

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**Štúdium transportu látok pomocou membránových
transportérov**

Diplomová práca

Vedúca diplomovej práce: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Hradec Králové 2021

Zuzana Halamová

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

Zuzana Halamová

Pod'akovanie

Chcela by som sa pod'akovať svojej školiteľke PharmDr. Lucii Smutnej, PhD. za jej ochotu, pomoc a cenné rady pri spracovaní tejto diplomovej práce. Ďakujem i projektu GAUK č. 150120 za finančnú podporu. V neposlednej rade chcem pod'akovať svojej rodine, priateľovi a kamarátom za podporu počas celého môjho štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Zuzana Halamová

Školiteľ: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Názov diplomovej práce: Štúdium transportu látok pomocou membránových transportérov

Široké spektrum špecializovaných transportných proteínov exprimovaných najmä v proximálnom tubule obličiek zabezpečuje exkréciu endogénnych i exogénnych látok. Na bazolaterálnej membráne proximálneho tubulu obličiek je lokalizovaný OCT2 (organic cation transporter 2) transportér prenášajúci široké spektrum štruktúrne odlišných látok. Vzhľadom na širokú substrátovú špecifitu môže na úrovni tohto transportéru dochádzať k liekovým interakciám.

V rámci tejto diplomovej práce bola zisťovaná akumulácia rádioaktívne značeného antivirotika [³H]lamivudínu a modelového substrátu hOCT2 [³H]MPP⁺ prostredníctvom akumulčných a transportných štúdií. Modelovými bunkovými líniami boli psie obličkové bunky MDCKII alebo ľudská bunková línia HeLa, ktoré stabilne alebo tranzientne exprimovali ľudský OCT2 transportér. K inhibičným štúdiám bolo využité antibakterálne chemoterapeutikum trimetoprim.

Z výsledkov vyplýva, že akumulácia lamivudínu u buniek s OCT2 transportérom je v porovnaní s MPP⁺ veľmi nízka. Akumulačnými štúdiami sa tiež zistilo, že lamivudín má vyššiu afinitu k OCT1 transportéru v porovnaní s transportérom OCT2. Pri súčasnej aplikácii trimetoprimu došlo len k malému zníženiu akumulácie lamivudínu oproti kontrolným bunkám. Testovaný lamivudín je teda veľmi slabým substrátom OCT2 transportéru, a preto nie je vhodným substrátom k realizácii experimentov, ktoré by odhaľovali liekové interakcie na úrovni OCT2 transportéru.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Zuzana Halamová

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Title of diploma thesis: Study of substance transport via membrane transporters

Wide range of specialized transport proteins expressed mainly in the kidney proximal tubule ensures the excretion of endogenous and exogenous substances. OCT2 (organic cation transporter 2) is localized on the basolateral membrane of the kidney proximal tubule, the transporter transports broad spectrum of structurally different substances. Drug-drug interactions may occur at the level of this transporter due to its broad substrate specificity.

Within this diploma thesis the accumulation of the radiolabeled antiviral agent [³H]lamivudine and the model hOCT2 substrate [³H]MPP⁺ was evaluated using accumulation and transport studies. The canine kidney cells MDCKII or human cell line HeLa were used as model cell lines. Mentioned cell lines expressed the human OCT2 transporter stably or transiently. The antibacterial chemotherapy agent trimethoprim was used as competitive inhibitor of OCT2 transporter.

The results indicate the lamivudine accumulation in the cells with OCT2 is low compared to accumulation of MPP⁺. Accumulation studies showed that lamivudine had a higher affinity to OCT1 transporter compared to OCT2 transporter. With simultaneous application of trimethoprim, there was only a slight decrease in lamivudine accumulation compared to control cells. Despite known facts, lamivudine was identified as weak substrate of OCT2 transporter under our laboratory conditions. Therefore it is not suitable substrate for conducting experiments that would reveal drug-drug interactions at the OCT2 transporter level.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1 ZOZNAM SKRATIEK | 1 |
| 2 ÚVOD..... | 3 |
| 3 TEORETICKÁ ČASŤ..... | 5 |
| 3.1 Membránové transportné systémy | 5 |
| 3.2. Transportéry v obličkách | 8 |
| 3.2.1 Transportéry organických katiónov | 10 |
| 3.3 Vybrané látky zo skupiny substrátov a inhibítorov ľudského transportéra OCT2 13 | |
| 3.3.1 1-metyl-4-fenylpyridinium | 13 |
| 3.3.2 Lamivudín..... | 13 |
| 3.3.3 Trimetoprim | 14 |
| 3.4 Transfekcia..... | 16 |
| 3.4.1 Biologické transfekčné metódy | 16 |
| 3.4.2 Fyzikálne transfekčné metódy | 17 |
| 3.4.3 Chemické transfekčné metódy..... | 18 |
| 4 CIELE PRÁCE | 20 |
| 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 21 |
| 5.1 Chemikálie, skúšané látky a použité kity..... | 21 |
| 5.2 Prístroje a vybavenie..... | 23 |
| 5.3 Bunkové línie | 25 |
| 5.4 Metódy | 27 |
| 5.4.1 Príprava roztokov | 27 |
| 5.4.2 Transfekcia buniek..... | 28 |
| 5.4.3 Akumulačné štúdie | 29 |
| 5.4.4 Transportné štúdie..... | 30 |
| 5.4.5 Inhibičné štúdie..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4.6 Stanovenie množstva proteínu BCA metódou..... | 32 |
| 5.4.7 Detekcia beta žiarenia kvapalnými scintilátormi..... | 34 |
| 5.4.8 Stanovenie relatívnej expresie génu pre ľudský transportér OCT2 polymerázovou reťazovou reakciou v reálnom čase | 35 |
| 6 VÝSLEDKY | 38 |
| 6.1 Akumulačné štúdie | 38 |
| 6.2 Transportné štúdie..... | 41 |
| 6.3 Inhibičné štúdie..... | 43 |
| 6.4 Relatívna expresia génu pre ľudský transportér OCT2 v stabilne i tranzientne transfekovaných bunkových modeloch | 45 |
| 7 DISKUSIA | 46 |
| 8 ZÁVER | 49 |
| 9 LITERATÚRA..... | 50 |

1 Zoznam skratiek

| | |
|------------------|--|
| ABC | transportéry nadrodiny ATP-binding cassette |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| AUC | plocha pod krivkou |
| BCA | bicinchoninová metóda (Bicinchoninic Acid Assay) |
| BCRP | „breast cancer resistance protein“ |
| BSA | hovädzí sérový albumín (Bovine Serum Albumin) |
| cDNA | komplementárna DNA |
| CNT | koncentračné nukleozidové transportéry |
| Ct | „cycle treshold“ |
| DMEM | „Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ |
| DNA | deoxyribonucleotidová kyselina |
| ENT | ekvilibračný nukleozidový transportér |
| FBS | fetálne hovädzie sérum (Fetal Bovine Serum) |
| HBV | vírus hepatitídy B |
| HeLa | bunková línia pomenovaná podľa Henriety Lacksovej |
| HEPES | kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazethansulfonová |
| HIV | vírus ľudskej imunodeficiencie (Human Immunodeficiency Virus) |
| hOCT2 | ľudský transportér pre organické katióny 2 |
| MATE | „multidrug and toxin extrusion protein“ |
| MDCKII | „Madin-Darby Canine Kidney Cells II“ |
| MDCK wt/hy | „Madin-Darby Canine Kidney Cells wild type“ nesúce genetický kód rezistencie na hygromycín |
| MDR | „multidrug resistance protein“ |
| MPP ⁺ | 1-methyl-4-fenylpyridínium |
| MPTP | 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tertrahydropyridín |

| | |
|------------------|--|
| mRNA | mediátorová RNA |
| MRP | „multidrug resistance-associated protein“ |
| OAT | transportér pre organické anióny (organic anion transporter) |
| OATP | polypeptidy transportujúce organické anióny |
| OCT | transportér pre organické katióny (organic cation transporter) |
| OCTN | „organic cation/carnitine transporter“ |
| Opti-MEM | „Opti-minimal essential medium“ |
| PBS | fosfátový pufer (Phosphate Buffered Saline) |
| PEPT | peptidické transportéry |
| PLB | pasívny lyzovací pufer (Passive Lysis Buffer) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| SLC | transportéry nadrodiny solute carrier |
| TEA ⁺ | tetraethylammonium |
| TMDs | transmembránové domény |
| URAT | urátový transportér |

2 Úvod

Pohyb látok cez bunkovú membránu do bunky a von z bunky je sprostredkovaný niekoľkými mechanizmami. Jedným zo základných mechanizmov je prostá difúzia, avšak nie každá transportovaná látka dokáže prechádzať takýmto spôsobom cez membránu. Široká škála exogénnych a endogénnych látok využíva na prechod tzv. transportéry, špecifické proteíny inkorporované do bunkových membrán. Využívajú sa na cirkuláciu živín, vylučovanie metabolitov či k detoxikácii a exkrécii liečiv z organizmu. Lokalizované sú vo veľkom množstve tkanív a orgánov ľudského tela (Klaassen a Aleksunes 2010).

Liekové transportéry nachádzajúce sa najmä v črevách, pečeni či žalúdku zásadne ovplyvňujú farmakokinetiku liečiv. Zasahujú tak do procesu ich absorpcie, distribúcie, metabolizmu a exkrécie, čím regulujú množstvo liečiv v systémovej cirkulácii. V čreve zabezpečujú najmä absorpciu látok. Transportéry nachádzajúce sa v pečeni umožňujú vstup liečiv z krvi do hepatocytov a ich následnú sekréciu do žlče. Pečeň je tiež dôležitým orgánom metabolizácie liečiv. Podstatným eliminačným orgánom sú obličky, kde sú lokalizované membránové transportné proteíny najmä v proximálnom tubule a zúčastňujú sa na sekrécii a reabsorpcii rôznych látok (Skálová 2017).

Na úrovni týchto transportérov dochádza k vzniku liekových interakcii. Najčastejšie liekové interakcie boli pozorované u influxných a efluxných transportérov ako sú OAT1 (organic anion transporter 1), OAT3, OCT2, BCRP (breast cancer resistance protein) a P-glykoproteín,. Vzniknuté liekové interakcie môžu byť indukčné alebo inhibičné. Dochádza tak k zníženiu účinku liečiva (pri indukcii) alebo k zvýšeniu jeho plazmatickej koncentrácie (pri inhibícii), čo sa prejaví zvýšeným výskytom nežiadúcich účinkov liečiva. Oplyvnenie hladiny liečiva je obzvlášť nebezpečné u liečiv s nízkym terapeutickým indexom. Niektoré liekové interakcie však môžu mať v terapii i pozitívny efekt. Napríklad pri súčasnom užívaní cytostatika cisplatinu a cimetidínu, inhibítora transportéru OCT2, môže dôjsť k prevencii nefrotoxicity spôsobenej cisplatinou. OCT2 transportér totižto hrá významnú úlohu v akumulácii cisplatinu v obličkách a v jej výslednom nefrotoxickom účinku (Liang et al. 2015, Han 2011, Koepsell et al. 2007)

Znalosť interakcii liečiv na úrovni liekových transportérov je dôležitá najmä z hľadiska bezpečnosti a účinnosti podávanej farmakoterapie. Z tohto dôvodu je dôležité

štúdium interakčného potenciálu terapeuticky podávaných liečiv na úrovni membránových transportérov (Liang et al. 2015).

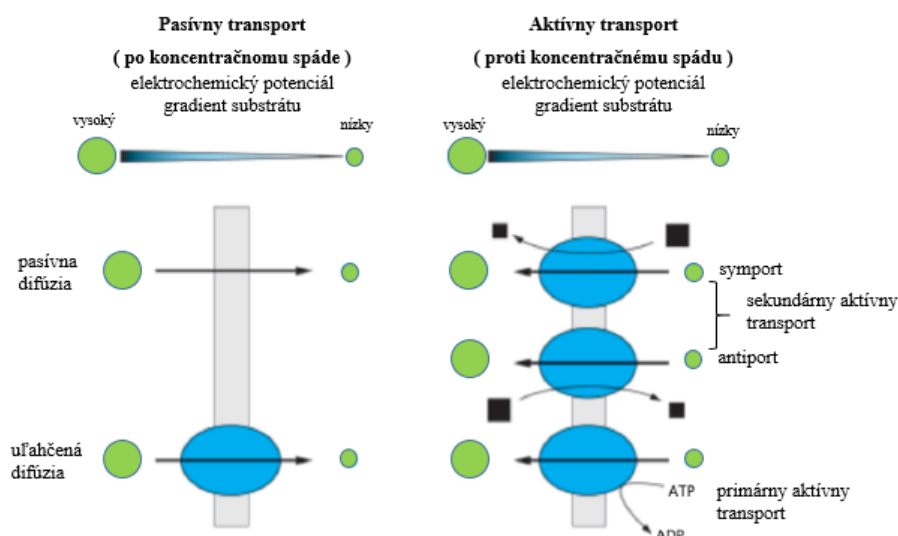
3 Teoretická časť

3.1 Membránové transportné systémy

Membránové transportéry sú špecifické proteíny inkorporované do biologických membrán, prostredníctvom ktorých dochádza k transportu látok do bunky a von z bunky. Na základe smeru prenosu substrátu ich rozdeľujeme na influxné (prenášajú substráty do bunky) a efluxné (prenášajú substráty z bunky von do okolitého prostredia) transportéry. Lokalizované sú na apikálnej alebo bazolaterálnej membráne polarizovaných buniek takmer v celom organizme. Ovplyvňujú absorpciu, distribúciu, metabolizmus a exkréciu veľkého množstva endogénnych i exogénnych látok. Transportné proteíny sa podieľajú na cirkulácii fyziologických látok a živín, vylučovaní metabolitov, detoxikácii a odstránení liečiv z organizmu. Sú miestom vzniku liekových interakcií, čo sú procesy vedúce k zmene koncentrácie liečiva v krvi či v tkanive, môžu tak pozmeniť účinnosť či bezpečnosť liečiva v organizme (Han 2011, Klaassen a Aleksunes 2010).

Prenos látok cez bunkové membrány (viď Obr.1) môže byť sprostredkovaný pasívnou difúziou, facilitovanou difúziou a aktívnym transportom. Pasívny transport zahŕňajúci pasívnu a uľahčenú difúziu prebieha v smere koncentračného gradientu bez spotreby energie. Pri pasívnej difúzii dochádza k prostému prechodu molekuly cez bunkovú membránu z miesta s vyššou koncentráciou do miesta s nižšou koncentráciou bez účasti transportéru. Facilitovaná difúzia zabezpečuje pohyb molekúl cez biomembránu pomocou špecifických bielkovinových prenášačov nachádzajúcich sa v bunkovej membráne. Ak dochádza k prestupu molekúl a iónov cez membránu proti ich koncentračnému alebo elektrochemickému spádu za spotreby energie, hovoríme o aktívnom transporte. Primárny aktívny transport prebieha proti elektrochemického gradientu, preto vyžaduje energiu získanú hydrolýzou ATP (adenozíntrifosfátu). Pri tomto procese sa substrát naviaže na povrch prenášača, dôjde ku konformačným zmenám transportného proteínu, čo spôsobí presun látky z jednej strany membrány na druhú. V prípade, že je pre transport jednej látky proti jej elektrochemickému gradientu využitý gradient druhej látky, hovoríme o sekundárnom aktívnom transporte, tiež nazývanom kotransport. Typickým substrátom pre tento typ transportu sú ióny. Ak tento systém transportuje dve látky v rovnakom smere, označuje sa ako symport, ak každá smeruje na opačnú stranu, antiport. Práve tento typ transportu látok v opačnom smere si môže

vytvoriť elektrochemický gradient samostatne, ktorý je následne využitý k terciárnemu aktívnemu transportu (Klaassen a Aleksunes 2010, Giacomini a Sugiyama 2011).



Obr. 1 Rozdelenie membránových transportných systémov. Zelené kruhy charakterizujú substráty, ktorých veľkosť je priamo úmerná koncentrácii. Šípky naznačujú smer toku. Čierne štvorce symbolizujú ióny/látky, ktoré sú hnacou silou transportu a ich veľkosť je priamo úmerná koncentrácii. Modré ovaly reprezentujú transportné proteíny. Modifikované podľa: (Giacomini a Sugiyama 2011)

V ľudskom genóme bolo identifikovaných viac než 400 transportérov, ktoré rozdeľujeme do dvoch hlavných nadrodín: ATP-binding cassette (ABC) a solute carrier (SLC) transportéry (Liang et al. 2015).

ABC transportéry

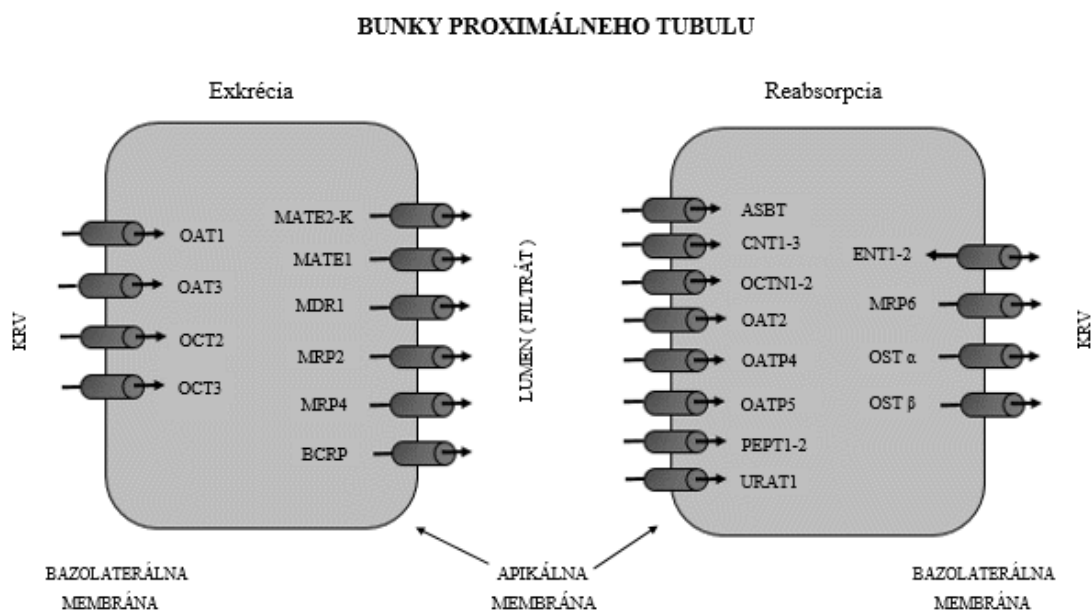
ABC transportéry pracujú ako efluxné prenášače na princípe primárneho aktívneho transportu, počas ktorého dochádza k spotrebe energie vo forme ATP. V ľudskom tele bolo detekovaných viac než 40 ABC transportérov, rozdelených do siedmich podrodín A-G. Vyskytujú sa predovšetkým v pečeni, črevách, mozgu a v placentе, kde zohrávajú dôležitú úlohu v absorpcii, distribúcii a eliminácii liečiv. Najvýznamnejšími zástupcami tejto skupiny sú P-glykoproteín (MDR1/ABCB1), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) a breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), ktoré sú študované najmä z dôvodu ovplyvnenia farmakokinetiky a liekových interakcií (Liu 2019, Klaassen a Aleksunes 2010).

SLC transportéry

SLC transportéry využívajú k prenosu látok cez biomembránu sekundárny alebo terciárny aktívny transport. Niektoré z nich využívajú k transportu facilitovanú difúziu. Na rozdiel od ABC transportérov, prevažne fungujú ako influxné transportéry, ale môže dôjsť i k efluxnému alebo obojstrannému transportu. Popísaných bolo viac než 300 členov tejto nadrodiny, ktoré sú exprimované vo veľkom množstve tkanív a orgánov, napríklad v pečeni, obličkách, srdci, mozgu, pľúcach, čreve či v placentе. Zodpovedné sú za transport veľkého množstva látok, ako sú cukry, lipidy, aminokyseliny, neurotransmitery, anorganické a organické ióny a liečivá. Medzi najhlavnejšie transportéry tejto nadrodiny patria OATP (organic anion transporting polypeptides), OCT (organic cation transporter), OAT (organic anion transporter), OCTN (organic cation/carnitine transporter), PEPT (peptide transporter), CNT (concentrative nucleoside transporter), ENT (equilibrative nucleoside transporter) či MATE (multidrug and toxin extrusion transporter), ktorý funguje ako efluxný transportér (Klaassen a Aleksunes 2010, Bai et al. 2018, Liang et al. 2015).

3.2. Transportéry v obličkách

Obličky sú jedným z najdôležitejších orgánov potrebných pre exkréciu veľkého množstva látok. Renálna eliminácia liečiv, toxínov i endogénnych metabolitov je zabezpečovaná prostredníctvom glomerulárnej filtrácie, tubulárnej sekrécie a tubulárnej reabsorpcie. Prostredníctvom tubulárnej sekrécie dochádza k prestupu látok z krvi do buniek proximálneho tubulu cez bazolaterálnu membránu a z buniek do lumen tubulov cez apikálnu membránu. Proces reabsorpcie prebieha v opačnom smere. Tubulárna sekrécia aj reabsorpcia sú veľmi často sprostredkované mnohými membránovými transportérmi exprimovanými v proximálnom tubule obličiek (viď Obr.2). Tieto špecifické proteíny sú zamerané najmä na prenos organických aniónov, organických kationov, peptidov a nukleozidov. V prípade akéhokoľvek ovplyvnenia aktivity alebo expresie týchto transportérov, môže dôjsť k zmene farmakokinetiky a teda i účinnosti a bezpečnosti liečiv (Launay-Vacher 2006, Klaassen a Aleksunes 2010).



Obr. 2 Transportéry exprimované v bunke proximálneho tubulu obličiek, ktoré sa zúčastňujú na renálnej exkrécii (vľavo) a renálnej reabsorpcii (vpravo). Šípky naznačujú smer transportu.

Modifikované podľa: (Klaassen a Aleksunes 2010)

Prvým krokom renálnej sekrécie je influx látok cez bazolaterálnu membránu do bunky renálneho tubulu. Na tomto procese sa podieľajú transportéry pre organické anióny OAT1, OAT3 a transportéry pre organické katióny hlavne OCT2, v menšej miere aj OCT3, ktoré patria do nadrodiny SLC transportérov. OAT transportéry umožňujú antiport organických aniónov výmenou za sodík a dikarboxylát, gradient vzniká kotransportom s Na^+/K^+ ATPázou. Proces prebieha terciárnym aktívnym transportom. Zatiaľ čo OAT1 a OAT3 sú exprimované na bazolaterálnej membráne, OAT2, OAT4, OAT5 sa nachádzajú na apikálnej strane renálneho tubulu a zabezpečujú prenos substrátov z lumen do bunky proximálneho tubulu. Spoločnými substrátmi jednotlivých transportérov pre organické anióny sú β -laktámové antibiotika, antivirotika, H_2 -antihistaminika, metotrexát. OCT transportéry, konkrétne OCT2, je jedným z najdôležitejších transportérov v proximálnom tubule obličiek, ktorý zabezpečuje transport množstva organických katiónov. Podrobnejšie sa budeme touto skupinou transportérov zaoberať v nasledujúcej podkapitole (Ivanyuk 2017, Klaassen a Aleksunes 2010).

Prechod látok cez apikálnu membránu tubulárnych buniek do moča zabezpečujú efluxné transportéry: MATE1, MATE2-K, MDR1, MRP2, MRP4 a BCRP. MATE1 a MATE2-K, patriace do nadrodiny SLC transportérov, zabezpečujú eflux organických katiónov výmenou za protón. Zatiaľ čo MATE1 je lokalizovaný i v iných orgánoch, ako napríklad pečeň, srdce, nadobličky, MATE2-K je špecifickým prenášačom pre obličky. Ostatné štyri uvedené transportéry patria do nadrodiny ABC transportérov. Jedná sa o transportéry, ktoré spôsobujú mnohopočetné liekové rezistencie a to najmä v terapii onkologických ochorení (Motohashi 2013, Yin a Wang 2016).

Reabsorpciu xenobiotik v bunkách proximálneho tubulu obličiek zabezpečujú nasledujúce apikálne transportéry. ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter), ktorý je však vo väčšej miere exprimovaný v terminálnom ileu, kde zabezpečuje absorpciu žlčových kyselín. OCTN1, OCTN2, ktoré sú významnými prenášačmi karnitínu. Ďalej sa v proximálnom tubule buniek nachádzajú transportéry organických aniónov OAT2, OAT4 a OAT5 popísané v texte vyššie. URAT1 (urate transporter 1), patriaci do skupiny transportérov OAT, reabsorbuje kyselinu močovú výmenou za anorganické ióny. Jeho kľúčovou úlohou je udržanie homeostázy kyseliny močovej v ľudskom organizme, nakoľko pri akumulácii urátu môže dôjsť k akútnemu dnavému záchvatu. Reabsorpcia di-peptidov a tri-peptidov, ale i látok peptidom podobných (β -laktámové antibiotika, inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu,

valaciclovir, bestatin) na apikálnej membráne proximálneho tubulu je zabezpečovaná petidovými transportérmi PEPT1 a PEPT2. Ďalšími podstatnými látkami reabsorbovanými v proximálnom tubule sú nukleozidy a nukleozidové analóga (didanosin, zidovudín, zalcitabín, stavudín). Tento proces zabezpečujú CNT1-3, umiestnené na apikálnej membráne proximálneho tubulu a ENT1-2, ktoré sa nachádzajú na bazolaterálnej membráne a umožňujú obojsmerný prechod nukleozidov, ENT1 i nukleozidových analógov a cytostatík po koncentračnom gradiente (Ivanyuk 2017, Klaassen a Aleksunes 2010).

Reabsorbciu xenobiotik na bazolaterálnej membráne obličiek zabezpečujú MRP6, OST α (organic solute transporter α) a OST β (Klaassen a Aleksunes 2010).

3.2.1 Transportéry organických katiónov

Medzi transportéry organických katiónov patria traja členovia: OCT1, OCT2 a OCT3, ktoré zaraďujeme do podrodiny SLC22A. Primárne umožňujú transport organických katiónov, nenabitých látok alebo aniónov. Transport, ktorý sprostredkovávajú je elektrogénny, na sodíku a pH nezávislý (Koepsell 2004).

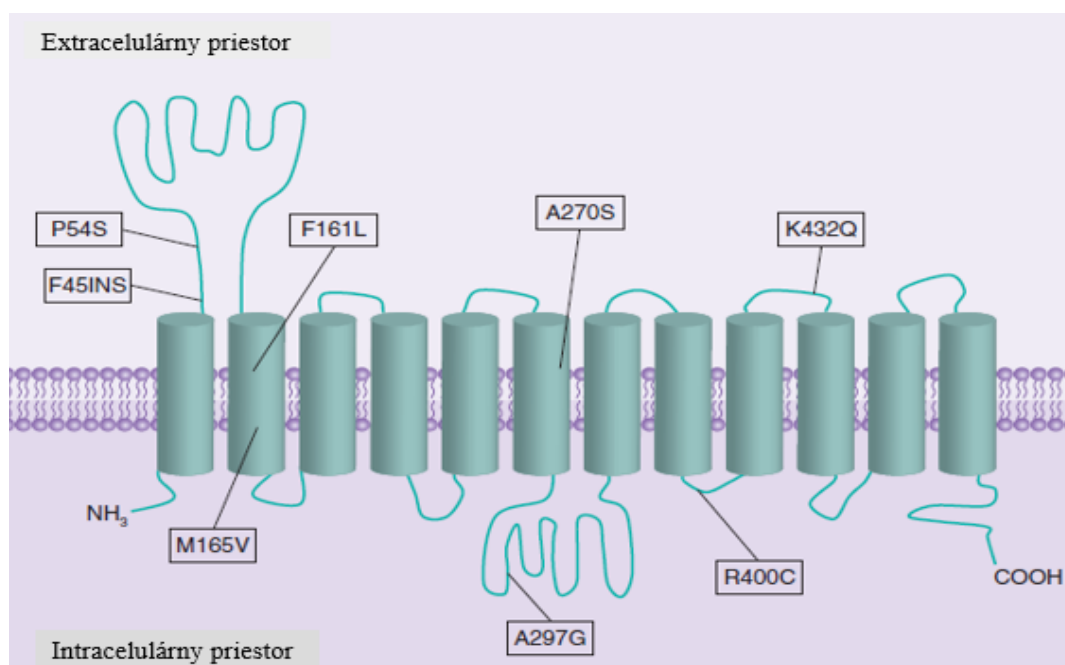
Zohrávajú kľúčovú úlohu v absorpcii, distribúcii a eliminácii vyššie zmienených látok, nakoľko sa nachádzajú v orgánoch ako sú tenké črevo, pečeň a obličky. OCT1 je vo veľkej miere exprimovaný na bazolaterálnej membráne hepatocytov, kde zabezpečuje presun kladne nabitých látok z krvi do pečene. Vo veľmi malej miere je lokalizovaný v tenkom čreve, obličkách, mozgu, srdci, placentе, kostrovom svalstve. OCT2 je dôležitý hlavne v bunkách proximálneho tubulu obličiek, kde zabezpečuje uptake organických katiónov z krvi do bunky renálneho tubulu. Okrem obličiek sa však nachádza i v iných orgánoch, ale v menšej miere. Posledným transportérom tejto podrodiny je OCT3, extraneuronálny transportér, ktorý má širokú distribúciu v tkanivách. Bol lokalizovaný v placentе, prostate, aorte, slinných žľazách, pľúcach, pečeni, obličkách, mozgu, srdci, tenkom čreve (Koepsell 2015).

Funkcia a štruktúra OCT2 transportéru

Obličkový transportér OCT2 (*SLC22A2*) je silno exprimovaný na bazolaterálnej membráne proximálneho tubulu obličiek. Tento špecifický transportný proteín bol v menšej miere detekovaný i v tenkom čreve, pľúcach, pečeni, mozgu, placentе, detskej žľaze i vo vnútornom uchu. Zabezpečuje renálnu exkréciu veľkého množstva liečiv,

toxínov i endogénnych látok. Transport je sprostredkovaný facilitovanou difúziou v smere koncentračného gradientu. Hnacou silou pre prenos substrátu je negatívny membránový potenciál vo vnútri bunky (Wagner 2016).

Ľudský gén pre transportér OCT2 (*SLC22A2*) sa nachádza spolu s OCT1 na chromozóme 6q26 a je tvorený 555 aminokyselinami. Štruktúra tohto transportného proteínu obsahuje 12 α -helikálnych transmembránových domén (TMDs). N-koniec a C-koniec sa nachádzajú v intracelulárnom priestore (v cytoplazme). Extracelulárne medzi TMD1 a TMD2 je lokalizovaná jedna veľká hydrofilná slučka, ktorá obsahuje niekoľko N-glykozylovaných miest. Medzi 6. a 7. transmembránovou doménou sa nachádza veľká intracelulárna slučka s fosforylovanými miestami. Sekundárna štruktúra OCT2 transportéru je zobrazená na obr. 3 (Ciarimbroli 2008, Wagner et al. 2016).



Obr. 3 Znázornenie sekundárnej štruktúry OCT2 transportéru. V malých obdĺžnikoch sú zobrazené najčastejšie študované nesynonymné SNPs (single nucleotide polymorphism). Modifikované podľa: (Zaïr et al. 2008)

Na ľudskom géne *SLC22A2* bolo identifikovaných osem nesynonymných jednonukleotidových polymorfizmov (viď obr. 3). Tie môžu zapríčiniť zmenu aktivity alebo špecifickosti transportéru a tým ovplyvniť účinnosť liečby (Volk 2014).

Substráty OCT2

OCT2 je polyšpecifický transportér, prenáša teda široké spektrum štruktúrne odlišných látok. Transportuje najmä malé hydrofilné organické katióny, ktoré majú pozitívny náboj pri fyziologickom pH. Najčastejšie používanými modelovými molekulami transportovanými prostredníctvom tohto transportéru sú TEA⁺ (tetraethylammonium) a MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium). Substrátmi sú aj rôznorodé liečiva ako napr. antiparkinsonika amantadin a memantin, cytostatika oxaliplatina, cisplatina a pikoplatina. Antivirotika, ktoré nie sú pri fyziologickom pH kladne nabité, zalcitabin a lamivudín. Podieľa sa i na transporte antagonistov H₂-receptoru cimetidínu, famotidínu a ranitidínu, antidiabetika metformínu či diuretika amiloridu. Okrem exogénnych látok transportuje i endogénne látky, ako sú tiamín, cholín, neurotransmitery acetylcholín, dopamín, adrenalín, noradrenalín, serotonín a histamín (Jonker a Schinkel 2004, Koepsell 2013, Wagner et al. 2016).

OCT2 transportér má veľký význam pri renálnej exkrécii látok rôzneho pôvodu. Pokiaľ by došlo k jeho ovplyvneniu, napríklad renálnym zlyhávaním, môže sa exkrécia liečiva znížiť a tak dôjsť k zvýšeniu plazmatickej koncentrácie daného liečiva. Tento jav bol pozorovaný u jedného zo substrátov tohto transportéra metformínu, ktorý je primárne eliminovaný glomerulárnou filtráciou a tubulárnou sekréciou, ale časť odchádza i žľou. Ak sa zvýši plazmatická koncentrácia metformínu v dôsledku akútneho alebo chronického zlyhávania obličiek, zvýši sa i koncentrácia metformínu v pečeni. Následne môže dôjsť k rozsiahlej inhibícii mitochondriálneho respiračného enzýmu, v dôsledku čoho môže vzniknúť život ohrozujúci stav, laktátová acidóza (Koepsell et al. 2007).

Inhibítory OCT2

Inhibítormi OCT2 transportného proteínu sú väčšie a lipofilnejšie kladne nabité látky, ako sú substráty. Inhibičný vplyv na tento transportér má H₁-antihistaminikum cetirizín aj H₂-antihistaminikum cimetidín. Ďalšími inhibítormi sú trimetoprim, chinidín, dabigatran i testosterón (Giacomini et al. 2010, Klaassen a Aleksunes 2010).

Inhibítory môžu spôsobiť zníženie prestupu substrátu cez membránu do bunky proximálneho tubulu a tým zvýšiť koncentráciu látky v systematickej krvi. Liekové interakcie vzniknuté na tomto podklade však môžu mať i pozitívny vplyv napr. pri terapii cisplatinou. Pri súčasnom užívaní cytostatika cisplatinou a inhibítora transportéru OCT2, môže dôjsť k prevencii nefrotoxicity spôsobenej cisplatinou (Koepsell et al. 2007).

3.3 Vybrané látky zo skupiny substrátov a inhibítorov ľudského transportéra OCT2

3.3.1 1-metyl-4-fenylpyridinium

1-metyl-4-fenylpyridinium (MPP^+) je kladne nabitá organická molekula s neurotoxickými účinkami. Je aktívnym metabolitom 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridínu (MPTP), lipofilnej látky schopnej prechodu cez hematoencefalickú bariéru. V gliových bunkách dochádza pomocou enzýmu monaminoxidázy B k oxidácii MPTP na toxický katión MPP^+ . Ten je absorbovaný dopamínovým transportérom do dopaminergných neurónov, kde uplatňuje svoje neurotoxické účinky. Hromadí sa v mitochondriách, kde inhibuje komplex I dýchacieho reťazca, čím dôjde k vyčerpaniu ATP a k následnej bunkovej smrti dopaminergných neurónov v substantia nigra. Znižuje tak hladinu dopamínu a preukázateľne spôsobuje príznaky podobné Parkinsonovej chorobe (Langston et al. 1984, Choi et al. 2015).

MPP^+ sa používa ako modelový substrát pri funkčnej analýze transportérov OCT1-3 a MATE1, MATE-2-K, nakoľko nepodlieha žiadnym ďalším metabolickým zmenám (Klaassen a Aleksunes 2010).

3.3.2 Lamivudín

Lamivudín je syntetický analóg nukleozidu citidínu, ktorý pôsobí proti vírusu HIV a vírusu hepatitídy B. V terapii chronickej hepatitídy B sa používa i v monoterapii, avšak pri liečbe HIV sa fixne kombinuje s nukleozidovými inhibítormi HIV reverznej transkriptázy zidovudínom (analóg tymidínu) alebo abakavirom (analóg guanozínu). Dochádza tak k zosilneniu účinku, zlepšuje sa priebeh a individuálna prognóza pacienta s HIV (Johnson et al. 1999, Švihovec et al. 2018).

Patrí medzi nukleozidové inhibítory DNA polymerázy a reverznej transkriptázy (RNA-dependentnej DNA polymerázy), enzýmu, ktorý využívajú retrovírusy na prepis svojej RNA do DNA. Po vstupe do bunky dochádza k intracelulárnej fosforylácii lamivudínu na aktívny metabolit lamivudíntrifosfát. Ten sa následne zabuduje do vírusovej DNA namiesto endogénneho citidíntrifosfátu pomocou HIV reverznej

transkriptázy a HBV polymerázy, ukončí sa syntéza DNA reťazca a znemožní sa replikácia vírusu (Perry a Faulds 1997, Švihovec et al. 2018).

Látka sa z tenkého čreva vstrebáva veľmi dobre a biologická dostupnosť po perorálnom podaní je u dospelého pacienta vyššia než 80%. Maximálnu koncentráciu v plazme po užití dosiahne za 0,5 až 1,5 hodiny. Distribuovaný je do všetkých telesných tekutín, čo môže byť spôsobené jeho relatívne malou molekulovou hmotnosťou a nízkou väzbou na plazmatické bielkoviny (< 36%). Lamivudín je metabolizovaný minimálne, až 70% sa vylúči v nezmenenej forme obličkami. Exkrécia prebieha glomerulárnou filtráciou a aktívnou tubulárnou sekréciou, zabezpečenou transportermi pre organické katióny. Polčas eliminácie lamivudínu sa pohybuje medzi 5-7 hodinami (Johnson et al. 1999, Švihovec et al. 2018).

Na eliminácii lamivudínu z organizmu sa pravdepodobne podieľajú viaceré obličkové transportné systémy: OCT2, MATE1 i MATE-2-K. Preto pri súčasnom podaní inhibítora jedného z týchto transportérov môže dôjsť k poklesu clearance lamivudínu (množstvo plazmy, ktoré sa očistí od lamivudínu za jednotku času). Významná je interakcia lamivudínu s kotrimoxazolom (sulfametoxazol + trimetoprim) pri liečbe asymptomatickej HIV infekcie. Kompetitívna inhibícia renálnej exkrécie lamivudínu trimetoprimom spôsobí nárast AUC (plochy pod krivkou) lamivudínu a pokles jeho renálnej clearance. Závažnosť interakcie sa zvyšuje u pacientov s renálnym zlyhávaním (Perry a Faulds 1997, Müller et al. 2013).

3.3.3 Trimetoprim

Trimetoprim je antibakteriálne chemoterapeutikum zo skupiny diaminopyrimidínov, zasahujúce do syntézy kyseliny listovej inhibíciou bakteriálneho enzýmu dihydrofolátreduktázy. Znemožňuje tak tvorbu tetrahydrofolátu (kyseliny tetrahydrolistovej), ktorý je potrebný pre biosyntézu nukleových kyselín a proteínov. Afinita trimetoprimu k bakteriálnej dihydrofolátreduktáze je niekoľkonásobne vyššia než k ľudskej. Zabezpečuje sa tak selektívny antibakteriálny účinok. Ľudský organizmus nedisponuje enzýmami potrebnými k syntéze kyseliny listovej, preto je nutné ju dopĺňať vo forme potravy (Zinner a Mayer 2018).

Trimetoprim sa používa v monoterapii hlavne na infekcie močových ciest. Spektrum účinku zahŕňa mnohé baktérie najmä *Escherichia coli* a ďalšie enterobaktérie rodu *Proteus*, *Klebsiela*, *Salmonella*, *Shigella*. Medzi ostatné baktérie citlivé

k trimetoprimu patria hemofily, stafylokoky, streptokoky, pneumokoky či *Gardnerella vaginalis* (Beneš 2018).

U mnohých z vyššie spomínaných baktérií však druhotne vznikla rezistencia na trimetoprim. Jedná sa najmä o enterobaktérie a pneumokoky. Prírodzene rezistentnými baktériami sú pseudomonády, mykoplazmy, spirochéty, *Mycobacterium tuberculosis*, rody *Neisseria*, *Bordetella*, *Helicobacter*, *Campylobacter* a väčšina anaerobných baktérií. Rezistencia môže byť spôsobená zmenou permeability bunky, nižšou afinitou bunky k liečivu, zvýšenou produkciou alebo zmenou dihydrofolátreduktázy (Beneš 2018, Wróbel et al. 2019).

Účinok trimetoprimu je zosilnený v kombinácii so sulfonamidom sulfametoxazolom, vďaka inhibícii dvoch súvisiacich metabolických pochodov v syntéze kyseliny listovej. Fixná kombinácia týchto dvoch liečivých látok v pomere 1:5 (sulfametoxazol:trimetoprim) sa nazýva kotrimoxazol, ktorý sa používa v liečbe respiračných, urogenitálnych a črevných infekcií. Kombináciou sa znižuje i riziko vzniku selektívnej rezistencie k jednotlivým liečivým látkam (Beneš 2018).

Nakoľko dochádza k čiastočnému ovplyvneniu i ľudskej dihydrofolátreduktázy, môže sa počas liečby vyskytnúť závažný útlm kostnej drene. Vyskytujú sa i alergické reakcie rôznej závažnosti, bolesti hlavy, hyperkalémia, kožné vyrážky alebo nauzea či zvracanie (Beneš 2018).

Vstrebanie látky po perorálnom použití je rýchle a takmer úplné. Maximálnych hladín v sére je dosahovaných približne po 1-4 hodinách od podania. Distribuovaný je do rôznych tkanív a telesných tekutín (sliny, žlč, vaginálny sekrét). V obličkách, pľúcach či prostate jeho koncentrácia presahuje plazmatické hladiny. V mozgu dosahuje približne 50% plazmatických koncentrácií. V menšej miere (cca 20%) je metabolizovaný v pečeni, väčšina sa v nezmenenej forme vylučuje obličkami. Pri vylučovaní látky močom sa uplatňuje glomerulárna filtrácia a aktívna tubulárna sekrécia. Vylučovanie sa zvyšuje ak je moč kyslý. V moči je koncentrácia trimetoprimu 10x vyššia než v krvi. Eliminačný polčas je 9-11 hodín, pri ťažkom poškodení obličiek až 24 hodín. Trimetoprim je substrátom a inhibítorom CYP2C9 a v menšej miere je transformovaný i CYP3A4, čo predstavuje ďalšiu úroveň, na ktorej sa môžu vyskytnúť liekové interakcie (Beneš 2018, Zinner a Mayer 2015).

3.4 Transfekcia

Transfekcia je metóda, prostredníctvom ktorej dochádza k prenosu genetického materiálu vo forme izolovanej RNA alebo DNA do eukaryotickej bunky. Takto geneticky modifikovaná bunka sa následne využíva na štúdium funkcie génov alebo génových produktov a zmeny génovej expresie či na analýzu rôznych mutácií. Uskutočniť sa môže na živom organizme (*in vivo*), čo sa využíva najmä v génovej terapii alebo *in vitro* tzn. za laboratórnych podmienok (Kaestner et al. 2015).

Transfekciu môžeme podľa dĺžky génovej expresie rozdeliť na prechodnú (tranzientnú) a stabilnú. Pri prechodnej transfekcii prenášaná genetická informácia neinteraguje s hostiteľským genómom, nedochádza tak k replikácii a k prenosu génu na ďalšie generácie. Vykazuje len dočasnú expresiu vložených génov, ktorá sa v priebehu delenia bunky stráca. K produkcii rekombinantného proteínu dochádza omnoho rýchlejšie než pri stabilnej transfekcii. Stabilná transfekcia je zložitý prenos génov, ktoré sa začlenia do genómu hostiteľskej bunky. Gény sa následne replikujú v hostiteľovi a odovzdávajú sa budúcim generáciám (Kim a Eberwine 2010).

Pri transfekcii musí dôjsť k prenosu záporne nabitého genetického materiálu cez záporne nabitú membránu bunky. Takýto prenos môžeme dosiahnuť prostredníctvom biologických, fyzikálnych alebo chemických transfekčných metód. Avšak nie všetky transfekčné metódy môžeme použiť na všetky typy buniek. Pri výbere treba dbať na vybraný typ bunkovej línie, ale i na účel transfekcie. Účinnosť závisí od veľkého množstva faktorov: použitá metóda transfekcie, druh bunečnej línie, ktorá bola použitá vrámci transfekcie, jej celkový stav (viabilita buniek by mala byť minimálne 90%), počet pasáží by nemal byť väčší než 30, je nutné vziať do úvahy aj kvalitu a množstvo nukleovej kyseliny (Sheikh et al. 2017, Thermo Fisher Scientific 2015).

3.4.1 Biologické transfekčné metódy

Transfekcia sprostredkovaná vírusmi, tiež nazývaná aj transdukcia, je jednou z najvyužívanejších metód v klinickom výskume. Sprostredkovaná je najčastejšie adenovírusmi, adeno-asociovanými vírusmi, lentivírusom, herpesovými vírusmi a inými retrovírusmi. Vhodná je pre všetky typy buniek, okrem buniek imunitného systému. Vírusová transfekcia je jednoduchá a veľmi účinná, nakoľko dochádza k priamej

integrácii vírusu do genómu hostiteľa. Nakoľko však integrácia prebieha náhodne, môže dôjsť k abnormálnej imunogénnej odpovedi, mutácii či dokonca k usmrteniu bunky (Kim a Eberwine 2010, Thermo Fisher Scientific 2015).

3.4.2 Fyzikálne transfekčné metódy

Fyzikálne metódy patria k najnovším transfekčným metódam, ktoré prenášajú genetickú informáciu do eukaryotickej bunky pomocou rôznych fyzikálnych nástrojov. Medzi najznámejšie patrí elektroporácia, mikroinjekcia, optická transfekcia, biolistické časticové zbrane (biolistic particle delivery, „gene gun“), sonoporácia a magnetofekcia. Veľkou výhodou je možnosť transfekovať i bunky, ktoré nie je možné transfekovať inými metódami (napr. bunky imunitného systému), pretože nezávisia na konkrétnych biologických alebo chemických vlastnostiach bunky (Kaestner et al. 2015).

Najvyužívanejšou fyzikálnou metódou je elektroporácia. Elektrické impulzy o vysokom napätí sa nechajú pôsobiť na bunku. V plazmatickej membráne sa následkom elektrického šoku vytvoria dočasné póry, ktoré umožnia prenos nukleovej kyseliny do bunky. Umožňuje transfekovať veľké množstvo buniek ľahko a rýchlo. Avšak nevýhodou je vysoká cena elektroporátora a tiež možnosť poškodenia bunky z dôvodu trvalej priepustnosti plazmatickej membrány (Han et al. 2015).

Vytvorenie dočasných pórov na plazmatickej membráne bunky, ktoré zabezpečujú prechod nukleovej kyseliny do bunky, je umožnené aj na základe ultrazvuku u sonoporácie alebo na báze magnetického poľa pri magnetofekcii (Kim a Eberwine 2010).

Pri optoporácii (optickej transfekcii) dochádza laserom k vytvoreniu pórov na biomembráne bunky a k následnému prechodu nukleovej kyseliny do bunky na základe osmotického rozdielu medzi cytoplazmou a médiom. Táto metóda môže byť použitá aj u veľmi malých buniek, avšak je finančne veľmi náročná (Kim a Eberwine 2010).

Mikroinjekciou sa pod mikroskopom vstrekuje nukleová kyselina priamo do cytoplazmy alebo jadra bunky. Transfekuje sa po jednej bunke, preto je vhodné využiť túto metódu hlavne v prípade, ak máme k dispozícii obmedzené množstvo buniek. Pri tomto type transfekcie je potrebná presnosť a veľké množstvo skúseností, aby nedochádzalo k poškodeniu buniek (Kaestner et al. 2015, Kim a Eberwine 2010).

Ďalšou finančne veľmi nákladnou metódou je transfekcia biolistickou strelou. Dochádza k obaleniu nukleovej kyseliny časticami zlata a k jej následnému vystreleniu

pomocou tzv. génového dela do jadra recipientnej bunky. Nevýhodou je vysoká pravdepodobnosť poškodenia bunky strelou (Kim a Eberwine 2010).

3.4.3 Chemické transfekčné metódy

Chemické metódy umožnili prvú úspešnú transfekciu cicavčích buniek, dodnes majú veľmi široké využitie. Najpoužívanejšími látkami umožňujúcimi prenos negatívne nabitaj nukleovej kyseliny cez negatívne nabitú plazmatickú membránu sú kationové polyméry, kationové lipidy a fosforečnan vápenatý. Tieto chemické látky vytvoria kladne nabitý alebo neutrálny komplex s nukleovou kyselinou, ktorý prechádza pravdepodobne endocytózou alebo fagocytózou do bunky. Účinnosť chemickej transfekcie závisí najmä na pomere nukleovej kyseliny a chemickej látky, pH roztoku a celkovom stave bunkovej membrány (Kim a Eberwine 2010, Sheikh et al. 2017).

Najlacnejšou a veľmi ľahko sprostredkovanou metódou je transfekcia pomocou fosforečnanu vápenatého. Metóda je vhodná pre stabilnú aj prechodnú transfekciu rôznych typov buniek. Veľkou nevýhodou je senzitivita komplexu na zmeny pH a teploty. Okrem toho môže fosforečnan vápenatý pôsobiť na bunky toxicky (Sheikh et al. 2017, Thermo Fisher Scientific 2015).

Najčastejšie používanými kationovými polymérmí sú diethylaminoethyl-dextran, polyetylenimin, dendriméry. Dendriméry sú syntetické rozvetvené polyméry, ktoré na svojom povrchu nesú kladne nabité aminokyseliny schopné interakcie s negatívne nabitou nukleovou kyselinou. Vzniknutý kladne nabitý komplex prechádza cez plazmatickú membránu pomocou endocytózy. Metóda je jednoduchá a finančne nenáročná, avšak transfekčná účinnosť je nízka a je vhodná len pre tranzientnú transfekciu. Nevýhodou je i vyššia cytotoxicita (Sheikh et al. 2017, Thermo Fisher Scientific 2015).

Najpopulárnejšou metódou v súčasnosti je transfekcia sprostredkovaná kationovými lipidmi, nazývaná aj lipofekcia. Patrí medzi vysoko účinné transfekcie, vhodná je pre prechodnú aj stabilnú transfekciu veľkého množstva bunkových línií. Každý bunkový typ si však vyžaduje optimalizáciu podmienok transfekcie. Kationové lipidy sú všeobecne zložené z kladne nabitaj časti, spojovacieho článku a dvoch alebo viacerých hydrofóbných uhl'ovodíkových reťazcov. Kladná časť interaguje s negatívne nabitým fosfátovým reťazcom nukleových kyselín. Spolu s tzv. pomocnými neutrálnymi lipidmi (dioleoylfosfatidyletanolamin, cholesterol), ktoré sa využívajú na

zvýšenie transfekcie buniek pomocou katiónových lipidov, sa vytvoria lipozómy (fosfolipidové vezikuly) s kladne nabitým nábojom vo vodnom prostredí. Tento kladný náboj lipozómu sprostredkuje interakciu so záporne nabitou membránou a umožní tak vstup nukleovej kyseliny do bunky prostredníctvom endocytózy. Najpoužívanejším transfekčným katiónovým lipidom je Lipofectamine, ktorý bol použitý i v tejto diplomovej práci (Dolby et al. 2004, Sheikh et al. 2017).

4 Ciele práce

1. Stanovenie akumulácie rádioaktívne značeného [³H]lamivudínu v modelových bunkových líniach stabilne alebo tranzientne exprimujúcich ľudský OCT2 transportér a jej porovnanie s modelovým substrátom [³H]MPP⁺.
2. Porovnanie afinity lamivudínu k hOCT1 a hOCT2.
3. Stanovenie vhodnosti použitia bunkovej línie HeLa tranzientne transfekovanej ľudským OCT2 transportérom k rutinnému odhaľovaniu možných liekových interakcií vznikajúcich na úrovni hOCT2 transportéru s využitím inhibičnej štúdie.

5 Experimentálna časť

5.1 Chemikálie, skúšané látky a použité kity

³H-lamivudín (Hartmann Analytic, Nemecko)

³H-methylfenylpyridínium (³H-MPP⁺, American Radiolabeled Chemicals, USA)

70% Etanol (Penta, Česká republika)

CaCl₂ (Sigma Aldrich, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, USA)

DMEM médium (Life Technologies, USA)

Fetálne bovinné sérum (Sigma Aldrich, USA)

Glukóza (Sigma Aldrich, USA)

HEPES (Sigma Aldrich, USA)

hOCT2 expresný konštrukt (Origane, USA)

Chloroform (Penta, Česká republika)

Izopropanol (Sigma Aldrich, USA)

KCl (Sigma Aldrich, USA)

Lamivudín (Sigma Aldrich, USA)

L-glutamín (Sigma Aldrich, USA)

Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific, USA)

MgCl₂·6H₂O (Sigma Aldrich, USA)

MPP⁺ (Sigma Aldrich, USA)

Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich, USA)

Na₂HPO₄·12H₂O (Sigma Aldrich, USA)

NaCl (Sigma Aldrich, USA)

NaH₂PO₄ (Sigma Aldrich, USA)

NaH₂PO₄·2H₂O (Sigma Aldrich, USA)

Neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich, USA)

Opti-MEM médium (ThermoFisher Scientific, USA)

Passive Lysis Buffer (PLB; Promega, USA)

PierceTM BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

RevertAid RT Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

RNase free voda (ThermoFisher Scientific, USA)

Sensi FASTTM Probe Hi-ROX Kit (Bioline, Austrália)

TaqMan Probe hOCT2 (ThermoFisher Scientific, USA)

TRI Reagent[®] (Sigma Aldrich, USA)

Trimetoprim (Sigma Aldrich, USA)

Trypsín (Sigma Aldrich, USA)

5.2 Prístroje a vybavenie

12 jamkové inzerty (Corning, USA)

24, 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP, Švajčiarsko)

Analytické váhy (Boeco, Nemecko)

Automatické pipety (Eppendorf, USA)

Beta Counter Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, USA)

Centrifugačné skúmavky (TPP, Švajčiarsko)

Doštičkový analyzátor Synergy 2 (BioTek, USA)

Doštičkový spektrofotometer Infinite M200 (Tecan, Nemecko)

Chladiaci stojan na mikroskúmavky (ThermoFisher Scientific, USA)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Jednorázové pipety (TPP, Švajčiarsko)

Kultivačné nádoby (TPP, Švajčiarsko)

Laminárny box TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Taliansko)

Mikroskúmavky (Eppendorf, USA)

Mikroskúmavky pre účely PCR (Eppendorf, USA)

Ochranné pracovné rukavice- latexové, nitrilové

Pasteurove pipety (Sigma Aldrich, USA)

Pinzeta

Pipetovací nástavec (TPP, Švajčiarsko)

Plynový kahan

Scintilačné vialky (Kartell, Nemecko)

Spektrofotometer NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, USA)

Svetelný mikroskop (Optika Microscopes, Taliansko)

Špičky (Eppendorf, USA)

Termálny cyklér Quant studio 6 flex (Applied Biosystems, USA)

Termálny cyklér StepOne Plus (Applied Biosystems, USA)

Vákuový odsávač

Vibračná trepačka Bio Vortex V1 (Biosan)

Vodný kúpeľ TW12 (Julabo, Nemecko)

5.3 Bunkové línie

Pri experimentoch boli použité dva typy epiteliálnych buniek. HeLa bunky, ktoré boli prechodne transfekované pomocou kationového lipidu Lipofectamine 3000 ľudským OCT2 transportérom (hOCT2). MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney) bunky stabilne exprimujúce ľudský transportér OCT2, ktoré boli získané vďaka láskavému daru prof. Martina F. Fromma z Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg.

HeLa

Bunková línia HeLa bola izolovaná v roku 1951 z nádoru krčka maternice pacientky Henrietty Lacksovej, podľa ktorej dostala i svoje pomenovanie. Bunkový biológ George Otto Gey pri práci s týmito bunkami zistil, že sa jedná o nesmrteľnú, neobmedzenú sa deliacu bunkovú líniu (Lucey et al. 2009).

Ako kultivačné médium potrebné k zabezpečeniu optimálnych podmienok a na podporu rastu buniek bolo použité DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) doplnené o 2 mM L-glutamín, 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % neesenciálne aminokyseliny.

MDCK II

MDCK II patria medzi stabilné, adherentné bunkové línie, ktoré boli po prvýkrát izolované Madinom a Darbom z distálneho tubulu obličiek dospelého feny kokršpaniela (Dukes et al. 2011).

Kultivačné médium DMEM, použité na kultiváciu týchto buniek, bolo doplnené o 2 mM L-glutamín a 10 % FBS.

Kultivácia buniek

Kultivácia buniek prebiehala v kultivačných nádobách v prostredí príslušného média. Množenie bunkovej línie bolo pozorované pod optickým mikroskopom. Optické pozorovanie množenia buniek umožňovalo hodnotenie stupňa konfluencie (pokrytia kultivačnej nádoby bunkami) a vylúčenie prítomnosti bakteriálnej alebo kvasinkovej kontaminácie. Po dosiahnutí vysokého percenta konfluencie buniek, dostatočného namnoženia buniek v kultivačnej nádobe, bol potrebný ich prenos (pasážovanie) do novej kultivačnej nádoby. Bunky boli pasážované jedenkrát týždenne. Pre minimalizovanie

rizika kontaminácie buniek pasážovanie prebiehalo v sterilnom prostredí laminárneho boxu. V prvom kroku bolo z kultivačnej nádoby odstránené staré médium a monovrstva buniek premytá PBS (Phosphate Buffered Saline). Premytím sa odstránili zvyšky média na bunkách. PBS nebolo pipetované priamo na bunky z dôvodu zabránenia predčasného odlepenia buniek z dna kultivačnej nádoby. Po odsatí PBS bol priamo na bunky napipetovaný proteolytický enzým trypsín, ktorý porušil peptidické väzby a umožnil tak oddelenie adherentných buniek z dna kultivačnej nádoby a rozrušenie medzibunkových väzieb. Kultivačná nádoba bola uzavretá a trypsín bol rovnomerne rozprestretý po celej monovrstve buniek opatrným nakláňaním nádoby. Bunky s trypsínom sa následne nechali inkubovať v inkubátore pri teplote 37°C. Odlepenie buniek z kultivačnej nádoby bolo pozorované pod optickým svetelným mikroskopom. V okamihu pozorovaného uvoľnenia buniek sa pôsobenie trypsínu zastavilo pridaním média. Bunky sa následne resuspendovali opakovaným nasávaním a vypúšťaním z pipety až do vzniku homogénnej bunkovej suspenzie. Požadované množstvo bunkovej suspenzie bolo pridané do novej kultivačnej nádoby s potrebným množstvom čerstvého média. Po kontrole prítomnosti buniek v novej kultivačnej nádobe sa nádoba vložila do inkubátora, kde prebiehala inkubácia vo zvlhčenej atmosfére s 5 % CO₂ pri teplote 37°C.

5.4 Metódy

5.4.1 Príprava roztokov

Fosfátový pufer (PBS)

PBS je izotonický soľný roztok o fyziologickom pH 7,4, ktorý bol použitý pri pasážovaní buniek. Slúžil k premytiu buniek od zvyškov média, aby sa zamedzilo deaktivácii trypsínu.

Pufer bol pripravený rozpustením anorganických solí (KCl, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) v 1 litri destilovanej vody. Navážky na 1 liter fosfátového pufru sú uvedené v Tab. 1. Následne bolo pH roztoku upravené na fyziologickú hodnotu 7,4 pomocou NaOH.

Tab. 1 Zloženie 1 litra fosfátového pufru

| | Navážka [g] | Koncentrácia [mM] |
|----------------------------------|----------------|----------------------|
| KCl | 8,01 | 137 |
| NaCl | 0,21 | 2,7 |
| Na ₂ HPO ₄ | 3,58 | 10 |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,56 | 10 |

STOP roztok

STOP roztok, ktorý pri experimentoch ukončoval transport nami sledovanej látky, obsahoval 137 mM NaCl, 10 mM pufrácie činidlo HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazethansulfonová) a destilovanú vodu. Navážky jednotlivých látok na 1 l vodného roztoku sú uvedené v Tab. 2. Hodnota pH výsledného roztoku bola upravená na hodnotu 7,4 pomocou NaOH.

Tab. 2 Zloženie 1 litra STOP roztoku

| | Navážka [g] | Koncentrácia [mM] |
|-------|----------------|----------------------|
| NaCl | 8,01 | 137 |
| HEPES | 2,38 | 10 |

Transportný roztok (Krebs-Ringerov roztok)

Transportný roztok, používaný pri vlastných akumulčných, transportných a inhibičných experimentoch rádioaktívne značenej látky, bol zložený z chloridov (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O), fosforečnanov (Na₂HPO₄·12H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O), glukózy, HEPES a doplnený destilovanou vodou do 1 litra. Navážky a koncentrácie látok v 1 l roztoku sú uvedené v Tab. 3. Roztok bol na záver upravený na hodnotu pH 7,4 pomocou 1M roztoku NaOH.

Tab. 3 Zloženie 1 litra transportného roztoku

| | Navážka [g] | Koncentrácia [mM] |
|--|----------------|----------------------|
| NaCl | 7,1589 | 122,5 |
| KCl | 0,4026 | 5,4 |
| CaCl ₂ | 0,1332 | 1,2 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,1626 | 0,8 |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 0,2865 | 0,8 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,0312 | 0,2 |
| Glukóza | 0,9909 | 5,5 |
| HEPES | 2,383 | 10 |

5.4.2 Transfekcia buniek

Pri prechodnej transfekcii, prenose genetickej informácie do eukaryotickej bunky, plazmidom kódujúcim ľudský OCT2 transportér bolo použité transfekčné činidlo Lipofectamine 3000. Lipofectamine obalil expresný OCT2 plazmid, vytvoril sa kladne nabitý lipidový komplex, ktorý umožnil prechod nukleovej kyseliny cez záporne nabitú bunkovú membránu a vstup do bunky prostredníctvom endocytózy.

Pri prenose genetickej informácie kódujúcej nami skúmaný transportér OCT2 do buniek HeLa a MDCK wt/hy sa postupovalo nasledovne:

1. Deň pred transfekciou sa bunky nasadili na 24 jamkovú doštičku.
2. V deň transfekcie boli v laminárnom boxe pripravené 4 nasledujúce roztoky. Do dvoch mikroskúmaviek sa napipetovalo požadované množstvo Opti-MEMu (Opti-Minimal Essential Medium) a zmiešalo sa s Lipofectaminom 3000. V ďalšej mikroskúmavke sa k Opti-MEMu pridal OCT2 expresný konštrukt a následne Reagent P3000 presne podľa pokynov výrobcu. Do poslednej štvrtrej

mikroskúmavky, ktorá slúžila ako kontrolný roztok, sa k Opti-MEMu pridal prázdny plazmid. Všetky roztoky boli opatrne premiešané pomocou pipety a nechali sa inkubovať 5 minút pri pokojovej teplote.

3. Následne bol roztok obsahujúci vnášanú DNA pridaný do jedného roztoku s Lipofectaminom a kontrolný roztok do druhého roztoku s Lipofectaminom. Vzniknuté dva roztoky sa opatrne premiešali a nechali inkubovať pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút.
4. Počas doby inkubácie roztokov bolo z 24 jamkovej doštičky odsaté staré médium a nahradené potrebným množstvom nového média.
5. Po uplynutí inkubačnej doby 5 minút sa na jednu polovicu doštičky pridal transfekčný roztok obsahujúci DNA a Lipofectamine a na druhú polovicu kontrolný roztok, v ktorom sa nachádzal prázdny plazmid.
6. Doštička s bunkami sa následne inkubovala za účelom transkripcie a následnej translácie OCT2 proteínu 48 hodín pri teplote 37°C.

5.4.3 Akumulačné štúdie

Akumulácia bola sledovaná u štandardného substrátu transportéra OCT2 MPP⁺ a antivirotika lamivudínu, ktorý bol v minulosti overený ako substrát ľudského OCT2 transportéra. Experiment prebiehal na 24 jamkovej doštičke, ktorá bola rozdelená vertikálne na dve polovice. Prvá polovica obsahovala bunky MDCK II stabilne exprimujúce ľudský OCT2 transportér. V druhej polovici doštičky sa nachádzali kontrolné MDCK wt/hy bunky, ktoré daný transportér neobsahovali. Akumulačné štúdie prebiehali v nesterilnom prostredí (mimo laminárneho boxu) podľa nasledujúceho postupu:

1. Z 24 jamkovej doštičky sa odstránilo celé médium. Bunky boli dvakrát opláchnuté transportným roztokom predhriatým na 37°C. Následne sa napipetovalo požadované množstvo transportného roztoku do každej jamky doštičky, ktorá sa nechala 10 minút preinkubovať v inkubátore.
2. Po uplynutí desiatich minút preinkubácie sa v rôznych časových intervaloch pipetoval do každej jamky doštičky akumulčný roztok. Ten bol pripravený zmiešaním transportného roztoku, MPP⁺ alebo lamivudínu a rádioaktívne značeného ³H-MPP⁺ alebo ³H-lamivudínu. Výsledná koncentrácia MPP⁺ v akumulčnom roztoku bola 1 µM a koncentrácia lamivudínu bola 1 µg/ml alebo

0,01 µg/ml. Odsal sa vždy jeden riadok z doštičky a napipetovalo sa požadované množstvo akumuláčného roztoku v danom časovom intervale.

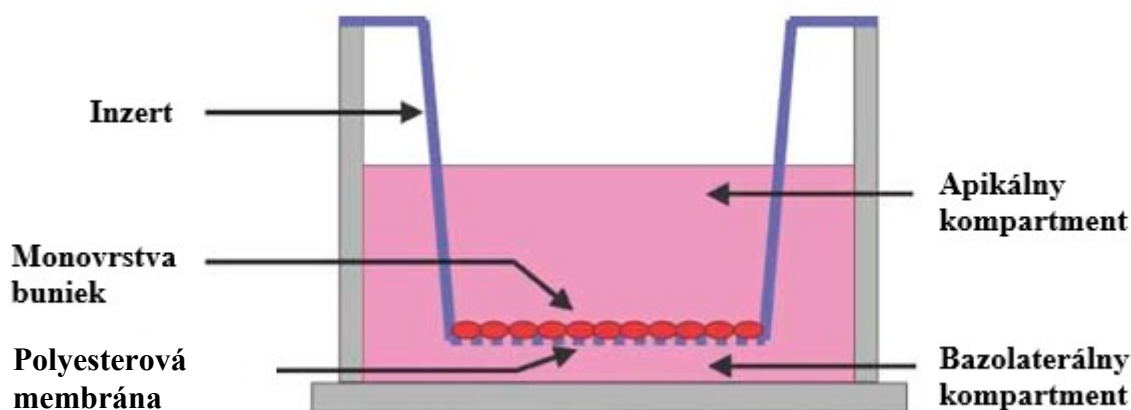
3. Po uplynutí časových intervalov sa odsal roztok zo všetkých jamiek a doštička bola dvakrát prepláchnutá 1 ml STOP roztoku vychladeným na 4°C v chladničke. STOP roztok bol pripravený v malých skúmavkách vložených do doštičky, aby sa akumulácia zastavila jednorazovo.
4. Zvyšky STOP roztoku boli odstránené pomocou odsávača a do každej jamky bol napipetovaný PLB (Passive Lysis Buffer) vychladený na 4°C. Doštička sa vložila do mrazničky, v ktorej sa ponechala až do úplného zamrzenia buniek. Vďaka použitému pasívnemu lyzovaciemu pufru a mrazu došlo k dezintegrácii buniek.
5. Následne boli odobraté vzorky na vyhodnotenie množstva proteínu pomocou BCA (Bicinchoninic acid assay) metódy a vzorky na zmeranie množstva naakumulovaného rádioaktívne značeného substrátu OCT2 transportéru $^3\text{H-MPP}^+$ alebo $^3\text{H-lamivudínu}$.

5.4.4 Transportné štúdie

Transportné štúdie, vykonávané za účelom zistenia mieri prestupu cez OCT2 transportér a akumulácie študovaných látok (lamivudín, MPP^+), boli realizované na 12 jamkovom inzerte s polyesterovou membránou (viď Obr.4). Experimenty boli realizované na MDCK II bunkách stabilne exprimujúcich ľudský OCT2 transportér. Kontrolné MDCK wt/hy bunky daný transportér neobsahovali.

1. Z 12 jamkového inzertu s bunkami sa odstránilo celé médium. Monovrstva buniek bola dvakrát opláchnutá transportným roztokom predhriatým na 37°C. Následne sa pridalo požadované množstvo transportného roztoku na každú stranu inzertu, aby boli obe hladiny vyrovnané. Takto pripravené inzerty nechali preinkubovať približne 10 minút.
2. Po uplynutí doby preinkubácie sa v časových intervaloch 5 min., 10 min. a 20 min. odsal roztok z jedného riadku inzertu (z horného i dolného kompartmentu) a napipetovalo sa požadované množstvo akumuláčného roztoku o výslednej koncentrácii lamivudínu 0,01 µg/ml alebo MPP^+ 0,1 µM. Akumulačný roztok sa pripravil zmiešaním potrebného množstva transportného roztoku, lamivudínu alebo MPP^+ a rádioaktívne značeného $^3\text{H-lamivudínu}$ alebo $^3\text{H-MPP}^+$. Medzi jednotlivými časovými intervalmi sa bunky nachádzali v inkubátore.

- Po uplynutí časových intervalov sa odsal roztok zo všetkých 12 jamiek inzertu, ktorý sa následne dvakrát prepláchol 1ml vychladeného STOP roztoku z oboch strán.
- Zvyšky STOP roztoku boli odsaté a membrána s bunkami, ktorá sa nachádzala na dne inzertu sa opatrne odstránila pinzetou. Odstránená membrána sa použila na zmeranie množstva rádioaktivity.



Obr. 4 Schematické znázornenie jamky s inzertom, polyesterovou membránou a monovrstvou buniek

Modifikované podľa: (Anonym 2020)

5.4.5 Inhibičné štúdie

Inhibičný potenciál bol sledovaný u antibiotika trimetoprimu. Experimenty boli realizované na HeLa bunkách prechodne transfekovaných ľudským transportér OCT2. Ako kontrola boli použité bunky, ktoré boli transfekované prázdny plazmidom. Rozloženie buniek v 24 jamkovej doštičke bolo rovnaké ako pri akumuláčnych štúdiách. Inhibičné štúdie boli vykonávané za nesterilných podmienok nasledovne:

- V prvok kroku bolo odsaté médium prítomné na 24 jamkovej doštičke. Bunky boli dvakrát opláchnuté transportným roztokom predhriatým na 37°C. Následne sa do každej jamky pridalo potrebné množstvo vopred pripraveného roztoku inhibítora trimetoprimu o koncentrácii 100 μM zmiešaného s transportným roztokom. Doštička s týmto roztokom sa nechala preinkubovať v inkubátore 10 minút.
- Po uplynutí preinkubačnej doby sa postupne odsával každý riadok doštičky v rôznych časových intervaloch. Po odsatí príslušného riadku sa do každej jamky

napipetoval rádioaktívne značený roztok o výslednej koncentrácii lamivudínu 0,01 µg/ml, ktorý bol pripravený zmiešaním transportného roztoku, neznačeného lamivudínu, rádioaktívne značeného ³H-lamivudínu a trimetoprimu.

3. Po ukončení časových intervalov bol všetok roztok odsatý a jamky dvakrát opláchnuté 1 ml vychladeného STOP roztoku. Zvyšky STOP roztoku sa odsali.
4. Do každej jamky sa pridal PLB a doštička sa umiestnila do mrazničky. Bunky boli vystavené mrazu až do úplného zamrzenia.
5. Po rozmrazení buniek sa odobrali vzorky na stanovenie množstva proteínu pomocou BCA metódy a na stanovenie množstva rádioaktivity.

5.4.6 Stanovenie množstva proteínu BCA metódou

Bicinchoninová metóda (BCA) je veľmi citlivá metóda, pri ktorej dochádza k redukcii meďnatých iónov na ióny meďné proteínom (resp. peptidovou väzbou) v alkalickom prostredí. Následná chelácia vzniknutých meďných iónov dvoma molekulami kyseliny bicinchoninovej zapríčini vznik vo vode rozpustného fialového komplexu. Koncentrácia proteínu vo vzorke je stanovená spektrofotometricky. Vzniknutý farebný komplex vykazuje vysokú absorbanciu pri vlnovej dĺžke 562 nm. K stanoveniu množstva proteínu vo vzorke sa využívajú rôzne štandardy proteínov, ako napríklad hovädzí sérový albumín (BSA) (Johnson 2012).

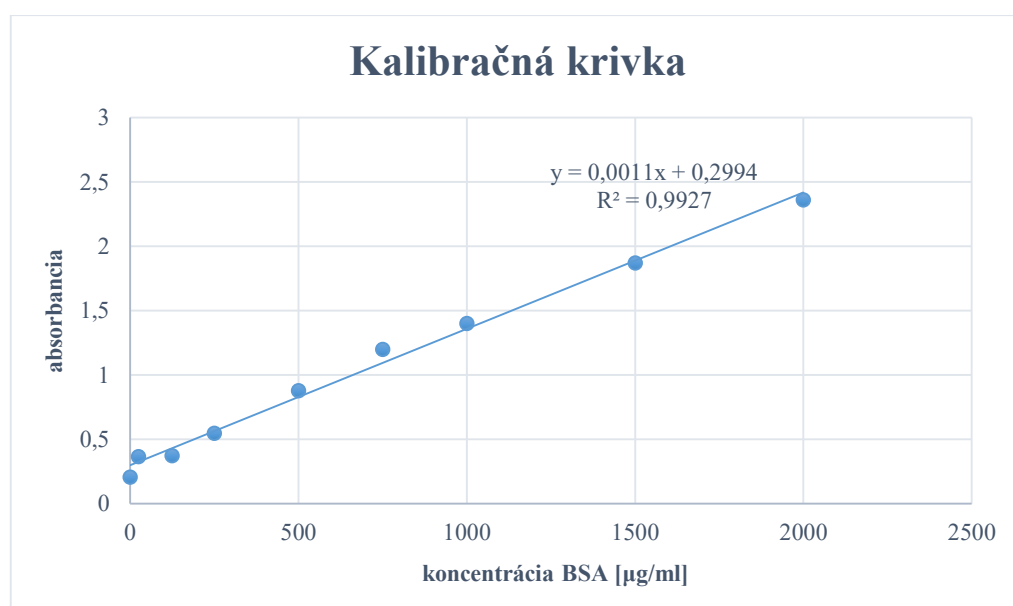
K vyhodnoteniu akumuláčnych a inhibičných štúdií bol použitý Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Pri stanovení bolo postupované nasledovne:

1. Na prvé dva riadky (stĺpce A-I) 96 jamkovej doštičky boli napipetované roztoky štandardu, potrebné k vytvoreniu kalibračnej krivky. Pripravené boli nariedením štandardu hovädzieho sérového albumínu potrebným množstvom PBS. Použité objemy jednotlivých činidiel a výsledná koncentrácia roztokov sú uvedené v Tab. 4.

Tab. 4 Príprava roztokov proteínového štandardu

| Označenie roztoku | Objem PBS [μl] | Objem BSA [μl] | Koncentrácia roztoku [μg/ml] |
|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
| A | 0 | 300 | 2000 |
| B | 125 | 375 | 1500 |
| C | 325 | 325 | 1000 |
| D | 175 | 175 z roztoku B | 750 |
| E | 325 | 325 z roztoku C | 500 |
| F | 325 | 325 z roztoku E | 250 |
| G | 325 | 325 z roztoku F | 125 |
| H | 400 | 100 z roztoku G | 25 |
| I | 400 | 0 | 0 |

- Do ďalších riadkov doštičky sa napipetovalo 20 μl vzorky zlyzovaných buniek odobratých z každej jamky 24 jamkovej doštičky. Následne bolo k jednotlivým vzorkám pridaných 5 μl PBS, aby sa dosiahol rovnaký objem vo všetkých jamkách.
- Nakoniec sa do každej jamky pridalo 200 μl pracovného roztoku. Pracovný roztok bol pripravený podľa návodu BCA Protein Assay Kitu zmiešaním reagentov A a B v pomere 50:1. Doštička sa nechala inkubovať 30 minút v inkubátore pri teplote 37°C.
- Po skončení doby inkubácie sa zmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm. Z nameraných hodnôt bola vytvorená kalibračná krivka. Príklad kalibračnej krivky je zobrazený na obr. 5.



Obr. 5 Kalibračná krivka zobrazujúca závislosť koncentrácie BSA na absorbancii

Kalibračná krivka znázornená na obr. 5 zobrazuje závislosť koncentrácie BSA na prístrojom nameranej absorbancii. V ideálnom prípade by mala byť závislosť lineárna a prechádzať počiatkom. Na obrázku je vyznačená rovnica lineárnej regresie $y = 0,0011x + 0,2994$, kde y je hodnota absorbancie a x je koncentrácia. Rovnica slúži k výpočtu koncentrácie proteínu v jednotlivých vzorkách. Korelačný koeficient (R^2) udáva linearitu jednotlivých bodov vyznačených na kalibračnej krivke. Čím je táto hodnota bližšia k 1, tým je výsledok spoľahlivejší.

5.4.7 Detekcia beta žiarenia kvapalnými scintilátormi

Kvapalný scintilátor je roztok tuhej organickej scintilačnej látky v organickom rozpúšťadle (napr. toluéne, benzéne). Tento roztok sa využíva k detekcii nízkoenergetického beta žiarenia, nakoľko je schopný po vystavení ionizujúcemu žiareniu vyvolať svetelné záblesky viditeľného svetla (scintilácie). Do roztoku kvapalného scintilátora sa pridá rádioaktívne značená vzorka. Úlohou rozpúšťadla prítomného v kvapalnom scintilátore je zachytiť energiu vyžarujúcu β časticami. Vzniknutá energia je absorbovaná molekulami scintilačnej látky, ktoré emitujú fotóny viditeľného svetla a vznikajú tak záblesky svetla. Svetelné impulzy sú detekované pomocou fotonásobiča. Tento svetlocitlivý senzor umožní prevod svetelných zábleskov na elektrické impulzy. Množstvo vzniknutých impulzov za jednotku času je úmerné množstvu rádioaktívne značenej látky vo vzorke (L'Annunziata et al. 2020).

K detekcii beta žiarenia bol využitý kvapalný scintilačný analyzátor Beta Counter Tri-Carb 2900TR. Po akumuláčnych, transportných a inhibičných štádiách prebiehalo stanovenie množstva rádioaktivity nasledovne:

1. Do scintilačných vialiek z plastu sa pridalo 150 μ l vzorky z každej jamky 24 jamovej doštičky alebo odstránená membrána z 12 jamkového inzertu. Dve scintilačné vialky slúžili ako kontrola, jedna obsahovala použitú vzorku transportného roztoku so skúmanou ^3H -značenou látkou a príslušné množstvo scintilačného roztoku. Druhá kontrola predstavovala samotný scintilačný roztok.
2. Do každej vialky sa pridalo 1 ml scintilačného roztoku, ktorý pri interakcii s β žiarením vyvolával svetelné záblesky.
3. Každá vzorka bola meraná v Beta Counteri 5 minút, aby sa získali čo najspoľahlivejšie výsledky.

5.4.8 Stanovenie relatívnej expresie génu pre ľudský transportér OCT2 polymerázovou reťazovou reakciou v reálnom čase

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je metóda umožňujúca amplifikáciu (namnoženie) určitého fragmentu DNA. Amplifikácia je docielená tromi základnými krokmi. Počiatočným krokom je denaturácia, kedy je molekula templátovej DNA vystavená vysokej teplote, pri ktorej sa rozdeľujú obe vlákna dvojšrobovice DNA. V nasledujúcom kroku sa teplota mierne znižuje a dochádza k nasadeniu primerov (annealingu) na komplementárnu sekvenciu denaturovaného templátu DNA. V poslednom kroku sa teplota opäť zvýši a začne sa syntetizovať DNA v smere 5'-3' vďaka enzýmu DNA-polymeráze. Tieto tri kroky tvoria jeden cyklus, ktorý sa opakuje štyridsaťkrát. Množstvo DNA sa v každom cykle zdvojnásobuje (Anonym 2014).

Kvantitatívna real time PCR (qRT-PCR) metóda je variáciou laboratórnej techniky PCR, umožňujúca stanoviť relatívne množstvo DNA po každom cykle. Princípom je detekcia fluorescenčného signálu po prebehnutí každého amplifikačného cyklu, ktorého intenzita je priamo úmerná množstvu namnoženej DNA (amplikónu). S každým cyklom je tak možné pozorovať nárast signálu (Anonym 2014).

Aby sme mohli stanoviť relatívnu génovú expresiu hOCT2 u MDCK buniek pomocou qRT-PCR je nutné najskôr vyizolovať mRNA z pripravených bunkových vzoriek. Následne ju podrobiť reverznej transkripcii, teda prepisu genetickej informácie z izolovanej mRNA do cDNA (komplementárnej DNA). Túto reakciu katalyzuje enzým reverzná transkriptáza. Vytvorená cDNA sa následne využije k vykonaniu qRT-PCR metódy.

Izolácia mRNA

Pred vykonaním samotnej qRT-PCR metódy bolo nutné izolovať mRNA z pripravených vzoriek. Pri izolácii mRNA z jednotlivých vzoriek sa postupovalo nasledovne:

1. Bunky sa rozpustili v špecifickom činidle TRI Reagent[®] obsahujúcom fenol a guanidín izothiokyanát.
2. K zhomogenizovanému roztoku sa pridal chloroform, s ktorým sa vzorky vytrepávali. Po niekoľkých minútach došlo k oddeleniu jednotlivých vrstiev. Spodná vrstva obsahovala bielkoviny a organické látky, medzivrstva DNA

a horná vodná vrstva obsahovala mRNA znečistenú organickými rozpúšťadlami. K dokonalému oddeleniu jednotlivých fází bola využitá centrifugácia pri vysokých otáčkach (15000 G).

3. Vodná fáza s mRNA bola odobratá opatrne tak, aby nedošlo k nabratiu DNA alebo organickej fáze. Nakoľko by mohlo dôjsť k znehodnoteniu vzorky.
4. K vodnej fáze sa pridal izopropanol, vďaka ktorému došlo k precipitácii mRNA. Vyzrážaná mRNA sa vplyvom centrifugácie usadila na dne mikroskúmavky a vytvorila sa tzv. peletka.
5. Peletka sa vyčistila od organických rozpúšťadiel pomocou vychladeného 70% etanolu (V/V). Nechala sa inkubovať 1 hodinu na ľade. Následne sa tento krok ešte raz zopakoval.
6. Po ukončení prečisťovacej fáze sa peletka nechala vyschnúť od zbytkového etanolu pri laboratórnej teplote 10-15 minút a následne sa rozpustila v RNase-free vode.
7. Na koniec sa skontrolovala čistota mRNA a zmerala koncentrácia vzoriek na spektrofotometri NanoDrop podľa príslušného návodu. Koncentrácia jednotlivých vzoriek bola nariadená na výslednú koncentráciu 250 ng/μl pomocou RNase-free vody.

Reverzná transkripcia

Reverzná transkripcia je proces, pri ktorom dochádza k vzniku cDNA na podklade vyizolovanej mRNA.

Reagencia použité na prípravu jednej vzorky potrebnej na prepis mRNA do cDNA boli nasledovné: mRNA templát nariadený na koncentráciu 250 ng/μl, náhodný hexamér, reakčný pufer, RNase-free voda, 10 mM zmes deoxyribonukleotidtrifosfátov (dNTP mix), RiboLock RNase inhibítor (20 U/μl) a RevertAid RT (200 U/ μl). Všetky uvedené reagenty s výnimkou mRNA templátu sú súčasťou komerčne dostupného kitu RevertAid RT Reverse Transcription. Po zmiešaní všetkých zložiek sa vytvorila reakčná zmes, ktorá bola vložená do termálneho cykléru (StepOne Plus), kde sa nastavila počiatočná teplota 25°C po dobu 5 minút, následne 42°C po dobu 60 minút a nakoniec 70°C po dobu 5 minút. Po dokončení reverznej transkripcie sa vzorky umiestnili do chladiaceho stojana. Vychladené vzorky boli zriedené pridaním RNase-free vody. Následne sa vzorky uchovávali v mrazničke pri teplote -20°C.

Real time PCR

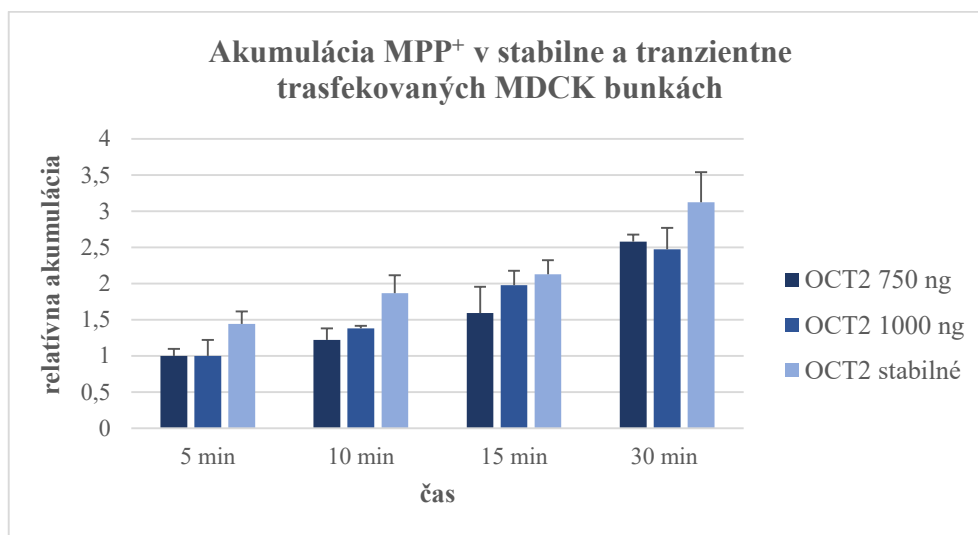
Vopred sa pripravila reakčná zmes zložená z RNase-free vody, Sensi FAST Probe Hi-ROX mixu a TaqMan Probe hOCT2. Táto zmes sa spolu so vzorkou pipetovala na 96 jamkovú doštičku pre PCR. Bola použitá aj negatívna kontrola, ktorá obsahovala všetky zložky reakčnej zmesi okrem cDNA. Všetky vzorky i negatívna kontrola boli pipetované v triplikátoch. Takto pripravená doštička sa umiestnila do termálneho cykléru (Quant studio 6 flex), na ktorom sa nastavila udržiavacia teplota 95°C na 5 minút potrebná k aktivácii Sensi FAST Probe Hi-ROX mixu. Následne sa štyridsaťkrát pravidelne opakovala cyklická fáza prebiehajúca v dvoch krokoch: 10 sekúnd pri teplote 95°C a 30 sekúnd pri teplote 60°C.

Po dokončení jednotlivých cyklov sa vypočítalo relatívne množstvo génu pre OCT2 transportér vďaka získaným hodnotám Ct (cycle threshold). Táto hodnota predstavuje číslo cyklu, v ktorom bol termálny cyklér schopný zaznamenať fluorescenčný signál. Výpočet sa vykoná podľa nasledujúceho vzorca: $X = 2,08^{(Ct_{\text{referenčnej vzorky}} - Ct_{\text{testovanej vzorky}})}$. Hodnota X vo vzorci značí výsledné relatívne množstvo OCT2.

6 Výsledky

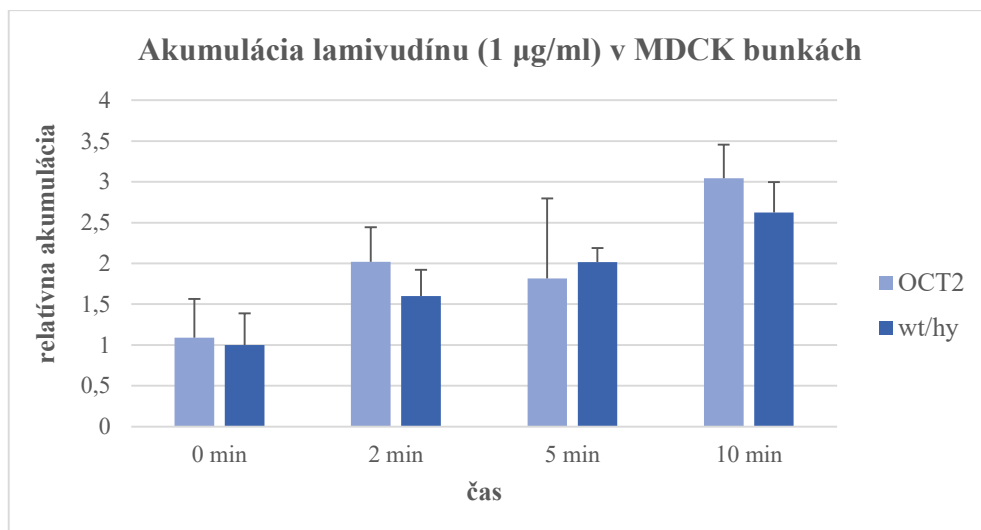
6.1 Akumulačné štúdie

Pri vyhodnocovaní akumuláčnych aj inhibičných štúdií boli výsledné hodnoty rádioaktivity v bunkovom lyzáte vzťahnuté na množstvo proteínu v každej jamke doštičky.



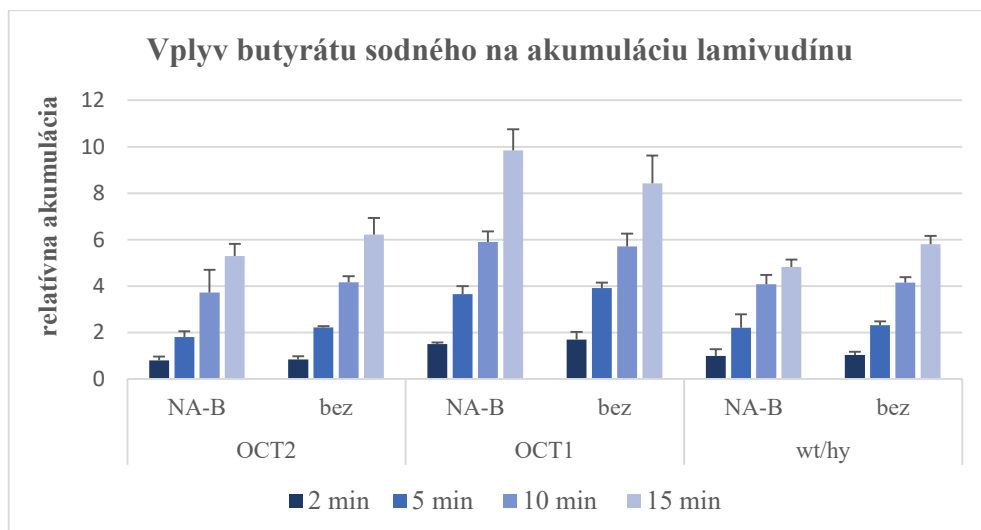
Obr. 6 Časová závislosť akumulácie MPP⁺ v bunkách MDCK transfekovaných stabilne a prechodne. Pre analýzu dát bola priradená hodnota 1 MDCK wt/hy bunkám transfekovaných prechodne 750 ng plazmidu a inkubovaných 2 minúty, na ktorú sa vzťahovali ostatné hodnoty relatívnej akumulácie.

Na obr. 6 vidíme rozdiel akumulácie MPP⁺ v bunkách transfekovaných stabilne a prechodne. Koncentrácia roztoku MPP⁺ bola 1 μM. MDCK II bunky stabilne exprimujúce OCT2 transportér vykazujú vyššie hodnoty akumulovaného MPP⁺ oproti MDCK bunkám transfekovaných prechodne expresným konštruktom pre ľudský OCT2 transportér. U buniek tranzientne transfekovaných väčším množstvom plazmidu (1000 ng) kódujúceho ľudský OCT2 transportér sa v čase inkubácie 10 a 15 minút dostáva MPP⁺ do buniek vo väčšom množstve než u buniek transfekovaných 750 ng plazmidu. V 5. minúte bola nameraná akumulácia MPP⁺ prakticky totožná za oboch skúmaných podmienok, naproti tomu v 15. minúte inkubácie bolo detekované menšie množstvo akumulovaného MPP⁺ u buniek transfekovaných 1000 ng OCT2 expresného plazmidu v porovnaní so 750 ng.



Obr. 7 Časová závislosť akumulácie lamivudínu v MDCK bunkách. Pre analýzu dát bola priradená hodnota 1 MDCK wt/hy bunkám inkubovaných 0 minút, na ktorú sa vzťahovali ostatné hodnoty relatívnej akumulácie.

Pri prvom experimente bola použitá koncentrácia roztoku lamivudínu 1 $\mu\text{g/ml}$. Z výsledkov znázornených na obr. 7 môžeme vidieť, že u MDCK II buniek stabilne exprimujúcich ľudský OCT2 transportér sa akumulácia lamivudínu s rastúcim časom inkubácie zvyšuje oproti kontrolným bunkám MDCK wt/hy, ktoré daný transportér neexprimujú. V čase inkubácie 5 minút je zaznamenaný u buniek MDCK II mierny pokles množstva naakumulovaného lamivudínu oproti kontrolným bunkám, avšak vzhľadom na vysokú smerodatnú odchylku nie je tento pokles štatisticky významný.

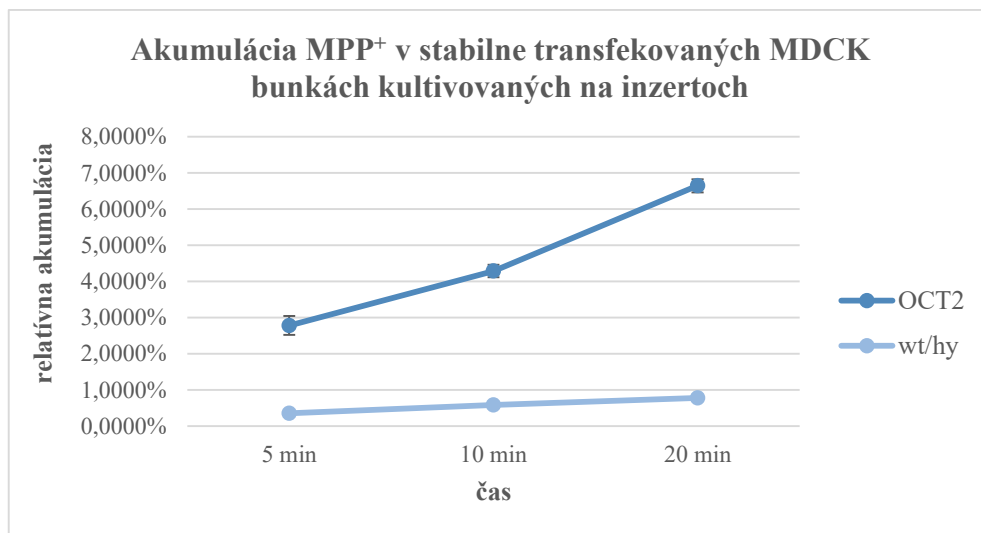


Obr. 8 Časová závislosť akumulácie lamivudínu u MDCK buniek inkubovaných v prítomnosti 2 mM butyrátu sodného a bez neho. Pre analýzu dát bola priradená hodnota 1 MDCK wt/hy bunkám s butyrátom sodným inkubovaných 2 minúty, na ktorú sa vzťahovali ostatné hodnoty relatívnej akumulácie.

Pri experimente, ktorého výsledky sú zobrazené na obr. 8, bol použitý 2 mM butyrát sodný za účelom zvýšenia expresie génu pre OCT2 transportér u stabilne transfekovaných buniek. Koncentrácia roztoku lamivudínu bola 0,01 $\mu\text{g/ml}$. MDCK II bunky stabilne exprimujúce OCT2 alebo OCT1 transportér a kontrolné bunky MDCK wt/hy boli inkubované 48 hodín v prítomnosti 2 mM butyrátu sodného alebo boli inkubované bez tejto látky. Z výsledkov tohto experimentu znázornených na obr. 8 je zrejme, že na bunky stabilne transfekované OCT2 transportérom nemá butyrát sodný žiadny efekt. Bunky inkubované bez butyrátu sodného dokonca vykazujú vyššie hodnoty akumulácie lamivudínu oproti bunkám inkubovaným s butyrátom sodným. Výraznejší efekt butyrátu sodného je zaznamenaný len u buniek stabilne transfekovaných OCT1 transportérom v čase inkubácie 15 minút, avšak ani tento rozdiel nie je štatisticky signifikantný. U kontrolných buniek MDCK wt/hy nie je takmer žiadny rozdiel v akumulácii, až na 15 minútu, kde je akumulácia vyššia u buniek inkubovaných bez prítomnosti butyrátu sodného. Obr. 8 nám tiež ukazuje, že afinita lamivudínu je vyššia k hOCT1 transportéru v porovnaní s hOCT2 transportérom.

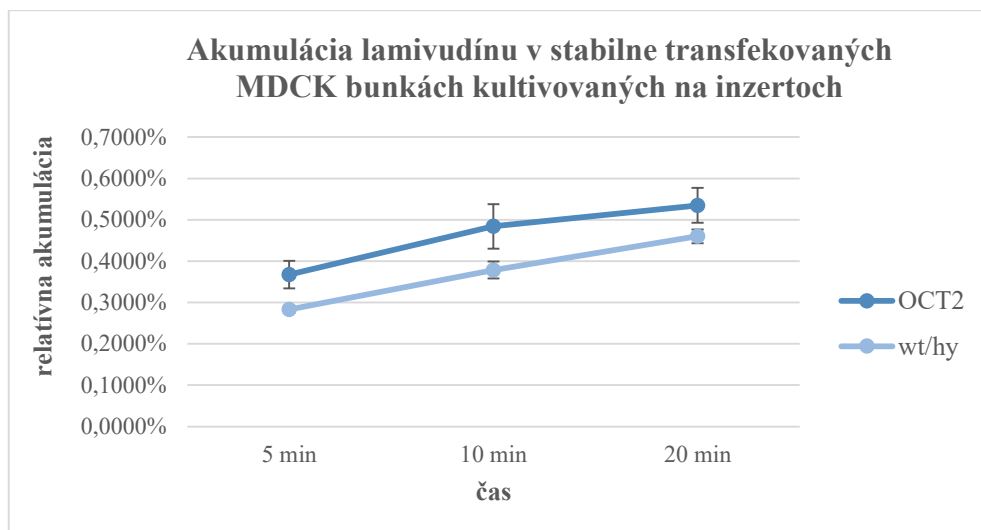
6.2 Transportné štúdie

Transportné štúdie prebiehajúce v časovom intervale 5, 10, 20 minút boli vyhodnocované na základe výsledkov rádioaktivity získaných pomocou betacounteru.



Obr. 9 Časová závislosť akumulácie MPP⁺ v polyesterovej membráne. Dáta sú prezentované ako percento akumulácie MPP⁺ oproti štandardu.

Na obrázku 9 je vidieť, že nárast akumulovaného modelového substrátu MPP⁺ je významne vyšší u bunkovej línie MDCK II stabilne exprimujúcej ľudský OCT2 transportér než u kontrolných MDCK wt/hy bunkách.

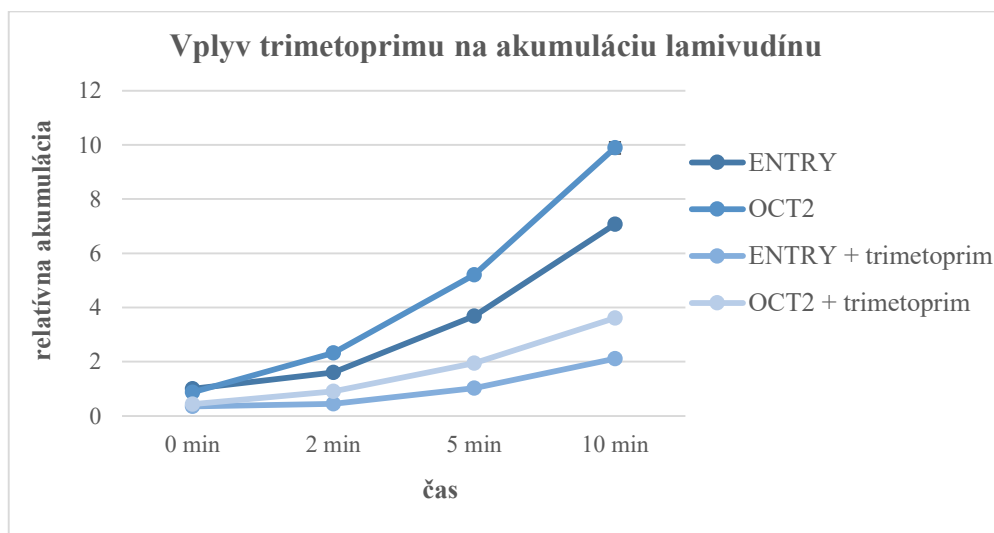


Obr. 10 Časová závislosť akumulácie lamivudínu v polyesterovej membráne. Dáta sú prezentované ako percento akumulácie lamivudínu oproti štandardu.

Obr. 10 nám ukazuje, že akumulácia lamivudínu sa s rastúcim časom inkubácie u MDCK II buniek stabilne transfekovaných OCT2 transportérom mierne zvýšila oproti kontrolným MDCK wt/hy bunkám.

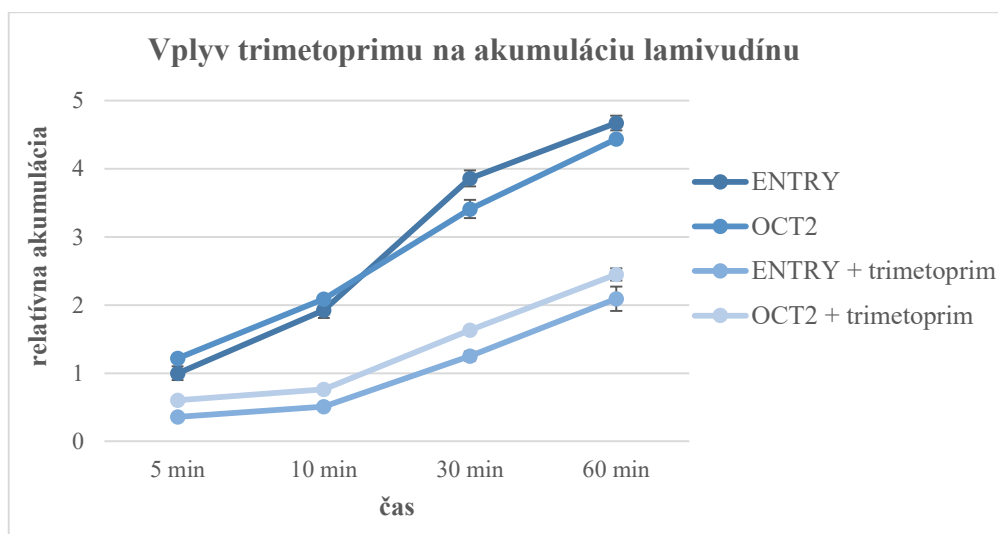
6.3 Inhibičné štúdie

Inhibičný potenciál trimetoprimu na OCT2 transportér bol sledovaný na prechodne transfekovanej bunkovej línii HeLa. K transfekcii bol využitý kationový lipid Lipofectamine, ktorý sa pokladá za zlatý štandard pre bezpečné vnesenie exogénnej DNA alebo RNA do buniek.



Obr. 11 Akumulácia lamivudínu v časovom intervale 0, 2, 5, 10 minút v bunkovej línii HeLa za použitia trimetoprimu a bez neho. Pre analýzu dát bola priradená hodnota 1 HeLa bunkám transfekovaným prechodne prázdny plazmidom (ENTRY) a inkubovaných 0 minút, na ktorú sa vzťahovali ostatné hodnoty relatívnej akumulácie.

Z výsledkov znázornených na obr. 11 je zrejme, že sa akumulácia lamivudínu u HeLa buniek tranzientne transfekovaných ľudským OCT2 transportérom s rastúcim časom inkubácie zvyšuje oproti kontrolným HeLa bunkám transfekovaným prázdny plazmidom. Použitím inhibítora OCT2 transportéru trimetoprimu sa akumulácia lamivudínu u oboch buniek znížila oproti situácii bez použitia trimetoprimu.

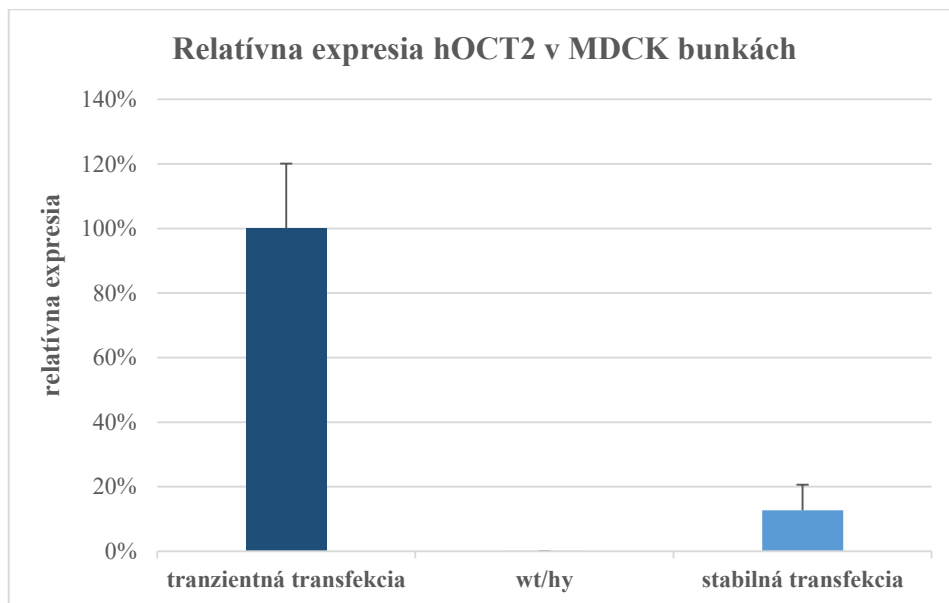


Obr.12 Akumulácia lamivudínu v časovom intervale 5, 10, 30, 60 minút v bunkovej línii HeLa za použitia trimetoprimu a bez neho. Pre analýzu dát bola priradená hodnota 1 HeLa bunkám transfekovaným prechodne prázdny plazmidom (ENTRY) a inkubovaných 5 minút, na ktorú sa vzťahovali ostatné hodnoty relatívnej akumulácie.

Na obr. 12 vidíme, že akumulácia lamivudínu v 5. a 10. minúte inkubácie je u HeLa buniek tranzientne transfekovaných ľudským OCT2 transportérom takmer zhodná s kontrolnými bunkami transfekovanými prázdny plazmidom. Od 10. minúty sa však akumulácia zvyšuje u kontrolných buniek. Použitím inhibítora OCT2 transportéru trimetoprimu sa akumulácia lamivudínu u oboch buniek znížila oproti situácii bez použitia trimetoprimu.

6.4 Relatívna expresia génu pre ľudský transportér OCT2 v stabilne i tranzientne transfekovaných bunkových modeloch

K vyhodnoteniu relatívnej expresie génu pre OCT2 transportér bola využitá kvantitatívna real time PCR metóda.



Obr. 13 Relatívna expresia génu pre ľudský OCT2 transportér u tranzientne a stabilne transfekovaných MDCK buniek. Pre analýzu dát bola relatívna expresia vzorky prechodne transfekovanej OCT2 transportérom stanovená ako 100 %.

Z výsledkov zobrazených na obr. 13 je zrejme, že relatívna expresia génu pre ľudský OCT2 transportér u MDCK buniek transfekovaných prechodne 750 ng plazmidu je približne osemkrát vyššia než u stabilne transfekovaných MDCK II buniek. U kontrolných buniek MDCK wt/hy nie je pozorovaná žiadna expresia sledovaného génu.

7 Diskusia

Membránové transportéry, špecifické transportné proteíny inkorporované do bunkovej membrány, ovplyvňujú absorpciu, distribúciu a elimináciu veľkého množstva liečiv. Regulujú tak ich prestup do tkanív a orgánov (Klaassen a Aleksunes 2010). Okrem toho sú tiež miestom vzniku liekových interakcií, ktoré môžu ovplyvniť účinok podávanej farmakoterapie. Jedným z takýchto transportérov je i OCT2 transportér exprimovaný na bazolaterálnej membráne proximálneho tubulu obličiek (Ivanyuk et al. 2017).

Obličkový OCT2 transportér zohráva kľúčovú úlohu v prvom kroku exkrécie kationových liečiv. Akékoľvek ovplyvnenie jeho aktivity (inhibícia alebo indukcia) či expresie môže vyústiť k zmene farmakokinetiky týchto liečiv (Launay-Vacher et al. 2006). Bolo identifikovaných niekoľko látok inhibujúcich tento transportér. Inhibíciou môže dôjsť pri súčasnej terapii inými liekmi transportovanými týmto transportérom k zníženiu ich obličkovej exkrécie a tým k zvýšeniu ich plazmatických koncentrácií. Liekové interakcie na úrovni tohto transportéru tak môžu viesť k nežiadúcim reakciám, ktoré majú vplyv na účinnosť a bezpečnosť terapeuticky podávaných liečiv (Giacomini et al. 2010). Exkrécia lamivudínu je zabezpečovaná glomerulárnou filtráciou a aktívnou tubulárnou sekréciou. Prvým krokom renálnej sekrécie je influx látok cez bazolaterálnu membránu do bunky renálneho tubulu, ktorý je zabezpečovaný aj OCT2 transportérom (Minuesa et al. 2009).

Na začiatku našej práce sme prostredníctvom akumuláčnych štúdií porovnávali efektívnosť tranzientne transfekovaných MDCK buniek so stabilne transfekovanými za použitia modelového substrátu OCT2 transportéru MPP⁺. Akumulácia lamivudínu bola vyššia u stabilne transfekovaných buniek než u buniek transfekovaných prechodne 750 ng alebo 1000 ng plazmidu. Na základe týchto zistení sme sa rozhodli, že pre nasledujúce experimenty budeme používať MDCK II bunky stabilne exprimujúce OCT2 transportér.

Následne bola vykonaná akumuláčna štúdia s rádioaktívne značeným [³H]lamivudínom v koncentrácii 1 µg/ml. U MDCK II buniek stabilne exprimujúcich hOCT2 došlo len k miernej zmene akumulácie lamivudínu v porovnaní s kontrolnými bunkami. Vzhľadom na to, že je lamivudín označovaný ako substrát OCT2 transportéru (Müller et al. 2013), by sa mala hodnota akumulácie v priebehu experimentu významne zvyšovať.

Z dôvodu nízkej hodnoty akumulácie lamivudínu sme použili inhibítor histondeacetylázy, butyrát sodný, ktorý by mal podľa doterajších poznatkov zvyšovať expresiu u stabilne transfekovaných buniek (Cui et al. 1999). Naše výsledky však nekorelovali s týmito zisteniami. Z výsledkov zobrazených na obr. 9 je vidieť, že butyrát sodný nemá v našom prípade žiaden vplyv na bunky stabilne exprimujúce OCT2 transportér. V prípade tohto experimentu bola použitá i nižšia koncentrácia lamivudínu (0,01 μ g/ml), aby sme predišli prípadnému presýteniu transportéru. Akumulácia lamivudínu sa u MDCK-hOCT2 i pri dlhšej dobe inkubácie (15 minút) oproti predchádzajúcemu experimentu opäť zvyšovala len veľmi málo, tento nárast bol takmer zhodný s kontrolnými bunkami. Naopak u MDCK buniek stabilne transfekovaných hOCT1 transportérom bol zistený signifikantnejší nárast akumulácie lamivudínu. Tento výsledok naznačuje, že má lamivudín vyššiu afinitu k pečenej hOCT1 transportéru oproti obličkovému hOCT2 transportéru, čo je v súlade s doterajšími publikovanými výsledkami (Minuesa et al. 2009).

Ďalej sme sa zaoberali možným vplyvom polarizácie buniek rastúcich za štandardných podmienkach na dne kultivačnej doštičky, čo by mohlo vysvetliť minimálne rozdiely medzi MDCK II bunkami stabilne exprimujúcimi ľudský OCT2 transportér a kontrolnými MDCK wt/hy bunkami. V prípade polarizácie buniek je totižto OCT2 transportér lokalizovaný bazolaterálne, čo by v prípade bežných akumulčných štúdií odpovedalo lokalizácií smerom ku dnu namiesto smerom k médiu. Táto naša teória bola však vyvrátená transportnými štúdiami, ktoré boli vykonávané na inzertoch, na ktorých dochádza k polarizácii kultivovaných buniek a je možná aplikácia látky do bazolaterálneho kompartmentu. Akumulácia MPP⁺, modelového substrátu OCT2 transportéru, na bunkovej monovrstve bola oproti kontrolným bunkám výrazne vyššia. Avšak pri použití lamivudínu bola jeho akumulácia opäť len nepatrne vyššia oproti kontrolným bunkám, čo opäť potvrdzuje naše doterajšie výsledky, ktoré naznačujú, že lamivudín je len slabým substrátom ľudského OCT2 transportéru.

Jednou z možností, prečo akumulácia lamivudínu bola taká nízka je, že nami zvolené psie obličkové MDCK II bunky neboli prosté iných transportérov (influxných či efluxných). Táto možnosť je nepravdepodobná, nakoľko boli bunky získané z erudovaného pracoviska a jedná sa o vysoko dediferencovanú bunkovú líniu, avšak nie nemožná. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli použiť k inhibičným štúdiám vykonávaných za účelom odhaľovania možných liekových interakcií vznikajúcich na úrovni hOCT2 transportéru bunkovú líniu HeLa prechodne transfekovanú hOCT2 transportérom.

K transfekcii bol opäť použitý Lipofectamine. K inhibičným štúdiám sme použili trimetoprim, ktorý sa pokladá za kompetitívneho inhibítora OCT2 transportéru (Müller et al. 2013). Zaznamenaný bol pokles akumulácie lamivudínu pri použití inhibítora. Avšak ani experimentami na tranzientne transfekovaných HeLa bunkách pri dvoch rôzne dlhých časových intervaloch sme nedosiahli očakávané výsledky, rozdiely medzi dátami získanými z buniek exprimujúcich hOCT2 a kontrolnými bunkami boli len veľmi malé.

V záverečnej štúdií sme využitím metódy qRT-PCR dokázali, že MDCK bunky prechodne transfekované OCT2 expresným konštruktom vykazovali významnú až o osemkrát vyššiu expresiu OCT2 než MDCKII bunky stabilne exprimujúce hOCT2. Avšak prítomnosť hOCT2 mRNA sme v dostatočne vysokej miere potvrdili vo všetkých hodnotených vzorkách s výnimkou kontrolných buniek, ktoré nevykazovali žiadnu expresiu hOCT2. Z výsledkov teda môžeme konštatovať, že oba prístupy (stabilná i tranzientná transfekcia) sú z hľadiska miery expresie vhodné pre akumulčné, transportné aj inhibičné štúdie. Pri tranzientnej transfekcii sú síce dosahované vyššie hodnoty vnášaných génov v porovnaní so stabilne transfekovanými bunkami, avšak je časovo i finančne náročnejšia v porovnaní so stabilnou transfekciou buniek.

Kombinácia dvoch a viacerých liečiv behom terapie predstavuje možné riziko vzniku liekových interakcií. OCT2 transportný proteín je vďaka svojej širokej substrátovej špecificite jednou z úrovni, na ktorých tieto liekové interakcie môžu vzniknúť. Interakcie môžu spočívať v inhibícii tohto transportéru, alebo v kompetícii o transportný proteín medzi súčasne podávanými substrátmi. Vzniknuté liekové interakcie môžu ovplyvniť bezpečnostný profil podávaných liečiv a mať tak negatívny vplyv na ľudský organizmus (zníženie účinku, zvýšenie nežiadúcich účinkov), preto je veľmi dôležité ich odhaľovať. Nami zvolená metodika práce má potenciál odhaľovať možné škodlivé interakcie, avšak lamivudín sa javí ako slabý substrát nami sledovaného OCT2 transportéru. Z tohto dôvodu nie je vhodným substrátom k realizácii experimentov, ktoré by odhaľovali liekové interakcie na úrovni OCT2 transportéru.

8 Záver

V rámci tejto diplomovej práce bola skúmaná akumulácia rádioaktívne značeného antivirotika [^3H]lamivudínu a modelového substrátu hOCT2 [^3H]MPP⁺ u MDCKII alebo HeLa buniek. Pomocou akumulčných a transportných štúdií realizovaných za rôznych podmienok sme preukázali, že lamivudín je substrát ľudského OCT2 transportného proteínu, čo dokazuje nárast akumulácie lamivudínu v čase v oboch testovaných koncentráciách (1 $\mu\text{g/ml}$ aj 0,01 $\mu\text{g/ml}$). Tento pozorovaný nárast bol však oproti kontrolnej bunkovej línii omnoho menší v porovnaní s MPP⁺. Zvýšenie akumulácie sa nepreukázalo ani pri použití 2mM butyrátu sodného, ktorý je využívaný k zvýšeniu expresie vnášaných génov u stabilne transfekovaných buniek, v tomto prípade sa jednalo o gén pre ľudský transportér OCT2. S využitím akumulčných štúdií uskutočnených na stabilne transfekovaných MDCKII bunkách sme tiež dokázali, že lamivudín má vyššiu afinitu k OCT1 transportéru v porovnaní s transportérom OCT2. Pozitívny efekt butyrátu sodného na akumuláciu lamivudínu nebol preukázaný ani v prípadne stabilne transfekovaných MDCKII buniek hOCT1 transportérom.

Realizáciou akumulčných štúdií na HeLa bunkách za použitia inhibítora ľudského OCT2 transportéru trimetoprimu bola demonštrovaná lieková interakcia medzi lamivudínom a trimetoprimom na úrovni OCT2 transportéru. Zaznamenaný bol pokles akumulácie lamivudínu pri použití inhibítora. Avšak ani experimenty realizované na tranzientne transfekovaných bunkách nepriniesli očakávané výsledky, rozdiely medzi dátami získanými z buniek exprimujúcich hOCT2 a kontrolnými bunkami boli malé.

V rámci záverečnej štúdie sa preukázalo, že hladina expresie OCT2 v MDCK bunkách stabilne exprimujúcich OCT2 transportér bola približne osemkrát nižšia v porovnaní s tranzientne transfekovanými bunkami. Táto skutočnosť je v súlade s vedeckými poznatkami o rozdieloch v expresii medzi stabilne a tranzientne transfekovanými bunkovými modelmi.

Celkovo tak môžeme konštatovať, že lamivudín používaný pri liečbe HIV či hepatitídy B je slabým substrátom ľudského OCT2 transportného proteínu. Z tohto dôvodu nie je vhodným substrátom k realizácii experimentov, ktoré by odhaľovali liekové interakcie na úrovni OCT2 transportéru.

9 Literatúra

Bai X, Moraes TF, Reithmeier RAF. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Mol Membr Biol.* 2017;34(1-2):1-32.

Beneš J. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Praha: Grada Publishing, 2018:502-526. ISBN 978-80-271-0636-3.

Ciarimboli G. Organic cation transporters. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):936-71.

Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol.* 1999;55(5):929-37.

Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 2004;33(2):95-103.

Dukes JD, Whitley P, Chalmers AD. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 2011;12:43

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):215-36.

Giacomini KM, Sugiyama Y. Membrane transporters and drug response. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. 12th edition. New York: McGraw Hill Companies, 2011:89-121 ISBN 978-0-07-162442-8.

Han HK. Role of transporters in drug interactions. *Arch Pharm Res.* 2011;34(11):1865-77.

Han NR, Lee H, Baek S, Yun JI, Park KH, Lee ST. Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;461(2):348-53.

- Choi SJ, Panhelainen A, Schmitz Y, Larsen KE, Kanter E, Wu M, Sulzer D, Mosharov EV. Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure. *J Biol Chem*. 2015;290(11):6799-809.
- Ivanyuk A, Livio F, Biollaz J, Buclin T. Renal Drug Transporters and Drug Interactions. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(8):825-892.
- Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, Bye A, Pakes GE. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clin Pharmacokinet*. 1999;36(1):41-66.
- Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(1):2-9.
- Kaestner L, Scholz A, Lipp P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(6):1171-6.
- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173-8.
- Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev*. 2010;62(1):1-96.
- Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007;24(7):1227-51.
- Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):413-35.
- Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(7):375-81.
- Koepsell H. Role of organic cation transporters in drug-drug interaction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(10):1619-33.
- L'Annunziata MF, Tarancón A, Bagán H, García JF. Liquid scintillation analysis: principles and practice. In: L'Annunziata MF. *Handbook of Radioactivity Analysis* 4th edition. Cambridge: Academic Press, 2020: 575-801. ISBN 9780128143971

Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett*. 1984;48(1):87-92.

Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol* 2006;103(3):97-106

Liang Y, Li S, Chen L. The physiological role of drug transporters. *Protein Cell*. 2015;6(5):334-50.

Liu X. ABC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1141:13-100.

Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463-7.

Minuesa G, Volk C, Molina-Arcas M, Gorboulev V, Erkizia I, Arndt P, Clotet B, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Martinez-Picado J. Transport of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(1):252-61.

Motohashi H, Inui K. Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney. *AAPS J*. 2013;15(2):581-8.

Müller F, König J, Hoier E, Mandery K, Fromm MF. Role of organic cation transporter OCT2 and multidrug and toxin extrusion proteins MATE1 and MATE2-K for transport and drug interactions of the antiviral lamivudine. *Biochemical Pharmacology* 2013:1-30

Perry CM, Faulds D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*. 1997;53(4):657-80.

Sheikh S, Coutts AS a La Thangue NB. Transfection, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017; 191–209.

Skálová L. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydanie. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-246-3733-4.

Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P, Chládek J, Příborský J, Slíva J a Votava M. *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

Thermo Fisher Scientific. Cell Culture Handbook, Gibco Cell Culture Basics Certification. Transfection Basics. 2015;5:41-58.

Volk Ch. OCTs, OATs, and OCTNs: structure and function of the polyspecific organic ion transporters of the SLC22 family. WIREs Membr Transp Signal 2014; 3:1–13.

Wagner DJ, Hu T, Wang J. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. Pharmacol Res. 2016;111:237-246.

Wróbel A, Arciszewska K, Maliszewski D, Drozdowska D. Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. The Journal of Antibiotics 2019; 73: 5–27.

Yin J, Wang J. Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions. Acta Pharm Sin B. 2016;6(5):363-373.

Zair ZM, Eloranta JJ, Stieger B, Kullak-Ublick GA. Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. Pharmacogenomics. 2008;9(5):597-624.

Zinner SH. a Mayer KH. 33- Sulfonamides and Trimethoprim. In: Bennett J, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders 2015:410-418. ISBN 9781455748013.

Internetové zdroje

Anonym. Cell Migration Experiment Service. In: *Medicilon*. 2020. Dostupné z: <https://www.medicilon.com/cell-migration-experiment-service/> Prístup: 11.3. 2021

Anonym. Real- Time PCR handbook. In: *Thermo Fisher Scientific*. 2014. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf> Prístup: 16.3. 2021

Johnsons M. Protein Quantitation. Material and Methods In: *Labome*. 2012 Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html> Prístup: 4.1. 2021