1788–1795. doi: 10.1136/gut.52.12.1788.

Doyle, L. A. and Ross, D. D. (2003) 'Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2).', *Oncogene*, 22(47), pp. 7340–58. doi: 10.1038/sj.onc.1206938.

Englund, G. *et al.* (2006) 'Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3–4 SPEC. ISS.), pp. 269–277. doi: 10.1016/j.ejps.2006.04.010.

FDA (2017) *In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry*, FDA Guidance. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM581965.pdf>.

Giacomini, K. M. *et al.* (2010) 'Membrane transporters in drug development', *Nature*

Reviews Drug Discovery, 9(3), pp. 215–236. doi: 10.1038/nrd3028.

Giacomini, K. M. and Huang, S.-M. (2013) ‘Transporters in Drug Development and Clinical Pharmacology’, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(1), pp. 3–9. doi: 10.1038/clpt.2013.86.

De Graaf, I. A. M. *et al.* (2010) ‘Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies’, *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 5(9), pp. 1540–1551. doi: 10.1038/nprot.2010.111.

Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. (1989) ‘Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability’, *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 96(3), pp. 736–749. doi: 10.1016/0016-5085(89)90897-4.

Hillgren, K. M., Kato, A. and Borchardt, R. T. (1995) ‘In vitro systems for studying intestinal drug absorption’, *Medicinal Research Reviews*, 15(2), pp. 83–109. doi: 10.1002/med.2610150202.

HIV-CAUSAL Collaboration *et al.* (2010) ‘The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals.’, *AIDS (London, England)*, 24(1), pp. 123–37. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283324283.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E. and Artursson, P. (2007) ‘Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers’, *Nature Protocols*, 2(9), pp. 2111–2119. doi: 10.1038/nprot.2007.303.

Chan, L. M. S., Lowes, S. and Hirst, B. H. (2004) ‘The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability’, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), pp. 25–51. doi: 10.1016/j.ejps.2003.07.003.

Chen, Z. *et al.* (2016) ‘Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade’, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 370(1), pp. 153–164. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.

Jemnitz, K. *et al.* (2010) ‘ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions’, *Drug Metabolism Reviews*, 42(3), pp. 402–436. doi: 10.3109/03602530903491741.

Juliano, R. L. and Ling, V. (1976) ‘A surface glycoprotein modulating drug permeability

in Chinese hamster ovary cell mutants', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 455(1), pp. 152–162. doi: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.

De Kanter, R. *et al.* (2005) 'A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(1), pp. 65–72. doi: 10.1016/j.vascn.2004.07.007.

Karageorgopoulos, D. E. *et al.* (2014) 'Drug interactions between antiretrovirals and new or emerging direct-acting antivirals in HIV/hepatitis C virus coinfection', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(1), pp. 36–45. doi: 10.1097/QCO.0000000000000034.

Keita, Å. V. and Söderholm, J. D. (2010) 'The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors', *Neurogastroenterology & Motility*, 22(7), pp. 718–733. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x.

Van De Kerkhof, E. G. *et al.* (2006) 'Innovative methods to study human intestinal drug metabolism in vitro: Precision-cut slices compared with Ussing chamber preparations', *Drug Metabolism and Disposition*, 34(11), pp. 1893–1902. doi: 10.1124/dmd.106.011148.

van de Kerkhof, E. G., de Graaf, I. a M. and Groothuis, G. M. M. (2007) 'In vitro methods to study intestinal drug metabolism.', *Current drug metabolism*, 8(7), pp. 658–675. doi: 10.2174/138920007782109742.

Kis, O. *et al.* (2010) 'The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters', *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(1), pp. 22–35. doi: 10.1016/j.tips.2009.10.001.

Kis, O. *et al.* (2013) 'Role of drug efflux and uptake transporters in atazanavir intestinal permeability and drug-drug interactions', *Pharmaceutical Research*, 30(4), pp. 1050–1064. doi: 10.1007/s11095-012-0942-y.

Konig, J., Muller, F. and Fromm, M. F. (2013) 'Transporters and Drug-Drug Interactions: Important Determinants of Drug Disposition and Effects', *Pharmacological Reviews*, 65(3), pp. 944–966. doi: 10.1124/pr.113.007518.

Li, M. *et al.* (2015) 'Rat precision-cut intestinal slices to study P-gp activity and the potency of its inhibitors ex vivo', *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 29(5), pp. 1070–1078. doi: 10.1016/j.tiv.2015.04.011.

- Li, M. *et al.* (2017) 'P-gp activity and inhibition in the different regions of human intestine *ex vivo*', *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 38(2), pp. 127–138. doi: 10.1002/bdd.2047.
- Li, M., de Graaf, I. A. M. and Groothuis, G. M. M. (2016) 'Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. Informa Healthcare, 12(2), pp. 175–190. doi: 10.1517/17425255.2016.1125882.
- Li, Y. and Paxton, J. W. (2013) 'The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9(3), pp. 267–285. doi: 10.1517/17425255.2013.749858.
- Lin, J. H. (2003) 'Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1), pp. 53–81. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00171-0.
- Mandracchia, D. *et al.* (2017) 'In vitro evaluation of glycol chitosan based formulations as oral delivery systems for efflux pump inhibition', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd., 166, pp. 73–82. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.096.
- Manosuthi, W., Wiboonchutikul, S. and Sungkanuparph, S. (2016) 'Integrated therapy for HIV and tuberculosis', *AIDS Research and Therapy*. BioMed Central, 13(1), p. 22. doi: 10.1186/s12981-016-0106-y.
- Martignoni, M., Groothuis, G. and de Kanter, R. (2006) 'Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine.', *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34(6), pp. 1047–54. doi: 10.1124/dmd.105.009035.
- McIlleron, H. *et al.* (2007) 'Complications of Antiretroviral Therapy in Patients with Tuberculosis: Drug Interactions, Toxicity, and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome', *The Journal of Infectious Diseases*, 196(s1), pp. S63–S75. doi: 10.1086/518655.
- Moitra, K., Lou, H. and Dean, M. (2011) 'Multidrug Efflux Pumps and Cancer Stem Cells: Insights Into Multidrug Resistance and Therapeutic Development', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. Nature Publishing Group, 89(4), pp. 491–502. doi: 10.1038/clpt.2011.14.

- Montanari, F. and Ecker, G. F. (2015) 'Prediction of drug–ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 86, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.001.
- Müller, F. and Fromm, M. F. (2011) 'Transporter-mediated drug–drug interactions', *Pharmacogenomics*, 12(7), pp. 1017–1037. doi: 10.2217/pgs.11.44.
- Niu, X., de Graaf, I. a. M. and Groothuis, G. M. M. (2013) 'Evaluation of the intestinal toxicity and transport of xenobiotics utilizing precision-cut slices', *Xenobiotica*, 43(1), pp. 73–83. doi: 10.3109/00498254.2012.729870.
- Pal, D. *et al.* (2011) 'Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals', *Life Sciences*. Elsevier B.V., 88(21–22), pp. 959–971. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.012.
- Pan, G., Giri, N. and Elmquist, W. F. (2007) 'Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine', *Drug Metabolism and Disposition*, 35(7), pp. 1165–1173. doi: 10.1124/dmd.106.014274.
- Rodriguez-Torres, M. *et al.* (2015) 'Sofosbuvir for Chronic Hepatitis C Virus Infection Genotype 1–4 in Patients Coinfected With HIV', *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 68(5), pp. 543–549. doi: 10.1097/QAI.0000000000000516.
- Sambuy, Y. *et al.* (2005) 'The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics', *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), pp. 1–26. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- Sharom, F. J. (2008) 'ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance', *Pharmacogenomics*, 9(1), pp. 105–127. doi: 10.2217/14622416.9.1.105.
- Schinkel, A. H. and Jonker, J. W. (2012) 'Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 64(SUPPL.), pp. 138–153. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.027.
- Srinivasan, B. *et al.* (2015) 'TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems', *Journal of Laboratory Automation*, 20(2), pp. 107–126. doi: 10.1177/2211068214561025.
- Storch, C. H. *et al.* (2007) 'Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-

glycoprotein', *Biochemical Pharmacology*, 73(10), pp. 1573–1581. doi: 10.1016/j.bcp.2007.01.027.

Sun, D. *et al.* (2002) 'Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs.', *Pharmaceutical research*, 19(10), pp. 1400–16. doi: 10.1023/A:1020483911355.

Sun, H. *et al.* (2008) 'The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(4), pp. 395–411. doi: 10.1517/17425255.4.4.395.

Taipalensuu, J. *et al.* (2001) 'Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 299(1), pp. 164–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11561076>.

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (2008) 'Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies', *The Lancet*, 372(9635), pp. 293–299. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61113-7.

Tong, L. *et al.* (2007) 'Effects of human immunodeficiency virus protease inhibitors on the intestinal absorption of tenofovir disoproxil fumarate in vitro', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), pp. 3498–3504. doi: 10.1128/AAC.00671-07.

Troutman, M. D. and Thakker, D. R. (2003) 'Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium.', *Pharmaceutical research*, 20(8), pp. 1210–24. doi: 10.1023/A:1025001131513.

United States Food and Drug Administration (2018) *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*, *Fda*. Available at: <https://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines> (Accessed: 15 March 2018).

Vasiliou, V., Vasiliou, K. and Nebert, D. W. (2008) 'Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family', *Human Genomics*, 3(3), p. 281. doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.

Volberding, P. A. (2017) 'HIV Treatment and Prevention: An Overview of

Recommendations From the IAS-USA Antiretroviral Guidelines Panel.’, *Topics in antiviral medicine*, 25(1), pp. 17–24. Available at: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85019986502&partnerID=40&md5=2c6a5d4f9f98919911a782b7822cbfec>.

Ward, A. B. *et al.* (2013) ‘Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), pp. 13386–13391. doi: 10.1073/pnas.1309275110.

Warnke, D., Barreto, J. and Temesgen, Z. (2007) ‘Therapeutic review: Antiretroviral drugs’, *Journal of Clinical Pharmacology*, 47(12), pp. 1570–1579. doi: 10.1177/0091270007308034.

WHO (2016) *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach*. 2nd editio. Geneva: World Health Organization. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466667>.

WHO (2017) *HIV/AIDS*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/> (Accessed: 5 March 2018).

Yamashita, S. *et al.* (2000) ‘Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells’, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3), pp. 195–204. doi: 10.1016/S0928-0987(00)00076-2.

Yumoto, R. *et al.* (1999) ‘Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds.’, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 289(1), pp. 149–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086998>.

Zakeri-Milani, P. and Valizadeh, H. (2014) ‘Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions’, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(6), pp. 859–871. doi: 10.1517/17425255.2014.905543.