

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM TRANSPORTU LÉKOVÝMI
TRANSPORTÉRY NA BUNĚČNÝCH MODELECH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Jana Znamínková

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

Jana Znamínková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce PharmDr. Lucii Hyršové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a za veškerou poskytnutou pomoc při provádění experimentů a v průběhu vypracovávání diplomové práce, zejména za její ochotu, vstřícnost, cenné rady a čas věnovaný konzultacím. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Jana Znamínková

Školitel: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium transportu lékovými transportéry na buněčných modelech

Játra jsou hlavním biotransformačním orgánem lidského organismu. Zdaleka ne všechny látky mohou přes hepatocytární membránu pronikat prostou difúzí. V těchto případech je jejich přenos přes membránu umožněn prostřednictvím specializovaných transportních proteinů. Uptakové transportéry lokalizované na bazolaterální membráně hepatocytů mají důležitou roli při přenosu látek z krve do jater, kde následně může docházet k jejich biotransformaci. Důležitým zástupcem této skupiny je OCT1 transportér, který přenáší organické kationty. Efluxní transportéry lokalizované na apikální membráně jsou naopak důležité pro přenos látek z jaterních buněk do žluče, čímž umožňují jejich eliminaci touto cestou. Příkladem takového transportéru je BCRP. Z důvodu široké substrátové specificity patří oba lékové transportéry mezi hlavní mechanismus vzniku lékových interakcí. Cílem této práce bylo využít substráty a inhibitory těchto dvou transportérů k ověření funkčnosti buněčného modelu. Byly použity psí jaterní buňky MDCK II stabilně transfekované lidskými transportéry OCT1 a/nebo BCRP. Jako substrát těchto transportérů byl použit radioaktivně značený lamivudin. Lamivudin je nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy, který se používá v kombinaci s jinými antiviroty k léčbě HIV. K inhibici transportérů byly využity antibakteriální chemoterapeutikum trimethoprim (inhibice OCT1) a proteázový inhibitor ritonavir (inhibice BCRP a OCT1). Zvýšení akumulace lamivudinu u buněk s OCT1 transportérem ve srovnání s kontrolními buňkami bylo stanoveno pomocí akumulační studie. Při akumulační studii provedené za snížené teploty (4 °C) došlo ke snížení akumulace lamivudinu, což potvrdilo účast aktivního transportu na přenosu této látky. Při současném podání ritonaviru nebo trimethoprimu došlo ke snížení intracelulární akumulace lamivudinu. Testovaný model tedy může být použit pro další testování a případné odhalování lékových interakcí na úrovni těchto transportních proteinů.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Jana Znamínková

Supervisor: PharmDr. Lucie Hyršová, PhD.

Title of diploma thesis: Study of transport mediated by drug transporters in model cell systems

Liver is the main biotransformation organ of human organism. Not every substance can cross the cell membrane of hepatocytes by simple diffusion. Transport of such substances across the membrane is mediated by specialized transport proteins. Uptake transporters localized on the basolateral membrane of hepatocytes play a crucial role in uptake of compounds from blood into hepatocytes, where the biotransformation takes place. OCT1 transporter belongs between important members of this group, it transports organic cations. Efflux transporters localized on the apical membrane are responsible for transport of substances from hepatocytes to bile canalicular and these transporters mediate their elimination in this way. BCRP is an example of this group of transporters. Drug transporters represent one of the most important mechanisms of drug-drug interactions due to their wide range of substrates. The aim of this study was to evaluate the function of novel cell models using substrate and inhibitors of these transporters. Stably transfected MDCK II cells expressing human OCT1 and/or BCRP transporters were used for this purpose. Lamivudine was used as substrate of studied transporters; it is a nucleoside reverse transcriptase inhibitor used in combination antiretroviral therapy of HIV. Antibacterial chemotherapeutic trimethoprim (an inhibitor of OCT1) and protease inhibitor ritonavir (an inhibitor of BCRP and OCT1) were used for inhibition studies. Significantly higher intracellular accumulation of lamivudine was observed in the monolayer of MDCK-OCT1 compared to control cell line MDCK II using accumulation assays. Decreased temperature (4 °C) significantly reduced intracellular accumulation of lamivudine, confirming the involvement of active transport mechanism. Co-administration of ritonavir or trimethoprim decreased intracellular accumulation of lamivudine. This model can be used for further studies and detection of transporter-mediated drug-drug interactions.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Seznam zkratk | 1 |
| 2 | Úvod | 3 |
| 3 | Teoretická část | 5 |
| 3.1 | Transportní proteiny | 5 |
| 3.1.1 | ABC transportéry | 6 |
| 3.1.2 | SLC transportéry | 6 |
| 3.2 | Transport látek přes buněčné membrány hepatocytů | 8 |
| 3.2.1 | Bazolaterální uptake transportéry | 9 |
| 3.2.2 | Apikální efluxní transportéry | 10 |
| 3.2.3 | Bazolaterální efluxní transportéry | 11 |
| 3.3 | BCRP transportér | 12 |
| 3.3.1 | Substráty BCRP | 13 |
| 3.3.2 | Inhibitory BCRP | 13 |
| 3.4 | OCT transportéry | 14 |
| 3.4.1 | Struktura a funkce OCT1 | 14 |
| 3.4.2 | Substráty OCT1 | 15 |
| 3.4.3 | Inhibitory OCT1 | 16 |
| 3.5 | Vybrané látky ze skupiny substrátů a inhibitorů lidských transportních bílkovin OCT1 a BCRP | 17 |
| 3.5.1 | Lamivudin | 17 |
| 3.5.2 | Trimethoprim | 18 |
| 3.5.3 | Ritonavir | 20 |
| 4 | Cíl práce | 22 |
| 5 | Experimentální část | 23 |
| 5.1 | Chemikálie | 23 |
| 5.2 | Pomůcky a přístroje | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3 | Buněčná linie MDCK II | 25 |
| 5.3.1 | Charakteristika MDCK buněk | 25 |
| 5.3.2 | Médium..... | 26 |
| 5.4 | Metody | 27 |
| 5.4.1 | Příprava roztoků | 27 |
| 5.4.2 | Kultivace buněk..... | 28 |
| 5.4.3 | Transportní studie | 29 |
| 5.4.4 | Akumulační studie..... | 31 |
| 5.4.5 | Inhibiční studie | 32 |
| 5.4.6 | Stanovení proteinu metodou BCA..... | 33 |
| 5.4.7 | Detekce beta záření s využitím kapalných scintilátorů | 35 |
| 6 | Výsledky | 37 |
| 6.1 | Transportní studie..... | 37 |
| 6.2 | Akumulační studie | 41 |
| 6.3 | Inhibiční studie..... | 43 |
| 7 | Diskuse..... | 45 |
| 8 | Závěr | 50 |
| 9 | Literatura..... | 51 |

1 Seznam zkratek

| | |
|------------|--|
| ABC | ATP-dependentní transportní membránový protein (ATP-binding cassette) |
| ADME | absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece |
| AIDS | syndrom získaného imunodeficitu (acquired immune deficiency syndrome) |
| ATP | adenosintrifosfát (adenosine triphosphate) |
| ATP7B | „ATPase copper transporting β polypeptide“ |
| AUC | plocha pod křivkou (area under the curve) |
| BCA | bicinchoninová metoda (bicinchoninic acid assay) |
| BCRP | „breast cancer resistance protein“ |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| BSEP | efluxní transportér pro sole žlučových kyselin (bile salt export pump) |
| C_{\max} | maximální dosažená plazmatická koncentrace léčiva |
| CSF | mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid) |
| DMEM | „Dulbecco's modified Eagle medium“ |
| ENT | ekvilibrační nukleosidový transportér |
| FBS | fetální bovinní sérum |
| FITC | „fluorescein isothiocyanate conjugate“ |
| HBV | virus hepatitidy B |
| HEPES | <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina |
| HIV | virus lidského imunodeficitu (human immunodeficiency virus) |
| K_m | Michaelisova konstanta |
| MATE | multidrug and toxin extrusion protein |
| MDCK II | Madin-Darbyho psí ledvinné buňky II (Madin-Darby canine kidney cells II) |
| MDR | „multidrug resistance protein“ |

| | |
|------------------|---|
| MEM | minimální esenciální médium |
| MPP ⁺ | <i>N</i> -methyl-4-fenylpyridinium |
| MRPs | „multidrug resistance-associated proteins“ |
| NBD | nukleotidy vázající doména |
| NTCP | „sodium/taurocholate cotransporting polypeptide“ |
| OAT | transportér pro organické anionty (organic anion transporter) |
| OATPs | polypeptidy transportující organické anionty |
| OCT | transportér pro organické kationty (organic cation transporter) |
| OCTN | „organic cation/carnitine transporter“ |
| Opti-MEM | „Opti-minimal essential medium“ |
| PEPT | peptidické transportéry |
| PBS | fosfátový pufr (phosphate buffered saline) |
| SLC | transportéry nadrodiny solute carrier |
| TER | transepiteliální rezistence |
| TMD | transmembránová doména |
| v_{\max} | maximální rychlost transportu |

2 Úvod

Pohyb látek přes lipidovou dvojvrstvu je nezbytný pro jejich funkci a eliminaci. Některé látky využívají k přesunu do buněk a ven z buněk mechanismus prosté difuze. V ostatních případech, z důvodu fyzikálních a chemických vlastností látek (velikost, hydrofilita, náboj), vyžadují látky asistenci pro přestup přes membránu. Ke zprostředkování přenosu látek přes membrány slouží specializované proteiny, nazývané jako transportéry. Transportéry jsou exprimovány v mnoha tkáních. Jejich substráty mohou být látky tělu vlastní (hormony, glukóza, aminokyseliny, neurotransmitery), ale i cizorodé, jako jsou léčiva (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

Transportní proteiny významně regulují prostup léčiv do různých orgánů a tkání. V hematoencefalické bariéře transportéry zamezují vstupu xenobiotik a chrání tak centrální nervovou soustavu před vstupem cizorodých látek, léčiv a metabolitů. V nádorech je přítomnost některých transportérů odpovědná za rezistenci k léčivům, která jsou jejich substráty. Nejen samotná struktura, ale i afinita a aktivita příslušných transportních proteinů určuje, jaké množství léčiv do organismu vstoupí, jak budou distribuována, biotransformována i eliminována (*Skálová 2017*).

Transportéry významně ovlivňují farmakokinetiku léčiv, hrají klíčovou roli v jejich absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME). Transportéry ve střevě ovlivňují absorpci, ale i exkreci léčiv. Transportéry lokalizované na membráně hepatocytů umožňují vstup léčiv do jater, hlavního místa jejich metabolismu. V játrech se transportéry také podílí na vylučování léčiv a jejich konjugátů do žluči. V ledvinách transportéry slouží k eliminaci léčiv a reabsorpci některých léčiv z moči zpět do tubulů. Tubulární sekrecí dochází k vylučování látek, léčiv a jejich konjugátů do moči (*Skálová 2017*).

Transportéry ovlivňují také farmakodynamiku léčiv, přímo určují míru jejich farmakodynamického účinku. Příkladem může být skupina hypolipidemických léčiv statinů, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy cholesterolu v hepatocytech. Transport do jater tedy klíčový pro jejich výsledný účinek (*Skálová 2017*).

Transportéry jsou místem, kde dochází k interakcím léčiv. Tyto interakce mohou být inhibiční nebo indukční a mohou se týkat efluxních i influxních transportérů. Nejvíce těchto lékových interakcí se týká hlavních transportérů léčiv, mezi které patří BCRP, P-glykoprotein, OAT1, OAT3, OCT1 a OCT2. Potenciální lékové interakce mohou vést k nepříznivým a vážným reakcím v důsledku změny ADME lékovými transportéry. Mohou mít vliv na účinnost a toxicitu podávaných léčiv. Podstatný klinický význam mají interakce, které mají za následek změnu koncentrace léčiva v místě působení mimo terapeutické okno. Interakce nemusí vést vždy ke snížení účinku léčiva nebo k jeho škodlivému působení na organismus. Některé interakce mohou mít záměrně příznivý efekt. Lékové interakce jsou tedy jedním z rozhodujících faktorů úspěšné a účinné farmakoterapie (*Endres et al. 2006, Liang et al. 2015*).

Nemusí se jednat jen o interakci lék-lék, ale i interakce léků a endogenních molekul (hormony, žlučové kyseliny, neurotransmitery), jejichž přenos a distribuce závisí na aktivitě transportérů. Inhibice těchto transportérů léčivy může vést k narušení transportu endogenních látek, což může mít vážné následky (*Liang et al. 2015*).

Transportéry jsou využívány jako léčebný cíl v klinické terapii. Příkladem může být inhibice SGLT2 transportéru v léčbě diabetu, kde se uplatňuje například empagliflozin nebo dapagliflozin. Dalším příkladem je využití inhibice MDR a MRP transportérů v léčbě rakoviny. Transportéry jsou nezbytné pro fyziologickou funkci organismu, zároveň mají důležitou roli při výskytu nemocí. Pochopení fyziologické role transportérů při normálním ale i patofyziologickém stavu může mít význam pro vývoj nových léčiv a nové léčby (*Liang et al. 2015*).

3 Teoretická část

3.1 Transportní proteiny

Transportéry jsou specializované proteiny, které slouží k přenosu látek přes lipidovou dvojvrstvu. Zprostředkovávají přenos látek do buněk a ven z buněk pomocí aktivních a pasivních mechanismů. Aktivní transport nastává, pokud jsou látky přenášeny přes membránu proti směru koncentračního gradientu nebo na základě elektrochemického potenciálu. Transportéry jsou lokalizované v membráně, nejčastěji cytoplazmatické, a nachází se snad ve všech tkáních lidského těla. Převážně zprostředkovávají transport eubiotik. Mezi eubiotika patří z okolí přijaté živiny, voda, vzduch, vitaminy, minerály a všechny látky tělu vlastní. Substrátem tedy mohou být látky exogenní i endogenní. Existuje početná skupina membránových proteinů, které přenášejí látky cizorodé neboli xenobiotika. Jedná se o lékové transportéry. Transportéry jsou důležité například pro cirkulaci fyziologických látek a živin, likvidaci metabolických produktů, detoxikaci, přemístění léčiv a jejich odstranění (*Klaassen a Aleksunes 2010, Skálová 2017*).

Obecně můžeme membránové transportéry rozdělit do dvou hlavních nadrodin, na ATP-dependentní transportní membránové proteiny ABC (z angl. ATP-binding cassette, skupina transportérů závislých na ATP) a SLC transportéry (transportéry nadrodiny solute carrier, přenašeče hydrofilních látek) (*Liang et al. 2015*).

Transportéry můžeme rozlišovat podle toho, v jaké formě přijímají energii nutnou k transportu substrátů na primární, sekundární a terciární. Při primárním aktivním transportu substrát prochází proti směru gradientu přes transportní protein. Energie potřebná k tomuto transportu je vytvořena hydrolýzou ATP (adenosintrifosfát). Sekundární aktivní transport látky je spřažen s přenosem jiné látky, často se jedná o různé ionty. Tento typ transportu se také nazývá kotransport. Může se jednat o transport látek ve stejném směru (symport) nebo ve směru opačném (antiport). Antiport transport často vytvoří elektrochemický gradient sám o sobě, který může být využit k terciárnímu aktivnímu transportu (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

Podle směru transportu můžeme dělit transportéry na tzv. "uptake" a "efflux" transportéry. Uptake importují substráty do buňky, effluxní transportéry exportují substráty ven z buňky (*Skálová 2017*).

3.1.1 ABC transportéry

ABC transportéry jsou primární transportéry, které využívají energii z hydrolyzy ATP k transportu substrátů přes membránu. Fungují jako effluxní pumpy, které odstraňují látky z buněk nebo organel. Jedná se o intracelulární i extracelulární transportéry. Některé se nachází apikálně, některé jsou lokalizovány na bazolaterální membráně epitelálních buněk, enterocytů nebo hepatocytů (*Klaassen a Aleksunes 2010, Skálová 2017*).

Nadrodina ABC transportních proteinů zahrnuje rozmanitou skupinu proteinů včetně MDRs (multidrug resistance proteins), MRPs (multidrug resistance-associated proteins), BCRP (breast cancer resistance protein), BSEP (effluxní transportér pro sole žlučových kyselin, bile salt export pump). Mezi nejvýznamnější v souvislosti s transportem léčiv patří P-glykoprotein (P-gp, MDR1), MRPs a BCRP (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

3.1.2 SLC transportéry

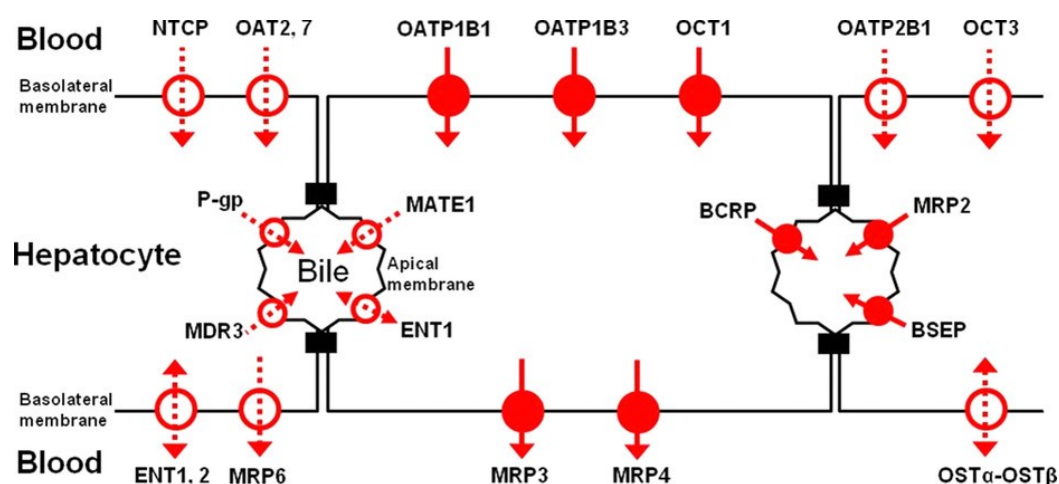
SLC transportéry typicky využívají sekundární nebo terciární aktivní transport k přenosu látek přes membránu. Substrát je přenášen proti směru gradientu. Energie k přenosu je získána z kotransportu nebo antiportu látek, které tvoří na membráně gradient. Sekundární využívají jeden gradient, terciární dva. SLC transportéry také mohou přenášet látky mechanismem facilitované difuze. Při facilitované difuzi přechází látky přes membránu po svém elektrochemickém gradientu. Jedná se většinou o uptake transportéry (*Liang et al. 2015, Skálová 2017*).

SLC transportéry se člení do dalších rodin, význam pro transport léčiv má rodina SLC22, mezi její zástupce patří skupina transportérů pro organické kationty OCT (organic cation transporter) a organické anionty OAT (organic anion transporter). Do této rodiny patří také transportéry OCTNs (organic cation/carnitine transporters). Rodina SLCO zahrnuje skupinu polypeptidů transportujících organické anionty OATP.

Dále do nadrodiny SCL transportérů patří NTCP (natrium/taurocholate cotransporting polypeptide), peptidické transportéry (PEPT), ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENT) nebo tzv. MATE transportéry (multidrug and toxin extrusion transporter) (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

3.2 Transport látek přes buněčné membrány hepatocytů

Játra jsou hlavním orgánem metabolismu léčiv. Na apikální a bazolaterální membráně hepatocytů se nachází celá řada uptake a efluxních transportérů, které mají vliv na farmakokinetiku léčiv, lékové interakce, jejich bezpečnost a účinek. Uptake transportéry usnadňují přenos léčiv z krve do jater. V játrech probíhá následné zpracování léčiv metabolizujícími enzymy a vylučovacími transportéry. Některá léčiva transportovaná do jater zde nemusí být metabolizována, ale místo toho jsou transportována přes membránu do žluči nebo efluxními transportéry přenášena přes bazolaterální membránu zpět do krve. Všechny důležité transportéry jsou znázorněny na obr. 1. Jaterní transportéry se podílí na enterohepatální cirkulaci léčiv (*Patel et al. 2016, Skálová 2017*).



Obr. 1 Subcelulární lokalizace uptake a efluxních transportních proteinů v hepatocytech. Transportéry s klinicky významným vlivem na dispozici léčiv nebo metabolitů jsou označeny plným symbolem. S otevřeným symbolem jsou uvedeny transportéry, u kterých není známa klinická významnost. Směr transportuje znázorněn příslušnou šipkou (převzato z: *Patel et al. 2016*).

3.2.1 Bazolaterální uptake transportéry

Organické anionty jsou do hepatocytů přenášeny skupinou membránových přenašečů OATP (polypeptidy transportující organické anionty). Jedná se o transportéry patřící do rodiny SLCO. Látky transportovány tímto systémem patří mezi organická barviva, konjugáty steroidů, anionické oligopeptidy, hormony štítné žlázy, toxiny a léčiva. OATP také transportují žlučové kyseliny mechanismem, který není závislý na sodíku. V důsledku výrazné exprese OATP1B1 a OATP1B3 na bazolaterální membráně hepatocytů, představují tyto transportéry velmi zásadní mechanismus pro uptake chemických látek do jater. Mezi substráty OATP1B1 a OATP1B3 patří například ansamycinové antibiotikum rifampicin, hypolipidemika ze skupiny statinů a hormon štítné žlázy thyroxin. Genetické polymorfismy těchto transportních proteinů mají vliv na farmakokinetiku substrátů z řady léčiv (*Červinková 2018, Klaassen a Aleksunes 2010*).

OAT transportéry (organic anion transporters) jsou členové rodiny SLC22. Zprostředkovávají uptake malých hydrofilních anionických sloučenin. V játrech jsou exprimovány OAT2 a OAT7. Jaterní OAT nejsou místem klinicky významných lékových interakcí a není známo, že by jejich genetické polymorfismy ovlivňovaly farmakokinetiku léčiv (*Patel et al. 2016*).

OCT1 transportér (*SLC22A1*) je zodpovědný za přenos organických kationtů do hepatocytů. OCT1 přenáší modelové substráty (např. tetraethylammonium), ale i řadu léčiv. Tento transportér je klíčový pro přenos antidiabetika metforminu do jater, hlavního místa jeho farmakologického účinku (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

NTCP (natrium/taurocholate cotransporting polypeptide) (*SLC10A1*) patří do skupiny SLC transportních proteinů. Jedná se o jaterní uptake transportér, který je lokalizován na bazolaterální membráně hepatocytů. Přenáší žlučové kyseliny (především kyseliny kojugované s taurinem) do hepatocytů. K transportu využívá sodný gradient. Bylo zaznamenáno, že některá léčiva ze skupiny hypolipidemik statinů a HIV antivirotik mohou interagovat s tímto transportérem. NTCP má omezenou schopnost přenášet léky a není známo, že by byl důležitý pro farmakokinetiku léčiv. Avšak inhibice tohoto transportéru léčiv může mít za následek narušení toku žlučových kyselin, což může vést k hyperbilirubinémii (zvýšené hladiny bilirubinu v krvi) (*Klaassen a Aleksunes 2010, Patel et al. 2016*).

ENTs (ekvilibrační nukleosidové transportéry) jsou facilitované transportéry patřící mezi SLC transportéry. Jsou exprimované na bazolaterální membráně hepatocytů a zprostředkovávají transport nukleosidů po směru koncentračního gradientu. Tyto transportéry mohou také zprostředkovat uptake nukleosidových látek, které patří do skupiny léčiv, například antivirotika ribavirinu. Lékové interakce s těmito transportéry se zatím neukázaly nijak klinicky významné (*Patel et al. 2016*).

3.2.2 Apikální efluxní transportéry

Tyto transportní proteiny jsou zodpovědné za biliární exkreci endogenních látek a xenobiotik. Na eliminaci léčiv a jejich konjugátů z hepatocytů do žluči se podílejí především efluxní transportéry MRP2, P-gp a BCRP (*Skálová 2017*).

MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) (*ABCC2*) patří do rodiny ABCC transportérů. Zprostředkovává biliární exkreci anionických léčiv a metabolitů. Přenáší látky konjugované s glutathionem, se zbytkem glukuronové kyseliny, nebo sulfátem do žluči. MRP2 hraje důležitou roli v eliminaci konjugovaného bilirubinu (bilirubin glukuronidu). Nepřítomnost funkčního MRP2 na apikální membráně hepatocytu způsobuje konjugovanou hyperbilirubinémii (*Nies a Keppler 2007*).

Dalším efluxním transportérem v játrech je P-glykoprotein (*ABCB1*), někdy též označován jako MDR1. Mezi jeho substráty patří široké spektrum nízkomolekulárních, lipofilních a často kationických sloučenin. Substráty z řady léčiv patří do skupiny inhibitorů HIV proteázy, imunosupresiv i chemoterapeutik (*Klaassen a Aleksunes 2010, Patel et al. 2016*).

BCRP (breast cancer resistance protein) (*ABCG2*) je důležitý pro vylučování exogenních látek do žluči. Transportuje široké spektrum terapeutických látek a jejich metabolitů. Jedná se o transportér z nadrodiny ABC. Genetické polymorfismy BCRP mohou mít vliv na farmakokinetiku jeho substrátů (*Klaassen a Aleksunes 2010, Patel et al. 2016*).

BSEP (efluxní transportér pro sole žlučových kyselin) (*ABCB11*) patří mezi primární exportér žlučových kyselin. Mechanismem aktivního transportu přenáší konjugáty žlučových kyselin (např. taurocholát, glykocholát) do žluči. Patří mezi

transportéry z nadrodiny ABC. Přenos látek je závislý na ATP (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

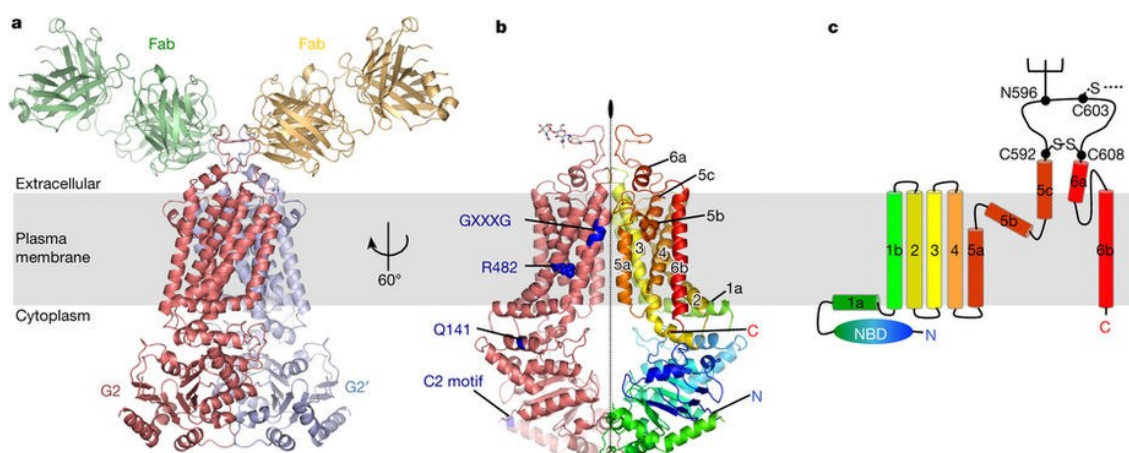
Transportér ATP7B (ATPase copper transporting β polypeptide) je důležitý pro vylučování mědi z jater do žluči. Mutace *ATP7B* genu má za následek autozomálně recesivní dědičné onemocnění zvané Wilsonova choroba. V důsledku poruchy exkrece mědi se měď kumuluje v játrech, což může mít za následek patologické stavy jako cirhózu jater, hepatitidu, jaterní steatózu až jaterní selhání (*Klaassen a Aleksunes 2010*).

3.2.3 Bazolaterální efluxní transportéry

Odstranění látek z hepatocytu do krve je uskutečňováno transportéry na bazolaterální (sinusoidální) membráně. Tyto transportéry přenáší endogenní sloučeniny, xenobiotika a jejich polární metabolity. Nejvýznamnější jsou transportéry MRP3 (*ABCC3*) a MRP4 (*ABCC4*). MRP (multidrug resistance-associated protein) patří do rodiny ABCC transportérů. MRP3 a MRP4 se podílí na transportu žlučových kyselin, přenáší léčiva a rovněž také jejich glukuronidované a sulfatované konjugáty. Glukuronidace je důležitá pro detoxikaci a exkreci polárních chemických látek. Glukuronidovaný konjugát morfinu je substrátem MRP3. Mezi další substráty patří například antihistaminikum fexofenadin. MRP4 transportuje z jater do sinusoidální krve sulfátové konjugáty látek. Mezi substráty patří hypolipidemikum rosuvastatin a antivirotika ze skupiny nukleosidových analog (*Klaassen a Aleksunes 2010, Patel et al. 2016*).

3.3 BCRP transportér

BCRP (breast cancer resistance protein) je transportér patřící do nadrodiny ABC transportérů, konkrétně se jedná o člen *ABCG2*. BCRP funguje jako homodimer, pro svou správnou funkci musí vytvářet v buněčné membráně dimery, jejichž obě jednotky jsou totožné. BCRP je tvořen z jedné NBD (nukleotidy vázající doména) a jedné TMD (transmembránové domény) spojené v jeden polypeptidový řetězec. Na intracelulární vazebné místo pro ATP (NBD doména) navazuje šest transmembránových segmentů, které jsou znázorněny na obr. 2. Na rozdíl od jiných ABC transportních proteinů, NBD (nukleotidy vázající doména) se nachází v blízkosti N-konce polypeptidu. N-konec a C-konec proteinu je lokalizován intracelulárně. Poslední extracelulární smyčka je z největší pravděpodobnosti N-glykosilovaná. Jde o efluxní transportér přenášející substrát proti gradientu transportované látky (*Schinkel a Jonker 2012, Taylor et al. 2017*).



Obr. 2 Grafické znázornění struktury proteinu BCRP (převzato z: *Taylor et al. 2017*).

BCRP se nachází například na bazolaterální membráně hepatocytů, kde se podílí na eliminaci léčiv a jejich konjugátů do žluče. Ve střevě je lokalizován na apikální membráně enterocytů a významně ovlivňuje absorpci řady vysokomolekulárních lipofilních substrátů. Substráty jsou vypuzovány zpět těmito transportéry. To má za následek snížení biodostupnosti těchto substrátů a zabránění jejich absorpce. BCRP se také podílí na intestinální eliminaci některých léčiv (např. kardiotonika digoxinu) a organických iontů z krve do lumen střeva. V hematoencefalické bariéře zamezuje

vstup xenobiotik do endoteliálních buněk. Zabraňuje tak vstupu cizorodých látek, léčiv a jejich metabolitů do centrální nervové soustavy (*Skálová 2017*).

Vysoká koncentrace tohoto transportéru je také v lidské placentě, konkrétně na apikální straně syncytiotrofoblastu placentární bariéry. V průběhu těhotenství tak chrání plod před kumulací léčiv. Mimo to je možné detekovat BCRP transportér v ledvinách, plicích, srdci, varlatech, vaječnicích nebo v děloze (*Klaassen a Aleksunes 2010, Schinkel a Jonker 2012*).

V nádorových buňkách tyto transportéry aktivně přenáší protinádorové léky (včetně antracyklinu doxorubicinu, antracendionového derivátu mitoxantronu, nebo látky ze skupiny kamptotecinů topotekanu) ven z buněk a tím způsobují lékovou rezistenci (*Jonker et al. 2000*).

3.3.1 Substráty BCRP

Za substráty BCRP byla původně označována široká skupina protinádorových chemoterapeutik jako mitoxantron (antracendion), deriváty kamptotecinu a imunosupresivum metotrexát. Substráty nepatří jen do skupiny chemoterapeutik, zahrnují i další skupiny léčiv, například α_1 -antagonista prazosin, H_2 -antihistaminikum cimetidin, sulfonamidové antibiotikum sulfasalazin a hypolipidemikum rosuvastatin. Antivirotika ze skupiny nukleosidových a nukleotidových analogů jako zidovudin a lamivudin jsou také substráty (*Mao a Unadkat 2015*).

3.3.2 Inhibitory BCRP

Bylo identifikováno velké množství inhibitorů s rozdílnou chemickou strukturou. Mnoho inhibitorů P-glykoproteinu jsou také výbornými inhibitory BCRP. Inhibitory HIV proteázy jako ritonavir, saquinavir a nelfinavir jsou účinnými inhibitory BCRP. Inhibitory tyrozinkinázy (imatinib, nilotinib a apatinib) jsou silnými duálními inhibitory P-gp/BCRP (*Mao a Unadkat 2015*).

Inhibitory BCRP mohou být použity ke zlepšení průniku protinádorových léčiv do nádorových buněk, které exprimují BCRP. Dalším důvodem jejich použití je zlepšení biodostupnosti substrátů BCRP (*Schinkel a Jonker 2012*).

3.4 OCT transportéry

OCT transportéry patří do skupiny SLC transportérů. Účastní se absorpce, distribuce a exkrece organických kationtů. Podílí se na transportu živin, endogenních aminů a mnoha kationických léčiv. Tyto transportéry jsou exprimovány v játrech, ledvinách, tenkém střevě a dalších orgánech. Lidský OCT je kódován geny rodiny *SLC22A*. Existují tři rozdílní členové této transportérové podrodiny – OCT1 (*SLC22A1*), OCT2 (*SLC22A2*) a OCT3 (*SLC22A3*) (*Han et al. 2013*).

OCT1 se u lidí převážně nachází v játrech a je zodpovědný za přenos kationtů z krve do jater. Mimo to, v menším množství můžeme detekovat nízkou expresi OCT1 i v ostatních tkáních. Zatímco OCT2 transportér je převážně lokalizován na bazolaterální membráně renálního proximálního tubulu. OCT3 je exprimován v kosterních svalech, placentě, slinných žlázách, ale i bazolaterální membráně hepatocytů, avšak v mnohem menší míře ve srovnání s OCT1 transportérem (*Wagner et al. 2016*).

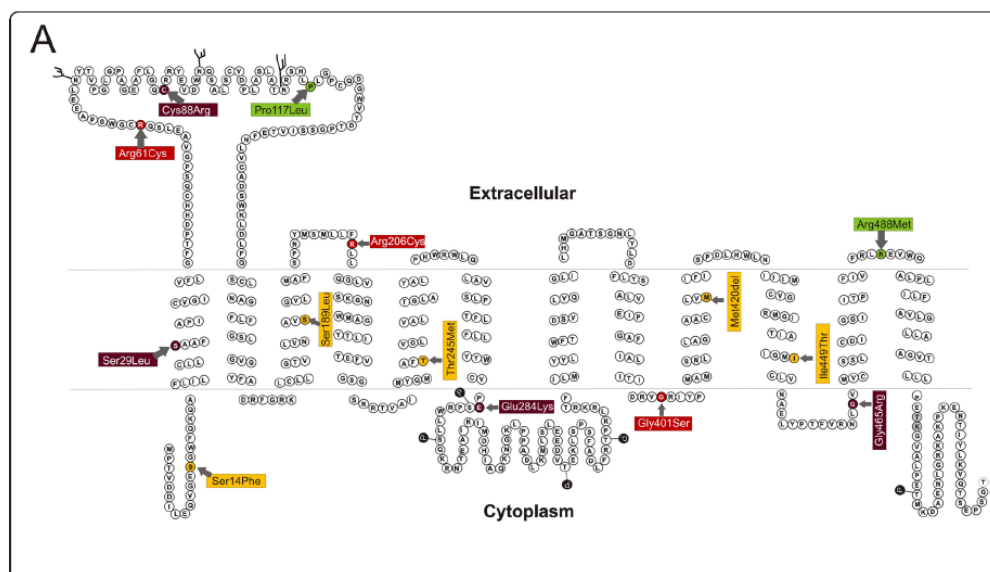
3.4.1 Struktura a funkce OCT1

Polyspecifický přenašeč organických kationtů OCT1 (*SLC22A1*) je u lidí exprimován v epitelálních buňkách a v některých neuronech. Primárně je ale exprimován na bazolaterální membráně hepatocytů a usnadňuje uptake malých organických kationtů ze sinusoidální krve do hepatocytů. V malé míře se můžeme setkat s nízkou expresí i v jiných orgánech, nádorových buňkách a bazofilních granulocytech. Můžeme ho nalézt například v tenkém a tlustém střevě, plicích, srdci a mozku (*Koepsell et al. 2007, Wagner et al. 2016*).

Transport kationtů zprostředkovaný OCT1 je nezávislý na sodných a chloridových iontech. OCT1 funguje jako facilitovaný transportér a směr přenosu je závislý na elektrochemickém gradientu substrátu. Negativní membránový potenciál uvnitř buňky je využit jako hnací síla k přenosu substrátu do buněk (*Wagner et al. 2016*).

Lidský gen *SLC22A1* je vysoce polymorfní, polymorfismy OCT1 mohou mít za následek ztrátu jeho transportní funkce a tím pádem mohou ovlivnit i farmakokinetiku a výsledný efekt léčby (*Seitz et al. 2015*).

Strukturu tohoto transportního proteinu tvoří dvanáct α -helikálních transmembránových domén (TMDs). Mezi první a druhou doménou se nachází velká glykosylovaná extracelulární smyčka. Dále se protein skládá z velké intracelulární smyčky mezi transmembránovou doménou 6 a 7 obsahující fosforylovaná místa. N-konec a C-konec je umístěn intracelulárně. Struktura OCT1 proteinu je vyobrazena na obr. 3 (Engler *et al.* 2011).



Obr. 3 Grafické znázornění struktury OCT1 proteinu (převzato ze: Seitz *et al.* 2015).

3.4.2 Substráty OCT1

Nejvíce substrátů OCT1 patří mezi organické kationty a slabé baze, které jsou kladně nabitě při fyziologickém pH. Nicméně některé nenabitě sloučeniny mohou být také transportovány (například cimetidin při alkalickém pH). Substráty lidského OCT1 zahrnují modelový kationt MPP^+ (*N*-methyl-4-fenylpyridinium), kationty jako tetraethylammonium (TEA^+), ale také některé endogenní sloučeniny, například cholin a acetylcholin. Mezi substráty se řadí i řada léčiv, např. antidiabetikum metformin, antimalarikum chinin, antiarytmikum chinidin, antivirotika aciklovir a ganciklovir. Mezi další substráty patří betablokátor atenolol, antiepileptikum lamotrigin a cytostatikum oxaliplatin (Koepsell *et al.* 2007, Wagner *et al.* 2016).

Další substráty lidského OCT1 transportéru jsou přehledně shrnuty v přehledovém článku od kolektivu autorů (Hyrsova *et al.* 2016).

Největší význam OCT1 spočívá v ovlivnění nitrobuněčné koncentrace substrátů v játrech a ovlivnění jejich farmakodynamiky. Metformin je, jak již bylo zmíněno výše, substrátem jaterního transportéru OCT1. Hlavním místem působení metforminu jsou játra a nejvýznamnější pro uptake transportér organických kationtů do hepatocytu je OCT1. Z toho plyne, že OCT1 je klíčový faktor, který ovlivňuje intracelulární koncentraci metforminu a jeho farmakologický účinek. Dalším substrátem OCT1 transportéru je lamivudin. Tato látka slouží k léčbě chronické virové hepatitidy B (HBV) a také HIV infekce (human immunodeficiency virus). Transport do jater je nezbytný pro interakci s replikujícím virem a má vliv na výsledek léčby HBV (*Wagner et al. 2016*).

3.4.3 Inhibitory OCT1

U některých inhibitorů OCT receptorů ze skupiny léčiv byla pozorována vyšší afinita k OCT1 v porovnání s OCT2 a OCT3. Šlo o antagonistu glutamátových receptorů fencyklidin, antagonisty histaminových receptorů difenhydramin a ranitidin, antagonistu muskarinových receptorů atropin a antidepresivum desipramin. *In vivo* inhibitory OCT1 s nejvyšší afinitou jsou atropin a α_1 -antagonista prazosin (*Koepsell et al. 2007*).

3.5 Vybrané látky ze skupiny substrátů a inhibitorů lidských transportních bílkovin OCT1 a BCRP

3.5.1 Lamivudin

Lamivudin, 3-thiacytidin, je analog cytosinu, pyrimidinové nukleové báze, která se podílí na stavbě DNA i RNA. Působí proti retrovirům a viru hepatitidy B (HBV). Ve fixní kombinaci se zidovudinem (thymidinový analog) a abakavirem (guanosenový analog) se používá k léčbě HIV infekce. Jejich účinek se navzájem doplňuje a ve fixní kombinaci je účinek aditivní. Lamivudin patří do skupiny nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy a DNA polymerázy. U DNA virů umožňuje DNA polymeráza přepis genetické informace. Reverzní transkriptáza je zodpovědná u RNA virů za přepis RNA do DNA (*Švihovec et al. 2018*).

Lamivudin podléhá intracelulární fosforylaci na aktivní metabolit lamivudintrifosfát. Ten se inkorporuje do řetězce virové DNA, ukončuje DNA řetězec a zabraňuje tak replikaci viru (*Perry a Faulds 1997*).

Látka se po perorálním podání dobře vstřebává, má dobrou biologickou dostupnost (u dospělých >80%). Lamivudin je distribuován do všech tělních tekutin, proniká přes hematoencefalickou bariéru. Vazba na plazmatické proteiny je nízká, méně než 36 %. Lamivudin není významně metabolizován a je vylučován primárně v nezměněné formě ledvinami. Převážná část lamivudinu se vylučuje glomerulární filtrací a aktivní tubulární sekrecí, ta je zprostředkována transportním systémem pro organické kationty. Eliminační poločas lamivudinu je 6 hodin (*Perry a Faulds 1997, Švihovec et al. 2018*).

Lamivudin je substrátem OCT1. Ze studie z roku 2009, která porovnávala účinnost transportu a afinitu substrátu u všech tří transportérů, vyplývá: OCT1 měl nejvyšší afinitu k lamivudinu s hodnotami ($K_m = 1.25 \pm 0.1$ mM; $V_{max} = 10.40 \pm 0.32$ nmol/mg protein/min). K_m symbolizuje Michaelisovu konstantu, udává koncentraci substrátu, při níž je rychlost rovna polovině maximální rychlosti transportu. V_{max} představuje maximální rychlost transportu s jednotkami nanomol na miligram proteinu za minutu. V_{max} a K_m vychází z rovnice Michaelise a Mentenové. V_{max}/K_m určuje účinnost transportu. U OCT1 byla zjištěna nejvyšší účinnost transportu ($V_{max}/K_m = 8.32 \pm 0.40$ μ l/mg protein/min), což je dvakrát více než OCT2 a OCT3. V porovnání

s metforminem (substrát OCT1) měl lamivudin pětinasobně větší účinnost transportu než metformin (*Minuesa et al. 2009*).

Jak již bylo zmíněno, lamivudin je také substrátem efluxního transportéru BCRP (*Mao a Unadkat 2015*).

Současné podání lamivudinu a kotrimoxazolu (sulfamethoxazol + trimethoprim) pacientovi s asymptomatickou HIV infekcí, má za následek vzrůst AUC (plocha pod křivkou) lamivudinu a pokles jeho renální clearance (množství léčiva vyloučeného za jednotku času ledvinami, vztažené na koncentraci látky v krvi). To je způsobeno pravděpodobně kompetitivní inhibicí renální exkrece lamivudinu trimethoprimem (*Perry a Faulds 1997*).

3.5.2 Trimethoprim

Trimethoprim, 2,4-diaminopyrimidinový derivát, je antibakteriální chemoterapeutikum zasahující do syntézy kyseliny listové a následné syntézy pyrimidinů v bakteriální buňce. Mechanismus působení spočívá v silné inhibici bakteriálního enzymu dihydrofolát reduktázy. Jedná se o enzymový krok, který následuje po tom, kdy může být syntéza kyseliny listové zablokována sulfonamidy. Trimethoprim inhibuje přeměnu dihydrofolátu na tetrahydrofolát (kyselinu tetrahydrolistovou), prekurzor kyseliny folinové a následné syntézy purinů a DNA. Lidské tělo nedokáže syntetizovat kyselinu listovou, ale přijímá ji v potravě. Syntéza purinů v lidském těle není významně ovlivněna enzymovou inhibicí trimethoprimem (*Zinner a Mayer 2015*).

Trimethoprim má selektivní antimikrobiální účinek, jeho afinita k bakteriálním enzymům je 10 000x až 100 000x vyšší než k lidské dihydrofolát reduktáze (*Beneš 2018*).

Trimethoprim zesiluje účinek sulfonamidů, dalším krokem inhibice syntézy kyseliny listové. Sekvenční blokáda stejné biosyntetické cesty má za následek velký stupeň synergistické aktivity proti širokému spektru mikroorganismů. Trimethoprim se používá samostatně nebo v kombinaci se sulfonamidy. Sulfomethoxazol ve fixní kombinaci s trimethoprimem, konkrétně v poměru 5:1 (sulfamethoxazol:trimethoprim) se nazývá kotrimoxazol (*Wormser et al. 1982, Zinner a Mayer 2015*).

Mezi nežádoucí účinky trimethoprimu patří nauzea, zvracení, cefalea, dyspepsie, průjem a různě závažné alergické reakce. Nejzávažnější účinek je útlum krvetvorby. Ten se může projevit trombocytopenií, neurocytopenií nebo pancytopenií (*Beneš 2018*).

Spektrum účinku a rezistence

Samotný trimethoprim je primárně určen k léčbě komunitních infekcí močových cest. Trimethoprim působí nejvíce na *Escherichia coli* a další enterobakterie (rody *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*), na hemofily a stafylokoky. Některé kmeny (zejména enterobakterie a pneumokoky) získaly druhotně rezistenci. V ČR je k trimethoprimu rezistentních asi 25 % kmenů *E.coli*. Přirozeně rezistentní jsou spirochéty, pseudomonády, mykoplazmata, *Mycobacterium tuberculosis* a většina anaerobně rostoucích bakterií (*Beneš 2018*).

U mnohých bakterií se vyvinula druhotně rezistenci k trimethoprimu. Ta je zprostředkována plasmidy nebo chromozomy. Rezistence může být způsobena změnami buněčné permeability, ztrátou schopnosti buňky vázat léčivo, nadprodukce nebo změna dihydrofolát reduktázy. Klinicky nejvýznamnější mechanismus je plazmidově zprostředkovaná dihydrofolát reduktáza rezistentní k trimethoprimu (*Zinner a Mayer 2015*).

Farmakokinetika

Látka se rychle a téměř kompletně vstřebává z gastrointestinálního traktu. Je široce distribuována do tkání a tělních tekutin. V ledvinách a plicích může dosahovat vyšších koncentrací než v krevní plazmě. Dále se může objevovat ve žluči, slinách, mateřském mléce a ve spermatu. V mozkomíšní tekutině dosahuje koncentrace okolo 40 % hladiny v krvi. Hlavní cesta eliminace je renální tubulární sekrecí. Přibližně 60-80 % podané dávky je vyloučeno močí v průběhu 24 hodin. Zbývající část látky je vylučováno ledvinami v podobě oxidovaných nebo hydroxylovaných derivátů (*Zinner a Mayer 2015*).

Asi z 20 % je trimethoprim metabolizován játry na neúčinné substance. Na transformaci se podílí zejména cytochrom CYP2C9 a v menší míře CYP3A4. V porovnání se sulfamethoxazolem se vzrůstající kyselostí moči roste míra vylučování trimethoprimu (*Beneš 2018*).

3.5.3 Ritonavir

Ritonavir patří do skupiny inhibitorů proteáz. Je široce používán v kombinaci s ostatními proteázovými inhibitory k terapii a prevenci HIV infekce a AIDS (acquired immune deficiency syndrome) (*Tsibris a Hirsch 2015*).

Původně byl užíván samostatně v dávkách 600 mg dvakrát denně. Dnes se běžně používá v nižších dávkách (100–200 mg dvakrát denně) jako inhibitor CYP3A4 ke zlepšení biodostupnosti a zvýšení biologického poločasu ostatních proteázových inhibitorů. Takto podávaný ritonavir má nižší nežádoucí účinky na gastrointestinální systém. V nižších dávkách také zlepšuje účinnost proteázových inhibitorů a snižuje výskyt rezistence. Ritonavir ve fixní kombinaci s lopinavirem funguje jako silný inhibitor CYP3A4 a zvyšuje koncentraci lopinaviru (*Tsibris a Hirsch 2015*).

HIV aspartyl-proteáza je enzym důležitý pro replikační cyklus HIV. Tento enzym je zodpovědný za posttranslační modifikaci virových polyproteinových prekurzorů na funkční proteiny a HIV enzymy. Inhibice tohoto enzymu vede k produkci nezralých neinfekčních částic, které nejsou schopny zahájit další cykly infekce. Ritonavir působí selektivně na HIV proteázy, je jen slabě účinný na lidské aspartyl-proteázy (*Lea a Faulds 1996*).

Gastrointestinální nežádoucí účinky, zejména průjem a nauzea, patří mezi běžné nežádoucí účinky a limitují lékovou toleranci. Může se objevit také dyslipidémie, zvracení a změna chuti (*Tsibris a Hirsch 2015*).

Indukce a inhibice enzymů

Ritonavir indukuje cytochrom P450, konkrétně izoformy CYP1A2, CYP2C9 a CYP2C19. Existuje tedy spousta interakcí s léčivými látkami, která jsou biotransformována prostřednictvím těchto isoenzymů. U léků jako warfarin (antikoagulans), metadon (opioidní analgetikum), levothyroxin (hormon štítné žlázy), valproová kyselina (antiepileptikum) a fenobarbital (barbiturát) bylo hlášeno značné snížení účinku při současném podání s ritonavirem. U další řady léků se očekává významné snížení účinnosti kvůli snížení plazmatických koncentrací substrátů podávaných současně s ritonavirem (například bronchodilatans teofylin, kofein, antipsychotikum olanzapin, antiepileptikum fenytoin a lamotrigin, antimykotikum vorikonazol). Ritonavir je silný inhibitor izoenzymu CYP3A4, ale také inhibuje CYP2D6, CYP2C19, CYP2C8 a CYP2C9. Ritonavir prodlužuje biologický poločas a zvyšuje hladinu plazmatické

koncentrace ostatních proteázových inhibitorů, které jsou metabolizovány cytochromem CYP3A4. Ritonavir také inhibuje P-glykoprotein, BCRP a transportéry ze skupiny OATP (*Foisy et al. 2008, Tseng et al. 2017*).

Farmakokinetika

Absolutní biodostupnost nebyla u lidí dosud stanovena. Ritonavir se z 98–99 % váže na plazmatické proteiny, včetně albuminu a α_1 -kyselého glykoproteinu. Z důvodu vysoké vazby na proteiny je distribuce do CSF (cerebrospinal fluid, mozkomíšní mok) nízká. Látka proniká do lymfatického systému (*Hsu et al. 1998*).

Ritonavir je metabolizován játry, primárně přes CYP3A4. Hlavní metabolitem je isopropylthiazol, který je podobně aktivní jako ritonavir. Ritonavir je eliminován převážně hepatobiliárním systémem (*Tseng et al. 2017*).

4 Cíl práce

Cílem práce bylo otestovat nově vytvořené buněčné modely stabilně exprimující lidské lékové transportéry OCT1 a/nebo BCRP. Provést základní transportní a akumulční studie se známými modelovými substráty a inhibitory. Stanovit tak funkčnost těchto modelů pro rutinní testování transportu léčiv a odhalování potenciálních farmakokinetických interakcí léčiv na úrovni zmiňovaných transportních proteinů.

5 Experimentální část

5.1 Chemikálie

Destilovaná voda

Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, USA)

DMEM (Life Technologies, USA)

FITC-albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, USA)

L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)

Lamivudin (Sigma Aldrich, USA)

³H-lamivudin (Hartmann Analytic, Německo)

Opti-MEM (Life Technologies, USA)

Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Triton X (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

5.2 Pomůcky a přístroje

12 jamková kultivační plata s inzerty s membránou (Corning, USA)

24, 96 jamkové kultivační destičky (TPP, Švýcarsko)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, USA)

Betacounter Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, USA)

Centrifugační zkumavky (TPP, Švýcarsko)

Destičkový analyzátor Synergy 2 (BioTek, USA)

Destičkový spektrofotometr Infinite M200 (Tecan, Německo)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Jednorázové pipety (TPP, Švýcarsko)

Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)

Laminární box TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Itálie)

Mikrozkumavky (Eppendorf, USA)

Pinzeta

Pipetovací nástavec (TPP, Švýcarsko)

Ochranné pracovní rukavice

Scintilační vialky (Kartell, Německo)

Sterilní pasteuřové pipety (Sigma Aldrich, USA)

Světelný mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)

Špičky (Eppendorf, USA)

Vakuová odsávačka

Vibrační třepačka Bio Vortex V1 (Biosan)

Vodní lázeň TW12 (Julabo, Německo)

5.3 Buněčná linie MDCK II

V této práci byla použita buněčná linie MDCK II (Madin-Darby canine kidney cells), izolována z psích epiteliálních buněk ledvin. MDCK II byly stabilně transfekované lidským OCT1 a/nebo lidským BCRP transportérem, zmiňované stabilně transfekované linie byly připravené na pracovišti.

MDCK II buňky patří do skupiny adherentních buněčných linií (Merck c2020). Na rozdíl od suspenzních buněk, které jsou volně dispergované v médiu, adherentní buňky mají tendenci se přichycovat na dno kultivační lahve (Oyeleye et al. 2016).

5.3.1 Charakteristika MDCK buněk

MDCK buňky jsou široce používaným modelem pro studium epiteliálních buněk. Jedná se o psí ledvinné buňky. Poprvé tuto buněčnou linii izolovali Madin a Darby z ledvinné tkáně dospělé feny kokršpaněla. Buňky mají stanovenou apikální a bazolaterální polaritu, dobře definované buněčné spoje, rychlý růst a jsou vhodné pro 2D buněčné kultury. Dostupné jsou různé kmeny MDCK buněk, například parenterální linie, MDCK I a MDCK II (Dukes et al. 2011).

Parenterální linie je heterogenní populace buněk, které vytváří polarizovanou monovrstvu. Z parenterální linie byly izolovány dva podtypy těchto buněk. MDCK I byly izolovány z nižší pasáže parenterálních MDCK buněk a mají velmi vysokou transepiteliální rezistenci (TER) ($> 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) zahrnující velmi těsné mezibuněčné spoje. Jsou negativní na claudin-2. Mají mezerové spoje (gap junctions) (Dukes et al. 2011).

MDCK II byly získány z vyšší pasáže MDCK buněk, oproti MDCK I mají mnohem menší hodnoty transepiteliální rezistence ($\sim 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$) a ne tak těsné spoje. Exprimují protein claudin-2, který se nachází v těsných spojích a je schopný tvořit transmembránové póry v cytoplazmatické membráně, což může snižovat hodnotu TER MDCK II buněk. Buňky mají nedostatek mezerových spojů (gap junctions), pokud nejsou modifikovány. Liší se také velikostí MDCK II jsou větší a delší, v porovnání s menším a ploššími MDCK I. MDCK II jsou nejvíce používanou linií MDCK buněk a jsou doporučovány pro mnohé studie (Dukes et al. 2011).

5.3.2 Médium

Jako kultivační médium byl použit DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) s přidavkem 10 % FBS (fetální bovinní sérum) a L-glutaminu o výsledné koncentraci 2 mM. Jedná se o variantu minimálního esenciálního média.

V den experimentu bylo použito Opti-MEM Reduced serum médium (Opti-minimal essential medium). Jde o vylepšené minimální esenciální médium (MEM), které vyžaduje snížený nebo žádný přidavek FBS. Médium je vhodné pro transportní a akumulární studie.

Nejčastěji používaným druhem séra je FBS. Sérum je komplex biologicky významných sloučenin. Tyto sloučeniny mají zásadní vliv na stimulaci buněčného růstu, funkci buněk, jejich adhezi i šíření, transport hormonů, minerálů a lipidů. Obsahuje proteiny, které slouží jako nosiči a ochranní činitelé pro ostatní molekuly. Příkladem takového proteinu je albumin, který zastává mnoho funkcí, jako vazbu mastných kyselin, vitaminů a iontů, například železo. Avšak sérum může sloužit jako potenciální zdroj biologické kontaminace. Byla vyvinuta také bezsérová média (*Oyeleye et al. 2016*).

Důležitým faktorem pro růst buněk je pH. Pro růst většiny buněčných linií je optimální pH 7,2-7,4. Aby se zabránilo kolísání pH, přidávají se do média pufrы, např. bikarbonátový. Výkyvy pH mohou mít nepříznivý vliv na růst buněk. Do většiny médií se přidává také acidobazický indikátor, nejčastěji jde o fenolovou červeň. Při pH 7,4 má červenou barvu. Při výskytu kontaminace změní indikátor barvu na žlutou v důsledku vzrůstající acidity. Buňky vylučují do média metabolity, pokud se barva média změní, je nutné médium vyměnit (*Phelan 2007*).

Nejvýznamnější zdroj energie je glukóza. Když je přidána do kultury ve vyšší koncentraci, stimuluje zrání buněk a moduluje metabolismus substrátu. Jako zdroj energie využívají buňky i aminokyselinu L-glutamin (*Oyeleye et al. 2016*).

K zabránění bakteriální kontaminace mohou být do média přidána antibiotika (často jde o betalaktamové antibiotikum penicilin v kombinaci s aminoglykosidem streptomycin sulfátem). Některá média mohou být také obohacena specifickými růstovými faktory a neesenciální aminokyselinami (*Phelan 2007*).

5.4 Metody

5.4.1 Příprava roztoků

Fosfátový pufr (PBS)

PBS (phosphate buffered saline, fosfátem pufovaný fyziologický roztok) je izotonický solný roztok o fyziologickém pH 7,4. Izotonické roztoky jsou používány k zachování životaschopných podmínek pro buňky, se kterými je manipulováno mimo jejich přirozené prostředí růstu. Fosfátový pufr sloužil k odstranění zbytků média a promytí buněk před použitím trypsinu. Obsahoval 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ a 10 mM NaH₂PO₄.

PBS roztok byl připraven rozpuštěním 8,01 g NaCl, 0,21 g KCl, 3,58 g Na₂HPO₄ a 1,56 g NaH₂PO₄ v 1 l destilované vody a pH roztoku bylo nakonec upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,4.

Dezintegrační roztok

Dezintegrační roztok obsahoval NaOH, Triton X a destilovanou vodu. Triton X patří mezi běžně používané neionogenní detergenty. Je považován za mírný, nedenuaturující detergent. Používá se k lýze buněk a solubilizaci membránových proteinů. Dochází tak k izolaci biologicky aktivních membránových proteinů. K lýze buněk je obvykle dostačující 0,1 % roztok Tritonu X. K přípravě 200 ml roztoku bylo použito 0,8 g NaOH a 1 ml Tritonu X.

STOP roztok

STOP roztok obsahoval NaCl, HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonová kyselina) a destilovanou vodu. HEPES je pufovací činidlo, které udržuje stálé pH buněčné kultury. STOP roztok ukončoval transport radioaktivně značeného roztoku. K přípravě roztoku byl použit 137 mM NaCl (8,01 g/l) a 10 mM (2,38 g/l) HEPES. Nakonec bylo ještě upraveno pH pomocí NaOH stejně jako v případě přípravy roztoku PBS.

5.4.2 Kultivace buněk

Buňky izolované přímo z tkáně, které jsou pěstovány v kultuře označujeme jako primární buněčnou kulturu. Tato kultura je obvykle heterogenní a má nízkou růstovou frakci a má limitovanou délku života. Většinou se buňky získávají rozvolněním tkáně mechanicky, enzymaticky nebo kombinací (*Philippeos et al. 2012*).

Obvykle se pro izolaci jednotlivých buněk používá trypsin nebo kolagenáza. Účinkem trypsinu dochází k rozkladu extracelulárních proteáz a glykosidas. Působením trypsinu jsou vnější nechráněné proteiny natráveny a dochází tak k rozvolnění buněk z tkáně a získání jednotlivých buněk. Tyto buňky jsou pak inkubovány a kultivovány v médiu. Nová kultura, která pochází z primární kultury a roste separátně v médiu, se nazývá subkultura. Dochází k rozšíření primární kultury, která je po první kultivaci považována za buněčnou linii (*Oyeleye et al. 2016*).

Adherentní buňky se rozrůstají dělením, dokud buňky nepokryjí celý povrch kultivační nádoby. Existují dva důležité faktory, které limitují rozmnožování buněk. Prvním faktorem je volný prostor v kultivační nádobě a druhý pokles živin, které buňkám zajišťuje médium. Obvykle když adherentní buňky zaplní 70-80 % kultivační nádoby, přichází ten správný čas na jejich pasážování. Jak často buňky pasážovat, závisí na druhu buněčné linie a rychlosti jejich růstu (*Phelan 2007, Uysal et al. 2018*).

Buňky se kultivují v inkubátoru, který buňkám zajišťuje prostředí pro jejich růst. Je zde stabilní teplota 37 °C, vysoká relativní vlhkost kolem 95 % a atmosféra vzduchu s obsahem 5 % CO₂. Optimální prostředí a zdroj živin pro růst buněk poskytuje buňkám kultivační médium (*Philippeos et al. 2012*).

Při mé práci byly buňky pasážovány jednou týdně. Při kultivaci buněk bylo postupováno následovně:

1. Nejprve bylo třeba zkontrolovat příslušnou buněčnou kulturu pod světelným mikroskopem. Tímto způsobem lze zhodnotit stupeň konfluence a vyvrátit přítomnost bakteriální nebo plísňové kontaminace.
2. V laminárním boxu se odsaje veškeré médium z kultivační lahve a buňky se opláchnou roztokem PBS. PBS je roztok používaný k odstranění zbytku média, které ulpělo na buňkách a znemožnilo by působení trypsinu. Aplikuje se opatrně

po stěně kultivační lahve, aby nedošlo k odtržení buněk ode dna. Po propláchnutí je PBS odsáto.

3. V následujícím kroku je přímo na buňky přidán trypsin, jeho účinkem dojde k uvolnění buněk ze dna lahve. Lahev s buňkami a trypsinem se nechá přibližně 10 minut inkubovat v inkubátoru při 37 °C. Uvolnění buněk je kontrolováno pod mikroskopem.
4. Přidáním stejného množství média se následně zastaví působení trypsinu na buňky a je možné vytvořit homogenní buněčnou suspenzi.
5. Do předem připravené nové kultivační lahve obsahující čerstvé médium se následně přenesou požadované množství buněčné suspenze popsané v předešlém kroku.
6. Pod mikroskopem se zkontroluje přítomnost buněk, homogenita nově vzniklé suspenze a případné shluky buněk, které by indikovaly nedokonalé rozsuspendování buněk ve 4. kroku. Nakonec je kultivační lahev umístěna do inkubátoru.

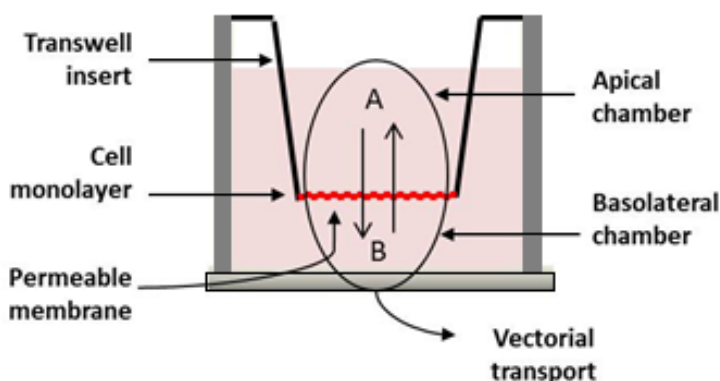
5.4.3 Transportní studie

Pro účely transportní studie byl použit 12 jamkový inzert s membránou. Schéma jamky s inzertem je znázorněno na obr. 4. Experiment byl prováděn na buňkách MDCK II stabilně transfekovaných lidskými transportéry OCT1, BCRP, oběma těmito transportéry a bez transportérů.

1. V laminárním boxu se odstraní veškeré DMEM médium z inzertu s buňkami. Buňky se opláchnou roztokem PBS, aby se odstranily zbytky média. Přidá se stejné množství Opti-MEM reduced-serum média. Inzert s buňkami se nechá přibližně 15 minut inkubovat v inkubátoru.
2. V laminárním boxu se odsálo médium ze spodní části inzertu a místo něj se napipetoval roztok o výsledné koncentraci lamivudinu 10 µg/ml. Roztok obsahoval Opti-MEM, radioaktivně značený ³H-lamivudin a roztok lamivudinu v DMSO. Inzert se vložil na 15 minut do inkubátoru.
3. Po 15 minutách se mikropipetou odebralo 10 µl z horní části inzertu. Takto se postupně odebral vzorek ze všech čtyř jamek, celkem 4 vzorky. Inzert s buňkami se vložil zpět do inkubátoru. Po třiceti minutách se odebralo stejným způsobem

opět všech výše popsaných vzorků. Dále se odebírány vzorky stejným způsobem po jedné, dvou, tří a čtyř hodinách od začátku inkubace.

4. Poté se odsálo médium, propláchno roztokem PBS a napipetoval se do každé jamky Opti-MEM. Do horních částí se napipetoval 1 μ l FITC (fluorescein isothiocyanate conjugate) albuminu o koncentraci 1 mg/ml. Albumin v tomto případě slouží jako ukazatel integrity membrány. Plato s inzerty se vložilo na jednu hodinu do inkubátoru.
5. Poté se odebralo 200 μ l roztoku z horního i dolního kompartmentu do černé 24 jamkové destičky a změřila se fluorescence za následujících podmínek: excitace 485 nm, emise 528 nm.
6. Pinzetou se opatrně odstranila membrána, umístila se do scintilační vialky a přidal se dezintegrační roztok. Dezintegrační roztok obsahoval v tomto případě 6 ml destilované vody a 6 ml DMSO. Dezintegrační roztok má za úkol rozpustit buňky. Poslední vzorek patřil standardu, který byl použit jako kontrola (jednalo se o roztok připravený v bodě 2 obsahující radioaktivně značený ^3H -lamivudin).



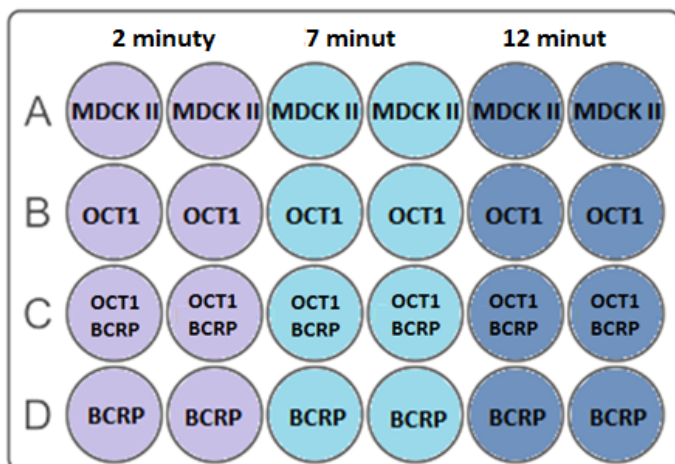
Obr. 4 Schéma jamky s inzertem s membránou, vyznačena apikální část a bazolaterální část, šipkami vyznačen směr transportu (modifikováno dle: *Sygnature Discovery c2020*).

Měřením fluorescence (viz bod 5. výše) zjistíme, kolik fluorescenčně značeného albuminu prošlo skrz buněčnou monovrstvu z apikálních do bazolaterálního kompartmentu. Pomocí FITC albuminu byla tedy testována těsnost mezibuněčných spojů. FITC slouží k fluorescenční vizualizaci albuminu. Naměřená fluorescence je přepočítána na % a vyjadřuje permeabilitu buněčné monovrstvy kultivované na membráně inzertu.

5.4.4 Akumulační studie

Pro hodnocení akumulace lamivudinu byla použita 24 jamková destička. Experiment byl prováděn na buňkách MDCK II stabilně exprimující lidské transportéry OCT1 a/nebo BCRP. Schéma rozložení kultivační destičky je znázorněno na obr. 5. Akumulace se provádí za nesterilních podmínek. Bylo postupováno následujícím způsobem:

1. V laminárním boxu se odstraní veškeré médium DMEM z 24 jamkové destičky. Buňky se dvakrát opláchnou roztokem, ve kterém bude probíhat akumulace, v tomto případě se jednalo o Opti-MEM. Roztok musí být předehřátý na 37 °C. Poté se napipetuje do každé jamky příslušné množství Opti-MEMu a destička se nechá 10 minut preinkubovat v inkubátoru.
2. Po uplynutí deseti minut se k buňkám přidá roztok o výsledné koncentraci lamivudinu 1 µg/ml. Ten se připravil smícháním Opti-MEMu, lamivudinu a radioaktivně značeného ³H-lamivudinu. Pipetou se odsají dva poslední sloupce a napipetuje se ve stejném množství připravený roztok. Poté se destička vloží zpět do inkubátoru.
3. Po pěti minutách se totéž provede s dalšími dvěma sloupci. Za další 3 minuty se odsají poslední dva sloupce, doplní se množstvím radioaktivně značeného roztoku a destička se vloží na 2 minuty do inkubátoru.
4. Poté se všechno roztok odsaje a destička se dvakrát propláchne přidáním vychlazeného STOP roztoku (4 °C). Zbytky STOP roztoku se odsají.
5. Do každé jamky se přidá 200 µl dezintegračního roztoku připraveného podle kapitoly 5.4.1. Destička se nechá přibližně půl hodiny v mrazáku. Dezintegrační roztok zlyzuje buňky.
6. Poté se odebraly vzorky na změření množství proteinu a vzorky na změření aktivity, tedy množství naakumulovaného značeného substrátu ³H-lamivudinu.



Obr. 5 Schéma rozložení 24 jamkového kultivační destičky s časy inkubace pro akumulční studii.

5.4.5 Inhibiční studie

Experimenty byly prováděny na buňkách MDCK II stabilně exprimujících lidský transportér OCT1, BCRP, oba tyto transportéry a bez transportérů. Transportní studie byly prováděny ve 24 jamkových destičkách. V první byl použit inhibitor trimethoprim, v druhé ritonavir. Bylo postupováno následovně:

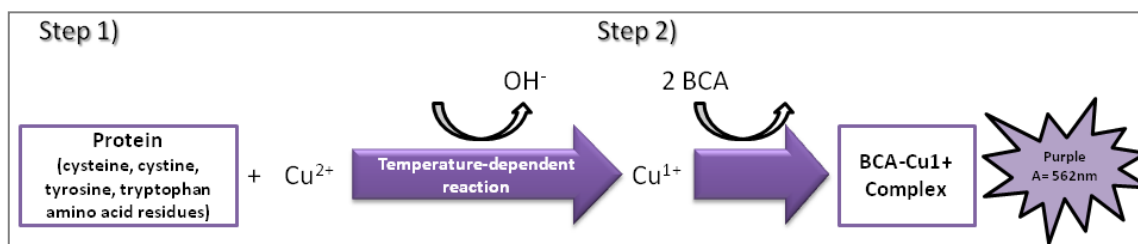
1. V laminárním boxu se buňky dvakrát opláchly médiem Opti-MEM, které sloužilo jako transportní roztok. Poté se přidal do každé jamky roztok inhibitoru. Do první 24 jamkové destičky se přidal připravený roztok s trimethoprimem o koncentraci 100 μM . Do druhé destičky se přidal roztok s ritonavirem o koncentraci 100 μM . Roztoky se připravily smísením média Opti-MEM a roztoku inhibitoru v DMSO. Poté se nechaly destičky 10 minut inkubovat v inkubátoru.
2. Mezitím se připravil radioaktivní roztok o výsledné koncentraci lamivudinu 1 $\mu\text{g/ml}$. Tento roztok obsahoval Opti-MEM, lamivudin a radioaktivně značený ^3H -lamivudin. Po uplynutí inkubační doby se v laminárním boxu odsají poslední dva sloupce a napipetuje se radioaktivně značený roztok. Destičky se vloží na dalších 10 minut do inkubátoru.
3. Poté se totéž provede s dalšími dvěma sloupci, za dalších 5 minut se odsají poslední dva sloupce a doplní radioaktivně značeným roztokem. Destičky se vloží na 5 minut do inkubátoru. Rozložení kultivační destičky bylo stejné jako

v případě akumulační studie a je znázorněno na obr. 5., časy inkubace se však lišily.

4. Následně se všechnen roztok odsaje a destička se dvakrát propláchne přidáním 1 ml vychlazeného STOP roztoku (4 °C). Zbytky STOP roztoku se odsají.
5. Do každé jamky se přidá dezintegrační roztok. Destička se nechá přibližně půl hodiny v mrazáku (-20 °C). Dezintegrační roztok zlyzuje buňky, mráz lyzaci ještě podpoří.
6. Nakonec se odeberou vzorky na stanovení množství proteinu a míry radioaktivity.

5.4.6 Stanovení proteinu metodou BCA

Bicinchoninová metoda (BCA - bicinchoninic acid assay) je založena na tvorbě komplexu Cu^{2+} iontů s proteiny a následné redukce Cu^{2+} na Cu^{1+} v alkalickém prostředí. Na redukci se podílí peptidová vazba a dále zbytky aminokyselin jako cystein, cystin, tryptofan a tyrosin. Kyselina bicinchoninová tvoří s Cu^{1+} ionty v alkalickém prostředí modro-fialový komplex. Koncentrace proteinu je určena spektrofotometricky, komplex vykazuje nejvyšší absorbanci při vlnové délce 562 nm. Absorbance je úměrná množství proteinu a může být vypočtena porovnáním se známým standardem proteinu, jako je např. bovinní sérový albumin. Schéma reakce je znázorněno na obr. 6 (Johnson 2012).



Obr. 6 Schéma stanovení proteinu metodou BCA (převzato z: Johnson 2012).

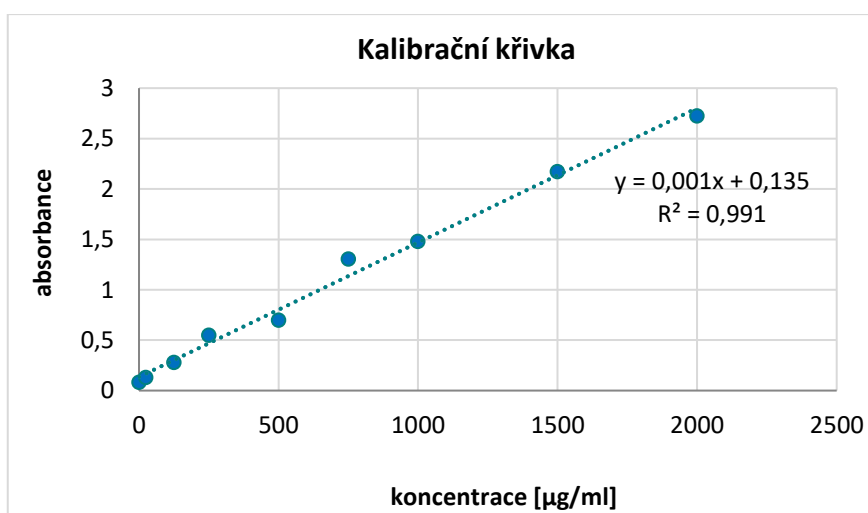
Ke stanovení množství proteinu byl použit Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Bylo postupováno následujícím způsobem:

1. Do 96 jamkové destičky se napipetují roztoky standardů (2 řady, sloupce A→I). Roztoky standardů se připravily naředěním daného množství PBS a standardu bovinního sérového albuminu (BSA), aby roztoky odpovídaly příslušným koncentracím, viz tab. 1.

Tab. 1 Příprava roztoků standardů.

| Označení | PBS [μl] | Standard BSA [μl] | Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$] |
|----------|-----------------------|--------------------------------|--|
| A | 0 | 300 | 2000 |
| B | 125 | 375 | 1500 |
| C | 325 | 325 | 1000 |
| D | 175 | 175 z (B) | 750 |
| E | 325 | 325 z (C) | 500 |
| F | 325 | 325 z (E) | 250 |
| G | 325 | 325 z (F) | 125 |
| H | 400 | 100 z (G) | 25 |
| I | 400 | 0 | 0 |

- Poté se do jamek napipetují vzorky. Do každé jamky se vzorky se napipetuje 5 μl PBS, aby výsledný objem v jamkách každého standardu i vzorku byl stejný. Nakonec se do každé jamky se přidá pracovní roztok. Pracovní roztok byl připraven smícháním reagentu A s B v poměru 50:1.
- Destička se vloží přibližně na 30 minut do inkubátoru. Poté se měří absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka, viz obr. 7.



Obr.7 Kalibrační křivka závislosti koncentrace BSA na absorbanci s rovnicí lineární regrese a hodnotou spolehlivosti.

Byla změřena absorbance několika roztoků BSA o různých koncentracích při vlnové délce 562 nm. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a na základě těchto hodnot byla sestavena kalibrační křivka, která zobrazuje závislost přístrojem naměřené absorbance na koncentraci roztoku. Výsledná závislost by měla být v ideálním případě lineární a měla by procházet počátkem. Z rovnice lineární regrese $y = 0,001x + 0,135$ a naměřené absorbance se vypočítá koncentrace všech proteinů v jednotlivých vzorcích. Proměnná x znamená koncentraci a proměnná y absorbanci. Číslo 0,135 je regresní koeficient, který vyjadřuje systematickou chybu měření. Hodnota spolehlivosti R^2 znamená koeficient determinace. Hodnota blízká číslu 1 ukazuje velmi silnou závislost, mezi proměnnými je tedy skutečně silný vztah. Obecně se dá říct, že čím více se koeficient determinace blíží k hodnotě 1, tím je výsledek spolehlivější.

5.4.7 Detekce beta záření s využitím kapalných scintilátorů

Scintilační detektory se používají pro detekci ionizujícího záření, mezi které patří i záření beta. Emitované β^- částice (vysoce energetické elektrony) vznikají při radioaktivním rozpadu β -zářičů, mezi které patří i tritium (^3H). Energie ionizujícího záření je přeměněna na záblesky viditelného záření neboli scintilace. Látky, které reagují na pohlčení kvant ionizujícího záření světelnými záblesky, se nazývají scintilátory (*Jarý a Pejchal 2017, National Diagnostics 2011*).

Kapalné scintilátory jsou používány k detekci nízkoenergetického β záření. Kapalným scintilátorem je látka kapalného skupenství, která při interakci s ionizujícím zářením převádí část absorbované energie na světelné záblesky viditelného světla (scintilace). Jedná se o roztoky vlastní scintilační látky (cyklické uhlovodíky) v organických rozpouštědlech (např. toluen). Měřený β -radioaktivní vzorek se přimíchá do roztoku kapalného scintilátoru. Energie záření beta je předávána nejprve molekulám rozpouštědla, rozpouštědlo absorbuje energii emitovanou β částicemi. Excitační energie molekul rozpouštědla se pak přenáší na molekuly scintilační látky. Mechanismus vzniku scintilace spočívá v excitaci a deexcitaci energetických stavů molekul scintilační látky. Při pohlčení (absorpci) energie ionizujícího záření dochází k přechodu molekul ze základního stavu na vyšší energetickou hladinu (excitace). Při deexcitaci (vrácení z vyšší energetické hladiny do základního stavu) molekuly scintilační látky emitují fotony viditelného světla a vzniká scintilační záblesk. Vzniklé scintilace jsou

detekovány světlocitlivým senzorem (fotonásobič). Ve fotonásobiči dochází k převádění světelných záblesků na elektrické impulzy. Počet zaregistrovaných impulzů za jednotku času je úměrný radioaktivitě ve vzorku (*Jary a Pejchal 2017, National Diagnostics 2011*).

Při akumulčních a inhibičních studiích bylo postupováno následujícím způsobem:

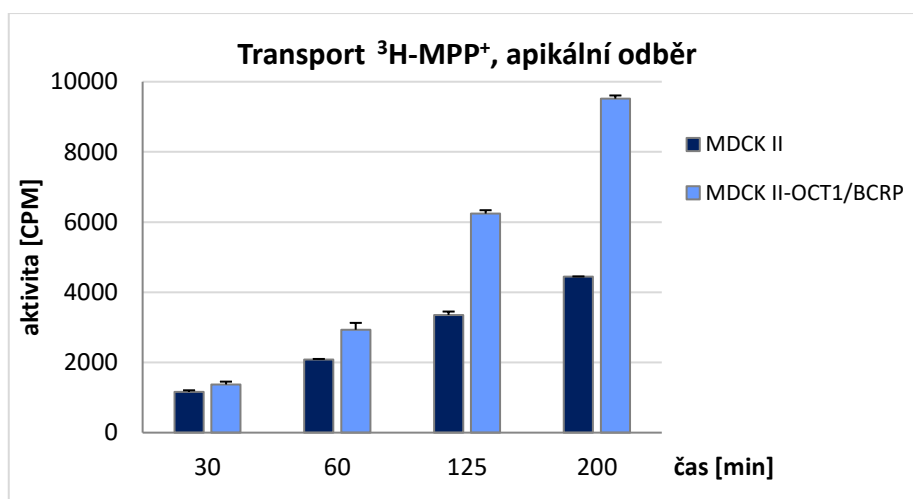
1. Napipetovali jsme 150 μ l z každého vzorku do scintilačních vialek, dvě obsahovaly standardy.
2. Do všech vialek se napipetuje 2 ml scintilačního roztoku. Tento roztok mění aktivitu na světelné impulzy, které jsou následně detekovány pomocí betacounteru.
3. Měření každého vzorku probíhalo po dobu 5 minut, abychom získali co nejpřesnější výsledky.

Měření byly získány hodnoty v jednotkách CPM (counts per minute) = počet naměřených světelných záblesků za minutu. Hodnoty CPM byly zprůměrovány u vzorků a standardů a následně vztaženy na koncentraci proteinu v každé jamce.

6 Výsledky

6.1 Transportní studie

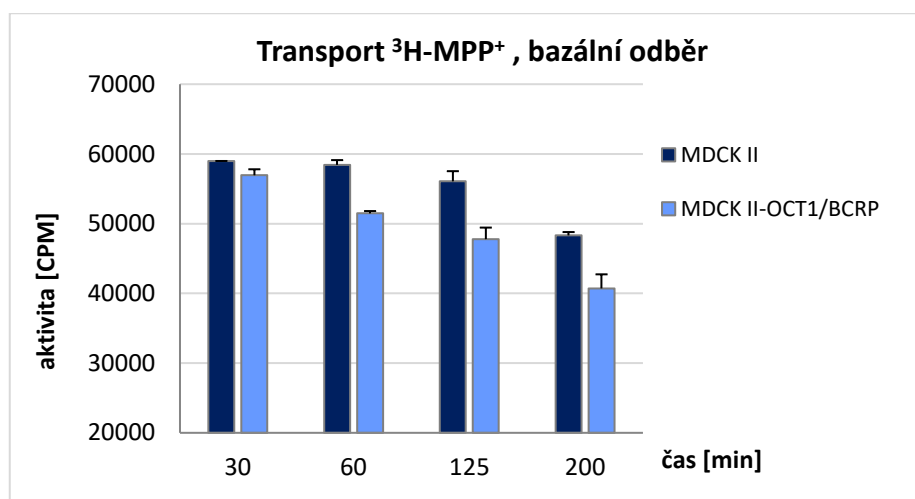
Pro kontrolu funkčnosti vytvořené buněčné linie MDCK II stabilně exprimující lidské transportéry OCT1 a BCRP byla provedena transportní studie s modelovým substrátem MPP⁺ (*N*-methyl-4-fenylpyridinium). Buňky byly inkubovány se standardním radioaktivně značeným substrátem OCT1 ³H-MPP⁺ po dobu 30, 60, 125 a 200 min při 37 °C. Látka je také substrátem BCRP transportéru. K vyhodnocení transportní studie byly použity výsledky měření aktivity získané pomocí betacounteru. Na obr. 8 je vidět nárůst množství značeného substrátu v apikálním kompartmentu při bazolaterálně-apikálním transportu, který je významně vyšší u dvojitě transfekovaných buněk než u buněk netransfekovaných.



Obr. 8 Transport ³H-MPP⁺ přes buněčnou monovrstvu MDCK II transfekovaných OCT1/BCRP a netransfekovaných - transport ve směru BA (v bazolaterálně-apikálním směru), odběr z apikálního kompartmentu. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD) množství transportované látky do apikální části inzertu.

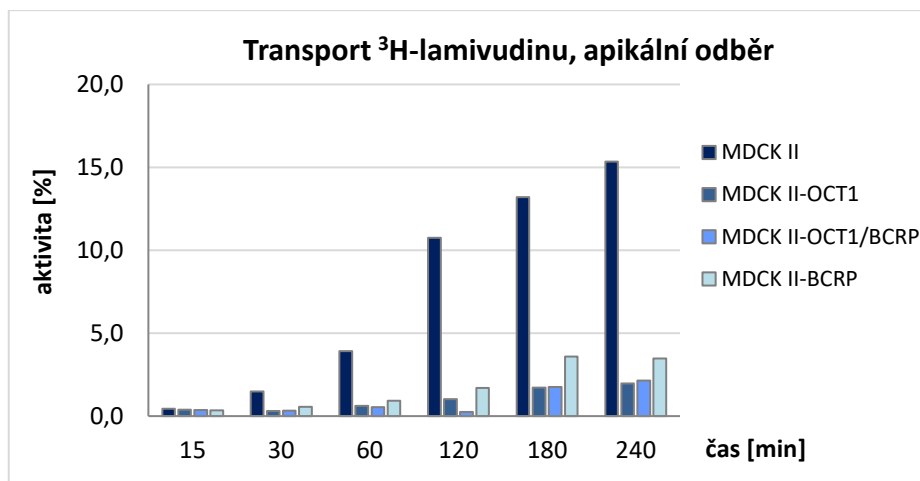
Na obr. 9 můžeme sledovat naopak úbytek značeného substrátu v bazolaterálním kompartmentu, kdy jsme opět pozorovali výraznější úbytek u buněk transfekovaných. Naměřené hodnoty akumulace ³H-MPP⁺ v membráně u obou použitých linií byly do pěti procent.

Těsnost buněčné monovrstvy byla stanovena pomocí fluorescenčně značeného albuminu (FITC-albuminu), který byl aplikován do apikálního kompartmentu. Naměřené hodnoty permeability monovrstvy se pohybovaly u obou použitých buněčných linií řádově v jednotkách procent, značící dobrou těsnost buněčné monovrstvy.



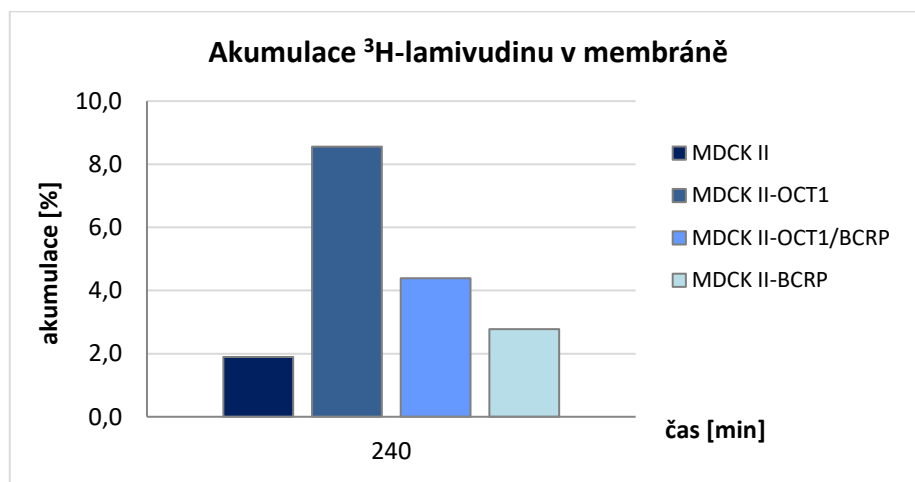
Obr. 9 Transport ³H-MPP⁺ přes buněčnou monovrstvu MDCK II netransfekovaných a stabilně transfekovaných transportéry OCT1/BCRP - transport ve směru BA, odběr z bazálního kompartmentu. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství transportovaného substrátu do apikální části inzertu.

Při transportní studii s ³H-lamivudinem byl testován bazolaterálně-apikální transport této látky v závislosti na čase. Byla použita buněčná linie stabilně exprimující lidské transportéry OCT1 a/nebo BCRP. Výsledky měření aktivity pomocí betacounteru byly porovnány se standardem a přečítány na procento transportovaného lamivudinu. Obr. 10 ukazuje nárůst testované látky v apikálním kompartmentu se zvyšujícím se časem inkubace. Nejvyšší hodnoty lze pozorovat u buněk netransfekovaných.



Obr. 10 Časová závislost transportu ³H-lamivudinu přes buněčnou monovrstvu - BA transport (v bazolaterálně-apikálním směru), odběr z apikálního kompartmentu. Data jsou prezentována jako procento transportovaného ³H-lamivudinu do apikální části inzertu oproti standardu.

V závěru transportní studie bylo provedeno stanovení akumulace lamivudinu v buněčné monovrstvě. Na obr. 11 je znázorněna akumulace ³H-lamivudinu v čase inkubace 240 minut. Nejvyšší akumulace je u buněk s transportérem OCT1, nejnižší naopak u buněk kontrolních, netransfekovaných.



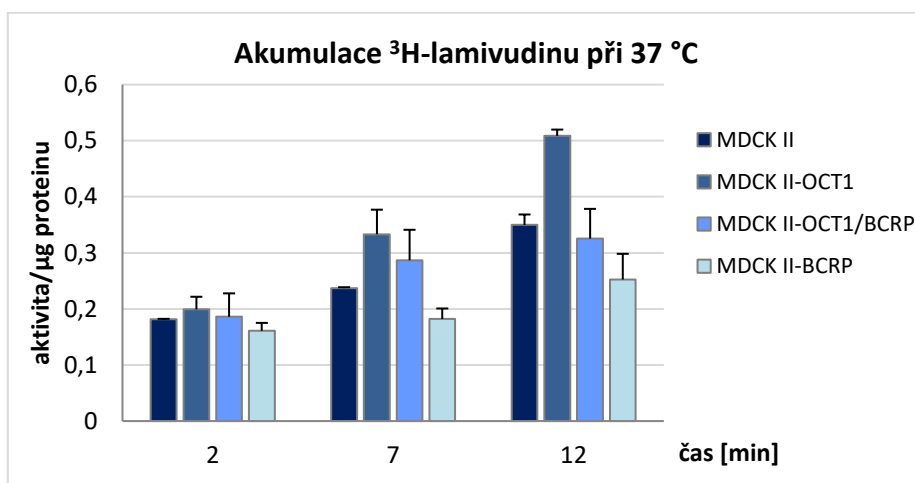
Obr. 11 Akumulace ³H-lamivudinu v membráně, transport probíhal v bazolaterálně-apikálním směru. Data jsou prezentována jako procento akumulace lamivudinu oproti standardu.

K vyhodnocení integrity monovrstvy byla měřena fluorescence FITC albuminu. Naměřené hodnoty integrity monovrstvy se pohybovaly řádově v desítkách procent. Hodnoty permeability z této transportní studie jsou poměrně vysoké, což může značit porušenou integritu monovrstvy buněk.

6.2 Akumulační studie

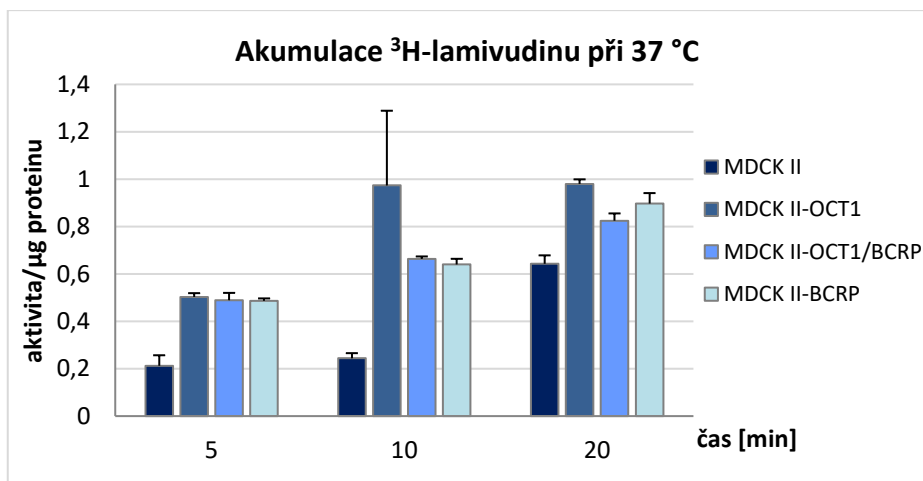
Měřením impulzů pomocí betacounteru byly získány hodnoty aktivity radioaktivně značeného roztoku, které se potom vztáhly na konkrétní koncentraci proteinu v každé jamce. Takto bylo postupováno i u inhibiční studie.

Z prvního experimentu je patrné, že nejvyšší akumulaci lamivudinu měly buňky s transportérem OCT1, kdy byl lamivudin přenášen do buněk. Nejnižší akumulace je u buněk s BCRP, substrát byl přenášen ven z buněk. S rostoucím časem inkubace se akumulace lamivudinu v buňkách zvyšuje. Výsledky znázorňuje následující graf obr. 12.

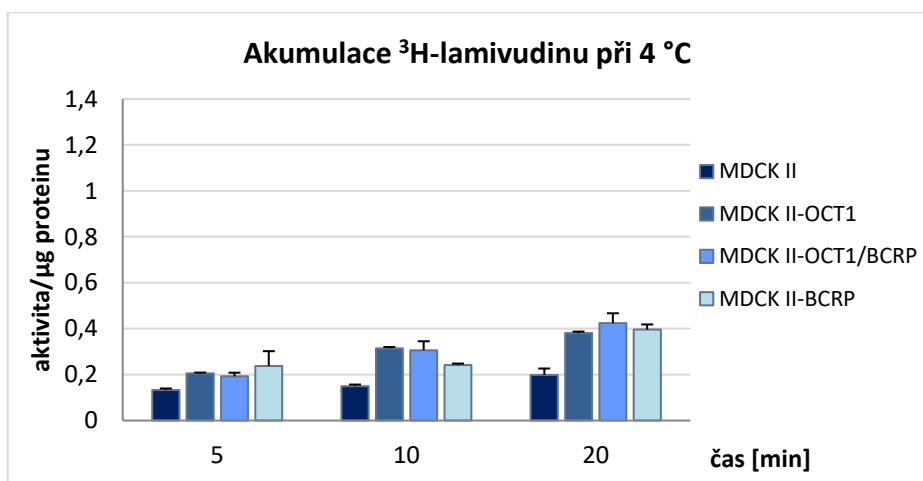


Obr. 12 Časová závislost akumulace lamivudinu v buňkách MDCK II netransfekovaných, transfekovaných lidskými OCT1 nebo BCRP a transfekovaných oběma transportéry při teplotě 37 °C. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulovaného ³H-lamivudinu v buňkách MDCK II.

K potvrzení aktivního transportu v námi vytvořeném modelu byly buňky MDCK II inkubovány s lamivudinem po dobu 5, 10, 20 minut při teplotách 37 °C a 4 °C. Navíc byla použita nižší koncentrace roztoku lamivudinu (0,1 µg/ml), aby se předešlo případnému přesycení transportérů. Z obr. 13 a 14 je patrné, že se při teplotě 4 °C akumulace výrazně snížila oproti inkubaci při 37 °C, což značí účast aktivních transportních mechanismů. Buňky transfekované OCT1 transportérem vykazují výrazně vyšší hodnoty akumulovaného značeného lamivudinu oproti kontrolním netransfekovaným buňkám.



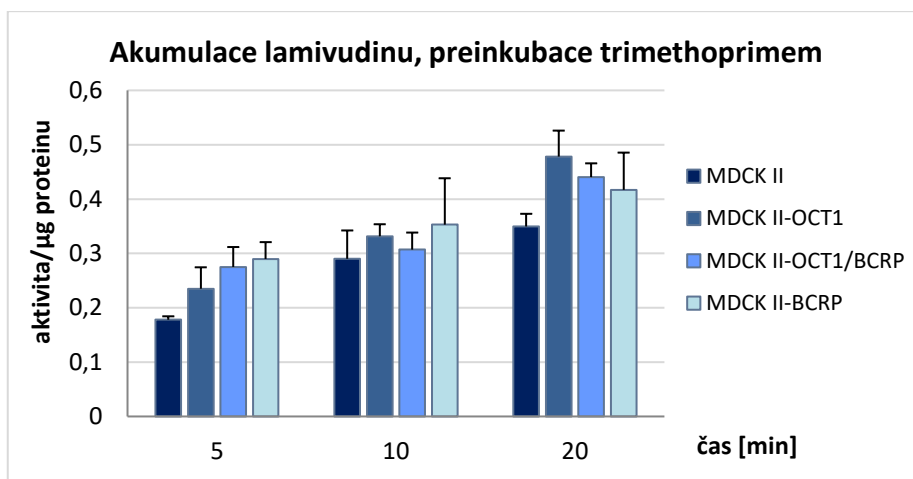
Obr. 13 Časová závislost akumulace lamivudinu v buňkách MDCK II při teplotě 37 °C. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulované látky v buňkách.



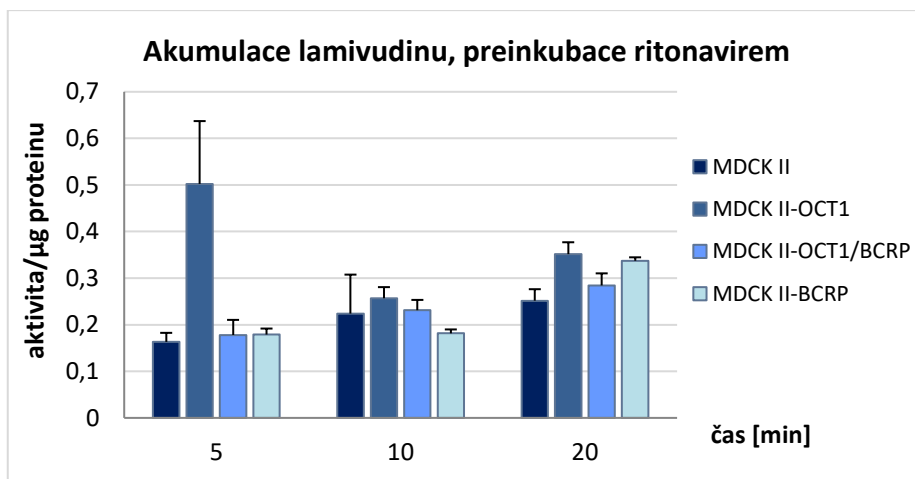
Obr. 14 Časová závislost akumulace lamivudinu v buňkách MDCK II při snížené teplotě 4 °C. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství akumulovaného ³H-lamivudinu v buňkách.

6.3 Inhibiční studie

Inhibiční studie byla provedena za využití známých inhibitorů transportérů OCT1 a BCRP. Inhibiční studie probíhaly po dobu 5, 10, 20 minut při 37 °C. Použitím trimethoprimu došlo k inhibici OCT1 transportéru. Výrazné snížení akumulace u buněk transfekovaných OCT1 oproti stavu bez použití inhibitoru (obr. 12 a 13) můžeme pozorovat na obr. 15. Výsledky inhibiční studie při použití ritonaviru (známý inhibitor efluxního BCRP transportéru i uptonového OCT1) jsou znázorněny na obr. 16. V tomto případě jsme pozorovali prakticky stejné hodnoty akumulace u všech testovaných linií s výjimkou MDCK II-OCT1 v 5. minutě, kdy byl zaznamenán vysoký nárůst akumulace, ovšem v důsledku vysoké směrodatné odchylky není tento nárůst statisticky významný.



Obr. 15 Časová závislost akumulace lamivudinu v buňkách MDCK II za použití inhibitoru trimethoprimu. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného ^3H -lamivudinu v buňkách.



Obr. 16 Časová závislost akumulace lamivudinu v buňkách MDCK II za použití inhibitoru ritonaviru. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného ^3H -lamivudinu v buňkách.

7 Diskuse

Léčiva mají kromě terapeutického efektu i nežádoucí, v krajním případě až toxický efekt. Velký význam v obraně před potenciálně nebezpečnými látkami mají biotransformační enzymy metabolizující léčiva a transportní proteiny, které regulují vstup látek do tkání a orgánů. Především jde o jejich transport do jater, hlavního biotransformačního a detoxikačního orgánu lidského organismu (Skálová 2017). Příkladem takového transportního proteinu je OCT1, který do jater přenáší organické kationty (Klaassen a Aleksunes 2010). Na eliminaci léčiv a konjugátů do žluči se podílí BCRP a další efluxní transportéry lokalizované na apikální membráně hepatocytů. Přenos léčiv transportními proteiny může ovlivňovat kromě farmakokinetiky léčiv i jejich farmakodynamiku – míru účinku (Skálová 2017).

Jaterní transportér OCT1 přenáší celou řadu léčiv. Přibližně 40 % všech léčiv jsou při fyziologickém pH kationty a mnoho z nich je přenášeno pomocí aktivního transportu z krve do hepatocytů. Lidský OCT1 transportér tak významně ovlivňuje farmakokinetiku mnoha kationických léčiv. Kompetice o transportér mezi jednotlivými léčivy může vést k lékovým interakcím (Ahlin *et al.* 2008). BCRP transportér má stejně jako OCT1 širokou substrátovou specifitu, bylo také identifikováno mnoho látek inhibujících tento transportér. Může proto docházet k mnoha interakcím zprostředkovaných tímto transportním proteinem (Mao a Unadkat 2015). Lékové interakce mohou vést k nepříznivým až vážným reakcím, mohou mít vliv na účinnost a toxicitu podávaných léčiv (Endres *et al.* 2006).

V rámci experimentální části této práce jsme při transportní studii testovali funkčnost buněčné linie za použití modelového substrátu MPP⁺ u buněk transfekovaných lidskými transportéry OCT1 a BCRP. Nárůstem substrátu v apikální části při BA transportu a poklesem v bazolaterální části byla ověřena dobrá funkčnost této linie. Na základě testování integrity monovrstvy bylo ověřeno, že těsnost buněk je rovněž vyhovující. Na základě těchto zjištění jsme konstatovali, že nově připravené dvojité transfekované buňky jsou vyhovující pro následující experimenty.

Dále byla provedena transportní studie s radioaktivně značeným lamivudinem. Při transportní studii vedené bazolaterálně apikálním směrem transportu lamivudinu s časem jsme pozorovali nepatrně vzrůstající množství u transfekovaných buněk

v apikálním kompartmentu. Vzhledem k tomu, že lamivudin je substrátem aktivního efluxního transportéru, jeho koncentrace by se měla v apikálním kompartmentu v průběhu experimentu významně zvyšovat. Vysoké hodnoty MDCK II buněk ve srovnání se stabilně transfekovanými transportérem OCT1 mohou být kromě výrazné permeability buněčné monovrstvy i např. z důvodu jejich kontaminace, kdy nedochází ke správné funkci. Přítomnost bakteriální a plísňové kontaminace byla vyloučena v buněčných kulturách, avšak vzhledem ke kultivaci buněk na membránách inzertů, ji nebylo možné vyloučit přímo na experimentálních platech, kde byly nasazené buňky po 4 dny kultivovány. Nicméně vzhledem k výsledkům akumulace získaným z buněčných monovrstev v závěru experimentu, které vyšly přesně podle našeho očekávání (nejvyšší akumulace byla zaznamenána v případě linie MDCK-OCT1, nižší v případě MDCK-OCT1/BCRP a nejnižší v případě kontrolních MDCK II buněk), můžeme vliv bakteriální kontaminace na funkčnost buněčných modelů vyloučit. Hodnoty permeability vypovídají o tom, že buňky nebyly dostatečně těsné a nepotvrzují správnou integritu monovrstvy. Mohou souviset s výskytem pórů, kterými by FITC albumin mohl paracelulárním transportem přecházet přes monovrstvu.

Při akumulačních studiích byla zjišťována aktivita radioaktivně značeného ^3H -lamivudinu. Ta byla přepočítána na koncentraci proteinu v jednotlivých jamkách. Inkubace byla prováděna v časech 2, 7 a 12 minut. Byl použit roztok o výsledné koncentraci lamivudinu 1 $\mu\text{g/ml}$, což přibližně odpovídá plazmatickým koncentracím. Při perorálním podání lamivudinu v dávce 2 mg/kg dvakrát denně pacientovi s onemocněním HIV byla maximální dosažená plazmatická koncentrace (c_{max}) $1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ (*National Center for Biotechnology Information [2005]*).

Vysoká akumulace lamivudinu u buněk s transportérem OCT1 naznačuje, že lamivudin je substrátem OCT1, což je v souladu s dosavadními poznatky (*Wagner et al. 2016*). Nejnižší akumulaci měly buňky s BCRP transportující substrát ven z buněk, což opět odpovídá doposud zjištěným poznatkům (*Mao a Unadkat 2015*), že je lamivudin substrátem BCRP. Hodnoty akumulace u buněk dvojité transfekovaných byly prakticky srovnatelné s kontrolními buňkami.

Dále byla akumulace lamivudinu porovnávána při teplotách 37 °C a 4 °C. Množství akumulované látky bylo při teplotě 37 °C několikrát vyšší než při teplotě 4 °C. Pokles teploty významně snížil akumulaci u buněk transfekovaných OCT1, ale i dalších typů buněk. Akumulace u buněk s OCT1 byla snížena průměrně o 63 %

(počítáno jako % snížení akumulace při 4 °C oproti 37 °C). U buněk transfekovaných OCT1 i BCRP došlo ke snížení akumulace průměrně o 54 %, u buněk s transportérem BCRP o 56 %. Inhibicí chladem bylo potvrzeno, že se na transportu lamivudinu podílí aktivní transportní systémy. Snížením teploty dochází k inhibici transportů v buňkách, které jsou závislé na energii, tedy i OCT1 a BCRP, čímž jsme potvrdili účast těchto transportních bílkovin na transmembránovém přenosu lamivudinu.

Použitím trimethoprimu došlo k inhibici transportéru OCT1, který přenáší substráty do jaterních buněk (*Ahlin et al. 2008*). Při časovém intervalu 5 a 10 minut je největší akumulace lamivudinu u buněk s transportérem BCRP, nicméně nevykazovala statistickou významnost a lze tedy hodnoty považovat za víceméně srovnatelné. Ve 20 minutách byla největší akumulace lamivudinu u buněk s transportérem OCT1, avšak tato hodnota je opět srovnatelná s hodnotami buněk transfekovanými transportérem BCRP a dvojitě transfekovanými. Celkově tak převyšuje hodnotu buněk kontrolních, což může být i dáno vlivem transfekce, kontrolní buňky totiž transfekovány nebyly. Při inkubaci 20 minut lze předpokládat nevyšší hodnoty akumulace ve srovnání s kratšími inkubačními časy vzhledem k delší době aplikace substrátu. Výrazný pokles akumulace oproti stavu bez inhibitorů je u MDCK-OCT1 a MDCK-OCT1/BCRP, kde byl blokován právě OCT1 transportér (porovnáno s akumulací lamivudinu o stejné koncentraci při teplotě 37 °C). U buněk s transportérem BCRP se hodnoty akumulace oproti stavu bez inhibitorů výrazně neměnily. Použitá koncentrace inhibitoru byla mnohonásobně vyšší (100 μM) než je maximální plazmatická koncentrace naměřená u pacientů léčených trimethoprimem. Při podání jednotlivé dávky 100 mg trimethoprimu byla dosažena průměrná plazmatická koncentrace přibližně 1 μg/ml, což odpovídá 3,44 μM (*DrugBank 2005*). Důvodem použití vyšší koncentrace bylo, abychom dosáhli spolehlivé inhibice OCT1 transportéru.

Ritonavir je účinný inhibitor transportéru BCRP (*Mao a Unadkat 2015*). Ritonavir dále inhibuje také OCT1 transportér (*Jung et al. 2008*). V použité koncentraci inhiboval oba studované transportéry, tedy jak BCRP, který vylučuje své substráty ven z buňky, tak i uptonový OCT1 transportér. Při časovém intervalu 5 minut byla největší akumulace u MDCK-OCT1, avšak s výraznou odchylkou, která mohla vzniknout i v důsledku odebrání nehomogenního vzorku pro stanovení buď proteinu nebo měření aktivity. Pokud bychom totiž počítali s nižším množstvím proteinu, tedy i nižším množstvím buněk než reálně ve vzorku byl, může to vést k umělému navýšení hodnoty

akumulace. Výsledky mohlo negativně ovlivňovat například nedokonalé promytí buněk, které mohlo způsobit ulpění radioaktivně značeného substrátu na buňkách. Ostatní buňky měly při inkubaci 5 minut přibližně stejnou nižší hodnotu. Po 10 a 20 minutách inkubace byla akumulace u všech buněčných modelů přibližně srovnatelná. Intracelulární akumulace lamivudinu oproti stavu bez použití inhibitoru se snížila u MDCK-OCT1/BCRP a MDCK-BCRP. U MDCK-OCT1 došlo k výraznému snížení po 10 a 20 minutách, což odpovídá inhibici OCT1 transportéru.

Ritonavir podávaný v dávce 100 mg dvakrát denně u pacienta s onemocněním HIV byly zjištěny hodnoty c_{\max} 0,89 $\mu\text{g/ml}$. Při dávce 200 mg jednou denně byly zaznamenány hodnoty c_{\max} $3,4 \pm 1,3$ $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty jsou uvedeny ve formě aritmetických průměrů (*European Medicines Agency 2009*). Námi použitá koncentrace inhibitoru byla mnohonásobně vyšší (100 μM) než jsou plazmatické koncentrace. Byla tak zvolena, abychom dosáhli spolehlivé inhibice studovaných transportérů a mohli lépe demonstrovat vliv na přenos lamivudinu přes buněčnou membránu.

Snížení intracelulární akumulace použitím obou inhibitorů ukazuje možný potenciál lékových interakcí mezi lamivudinem a jinými současně podávanými léčivy, která jsou inhibitory transportérů OCT1 a BCRP. Lamivudin není významně metabolizován v játrech a je vylučován primárně v nezměněné formě ledvinami (*Perry a Faulds 1997*). Převážná část se vylučuje glomerulární filtrací a aktivní tubulární sekrecí zprostředkovanou transportním systémem pro organické kationty OCT2 (*Minuesa et al. 2009, Švihovec et al. 2018*). Vzhledem těmto tvrzením je nepravděpodobná interakce na úrovni biotransformace, ale stále může docházet ke vzniku dalších farmakokinetických interakcí na úrovni membránového transportu.

OCT1 transportér hraje důležitou roli v přenosu organických kationtů, jejichž hlavním místem účinku jsou játra. Při léčbě virové hepatitidy je přístup léčiv do jater klíčový pro interakci s replikujícím se virem (*Wagner et al. 2016*). Interakce s trimethoprimem by mohly mít vliv na snížení účinku lamivudinu při léčbě hepatitidy B.

BCRP i OCT1 transportér díky své široké substrátové specifitě zprostředkovávají přenos velkého spektra terapeutických látek. Bylo identifikováno také velké množství inhibitorů těchto transportních proteinů. Kombinace dvou a více léčiv během terapie představuje riziko vzniku lékových interakcí, které mohou vznikat

i na úrovni těchto transportních proteinů. Interakce mohou spočívat jak v inhibici transportérů, tak v kompetici o přenašeč mezi současně podávanými substráty. OCT1 a BCRP tak mohou mít významný vliv na vznik lékových interakcí, které mohou mít negativní vliv na lidský organismus. Z tohoto hlediska je tedy důležité vytvoření nových modelů, kde bude možné tyto potenciálně škodlivé interakce odhalovat a získané poznatky využít v klinické praxi při předcházení těmto interakcím.

8 Závěr

V této diplomové práci byl zkoumán přenos radioaktivně značeného ^3H -lamivudinu pomocí jaterních membránových transportérů OCT1 a BCRP.

Funkčnost nově vytvořené dvojité stabilně transfekované buněčné linie MDCK-OCT1/BCRP byla potvrzena pomocí transportní studie se značeným modelovým substrátem ^3H -MPP⁺, čímž jsme potvrdili využitelnost modelu pro následující experimenty.

Transportní studie se značeným substrátem ^3H -lamivudinem neprokázala transport tohoto antivirotika ve vyšší míře ve srovnání se standardní, netransfekovanou buněčnou linií MDCK II, avšak data získaná z buněčné monovrstvy potvrzují, že se na transportu ^3H -lamivudinu podílí transportéry OCT1 a BCRP. Navíc jsme prokázali, že se na přenosu lamivudinu přes buněčné membrány podílí aktivní transport, což jsme dokázali akumulací studií, která byla realizována za snížené teploty, při 4 °C. Provedením transportní studie se známými inhibitory trimethoprimem a ritonavirem byla demonstrována léková interakce mezi výše zmiňovanými léčivy na úrovni lékových transportérů.

Námi testovaný model tedy celkově vyhovuje pro další testování a případné odhalování lékových interakcí na úrovni lidských membránových transportních proteinů OCT1 a BCRP.

9 Literatura

AHLIN, Gustav, Johan KARLSSON, Jenny M. PEDERSEN, et al. Structural Requirements for Drug Inhibition of the Liver Specific Human Organic Cation Transport Protein 1. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008, **51**(19), 5932-5942. DOI: 10.1021/jm8003152. ISSN 0022-2623.

BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 502-526. ISBN 978-80-271-0636-3.

ČERVINKOVÁ, Zuzana. Funkce jater. HŮLEK, Petr a Petr URBÁNEK. *Hepatologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 29-30. ISBN 9788027103942.

DUKES, Joseph D, Paul WHITLEY a Andrew D CHALMERS. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biology*. 2011, **12**(1). DOI: 10.1186/1471-2121-12-43. ISSN 1471-2121.

ENDRES, Christopher J., Peng HSIAO, Francisco S. CHUNG a Jashvant D. UNADKAT. The role of transporters in drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, **27**(5), 501-517. DOI: 10.1016/j.ejps.2005.11.002. ISSN 09280987.

ENGLER, Jane R., Timothy P. HUGHES a Deborah L. WHITE. OCT-1 as a Determinant of Response to Antileukemic Treatment. *Clinical Pharmacology&Therapeutics*. 2011, **89**(4), 608-611. DOI: 10.1038/clpt.2011.12. ISSN 0009-9236.

FOISY, Michelle M, Erin M YAKIWCHUK a Christine A HUGHES. Induction Effects of Ritonavir: Implications for Drug Interactions. *Annals of Pharmacotherapy*. 2008, **42**(7-8), 1048-1059. DOI: 10.1345/aph.1K615. ISSN 1060-0280.

HAN, Tianxiang (Kevin), Ruth S. EVERETT, William R. PROCTOR, Chee M. NG, Chester L. COSTALES, Kim L. R. BROUWER a Dhiren R. THAKKER. Organic Cation Transporter 1 (OCT1/mOct1) Is Localized in the Apical Membrane of Caco-2 Cell Monolayers and Enterocytes. *Molecular Pharmacology*. 2013, **84**(2), 182-189. DOI: 10.1124/mol.112.084517. ISSN 0026-895X.

HSU, Ann, G Richard GRANNEMAN a Richard J. BERTZ. Ritonavir. *Clinical Pharmacokinetics*. 1998, **35**(4), 275-291. DOI: 10.2165/00003088-199835040-00002. ISSN 0312-5963.

HYRSOVA, Lucie, Tomas SMUTNY, Frantisek TREJTNAR a Petr PAVEK. Expression of organic cation transporter 1 (OCT1): unique patterns of indirect regulation by nuclear receptors and hepatospecific gene regulation. *Drug Metabolism Reviews*. 2016, **48**(2), 139-158. DOI: 10.1080/03602532.2016.1188936. ISSN 0360-2532.

JONKER, J. W., J. W. SMIT, R. F. BRINKHUIS, M. MALIEPAARD, J. H. BEIJNEN, J. H. M. SHELLENS a A. H. SCHINKEL. Role of Breast Cancer Resistance Protein in the Bioavailability and Fetal Penetration of Topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000, **92**(20), 1651-1656. DOI: 10.1093/jnci/92.20.1651. ISSN 14602105.

JUNG, Norma, Clara LEHMANN, Andrea RUBBERT, et al. Relevance of the Organic Cation Transporters 1 and 2 for Antiretroviral Drug Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008, **36**(8), 1616-1623. DOI: 10.1124/dmd.108.020826. ISSN 0090-9556.

KLAASSEN, Curtis D. a Lauren M. ALEKSUNES. Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacological Reviews*. 2010, **62**(1), 1-96. DOI: 10.1124/pr.109.002014. ISSN 0031-6997.

KOEPSSELL, Hermann, Katrin LIPS a Christopher VOLK. Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharmaceutical Research*. 2007, **24**(7), 1227-1251. DOI: 10.1007/s11095-007-9254-z. ISSN 0724-8741.

LEA, Andrew P. a Diana FAULDS. Ritonavir. *Drugs*. 1996, **52**(4), 541-546. DOI: 10.2165/00003495-199652040-00007. ISSN 0012-6667.

LIANG, Yu, Siqi LI a Ligong CHEN. The physiological role of drug transporters. *Protein & Cell*. 2015, **6**(5), 334-350. DOI: 10.1007/s13238-015-0148-2. ISSN 1674-800X.

MAO, Qingcheng a Jashvant D. UNADKAT. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *The AAPS Journal*. 2015, **17**(1), 65-82. DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6. ISSN 1550-7416.

MINUESA, Gerard, Christopher VOLK, Míriam MOLINA-ARCAS, et al. Transport of Lamivudine [(-)- β -1-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidine] and High-Affinity Interaction of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors with Human Organic Cation Transporters 1, 2, and 3. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009, **329**(1), 252-261. DOI: 10.1124/jpet.108.146225. ISSN 0022-3565.

NIES, Anne T. a Dietrich KEPPLER. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2007, **453**(5), 643-659. DOI: 10.1007/s00424-006-0109-y. ISSN 0031-6768.

OYELEYE, O. O., S. T OGUNDEJI, S. I. OLA a O. G. OMITOGUN. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2016, **11**(2), 6-16. DOI: 10.5897/BMBR2016.0261. ISSN 1538-2273.

PATEL, Mitesh, Kunal S. TASKAR a Maciej J. ZAMEK-GLISZCZYNSKI. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2016, **56**, S23-S39. DOI: 10.1002/jcph.671. ISSN 00912700.

PERRY, Caroline M. a Diana FAULDS. Lamivudine. *Drugs*. 1997, **53**(4), 657-680. DOI: 10.2165/00003495-199753040-00008. ISSN 0012-6667.

PHELAN, Mary C. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*. 2007, **36**(1), 1.1.1-1.1.18. DOI: 10.1002/0471143030.cb0101s36. ISSN 19342500.

PHILIPPEOS, Christina, Robin D. HUGHES, Anil DHAWAN a Ragai R. MITRY. Introduction to Cell Culture. *Human Cell Culture Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-10-7, s. 1-13. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-61779-367-7_1. ISBN 978-1-61779-366-0.

SEITZ, Tina, Robert STALMANN, Nawar DALILA, et al. Global genetic analyses reveal strong inter-ethnic variability in the loss of activity of the organic cation

transporter OCT1. *Genome Medicine*. 2015, 7(1), 56. DOI: 10.1186/s13073-015-0172-0. ISSN 1756-994X.

SCHINKEL, Alfred H. a Johan W. JONKER. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64(1), 138-153. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.027. ISSN 0169409X.

SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3733-4.

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA, ed. *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

TAYLOR, Nicholas M. I., Ioannis MANOLARIDIS, Scott M. JACKSON, Julia KOWAL, Henning STAHLBERG a Kaspar P. LOCHER. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*. 2017, 546(7659), 504-509. DOI: 10.1038/nature22345. ISSN 0028-0836.

TSENG, Alice, Christine A. HUGHES, Janet WU, Jason SEET a Elizabeth J. PHILLIPS. Cobicistat Versus Ritonavir: Similar Pharmacokinetic Enhancers But Some Important Differences. *Annals of Pharmacotherapy*. 2017, 51(11), 1008-1022. DOI: 10.1177/1060028017717018. ISSN 1060-0280.

TSIBRIS, Athe M. N. a Martin S. HIRSCH. 130 Antiretroviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infection. BENNETT, John E., Raphael DOLIN a Martin J. BLASER. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, [2015], 1622-1641.e6. ISBN 978-1-4557-4801-3.

UYSAL, Onur, Tugba SEVIMLI, Murat SEVIMLI, Sibel GUNES a Ayla EKER SARIBOYACI. Cell and Tissue Culture. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Elsevier, 2018, 2018, s. 391-429. DOI: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8. ISBN 9780128046593.

WAGNER, David J., Tao HU a Joanne WANG. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. *Pharmacological Research*. 2016, **111**, 237-246. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.06.002. ISSN 10436618.

WORMSER, Gary P., Gerald T. KEUSCH a Rennie C. HEEL. Co-trimoxazole (Trimethoprim-sulfamethoxazole) An Updated Review of its Antibacterial Activity and Clinical Efficacy. *Drugs*. 1982, **24**(6), 459-518. DOI: 10.2165/00003495-198224060-00002. ISSN 0012-6667.

ZINNER, Stephen H. a Kenneth H. MAYER. 33 Sulfonamides and Trimethoprim. BENNETT, John, Raphael DOLIN a Martin J. BLASER. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, [2015], s. 410-418. DOI: 10.1016/B978-1-4557-4801-3.00033-3. ISBN 9781455748013.

Internetové zdroje

DrugBank. Trimethoprim. In: *DrugBank* [online], 2005. Updated on April 03, 2020. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00440>. Přístup 3. 4. 2020

European Medicines Agency. Norvir : EPAR - Product information. In: *European Medicines Agency* [online]. 2009. Last updated: 16/10/2019 Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/norvir-epar-product-information_cs.pdf. Přístup 3. 4. 2020

JARÝ, Vítězslav a Jan PEJCHAL. *Scintilátory kolem nás* [online]. 1. Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2017. Věda kolem nás. ISBN 978-80-270-2078-2. Dostupné z: www.academia.cz/edice/kniha/scintilatory-kolem-nas. Přístup 14. 3. 2020

JOHNSON, Mary. Protein Quantitation. *Materials and Methods* [online]. 2012; 2. 29.2.2012 DOI: 10.13070/mm.en.2.115. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>. Přístup 15. 3. 2020

Merck. MDCK-II Cell Line canine In: *Sigma-Aldrich* [online]. c2020. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>. Přístup 4. 4. 2020

National Center for Biotechnology Information. Lamivudine. *PubChem Database*. [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, [2005]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lamivudine>. Přístup 3. 4. 2020

National Diagnostics. Fundamentals of Liquid Scintillation Counting. In: *National Diagnostics* [online]. c2011. Dostupné z: www.nationaldiagnostics.com/taxonomy/articles/liquid-scintillation. Přístup 14. 3. 2020

Sygnature Discovery. MDCK-WT/MDR1 Permeability. In: *Sygnature Discovery* [online]. c2020. Dostupné z: www.sygnaturediscovery.com/publications/technical-notes/mdck-wt-mdr1-permeability. Přístup 24. 3. 2020