

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



**INTERAKCE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK S LÉKOVÝMI
LEDVINNÝMI TRANSPORTNÍMI SYSTÉMY *IN VITRO***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Hradec Králové 2014

Mgr. Jana Mandíková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Františka Trejtnara, CSc. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

.....

Mgr. Jana Mandíková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem spolupracovníkům z oddělení Radiofarmak na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK, se kterými jsem v průběhu mého doktorského studia spolupracovala, a díky kterým jsem mohla úspěšně dokončit úkoly mé vědecké práce.

Zvláště bych chtěla poděkovat mému školiteli doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc. za odborné vedení a hodnotné konzultace během mého studia.

Za cennou spolupráci a velmi přátelské prostředí vděčím mým kolegům z pracoviště prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc., doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc., Jarmile Hoderové, Evě Teichmanové, Ivě Filipové, PharmDr. Ludmile Melicharové, Ph.D., prof. PharmDr. Petru Pávkovi a mým spolužákům Mgr. Marii Volkové, Mgr. Zbyňku Novému a Mgr. Pavlu Bártovi, Ph.D.

Mnohokrát děkuji Ing. Zlatku Janebovi, Ph.D. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za spolupráci a poskytnutí vývojových antivirotik.

Velmi bych chtěla poděkovat své rodině a příteli Jonathanovi, kteří mi byli po dobu mého studia silnou oporou, a proto bych jim chtěla věnovat tuto závěrečnou zprávu.

Za finanční podporu děkuji i poskytovatelům grantu GAUK No. 360811/FaF/C-LEK, grantu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV-260-064 a grantu IGA MZ No. NT12398-4/2011.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Jana Mandíková

Školitel: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Název disertační práce: Interakce antimikrobiálních látek s lékovými ledvinnými transportními systémy *in vitro*

Řada významných a často užívaných antimikrobiálních léčiv je po podání z organismu vylučována ledvinami. Během tohoto exkrečního procesu může docházet k interakcím s různými membránovými transportními systémy (transportéry), které jsou v ledvinné tkáni exprimovány. Tyto interakce jsou často určujícími faktory jak pro ledvinnou exkreci, tak pro toxické působení těchto léčiv v ledvinách. Mezi transportéry s vysokou expresí v ledvinné tkáni patří např. influxní přenašeče pro organické anionty (OATs), organické kationty (OCTs) či koncentrační nukleosidové transportéry (CNTs) a efluxní transportéry BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) a P-glykoprotein (P-gp). Přes velký význam ledvinných lékových transportérů pro eliminaci a nefrotoxické působení léčiv a intenzivní výzkum v této oblasti, nejsou interakce řady důležitých antimikrobiálních látek s lékovými transportéry v ledvinách popsány dostatečně nebo nejsou známy vůbec.

Cílem této práce bylo zkoumat interakce vybraných antivirotik a antibiotik s důležitými lidskými ledvinnými lékovými transportéry *in vitro*, posoudit potenciál těchto transportních interakcí pro lékové interakce s vybranými léčivy a zjistit význam nalezených transportních mechanismů pro toxicitu studovaných látek. Důležitou součástí práce bylo zavedení optimalizovaných metod využívajících buněčné modely s přechodně zvýšenou expresí studovaných transportérů. Tyto metody byly využity v inhibičních a transportních experimentech, které sloužily ke stanovení kvantitativních parametrů interakcí studovaných látek s transportéry OAT1, OCT2, CNT2 a CNT3. Interakce BCRP a P-gp se studovanými látkami byly zkoumány s využitím buněčných linií se stabilně vysokou expresí těchto transportérů. Výzkum v rámci této práce byl koncentrován na vývojová antivirotika ze skupiny acyklických nukleosidových fosfonátů (ANPs), na

novější antivirotikum entecavir pro léčbu virové hepatitidy a na významné antimykotikum amfotericin B ve formě komplexu s deoxycholátem (AmB/DOC). Ledvinami vylučovaná antivirotika adefovir, tenofovir a cidofovir, která mohou být v klinické praxi podávána současně se studovanými léčivy, byla použita pro porovnání intenzity interakce studovaných látek s vybranými transportéry a byla studována i z hlediska možných lékových interakcí s testovanými látkami.

Buněčné *in vitro* studie ukázaly, že entecavir (ETV) je inhibitorem a substrátem hOAT1, hCNT2 a hCNT3. ETV inhiboval buněčný uptake adefoviru, tenofoviru a cidofoviru prostřednictvím hOAT1. Účinná inhibice transportu byla ovšem pozorována až při koncentracích ETV vyšších, než jsou terapeutické hladiny. Ve srovnání s adefovirem, tenofovirem a cidofovirem působil ETV méně toxičticky na buňky transfekované hOAT1. ETV vykazoval mírný inhibiční vliv na BCRP/ABCG2 a P-gp/ABCB1.

Většina testovaných ANPs se vyznačovala určitou interakcí s hOAT1. Afinita látky GS-9191 k hOAT1 byla poměrně vysoká a srovnatelná s afinitou známých substrátů hOAT1 adefovirem a tenofovirem. Míra interakce s hOAT1 nekorelovala s lipofilitou těchto látek. Zatímco látka GS-9191 vykazovala silné inhibiční účinky na funkci P-gp a BCRP, látka PMEO-DAPy inhibovala pouze P-gp. Většina testovaných ANPs způsobila významný pokles viability buněk transfekovaných hOAT1. Cytotoxický účinek ANPs *in vitro*, s výjimkou relativně lipofilní látky GS-9191, odpovídal jejich schopnosti interagovat s hOAT1. Vyšší cytotoxicita ANPs s afinitou k hOAT1 je nepřímým důkazem, že tyto látky jsou nejen inhibitory, ale i substráty tohoto transportéru.

Provedené akumulční studie potvrdily aktivní transport AmB do buněk. Komplexní preparát AmB/DOC inhiboval jak hOAT1, tak i hOCT2. Jako složka odpovědná za interakci s OAT1 byla identifikována DOC. AmB neinteragoval s hOAT1, avšak výrazně inhiboval hOCT2. Buněčný uptake AmB prostřednictvím hOAT1 a hOCT2 jsme neprokázali. AmB/DOC v supratherapeutických koncentracích interagoval s adefovirem, tenofovirem a cidofovirem v buňkách transfekovaných hOAT1.

Na základě zjištěných experimentálních dat lze konstatovat, že ETV má ve srovnání s nefrotoxičticky působícími antivirotiky jen relativně slabé interakce se studovanými ledvinými transportéry, které pravděpodobně nemohou mít význam pro transportéry zprostředkovanou cytotoxicitu ani být podkladem lékových interakcí. V případě ANPs byly zjištěny mezilátkově rozdílné interakce především s OAT1, které by mohly mít význam pro jejich ledvinou exkreci *in vivo*. Provedené studie vedly

k prvním popsaným informacím o interakci AmB s SLC membránovými transportními systémy, které se sice na jeho sekreci v ledvinných tubulech pravděpodobně nepodílí, avšak jejich význam pro lékové interakce a toxicitu léčiva by měl být dále ověřen.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Jana Mandíková
Supervisor: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.
Title of doctoral thesis: Interactions of antimicrobial agents with drug renal transport systems *in vitro*

A number of important and frequently used antimicrobial agents are excreted from the body through the kidneys. During this excretory process drugs may interact with different membrane transport systems (transporters) which are expressed in the renal tissue. These interactions are often the determining factors for both renal excretion, and the toxic effects of these drugs in the kidney. There are highly expressed influx transporter such as organic anion transporters (OATs), organic cation transporters (OCTs) and the concentrative nucleoside transporters (CNTs) and efflux transporter BCRP (breast cancer resistance protein) and P-glycoprotein (P-gp) in the kidney. Despite the importance of renal drug transporters for elimination and nephrotoxic effects of drugs and intensive research in this field, interactions of a number of important antimicrobial drugs with transporters in the kidney are not known or sufficiently described.

The aim of this study was to investigate the interaction of selected antivirals and antibiotics with important human renal drug transporters *in vitro*, to assess the potential of these interactions for drug-drug interactions with selected drugs and determine the importance of the found transport mechanisms for the toxicity of the studied compounds. An important part of the work was the implementation of the optimized methods using cell models with a transient increase in the expression of the studied transporters. These methods were used in inhibition and transport experiments, which served to determine the quantitative parameters of the interaction of the studied compounds with OAT1, OCT2, CNT2 and CNT3. Interaction of BCRP and P-gp with studied compounds were investigated using cell lines stably expressing high levels of these transporters. The research in this work was centered on the developmental antiviral agents from the group of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs), the newer antiviral

agent entecavir for the treatment of viral hepatitis and important antifungal agent amphotericin B in the complex with deoxycholate (AmB/DOC).

Antivirals adefovir, tenofovir and cidofovir, which may be clinically administered simultaneously with the studied drugs, were used to compare the intensity of the interaction of the studied compounds with selected transporters and were studied in terms of potential drug interactions with the tested substances.

In vitro studies demonstrated that entecavir (ETV) is an inhibitor and substrate of hOAT1, hCNT2 and hCNT3. ETV inhibited the cellular uptake of adefovir, tenofovir and cidofovir via hOAT1. However, the effective inhibition of transport was observed at concentrations of ETV highly exceeding therapeutic levels. In comparison with adefovir, tenofovir and cidofovir, ETV was less toxic to cells transfected with hOAT1. ETV showed a mild inhibitory effect on BCRP/ABCG2 and P-gp/ABCB1.

Most of the tested ANPs interacted with hOAT1. The affinity of the substance GS-9191 for hOAT1 was relatively high and comparable to the affinity of the known substrates of hOAT1 adefovir and tenofovir. The rate of interaction with hOAT1 correlated with the lipophilicity of these compounds. While GS-9191 showed strong inhibitory effects on the function of P-gp and BCRP, PMEO-DAPy inhibited only P-gp. Most of the tested ANPs caused a significant decrease in viability of the cells transfected with hOAT1. Cytotoxic effect of ANPs *in vitro*, with the exception of the relatively lipophilic GS-9191, corresponded to their ability to interact with hOAT1. Increased cytotoxicity of ANPs with the affinity for hOAT1 is an indirect evidence that these substances are not only inhibitors but also substrates of this transporter.

Performed accumulation studies confirmed active transport of AmB into cells. AmB/DOC inhibited both hOAT1, and hOCT2. We identified DOC as the component responsible for the interaction with OAT1. AmB did not interact with hOAT1, but significantly inhibited hOCT2. We did not find the cellular uptake of AmB via hOAT1 and hOCT2. AmB/DOC in supratherapeutic concentrations interacted with adefovir, tenofovir and cidofovir in the cells transfected with hOAT1.

In conclusion, ETV in comparison with nephrotoxic antivirals showed relatively weak interactions with the studied renal transporters, which are not likely to be relevant to transporter-mediated cytotoxicity nor are the basis for drug-drug interactions. Among the tested ANPs, we found the differences in interactions with hOAT1. This transporter could be relevant for the renal excretion of ANPs *in vivo*. The performed studies have demonstrated the first interaction of AmB with membrane transport system, which is

probably not included in secretion of AmB in renal tubules, but its importance for drug interactions and drug toxicity should be verified in the future.

Obsah

1	Seznam zkratek	1
2	Úvod	4
3	Teoretická část	6
3.1	Ledviny jako kritický orgán podání léčiv	6
3.2	Ledvinná exkrece léčiv	7
3.2.1	Vliv fyzikálně-chemických vlastností na ledvinnou exkreci léčiv.....	8
3.3	Mechanismy lékového poškození ledvin	8
3.4	Lékové interakce v ledvinách	10
3.5	Mechanismy transmembránového transportu.....	11
3.6	Transportéry exprimované v ledvinách	13
3.6.1	Solute carrier (SLC) transportéry.....	15
3.6.2	ATP-binding cassette (ABC) transportéry	25
3.7	Charakteristika zkoumaných antimikrobiálních látek.....	28
3.7.1	Antivirotika.....	28
3.7.2	AmB.....	32
4	Cíle práce.....	35
5	Experimentální část.....	36
5.1	Materiál.....	36
5.1.1	Použité přístroje a vybavení.....	36
5.1.2	Studované látky a další důležité chemikálie.....	37
5.2	Použité metody	38
5.2.1	Buněčné kultivace	38
5.2.2	Transfekce	39
5.2.3	Western blotting	40
5.2.4	Transportní studie s buněčnými modely.....	42
5.2.5	Stanovení cytotoxicity	48
5.2.6	Statistická analýza	49
6	Výsledky	50
6.1	Ověření funkčnosti transportérů v buněčných modelech	50
6.2	Ověření exprese transportérů v buněčných modelech Western blottingem.....	51
6.3	Interakce entecaviru s transportéry.....	51
6.3.1	Interakce ETV s SLC transportéry	51
6.3.2	Interakce ETV s ABC transportéry	57

6.3.3	Cytotoxicita ETV	58
6.4	Interakce antivirových ANPs s transportéry.....	61
6.4.1	Interakce s SLC transportéry	61
6.4.2	Interakce ANPs s ABC transportéry	64
6.4.3	Posouzení transportéry zprostředkované cytotoxicity u ANPs.....	67
6.4.4	Relace afinity k OAT1 a lipofility u ANPs	69
6.5	Interakce amfotericinu B s transportéry	70
6.5.1	Ověření charakteru transportu AmB.....	70
6.5.2	Interakce AmB/DOC, AmB a DOC s hOAT1 a hOCT2.....	72
7	Diskuze	77
8	Závěr.....	90
9	Literatura.....	92
10	Seznam publikovaných vědeckých prací	105
10.1	Práce související s disertační prací	105
10.2	Seznam publikovaných vědeckých prací	105
11	Výstupy na odborných konferencích	107
12	Recenzované odborné články publikované v časopisech s impakt faktorem a související s tématem disertační práce	110

1 Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)
ADP	adenosindifosfát (Adenosine Diphosphate)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AmB	amfotericin B (Amphotericin B)
ANPs	acyklické nukleosidové fosfonáty (Acyclic Nucleoside Phosphonates)
APS	peroxodisíran amonný (Ammonium Persulfate)
ASBT	apikální na sodíku závislý transportér pro žlučové kyseliny (Apical Sodium Dependent Bile Acid Transporter)
ATP	adenosintrifosfát (Adenosine Triphosphate)
BCA	kyselina bicinchonová (Bicinchonic Acid)
BCRP	protein rezistence k rakovině prsu (Breast Cancer Resistance Protein)
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
C	kotransport (Cotransport, Symport)
CCD	zařízení s vázanými náboji (Charge-Coupled Device)
CL _L	ledvinná clearance (Renal Clearance)
CMV	cytomegalovirus
CNTs	koncentrační nukleosidové transportéry (Concentrative Nucleoside Transporters)
CYP3A4	cytochrom P450 3A4 (Cytochrome P450 3A4)
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid (Dimethyl Sulfoxide)
DOC	kyselina deoxycholová (Deoxycholic Acid)
E	výměník (Exchanger)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium (Eagle's Minimal Essential Medium)
ENTs	ekvilibrační nukleosidové transportéry (Equilibrative Nucleoside Transporters)
ETV	entecavir
F	facilitovaný transport (Facilitated Transport)
GMO	geneticky modifikovaný organismus (Genetically Modified Organism)
HBV	virus hepatitidy B (Hepatitis B Virus)
HCV	virus hepatitidy C (Hepatitis C Virus)

HEK293	lidské ledvinné embryonální buňky (Human Embryonic Kidney 293 Cells)
HeLa	lidské epiteliální buňky z nádoru děložního hrdla (Human Epithelial Carcinoma Cell Line)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HIV	virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus)
HK-2	lidské ledvinové buňky (Human Kidney Cells)
HPMP	3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl
HSV	herpes simplex virus
CHO	ovariální buňky čínského křečka (Chinese Hamster Ovary Cells)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace potřebná k inhibici procesu na 50 %
K _m	Michaelisova konstanta (Michaelis constant)
LDH	laktátdehydrogenáza (Lactate Dehydrogenase)
LLC-PK1	prasečí buňky proximálního tubulu ledvin (Pig Kidney Proximal Tubule Cell Line)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza (Mitogen Activated Protein Kinase)
MATE	transportér pro mnohočetný odtok léků a toxinů (Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter)
MDCK II	Madin-Darbyho psí ledvinné buňky (Madin Darby Canine Kidney Cells II)
MDR	transportér multilékové rezistence (Multiple Drug Resistance)
MDR1	gen kódující P-glykoprotein (Multidrug Resistance 1 Gene)
MPP ⁺	1-methyl-4-fenylpyridinium (1-methyl-4-phenylpyridinium)
MRPs	proteiny multilékové rezistence (Multidrug Resistance-Associated Proteins)
NaDC3	transportér dikarboxylátu sodného 3 (Sodium Dicarboxylate Transporter 3)
NBTI	nitrobenzylthioinosin (Nitrobenzylthioinosine)
NHE3	výměník pro ionty sodíku a vodíku 3 (Sodium-Hydrogen Exchanger 3)
NRTI	nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors)
NTs	nukleosidové transportéry (Nucleoside Transporters)
O	sirotčí transport (orphan transport)
OA-	organický aniont (Organic Anion)
OATPs	polypeptidové transportéry pro organické anionty (Organic Anion-Transporting Polypeptides)
OATs	transportéry pro organické anionty (Organic Anion Transporters)
OC ⁺	organický kationt (Organic Cation)
OCTN	transportér pro organické kationty, nový (Organic Cation Transporter, Novel)

OCTs	transportéry pro organické kationty (Organic Cation Transporters)
PAH	kyselina <i>p</i> -aminohippurová (<i>p</i> -Aminohippuric Acid)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PEPT	peptidový transportér (Peptide Transporter)
PME	2-(fosfonomethoxy)ethyl (2-(phosphonomethoxy)ethyl)
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride)
P-pg	P-glykoprotein (P-glycoprotein)
PVDF	polyviniliden fluorid (Polyvinylidene Fluoride)
RFU	relativní fluorescenční jednotka (Relative Fluorescence Unit)
RIPA	radioimunoprecipitační pufr (Radioimmunoprecipitation Buffer)
SARS	těžký akutní respirační syndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome)
SDS	dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SLC	nosiče rozpustných látek (Solute Carrier)
TBS	tris pufr (Tris-Buffered Saline)
TBST	tris pufr s tweenem 20 (Tris-Buffered Saline with Tween 20)
TCDB	databáze pro klasifikaci transportérů (Transporter Classification Database)
TDF	tenofovir disoproxil fumarát (Tenofovir Disoproxil Fumarate)
TEA	tetraethylammonium
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)
URAT1	urátový transportér 1 (Urate Transporter 1)
VZV	varicela-zoster virus
α -KG	α -ketoglutarát (α -ketoglutarate)

2 Úvod

Antimikrobiálně účinné látky patří v klinické praxi k nejčastěji užívaným léčivům. Jejich podávání pacientům v mnoha případech dokáže zabránit závažným následkům infekčních chorob (Leekha et al., 2011). Úspěšná léčba mikrobiálních infekcí často vyžaduje intenzivní terapii vysoce účinnými léčivy. Pro řadu léčiv používaných k terapii infekčních onemocnění je pro vyloučení z organismu důležitá ledvinná exkrece (Varma et al., 2009). Při užívání těchto léčiv mohou být pacienti vystaveni riziku nežádoucích účinků plynoucích z poškození ledvinné funkce. Taková léčiva se vyskytují např. ve skupině antivirotických účinných léčiv, u kterých se s rizikem lékového poškození ledvinné funkce můžeme setkat poměrně často (Naughton, 2008). Látky s potenciálním nefrotoxickým účinkem se také mohou vyskytovat mezi antimykoticky či antibakteriálně působícími léčivy.

Ledviny mohou být místem, kde může během ledvinné exkrece docházet k interakcím léčiv s membránovými transportními systémy (transportéry), které zajišťují transmembránový přenos léčiv a dalších látek do buněk nebo z buněk. Interakce s transportéry určují u řady látek distribuci v ledvinách a jejich exkreční mechanismus. Transportéry mohou být odpovědné za nežádoucí kumulaci xenobiotik v ledvinných buňkách a mohou být místem, na kterém dochází ke kompetici současně podávaných léčiv, což může významně ovlivnit jejich farmakokinetiku. Ačkoliv mají ledvinné lékové transportéry velký význam pro eliminaci, lékové interakce a nefrotoxické působení léčiv, údaje o interakcích s některými antimikrobiálními látkami nejsou stále dostatečné. U řady látek nejsou údaje o interakcích s transportéry exprimovanými v ledvinách v odborných zdrojích dostupné nebo jsou tyto interakce popsány v nedostatečném rozsahu. Získání dalších informací v této oblasti farmakologie je proto předmětem intenzivního výzkumu a mohlo by přispět k bezpečnějšímu používání antimikrobiálních léčiv.

Předkládaná disertační práce experimentálního charakteru se zabývá interakcemi vybraných látek ze skupiny antivirotik a antibiotik s lidskými lékovými transportéry, které se nacházejí v ledvinné tkáni v poměrně vysoké míře, a jsou známy jako důležité determinanty osudu mnoha léčiv v ledvinách. Práce je zaměřena na studium významu interakcí transportérů pro ledvinnou exkreci se studovanými antimikrobiálními látkami, na případné lékové interakce s vybranými léčivy a studium možných souvislostí s toxicitou studovaných látek. Práce uvádí popis použitého metodického aparátu, shrnuje dosažené experimentální výsledky, komentuje jejich vztah k již známým údajům v oblasti

interakcí léčiv s ledvinnými transportéry a uvádí i možné souvislosti získaných výsledků s klinickou praxí. Do předkládané práce je zařazena teoretická část shrnující dosavadní poznatky ve studované oblasti.

Experimentální studie v rámci této práce zahrnují tři typy antimikrobiálních léčiv: vývojové antivirotické účinné látky ze skupiny acyklických nukleosidových fosfonátů, novější léčivo pro terapii chronické hepatitidy B entecavir a významné antimykotikum amfotericin B, resp. jeho v klinické praxi používanou formu s deoxycholátem. Ledvinami vylučovaná antivirotika adefovir, tenofovir a cidofovir, byla použita pro porovnání intenzity interakce studovaných látek s vybranými transportéry a byla posouzena i z hlediska možných lékových interakcí se studovanými látkami.

3 Teoretická část

3.1 Ledviny jako kritický orgán podání léčiv

Lidský organismus je často vystavován mnoha vlivům prostředí, zejména toxickým organickým sloučeninám z přírodních i uměle připravených zdrojů. K těmto organickým sloučeninám mohou patřit např. hormony, neurotransmitery, odpadní produkty buněčného metabolismu a léčiva. Užívání léčiv vyžaduje od pacienta dodržování každodenního striktního režimu, mnohdy s užíváním vysokých dávek. Eliminační orgány vytváří obranný systém organismu, který částečně chrání před systémovou expozicí potenciálně toxických látek a jejich farmakologickými nebo toxikologickými efekty (Anzai a Endou, 2007).

Ledviny jsou důležitým eliminačním orgánem, který hraje nezastupitelnou úlohu v udržování homeostatických funkcí a přispívá k eliminaci odpadních produktů metabolismu a cizorodých látek z těla. Základní funkční jednotkou ledvin je nefron, kde probíhají hlavní procesy renální exkrece látek. V glomerulu a Bowmanově pouzdře dochází k filtraci krve přicházející z renální arterie, čímž se organismus zbavuje malých a na plazmatické proteiny nenavázaných látek ze systémové cirkulace. Řada látek, včetně léčiv, může být aktivně sekretována z peritubulárních kapilár do lumen ledvinných tubulů (Fagerholm, 2007; Masereeuw a Russel, 2001).

Membrána buněk ledvinných proximálních tubulů je důležitou bariérou, ve které probíhají transportní procesy spojené s detoxifikací organismu (Anzai a Endou, 2007). Membránové transportní proteiny, zvané také jako transportéry, zajišťují v proximálních tubulech aktivní transport látek přes buněčné membrány a jejich následnou exkreci do moči. Transportéry se tak významně podílejí na výsledném farmakokinetickém chování léčiv. Pokud je rovnováha transportních systémů narušena některým z patologických mechanismů, např. je-li neúměrně vystupňována akumulace potenciálně toxických látek v buňkách nebo je naopak zablokovan jejich výstup z buněk, může dojít k poškození ledvinné tkáně (Fisel et al., 2014). Změna funkce ledvin může být poté spojena s nefyziologickou aktivitou transportérů, což může významně ovlivnit farmakokinetiku jak léčiv eliminovaných ledvinami (Varma et al., 2009).

V současné době se na trhu vyskytuje řada léčiv, při jejichž dlouhodobém užívání se pacientovi doporučuje pravidelná kontrola renálních funkcí. Mezi takovými léčivy je mnoho látek ze skupiny antimikrobiálních léčiv. Z tohoto důvodu je poměrně důležitou oblastí výzkumu poznávání mechanismů ledvinných poškození těmito většinou

frekventně používanými látkami. Následující tabulka uvádí příklady některých potenciálně nefrotoických antimikrobiálních léčiv běžně užívaných v klinické praxi (tabulka 1).

Tab. 1 Antimikrobiální léčiva s potenciální nefrotoxicitou (modifikováno z Naughton, 2008).

Zástupci	Patofyziologický mechanismus renálního poškození
acyklovir	Akutní intersticiální nefritida, krystalová nefropatie
aminoglykosidy	Toxické poškození tubulárních buněk
amfotericin B (forma deoxycholátu více než forma lipidová)	Toxické poškození tubulárních buněk
beta-laktamy (peniciliny, cefalosporiny)	Akutní intersticiální nefritida, glomerulonefritida (ampicilin, penicilin)
foskarnet	Krystalová nefropatie, toxicita tubulárních buněk
ganciklovir	Krystalová nefropatie
pentamidin	Toxicita tubulárních buněk
chinolony	Akutní intersticiální nefritida, krystalová nefropatie (ciprofloxacin)
rifampicin	Akutní intersticiální nefritida
sulfonamidy	Akutní intersticiální nefritida, krystalová nefropatie
vankomycin	Akutní intersticiální nefritida
adefovir, cidofovir, tenofovir	Toxické poškození tubulárních buněk
indinavir	Akutní intersticiální nefritida, krystalová nefropatie

3.2 Ledvinná exkrece léčiv

Farmakokinetický profil molekuly léčiva je funkcí dávky, absorpce, distribuce a celkové clearance všemi eliminačními orgány. Ze všech eliminačních orgánů přispívají největším podílem k celkové tělesné clearance játra a ledviny. Vylučování látek

ledvinami nejlépe charakterizuje veličina ledvinná clearance (CL_L). Ledvinná clearance je definována jako objem plasmy, obsahující určité množství látky, která je vyloučena ledvinami za jednotku času (Rang a Dale, 2007). Ledvinná clearance je určována procesy glomerulární filtrace, tubulární sekrece a reabsorpce (Fagerholm, 2007; Masereeuw a Russel, 2001).

Ledvinami se vylučuje kolem 60 % sloučenin používaných k léčbě infekčních onemocnění. U řady léčiv používaných v terapii infekčních onemocnění byla prokázána tendence vylučování prostřednictvím tubulární sekrece (Varma et al., 2009).

Ledvinná exkrece může být ovlivňována transportéry exprimovanými v proximálních tubulech ledvin. Tyto transportéry se tak stávají styčnými místy, na nichž dochází k lékovým interakcím, a mohou být zodpovědné např. za nežádoucí akumulaci potenciálně nefrotoxických látek (Feng et al., 2010).

3.2.1 Vliv fyzikálně-chemických vlastností na ledvinnou exkreci léčiv

Varma et al. (2009) v rozsáhlé studii s využitím databáze s 391 léčivy běžně používanými v klinické praxi dokázali popsat složité vztahy mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek a lidskou ledvinnou clearance. Předpověď těchto vlastností je komplikována komplexností celého procesu aktivních a pasivních transportních mechanismů v ledvinách. Je možné popsat několik základních pravidel:

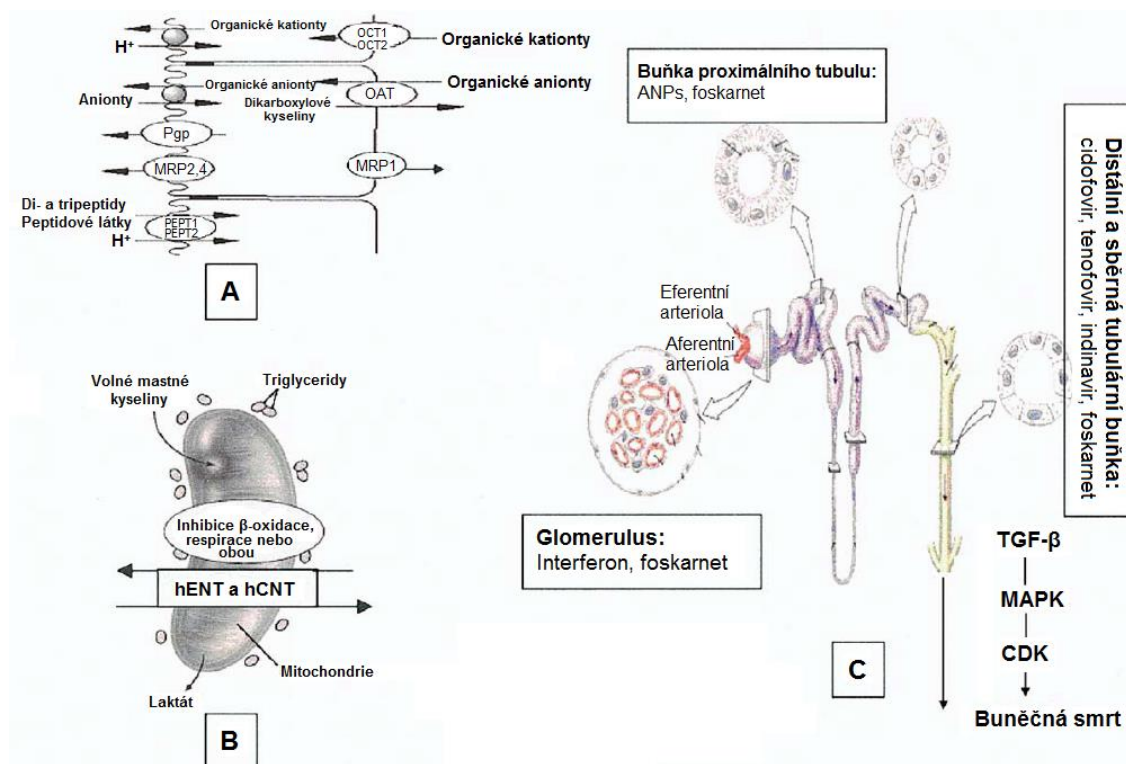
- 1) Ledvinná clearance se snižuje se zvyšující se lipofilitou látky a $cLogP$.
- 2) Ledvinná clearance se zvyšuje u látek se schopností tvořit vodíkové můstky nebo s počtem vazeb schopných rotace.
- 3) Přítomnost náboje látky může zvyšovat ledvinnou clearance, zatímco látky s neutrálním nábojem mají tendenci se vylučovat ledvinami pomaleji.

Vyšší lipofilita látky může dále přispět k jejímu pasivnímu průniku (reabsorpci) přes tubulární membrány a pravděpodobně také k částečnému či úplnému maskování tubulární sekrece (Avdeef, 2001; Feng et al., 2010; Varma et al., 2009).

3.3 Mechanismy lékového poškození ledvin

Pro antimikrobiálně působící léčiva je vylučování ledvinami obecně velmi častým způsobem exkrece. Ovšem následkem intenzivní močové exkrece může být nefrotoxicita, která se tak stává limitujícím faktorem léčby těmito látkami (Perazella, 2009). Takto

působí např. skupina antivirotických účinných léčiv, u kterých se s rizikem lékového poškození ledvinné funkce můžeme setkat poměrně často. Mechanismy antivirotické indukovaného poškození ledvin uvádí obr. 1. Funkce zdravého nefronu může být ovlivněna minimálně třemi způsoby: (1) Nadměrnou expresí nebo kompetitivní inhibicí transportérů označovaných jako OAT (transportéry pro organické anionty) nebo MRP (proteiny multilékové rezistence). Inhibicí OAT dochází k prevenci renálního poškození, zatímco inhibice MRP vede k toxickému poškození buněk tubulů (tubulární acidóze). Typickými představiteli takto působících látek jsou antivirotika ze skupiny acyklických nukleosidových fosfonátů (ANPs). (2) Aktivací mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK) dráhy může dojít k ovlivnění bariérové funkce v ledvinné epitelové buněčné kaskádě, což vede k programované buněčné smrti. (3) Jiné cesty poškození ledvin se mohou rozvinout, pokud látky negativně ovlivňují funkci mitochondrií, narušují oxidaci mastných kyselin a výrobu energie. Pokud se látky navážou nebo jinak deaktivují enzymy respiračního řetězce nebo mitochondriální DNA, vzniklý oxidativní stres a následný anaerobní metabolismus způsobí laktátovou acidózu a hromadění triglyceridů (mikrovezikulární tuk uvnitř buněk). Přítomnost reaktivních forem kyslíku může dále narušit mitochondriální DNA. Tento mechanismus účinku je charakteristický pro celou řadu látek, včetně nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy (NRTI), které se vážou přímo na mitochondriální DNA. Dále bylo popsáno, že předchozí mitochondriální poškození, způsobené např. použitím léčiv ze skupiny NRTI, může ledvinu natolik poškodit, že po podání tenofoviru snadno dochází k projevům poškození ledvinných tubulů (Izzedine et al., 2005a).



Obr. 1 Mechanismy antivirových indukovaného ledvinného poškození. A) Nadměrná exprese nebo kompetitivní inhibice OAT nebo MRP. B) Aktivace MAPK a následná buněčná smrt. C) Narušení funkce mitochondrií, oxidace mastných kyselin a výroby energie (modifikováno z Izzedine et al., 2005a).

3.4 Lékové interakce v ledvinách

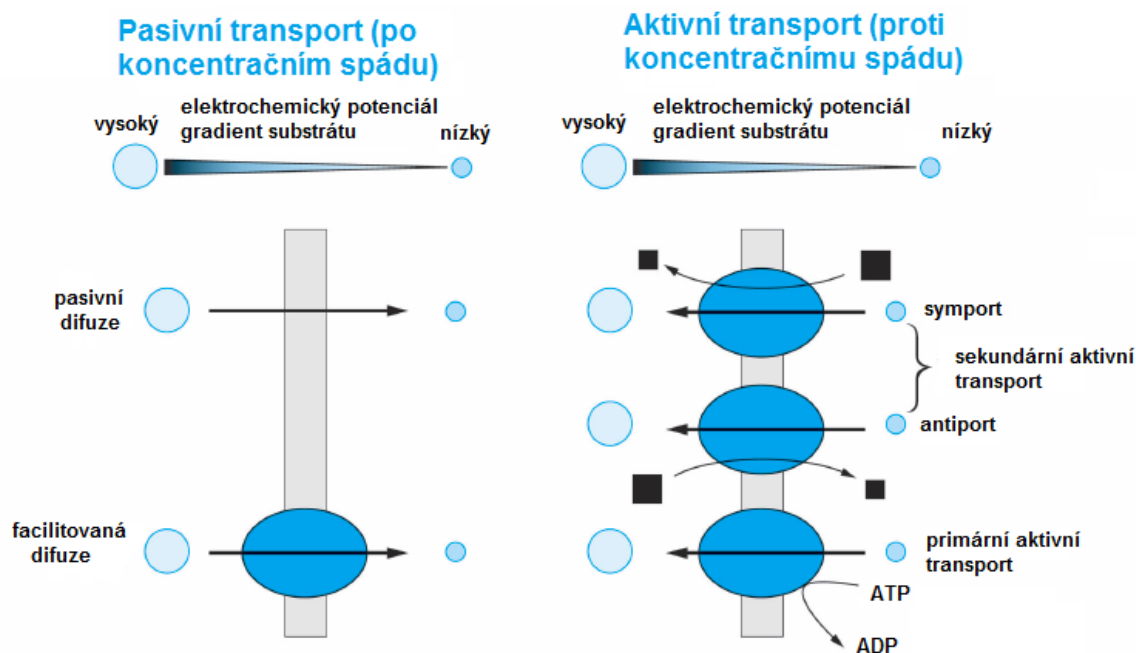
Pojem lékové interakce (interakce léčiv) může být vysvětlován jako vzájemné působení dvou nebo více farmak (Lüllmann et al., 2004). Při současném podávání léčiv, u nichž převládá ledvinná eliminace, se může vyskytnout několik typů interakcí (Bonate et al., 1998). Při určitém zjednodušení můžeme na ledvinné úrovni rozlišit 5 základních mechanismů lékových interakcí:

- 1) Uvolnění navázaného léčiva z vazby, což vede ke zvýšení vylučování léčiva pomocí glomerulární filtrace.
- 2) Kompetice látek při tubulární sekreci, čímž dochází ke snížení ledvinné sekrece.
- 3) Kompetice látek při tubulární reabsorpci, čímž dochází ke zvýšení ledvinné exkrece.
- 4) Změna pH moči a/nebo průtoku, což může zvýšit nebo snížit exkreci léčiv závislou na pKa léčiva.
- 5) Inhibice ledvinného metabolismu léčiv (Bonate et al., 1998).

V klinické praxi by proto měly být brány v úvahu potenciální farmakokinetické a/nebo farmakodynamické lékové interakce tak, aby se minimalizovalo riziko toxicity nebo nedostatečné účinnosti léčby (Izzedine et al., 2005a). Např. pro léčbu HIV pozitivních pacientů se předepisují kombinace několika antivirotických účinných látek současně s léčivými na přidružené nemoci, kterými pacienti často trpí (Berns a Kasbekar, 2006). Nevýhodou mnohých takto podaných léčiv (např. tenofovir) bývá nefrotoxicita, která je spojována s jejich nežádoucí akumulací v proximálních tubulech ledvin (Hall, 2013; Lepist a Ray, 2012). Příklady známých interakcí antimikrobiálních látek s membránovými transportními systémy, které se vyskytují v ledvinách, jsou detailněji vysvětleny v následujících kapitolách věnovaných individuálním léčivům (kap. 3.6-3.7).

3.5 Mechanismy transmembránového transportu

Transport látek přes biologické membrány může probíhat na základě pasivní difuze, usnadněné (facilitované) difuze a aktivního transportu. Pasivní difuze látek probíhá po směru elektrochemického potenciálu bez účasti transportních proteinů. Usnadněná difuze látek získává energii pro transport díky rozdílnému elektrochemickému potenciálu na vnitřní a vnější straně membrány. Aktivní transport látek probíhá proti jejich elektrochemickému gradientu a může být dále dělen na primární a sekundární. Primární aktivní transport látek využívá energii z hydrolýzy ATP. Sekundární aktivní transport látek probíhá díky tzv. spřaženému transportu s jinou látkou, která dodává energii díky transportu po jejím elektrochemickém gradientu (symport, antiport) (Giacomini a Sugiyama, 2011; Hediger et al., 2004; Schlessinger et al., 2010). Zjednodušený popis membránových transportních mechanismů shrnuje obr. 2. Substrátem se rozumí látka, která tvoří komplex s transportérem, který po následné konformační změně převádí substráty na druhou stranu membrány. Transportéry zprostředkovaný membránový transport je charakterizován saturabilitou a inhibovatelností substrátovými analogy (Giacomini a Sugiyama, 2011).



Obr. 2 Klasifikace membránových transportních mechanismů. Světle modré kruhy charakterizují substráty. Velikost symbolů je proporcionalní koncentraci substrátu. Šipky ukazují směr toku. Černé čtverce reprezentují ionty, které dodávají hnací sílu pro transport (velikost je proporcionalní koncentraci iontu). Tmavě modré ovály charakterizují transportní proteiny (modifikováno z Giacomini a Sugiyama, 2011).

Transportní systémy poskytují buňce řadu užitečných funkcí. Představují je specifické proteiny (transportéry) ukotvené v buněčné membráně, které: (1) umožňují vstup (uptake) základních živin do cytoplazmy a následně do organel, což usnadňuje metabolismus exogenních zdrojů prvků uhlíku, dusíku, síry, fosforu atp., (2) mohou pomoci regulovat koncentraci metabolitů látek v buňce, (3) zprostředkovávají účinný výdej (eflux) léčiv nebo jiných potenciálně toxických látek z cytoplazmy nebo z plazmatické membrány, (4) pomáhají zajišťovat uptake a eflux látek, které musí být v buňce udržovány v koncentracích lišících se od vnějšího prostředí, (5) podílí se na sekreci důležitých proteinů, sacharidů a lipidů do a z cytoplazmatické membrány, (6) umožňují přenos nukleových kyselin přes buněčné membrány, (7) usnadňují příjem a uvolňování různých hormonů, neurotransmiterů a signálních molekul (Saier et al., 2000).

Transportéry se od sebe mohou lišit různými afinitami a schopnostmi interagovat s jednotlivými sloučeninami. Schopnosti vzájemné interakce látek s buněčnými transportéry ovšem mohou být i mezidruhově rozdílné (Feng et al., 2010). Rozdíly ve farmakokinetice látek může také způsobovat přítomnost polymorfismů v genech kódujících příslušné lékové transportéry, které dané látky přenášejí (Michaud et al.,

2012). Tato velmi aktuální problematika, kterou se zabývá především farmakogenomika a personalizovaná medicína, se dnes poměrně intenzivně rozvíjí s cílem získat znalosti pro doporučení, kterému pacientovi je možné podat dané léčivo, a u kterého hrozí nežádoucí účinky. Pro zajištění účinnější a bezpečnější terapie je ovšem nutná i detailní znalost transportních procesů u jednotlivých léčiv.

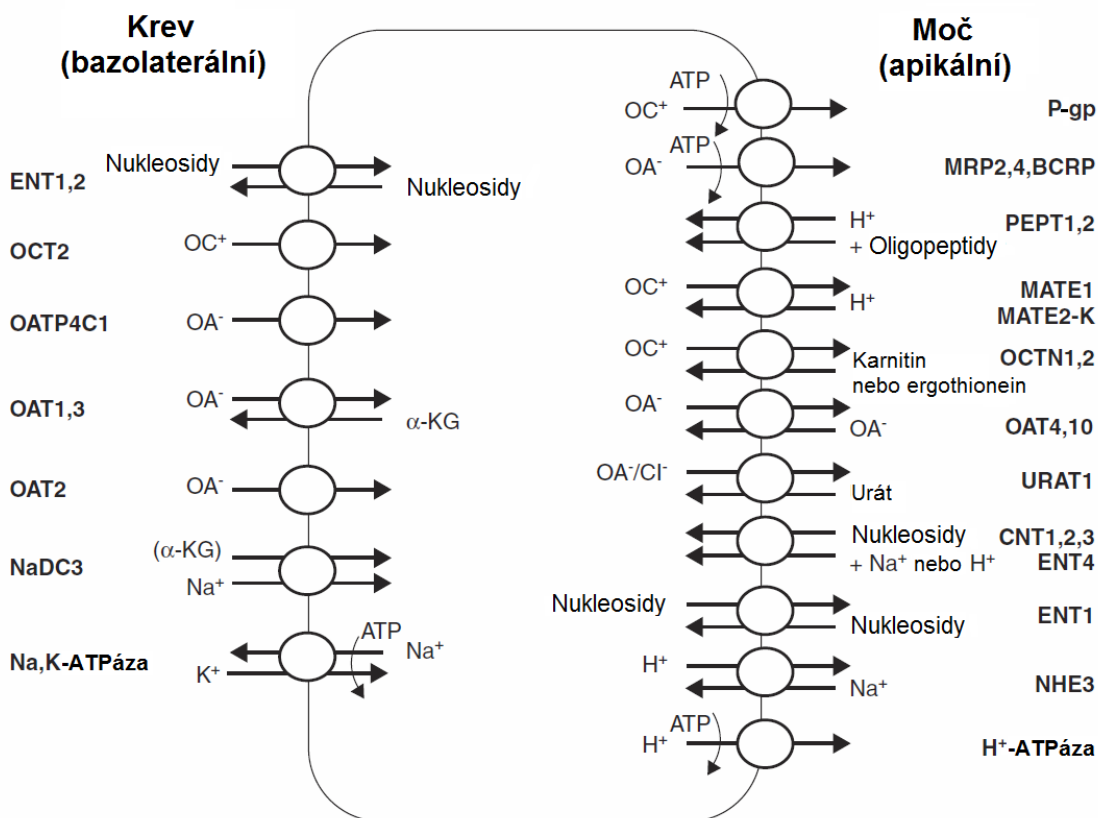
Základní informace o klasifikaci transportních proteinů se stále rozšiřují a aktualizují. Známa je např. databáze Transporter Classification Database (TCDB; <http://www.tcdb.org>), která v roce 2013 obsahovala více než 10000 proteinů, které reprezentují v současné době uznávané rodiny transmembránových molekulárních transportních systémů. TCDB zahrnuje proteiny všech druhů živých organismů a je jediným univerzálním klasifikačním systémem, který je uznaný Mezinárodní unií biochemie a molekulární biologie (Saier et al., 2014).

3.6 Transportéry exprimované v ledvinách

Exkrece mnoha léčiv z organismu je zprostředkována specifickými membránovými transportéry exprimovanými v ledvinách. Příkladem léčiv eliminovaných do moči mohou být hydrofilní nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy. Ačkoliv renální exkrece hraje menší roli v eliminaci dalších antivirotik, jako jsou např. inhibitory proteázy a nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, tato léčiva mohou interagovat s transportéry lokalizovanými v ledvinách (Kis et al., 2010). V současné době je známo široké spektrum transportérů exprimovaných v proximálních tubulech ledvin, které reprezentují 2 velké rodiny (superfamilies) transportérů označované jako SLC (solute carrier) a ABC (ATP-binding cassette) (viz dále). Tyto transportéry vzájemně spolupracují, aby umožnily přenos látek dovnitř či ven přes buněčnou membránu (Fisel et al., 2014).

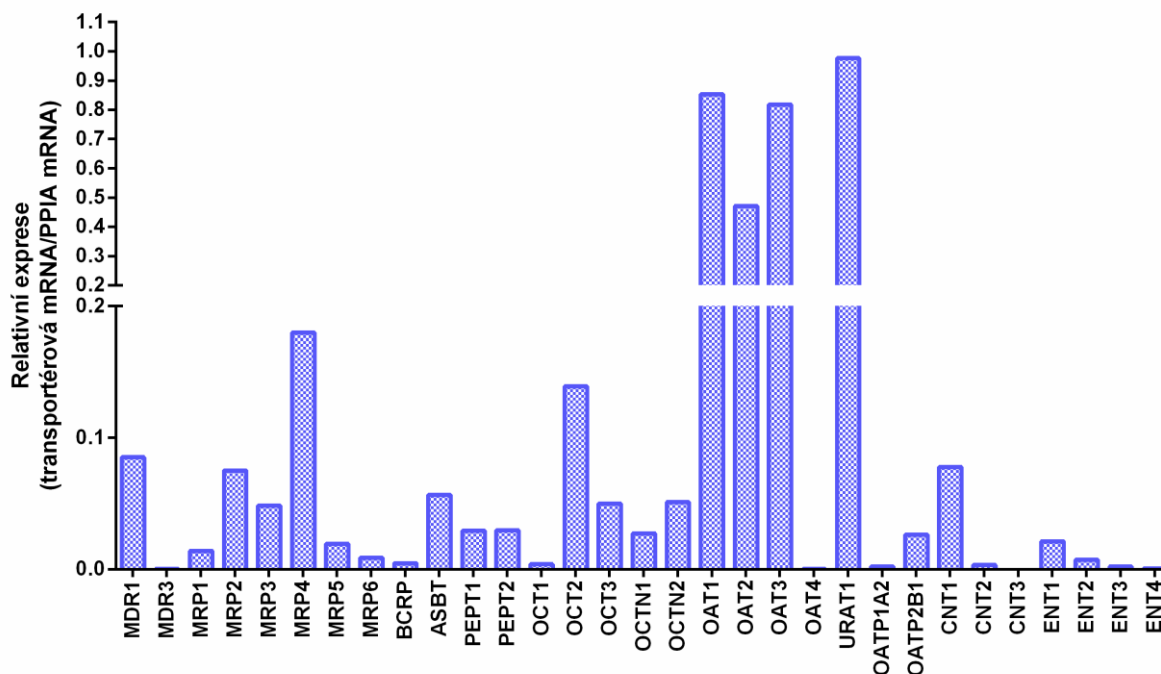
Transport organických aniontů a kationtů přes basolaterální membránu prostřednictvím OAT1-3, OCT1-3 a OATP4C1 představuje první krok v ledvinné sekreci. Látky, které se dostaly z krve do buněk proximálních tubulů, jsou následně převáděny efluxními transportéry umístěnými na apikální membráně (např. MRP2, MRP4, BCRP, P-gp a MATE1) do moči. Reabsorpce látek v ledvinách může být z moči do buněk zjišťována apikálními transportéry (např. CNT1-3, OAT4, URAT1, PEPT1-2 a OCTN1-2) a následně z buněk ven např. basolaterálními transportéry ENT1-2 (Klaassen a Aleksunes, 2010; Lepist a Ray, 2012). Pro lepší orientaci v textu jsou transportéry

uvedeny zkratkou. Zkratky jsou dále vysvětleny s obr. 3 a v dalších specializovaných kapitolách. Obr. 3 popisuje lokalizaci a základní funkce transportérů exprimovaných v lidských proximálních tubulech.



Obr. 3 Transportéry exprimované v lidských ledvinných proximálních tubulech. Kroužky zházorňují transportní proteiny a šipky směr transportu látek. BCRP = Breast Cancer Resistance Protein (protein rezistence k rakovině prsu), CNT = Concentrative Nucleoside Transporter (koncentrační nukleosidový transportér); ENT = Equilibrative Nucleoside Transporter (ekvilibrační nukleosidový transportér); MATE = Multidrug and Toxin Compound Extrusion Transporter (transportér pro mnohočetný odtok léků a toxinů); MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein (protein multilékové rezistence); NaDC3 = Sodium Dicarboxylate Transporter 3 (transportér dikarboxylátu sodného 3); NHE3 = Sodium-Hydrogen Exchanger 3 (výměník pro ionty sodíku a vodíku 3); OAT = Organic Anion Transporter (transportér pro organické anionty); OATP = Organic Anion-Transporting Polypeptide (polypeptidový transportér pro organické anionty); OCT = Organic Cation Transporter (transportér pro organické kationty); OCTN = Organic Cation Transporter, Novel (transportér pro organické kationty, nový); PEPT = Peptide Transporter (peptidový transportér); P-gp = P-glycoprotein (P-glykoprotein); URAT = Urate Transporter (urátový transportér); α -KG (α -ketoglutarát) (modifikováno z Lepist a Ray, 2012).

V největším množství jsou v ledvinách zastoupeny transportéry OAT1-3, URAT1, OCT2, MRP4 a MDR1 (P-gp) (Nishimura a Naito, 2005). Srovnání exprese jednotlivých transportérů v ledvinách uvádí obr. 4.



Obr. 4 Hodnoty mRNA exprese SLC a ABC transportérů v lidských ledvinách. MDR = Multidrug Resistance (transportéry multilékové rezistence); MRP = Multidrug Resistance-Associated Protein (protein multilékové rezistence); BCRP = Breast Cancer Resistance Protein (protein rezistence k rakovině prsu); ASBT = Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter (apikální na sodíku závislý transportér pro žlučové kyseliny); PEPT = Peptide Transporter (peptidový transportér); OCT = Organic Cation Transporter (transportér pro organické kationty); OCTN = Organic Cation Transporter, Novel (transportér pro organické kationty, nový); OAT = Organic Anion Transporter (transportér pro organické anionty); URAT = Urate Transporter (urátový transportér); OATP = Organic Anion-Transporting Polypeptide (polypeptidový transportér pro organické anionty); CNT = Concentrative Nucleoside Transporter (koncentrační nukleosidový transportér); ENT = Equilibrative Nucleoside Transporter (ekvilibrační nukleosidový transportér) (modifikováno z Lepist a Ray, 2012).

3.6.1 Solute carrier (SLC) transportéry

SLC transportéry jsou membránové proteiny, které mají rozhodující význam pro buněčný uptake, ale také eflux velkého množství substrátů, jako jsou např. esenciální buněčné živiny, toxiny a léčiva. V současné době je známo celkem 386 členů SLC transportérů, které se odlišují svojí sekvencí, strukturou a funkcí (Schlessinger et al., 2013). Tito členové se dle své příslušnosti zařazují do menších skupin (rodin) SLC

transportérů, kterých rozeznáváme celkem 52 (SLC1-SLC52). SLC transportéry hrají důležitou roli při zajištění mnoha buněčných funkcí. Mohou se také podílet na formování léčiv regulací jejich absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME) (Koepsell, 2013).

Tvar a fyzikálně-chemické vlastnosti vazebného místa na SLC transportéru obvykle určují, jaká molekula se na něj bude nebo nebude vázat, a zda jím bude nebo nebude transportována přes buněčnou membránu. Interagující molekuly lze pak rozdělit na inhibitory, substráty a současně inhibitory/substráty transportérů (Abramson a Wright, 2009; Karpowich a Wang, 2008, Schlessinger et al., 2013). Substráty SLC transportérů mohou mít i velmi odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro řadu léčiv je typické, že interagují s několika typy SLC transportérů. Např. léčiva používaná proti virům interagují s řadou SLC transportérů, jako jsou polypeptidové transportéry pro organické anionty (OATPs), transportéry pro organické anionty a kationty (OATs a OCTs) a rovněž s ekvilibračními a koncentračními nukleosidovými transportéry (ENTs a CNTs) (Kis et al., 2010). Typy SLC transportérů a jejich možných substrátů je možné vyhledat v dostupných databázích, jako je např. Bioparadigms (<http://slc.bioparadigms.org/>).

Ledvinné influxní transportéry mohou být zodpovědné nejen za toxicitu léčiv v ledvinách, ale také za potenciální interakce typu léčivo-léčivo, které mohou vyústit v závažné změny v ledvinných exkretčních parametrech a ovlivnit farmakokinetiku (Endres et al., 2006; Müller a Fromm, 2011).

3.6.1.1 SLC22

Tato práce se zabývá v největší míře transportéry pro organické ionty (rodina SLC22), které přispívají k ledvinné a jaterní exkreci mnoha léčiv (Koepsell, 2013). Rodina transportérů SLC22 se skládá v současné době ze 13 popsaných lidských membránových proteinů, které se všechny vyznačují strukturou 12 α -helikálních transmembránových domén. Rodina se skládá ze skupiny transportérů pro organické kationty, transportérů pro organické zwitterionty/kationty (OCTN) a transportérů pro organické anionty. Tyto transportéry se podílejí nejen na ledvinném a jaterním vylučování látek, ale i na jejich střevní absorpci a homeostatických funkcích v srdci a mozku. Tabulka 2 shrnuje charakteristické vlastnosti členů rodiny transportérů SLC22 exprimovaných v ledvinách, jejich dominantní substráty, typ transportu, další tkáňovou distribuci a možná postižení spojená s popisovaným typem transportéru. Tabulka 3 uvádí transportéry rodiny SLC22 a jejich známé substráty ze skupiny endogenních látek, léčiv a toxinů.

Tab. 2 Základní charakteristika transportérů pro organické kationty/anionty/zwitterionty z rodiny SLC22 (modifikováno z Koepsell, 2013).

Symbol lidského genu	Jméno proteinu	Dominantní substrát	Typ transportu	Tkáňová distribuce/buněčná exprese	Způsobené postižení
SLC22A1	OCT1	Organické kationty	F	Játra, tenké střevo, ledviny, plíce, kosterní svalstvo, mozek, tuková tkáň, buňky imunitního systému	Cytotoxicita oxaplatiny a picoplatiny
SLC22A2	OCT2	Organické kationty	F	Ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů), tenké střevo, plíce, placenta, mozek, vnitřní ucho	Cytotoxicita cisplatin, oxaplatiny a picoplatiny
SLC22A3	OCT3	Organické kationty	F	Srdce, kosterní svalstvo, mozek, tenké střevo, játra, plíce, ledviny, močový měchýř, mléčné žlázy, kožní cévy	Rakovina prostaty, ischemická choroba srdeční, obsedantně kompulsivní poruchy
SLC22A4	OCTN1	Zwitterionty organické kationty	F nebo E/H ⁺	Ledviny, střevo, slezina, srdce, kosterní svalstvo, mozek, mléčné žlázy, prostata, dýchací cesty, varlata, oči, játra plodu, sperma, buňky imunitního systému	Revmatoidní artritida, Crohnova nemoc
SLC22A5	OCTN2	Zwitterionty (<i>L</i> -karnitin), organické kationty	C (Na ⁺ a <i>L</i> -karnitin) F (organické kationty)	Kosterní svalstvo, ledviny (apikální membrána proximálních tubulů), prostata, plíce, slinivka, srdce, tenké střevo, nadledviny, štítná žláza, játra, atd.	Primární systémová karnitinová nedostatečnost, Crohnova nemoc

SLC22A6	OAT1	Organické anionty	E (organické anionty)	Ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů), placenta, mozek	
SLC22A7	OAT2	Organické anionty	F nebo E	Játra, ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů)	
SLC22A8	OAT3	Organické anionty	E/dikarboxylát	Ledviny (bazolaterální membrána proximálních tubulů), mozek, kosterní svalstvo, kost	
SLC22A1 1	OAT4	Organické anionty	F nebo E	Ledviny (luminální membrána proximálních tubulů), placenta	Snížená plazmatická hladina kyseliny močové
SLC22A1 2	URAT1	Urát, organické anionty	E/organické anionty	Ledviny	Renální hypourikémie, dna
SLC22A1 3	OAT10	Urát, organické anionty	E/anionty	Ledviny, tlusté střevo, tenké střevo, mozek, srdce	Cyklosporinem A indukovaná hyperurikémie
SLC22A1 4	OCTL2	Neurčeno	O	Ledviny, tlusté střevo, tenké střevo	
SLC22A1 5	FLIPT1	Neurčeno	O	Ledviny, mozek, játra, kosterní svalstvo, srdce, placenta, plíce, slezina	
SLC22A1 6	OCT6	L-karnitin, nenabitě sloučeniny	F	Varlata, kostní dřeň, leukocyty, ledviny	Bipolární porucha
SLC22A1 8		Pravděpodobně organické anionty		Ledviny (apikální membrána proximálních tubulů)	

F - facilitovaný transport, E – exchange (výměna), O – orphan transport, C – kotransport

Tab. 3 Významné substráty transportérů rodiny SLC22^a (modifikováno z Koepsell, 2013).

Transportér	Substráty, endogenní sloučeniny a doplňky stravy	Léčiva	Toxiny
OCT1 SLC22A1	Putrescin, cyklo(His-Pro), salsolinol, agmatin	Metformin, lamuvidin, acyclovir, ganciclovir, pentamidin, furamidin, berberin, oxaliplatin, picoplatin, cisdiammin(pyridin)chloro platina(II), irinotecan, paclitacel	Aflatoxin B1, ethidium bromid
OCT2 SLC22A2	Acetylcholin, dopamin, adrenalin, noradrenalin, serotonin, histamin, putrescin, cholin, cyklo(His-Pro), salsolinol, agmatin	Memantin, amantadin, oxaliplatina, picoplatina, cisplatina, ifosfamid, cimetidin, famotidin, ranitidin, zalcitabin, lamuvidin, amilorid, metformin, berberin	Aflatoxin B1, paraquat, ethidium bromid
OCT3 SLC22A3	Adrenalin, noradrenalin, histamin, agmatin, cyklo(His-Pro), salsolinol	Lidocain, chinidin, metformin, etilefrin, oxaliplatina, lamuvidin	
OCTN1 SLC22A4	Acetylcholin, ergothionein, glycinbetain, L-karnitin	Chinidin, pyrilamin, verapamil, ipratropium, tiotropium, mitoxantron, doxorubicin, stachydrin, betonicin, gabapentin	
OCTN2 SLC22A5	L-karnitin, cholin	Mildronát, cefaloridin, emetin, pyrilamin, verapamil, spironolakton, oxaliplatina, ipratropium, tiotropium	
OAT1 SLC22A6	Mastné kyseliny se středním řetězcem, -ketoglutarát, citrullin, cAMP, cGMP, prostaglandin E2, prostaglandin F2, urát, vanilmandlová kyselina, sulfatované konjugáty flavonoidů, hydroxyskořicové kyseliny	Tetracyklin, acyklovir, adefovir, cidofovir, ganciclovir, tenofovir, zidovudin, cimetidin, ranitidin, bumetanid, furosemid, ibuprofen, indometacin, ketoprofen	Perfluoro oktanová kyselina, 8-methoxy-6-nitrofenanthro [3,4-d]-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina
OAT2 SLC22A7	Glutamát, glutarát, urát, L-askorbát, kyselina orotová, trigonellin, hypoxanthin, GMP, GDP, GTP, cGMP, cAMP, prostaglandin E2, prostaglandin F2,	Salicylát, bumetanid, erythromycin, tetracyklin, zidovudin, ranidin, 5-fluorouracil, paclitaxel, alopurinol, methotrexát, taxol	Aflatoxin B1

	estron-3-sulfát, dehydroepiandrosteron sulfát, α -ketoglutarát		
OAT3 SLC22A8	cAMP, kortisol, prostaglandin E2, prostaglandin F2a, dehydroepiandrosteron sulfát, estron sulfát, estradiol-17 β -glukuronid, taurocholát, cholát, urát, indoxyl sulfát, glukuronidované konjugáty flavonoidů, vanilmandlová kyselina, konjugáty kyseliny hydroxyskořicové	Benzylpenicillin, tetracyclin, valacyclovir, zidovudine, adefovir, cidofovir, tenofovir, aktivovaný oseltamivir, cimetidin, famotidin, ranitidin, fexofenadin, bumetanid, furosemid, torasemid, indometacin, salicylát, ketoprofen, ibuprofen, pravastatin, rosuvastatin, methotrexát, topotecan, quinaprilát, sitagliptin, edaravon sulfát	Ochratoxin A, perfluoro oktanová kyselina, aflatoxin B1, 8-methoxy-6- nitro- fenanthro[3,4- d]-1,3-dioxolo- 5-karboxylová kyselina
OAT4 SLC22A11	Estron-3-sulfát, urát, prostaglandin E2, prostaglandin F2, dehydroepiandrosteron sulfát, sulfát kyseliny hydroxyskořicové	Torasemid	Aflatoxin B, ochratoxin A
URAT1 SLC22A12	Urát, <i>L</i> -laktát, nikotinát	Pyrazinkarboxylová kyselina	
OAT10 SLC22A13	Nikotinát, <i>L</i> -laktát, urát, sukcinát, glutathion	Cyklosporin A, pyrazinoát	
OCT6 SLC22A16	<i>L</i> -karnitin, spermidin	Doxorubicin, bleomycin A5	

^a V minulosti byla identifikována řada látek jako inhibitory SLC22 transportérů, ovšem jejich substrátová specifita nebyla zkoumána.

Nejvíce exprimovanými transportéry typu OAT a OCT v lidských proximálních tubulech jsou OAT1 a OCT2 (Klaassen a Aleksunes, 2010). Pro jejich významnou přítomnost v ledvinách jim v této práci byla věnována největší pozornost. Detailnější charakteristika těchto transportérů je uvedena v následujícím textu.

Transportéry pro organické anionty (OATs)

OATs hrají důležitou úlohu v ledvinné eliminaci léčiv a mají vliv na jejich farmakokinetické vlastnosti. OATs se podílejí na transportu organických aniontů z krve do moči (Xu, 2005). OATs se řadí k tzv. polyspecifickým transportérům. Vykazují širokou substrátovou specifitu a interagují s velkým množstvím nízkomolekulárních látek (do 400-500 Da) amfifilních organických aniontů různých chemických struktur. OATs

interagují také s hydrofobními látkami, nenabitými molekulami a dokonce i s některými organickými kationty (Ahn et al. 2009; Burckhardt a Wolff, 2000; Pritchard a Miller, 1993; Sweet a Pritchard, 1999; Ullrich, 1997; Van Aubel et al., 2000). Typickým substrátem je např. kyselina *p*-aminohippurová (PAH) (Rizwan a Burckhardt, 2007; Sekine et al., 2006). Tabulka 3 mimo jiné uvádí některá často používaná léčiva, u kterých lze očekávat interakce s OAT. Vzhledem k lokalizaci v epitelálních buňkách mnoha orgánů (tabulka 2) mohou OAT hrát významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci klinicky významných léčiv (Eraly et al., 2004; Shugarts a Benet, 2009; Sweet et al., 2001).

Většina OAT pracuje na principu aniontových výměníků (exchangers). Příjem organického aniontu do buňky je doprovázen výdejem jiného organického aniontu z buňky ven. K tomuto ději dochází především díky výměně za intracelulární α -ketoglutarát s využitím energie z jeho intracelulárního > extracelulárního gradientu, která pohání uptake OAT substrátů (obr. 3) (Giacomini a Sugiyama, 2011).

Řada potenciálně nefrotoxických látek ze skupiny antimikrobiálních léčiv je do ledvin dopravována pomocí OATs. Akumulace toxických látek v nefronu prostřednictvím OAT pak může být počátečním impulzem pro rozvoj akutního renálního poškození (Cihlar et al., 1999; Jariyawat et al., 1999; Jung et al., 2002; Khamdang et al., 2003; Tsuda et al., 1999). OATs mohou být také místem potenciálních interakcí typu léčivo-léčivo díky kompetici dvou nebo více látek o stejný transportér (Rizwan a Burckhardt, 2007). Důležitým příkladem klinického využití této kompetice je např. preventivní strategie pro snížení akumulace tenofoviru v proximálních tubulech současným podáním probenecidu, který je známým inhibitorem transportérů pro organické anionty (Hall, 2013).

Transportér OAT1

Transportér OAT1 spolu s transportérem OAT3 patří k nejvíce exprimovaným transportérům na bazolaterální membráně epitelálních buněk ledvinných tubulů (Bleasby et al., 2006; Lu et al., 1999). OAT1 zajišťuje spolu s OAT3 první krok tubulární sekrece organických aniontů, tj. přechod organických aniontů z krve přes bazolaterální membránu buněk proximálního tubulu (Rizwan a Burckhardt, 2007; Wright a Dantzler, 2004). OAT1 interaguje s velkým množstvím endogenních i exogenních organických aniontů. Z exogenních organických aniontů jsou to např. některá léčiva ze skupiny

antihypertenziv, statinů, antibiotik, antagonistů histaminového receptoru 2, nesteroidních antiflogistik a mnoho dalších látek (Riedmaier et al., 2012). Detailnější seznam látek interagujících s OAT1 je uveden v tabulce 3. OAT1 akceptuje i hydrofilní látky s relativně nízkou molekulovou hmotností, které nemají negativní náboj, jako jsou např. antivirotika typu acyklických nukleosidových analogů (Maeda a Sugiyama, 2013; Mandíková et al., 2013). Substráty či inhibitory OAT1 endogenního původu jsou např. hormon dehydroepiandrosteron sulfát (Hasegawa, 2003), purinové metabolity xantin a hypoxantin (Sugawara et al., 2005), či metabolity neurotransmiterů noradrenalinu, dopaminu a serotoninu (Bahn et al., 2005).

Buněčné experimenty *in vitro* ukázaly, že exprese hOAT1 je spojena s cytotoxickým působením adefoviru a cidofoviru (Ho et al., 2000). V podobném modelu byl testován efekt záměrně vytvořené lékové interakce na hOAT1 mezi adefovirem a nesteroidními antiflogistiky. Tento experiment demonstroval, že současné podání těchto léčiv vede ke snížení cytotoxického účinku adefoviru v buňkách exprimujících OAT1, což potvrdilo důležitost zkoumaného transportéru pro toxické účinky adefoviru (Mulato et al., 2000).

Transportéry pro organické kationty (OCTs)

OCTs jsou exprimovány na bazolaterální membráně buněk proximálního tubulu ledvin (Karbach et al., 2000; Motohashi et al., 2002). Podílí se na ledvinné exkreci široké škály organických kationtů endogenního původu (hormony, neurotransmitery, kreatinin, aj.) i exogenních molekul (antivirotika, antidiabetika, cytostatika, a další) (Jung et al., 2008; Koepsell et al., 2007; Zhang et al., 2006). Přehled známých substrátů OCTs uvádí tabulka 3. OCTs usnadňují vstup látek do buňky facilitovanou difuzí. Hnací silou určující směr transportu je elektrochemický gradient transportovaných organických kationtů. Následný přestup organických kationtů přes apikální membránu do moči je stimulován díky opačnému protonovému gradientu (obr. 3). Substráty OCT jsou strukturně odlišné organické kationty hydrofilního charakteru s relativně malou molekulovou hmotností (do 400 Da) (Klaassen a Aleksunes, 2010). Tetraethylammonium (TEA) a 1-methyl- 4-fenylpyridinium (MPP⁺) se používají jako prototypické substráty OCTs (Jonker a Schinkel, 2004).

Transportér OCT2

OCT2 je považován především za ledvinný transportér, který je převážně lokalizován v bazolaterální membráně buněk proximálních tubulů (Gorboulev et al., 1997). OCT2 interaguje s řadou kationických látek jako jsou např. cimetidin, nikotin, chinin a chinidin, cisplatina (Koepsell, 2004; Filipiński et al., 2008). OCT2 preferuje při transportu malé hydrofilní substráty, zatímco OCT1 dává přednost větším a hydrofobnějším látkám (Cano-Soldado a Pastor-Anglada, 2011; Dresser et al., 2002). Substráty OCT2 jsou některá antiretrovirotika (lamivudin, zalcitabin), která nesou při fyziologickém pH kladný náboj (Jung et al., 2008; Taubert et al., 2007). OCT2 se může podílet také na některých lékových interakcích (Müller a Fromm, 2011). Některé inhibitory proteázy (např. nelfinavir, ritonavir, saquinavir a indinavir) v *in vitro* podmínkách silně inhibovaly uptake lamivudinu prostřednictvím OCT1 a OCT2 (Zhang et al., 2000). Inhibiční vliv na OCT2 má antivirotikum používané proti hepatitidě C telaprevir. Novější doporučení uvádějí, že současné podávání léčiv, které jsou substráty tohoto transportéru, by mělo být monitorováno (Kunze et al., 2012). Dalším inhibitorem OCT2 je např. novější antiretrovirotikum dolutegravir (Reese et al., 2013). Na druhou stranu, vhodné inhibitory OCT2 jsou doporučovány k dalšímu klinickému výzkumu jako specifické modifikátory nefrotoxicity způsobené cisplatinou (Sprowl et al., 2013).

3.6.1.2 SLC28 a SLC29

Lidský genom obsahuje tři geny rodiny SLC28 (SLC28A1, SLC28A2 a SLC28A3), které kódují tři koncentrační nukleosidové transportérové proteiny (CNT1-3) a čtyři geny rodiny SLC29 (SLC29A1, SLC29A2, SLC29A3 a SLC29A4), které kódují čtyři ekvilibrační nukleosidové transportérové proteiny (ENT1-4). Obě tyto rodiny transportérů hrají důležitou roli při ledvinné sekreci a reabsorpci endogenních nukleosidů a nukleosidových léčiv (Mangravite et al., 2003; Young et al., 2013). NTs jsou v těle široce distribuovány. Kromě ledvinné tkáně se NTs mohou nacházet např. ve střevě, hematoencefalické bariéře, placentě a v játrech (Gray et al., 2004; Chang et al., 2004). Mimo jiných látek NTs transportují i řadu antivirotik, např. ribavirin (Jarvis et al., 1998) a některé nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (Kis et al., 2010).

Z hlediska ledvinného transportu lze pokládat za nejdůležitější koncentrační nukleosidové transportéry typu 2 a 3. Z tohoto důvodu je v dalším textu připojena podrobnější charakteristika těchto transportérů. Pro úplnost informací týkajících se

nukleosidových transportérů jsou též uvedeny základní informace o ekvilibračních transportérech.

Koncentrační nukleosidové transportéry (CNTs)

CNTs představují membránové pumpy, kterými se nukleosidy dostávají do buňky (Ritzel et al., 1997, 1998, 2001). CNTs pracují na principu kotransportu s Na^+ (Elwi et al., 2006; Mangravite et al., 2003). V ledvinných buňkách CNTs vzájemně spolupracují, aby zprostředkovaly transmembránový přechod relevantních nukleosidů a jejich analogů. Všechny tři typy CNTs transportují uridin, avšak v různé míře akceptují i další substráty. Zatímco CNT1 vykazuje selektivitu pro pyrimidinové nukleosidy (v menší míře transportuje adenosin), CNT2 preferuje purinové nukleosidy a CNT3 je schopen transportovat jak purinové, tak i pyrimidinové nukleosidy. V ledvinné tkáni se CNTs vyskytují na apikální membráně buněk proximálních tubulů a podílejí se na reabsorpci látek z moči do buňky (Klaassen a Aleksunes, 2010; Mangravite et al., 2003).

CNT3 se mírně odlišuje od CNT1 a CNT2 ve dvou rysech. Za prvé, poměr transportovaného Na^+ : nukleosidu pro CNT3 je 2 : 1, zatímco pro ostatní dva CNTs je tento poměr 1 : 1. Za fyziologických podmínek dokáže CNT3 koncentrovat nukleosidy v buňce přibližně 10 krát intenzivněji než CNT1 a CNT2. Transport nukleosidů nebo nukleosidových analogů prostřednictvím CNT3 proto může hrát důležitou úlohu i v ledvinné tkáni, přestože je zde exprese tohoto transportéru relativně nízká. Za druhé, CNT3 představuje málo selektivní transportér pro nukleosidové substráty purinového a pyrimidinového typu. Interaguje s větším množstvím terapeuticky užívaných nukleosidových analogů a díky tomu může hrát důležitou roli v absorpci, distribuci a eliminaci těchto léčiv (Ritzel et al., 2001).

CNT2 zprostředkovává uptake antivirových purinových derivátů, jako jsou kladribin, fludarabine a klofarabin (Cano-Soldado a Pastor-Anglada, 2011; King et al., 2006; Lang et al., 2001). CNT2 je chopen transportovat 5-fluorouridin a 5-fluoro-2'-deoxyuridin (King et al., 2006; Lang et al., 2001). Guanosinový analog ribavirin je známým substrátem nejen CNT2, ale i CNT3 (Yamamoto et al., 2007). V *in vivo* podmínkách byl také dokázán transport zidovudinu a lamivudinu pomocí CNT1 (Cano-Soldado et al., 2004; Lostao et al., 2000; Ritzel et al., 1997) a didanosinu prostřednictvím CNT2 (Ritzel et al., 1998), zatímco afinita zidovudinu a didanosinu k CNT3 byla relativně nízká (Ritzel et al., 2001).

Ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENTs)

Ekvilibrační nukleosidové transportéry zprostředkovávají usnadněnou difuzi širokého spektra nukleosidů, ke kterým mají ovšem relativně nižší afinitu než CNTs. ENTs bývají klasifikovány jako nízkoafinitní a na sodíku nezávislé transportéry. ENT pracují jako influxní transportéry, ale mohou zajišťovat i transport adekvátních substrátů z buňky ven (Baldwin et al., 2004; Young et al., 2008). ENT1 a ENT2 jsou v lidské tkáni široce distribuovány. V ledvinách se ENTs převážně vyskytují na basolaterální membráně epiteliálních buněk a účastní se reabsorpce nukleosidů zpět do krve (Lai et al., 2002; Mangravite et al., 2003). ENT1 se ovšem vyskytuje i na apikální membráně proximálních tubulů a Henleovy kličky (Damaraju et al., 2007). ENT1 je exprimován také v mitochondriích, kde se může podílet na buněčné toxicitě antivirotik (Govindarajan et al., 2009; Lai et al., 2004).

ENT1-3 transportují purinové a pyrimidinové nukleosidy. Nukleosidový transport zprostředkovaný ENT1 a ENT2 je farmakologicky inhibován nitrobenzylthioinosinem (NBTI) a koronárními vazodilatanciemi (dipyridamolem nebo dilazepem) (Osses et al., 1996). Známým substrátem ENT1 je ribavirin (Endres et al., 2009). K substrátům ENT2 patří např. zidovudin, didanosin a zalcitabin, didanosin a zalcitabin rovněž substráty ENT1 (Yao et al., 2001).

3.6.2 ATP-binding cassette (ABC) transportéry

ABC transportéry jsou membránové proteiny schopné aktivním procesem přenášet substráty přes membrány proti koncentračnímu spádu. Většina ABC proteinů využívá energii z hydrolyzy ATP na ADP. Důležitá farmakologická funkce těchto transportérů je export xenobiotik směrem ven z buněk tkání. S touto jejich vlastností může být spojena rezistence k některým léčivům (Giacomini a Sugiyama, 2011; Weiss a Haefeli, 2010). Je známo nejméně 49 genů pro ABC proteiny, které mohou být rozděleny do sedmi podtříd nebo rodin (ABCA až ABCG) (Borst a Elferink, 2002). Rodina ABC zahrnuje efluxní transportéry jako P-glykoprotein (produkt genu MDR1/ABCB1), proteiny multilékové rezistence (MRPs) a protein rezistence k rakovině prsu (BCRP, produkt genu ABCG2) (Ho et al., 2005; Weiss a Haefeli, 2010).

ABC proteiny jsou přítomny v cytoplazmatické (vnitřní) membráně bakterií a v plazmatické membráně a membránách organel eukaryotických organismů (Dean et al., 2001; Kis et al., 2010; Sheps et al., 2004). ABC proteiny v jejich funkční formě

obsahují minimálně 4 základní domény: 2 domény vázané na membránu, které zajišťují průnik transportovaných substrátů, a 2 vazebné domény pro nukleotidy, které hydrolyzují ATP. Prokaryotické ABC proteiny mohou látky transportovat dovnitř buňky i ven, zatímco eukaryotické ABC proteiny pracují jako exportéry (Sharom, 2008). ABC transportéry jsou lokalizovány ve velkém množství epiteliálních a endoteliálních buněk, kde se účastní absorpčních, distribučních a exkrečních procesů. Tyto přenašeče jsou exprimovány např. v ledvinách, játrech, hematoencefalické bariéře či placentě, kde mohou ovlivňovat farmakokinetiku příslušných substrátů (Schinkel a Jonker, 2003). Nejvíce zastoupenými ABC transportéry v ledvinách jsou P-glykoprotein, MRP2 a MRP4. Jsou lokalizovány v apikální membráně a hrají důležitou roli při exkreci relevantních substrátů do moči (Lepist a Ray, 2012). Experimentální studie ukázaly, že ABC transportéry P-glykoprotein a BCRP se podílejí na efluxu xenobiotik v proximálních tubulech (Masereeuw a Russel, 2012; Schinkel a Jonker, 2003).

ABC proteiny jsou schopny transportovat cukry, aminokyseliny, toxiny, lipidy, steroly, antimikrobiální látky, žlučové kyseliny, peptidy, nukleotidy, endogenní metabolity a ionty. Díky velkému množství substrátů/inhibitorů ABC transportérů lze v klinické praxi očekávat četné interakce typu léčivo-léčivo.

Nejvýznamnějšími transportéry z rodiny ABC transportérů, které se mohou uplatnit v organismu, jsou P-glykoprotein a BCRP. Z tohoto důvodu je v následujícím textu uvedena jejich detailnější charakteristika.

P-glykoprotein

P-glykoprotein (P-gp) patří mezi nejvýznamnější transportéry rodiny ABC. Funguje jako transmembránová efluxní pumpa, která transportuje substráty z intracelulárního prostoru ven z buňky. Exprese P-gp byla nejdříve popsána u nádorových buněk, u kterých tento transportér způsoboval rezistenci k protinádorové terapii (Juliano a Ling; 1976). P-gp se nachází i v nenádorové tkáni (např. ve střevech, játrech, ledvinách, plicích, placentě), kde působí ochranným mechanismem proti potenciálně toxickým látkám (Cordon-Cardo et al., 1990; Tiebaut et al., 1987). P-gp exprimovaný na apikální membráně proximálních tubulů ledvin zprostředkovává přenos jeho substrátů do moči (Fromm, 2004).

Substráty P-gp mají většinou hydrofobní charakter a planární strukturu s pozitivním nebo neutrálním nábojem (Ambudkar et al., 1999). Substráty P-gp můžeme

nalézt v řadě farmakoterapeutických skupin včetně cytostatik (doxorubicin, topotecan), analgetik (morfin), antihistaminik (fexofenadin), imunosupresiv (cyklosporin A), antiarytmik (chinidin), fluorescenčních látek (rhodamin 123, Hoechst 33342), blokátorů kalciového kanálu (verapamil), steroidů (kortikosteron), antihypertenziv (propranolol) a dalších (Sharom, 2008). P-gp se stal předmětem výzkumu v oblasti HIV, protože se ukázalo, že jeho substráty je řada antiretrovirotik, jako jsou např. ritonavir, saquinavir, nelfinavir, abacavir a raltegravir (Hashiguchi et al., 2013; Choo et al., 2000; Kim et al., 1998; Shaik et al., 2007; Srinivas et al., 1998). Substráty P-gp jsou i některá antibiotika ze skupiny β -laktamů, fluorochinolonů a makrolidů (Haritova, 2008). Kromě jiných inhibičně působících léčiv mohou účinně inhibovat P-gp i některé inhibitory HIV proteázy (Storch et al., 2007). Dlouhodobé podávání léčiv z této skupiny (lopinaviru nebo ritonaviru) naopak indukuje expresi P-gp (Huang et al., 2001; Vishnuvardhan et al., 2003). Kardioaktivní glykosid digoxin je eliminován ledvinami a je také substrátem P-gp. Příkladem interakce léčivo-léčivo může být inhibice renální clearance digoxinu, která je přisuzována současnému podání ritonaviru díky inhibici efluxního P-gp. Terapeutické dávky antiretrovirotika ritonaviru tedy mohou výrazně ovlivnit farmakokinetiku substrátů P-gp (Ding et al., 2004; Müller a Fromm, 2011).

Transportér BCRP

Transportér BCRP byl poprvé objeven u multirezistentní buněčné linie rakoviny prsu (Doyle et al., 1998). Tento transportér aktivním efluxním procesem dopravuje své substráty přes buněčnou membránu. Podobně jako P-gp je BCRP exprimován v různých tkáních, které mají bariérovou funkci, jako jsou např. střeva, játra, mozek a placenta (Schinkel a Jonker, 2003). V ledvinách je BCRP lokalizován v apikální membráně proximálních tubulů (Huls et al., 2008) a může tak být potenciálním transportérem v procesu ledvinné tubulární sekrece léčiv.

BCRP transportuje funkčně a strukturně odlišné substráty, které mohou mít jak pozitivní, tak negativní náboj (Ishikawa et al., 2005; Štaud a Pávek, 2005). BCRP transportuje jak hydrofobní látky (např. mitoxantron), tak hydrofilní konjugované organické anionty, zejména sulfatované konjugáty. BCRP a P-gp mohou vzájemně spolupracovat a synergickým efektem zabránit průniku jejich substrátů přes důležité biologické bariéry (Polli et al., 2009).

Příkladem substrátů BCRP jsou chemoterapeutika (mitoxantron, topotecan), antivirotika (abacavir, zidovudin, lamivudin), fluorescenční látky (rhodamin 123, Hoechst 33342), konjugované anionty (estron-3-sulfát), flavonoidy (genistein), foláty (kyselina listová), ribovlavin (vitamin B12) a porfyriny (hem) (Chen et al., 2003; Krishnamurthy et al., 2004; Mao a Unadkat, 2005; Pan et al., 2007; van Herwaarden et al., 2007). Inhibitory HIV proteázy ritonavir, saquinavir a nelfinavir nejsou substráty, ale jsou efektivními inhibitory BCRP (Gupta et al., 2004). BCRP tak může hrát důležitou úlohu při interakcích typu léčivo-léčivo v situacích, kdy je pacientovi např. podán některý z inhibitorů HIV proteázy současně se substrátem BCRP.

3.7 Charakteristika zkoumaných antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky jsou definovány jako látky působící proti mikroorganismům, tj. proti bakteriím, virům, houbám a parazitům. Antimikrobiální látky zahrnují antibiotika, chemoterapeutika, virostatika (antivirotika), antimykotika aj. (Vokurka et al., 2007). Antimikrobiální látky jsou v klinické praxi jedny z nejčastěji užívaných léčiv a jejich podávání patří k opatřením zabraňujícím mnohdy fatálním následkům. V této skupině se vyskytuje poměrně značný počet látek, které jsou z organismu eliminovány ledvinami (Leekha et al., 2011). V důsledku vysoké expozice po podání takových léčiv může dojít k rozvoji toxického poškození ledvinné tkáně s příslušným dopadem na funkci ledvin. Transportní mechanismy přestupu mnohých antimikrobiálně účinných látek přes biologické membrány v ledvinách nejsou zatím dostatečně popsány a vysvětleny. Získávání dalších znalostí v této oblasti farmakologie by mohlo přispět k bezpečnějšímu a racionálnímu používání antimikrobiálních léčiv. Z uvedených důvodů byly do výzkumné práce zahrnuty následující skupiny látek a jednotlivá léčiva ze skupiny antimikrobiálních látek. Stručná charakteristika jednotlivých studovaných látek je uvedena v dalším textu.

3.7.1 Antivirotika

V poslední době se značně zvyšuje poptávka po nových antivirových léčivech a strategiích. K faktorům, které přispívají ke zvyšující se poptávce, může být řazen stále rostoucí výskyt chronických virových infekcí typu HIV, hepatitidy B a C a nástup virů, jako jsou např. koronaviry způsobující SARS (těžký akutní respirační syndrom) (De Clercq, 2004). Zatímco u HIV a viru hepatitidy C (HCV) je terapie založena na

kombinaci více léčiv, u ostatních virů, jako jsou herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), virus neštovic, virus chřipky, virus hepatitidy B (HBV) a filovirus, spočívají aktuální strategie v použití monoterapie jednotlivými antiviroty (De Clercq, 2013).

Zavedení účinnějších antiviroty do klinické praxe a nutnost kombinace některých potenciálně toxických léčiv u různých skupin pacientů (např. HIV pacientů nebo imunokompromitovaných pacientů při transplantacích) ovšem mohou být příčinami zvýšeného výskytu antiviroty indukované nefrotoxicity (Izzedine et al., 2005a).

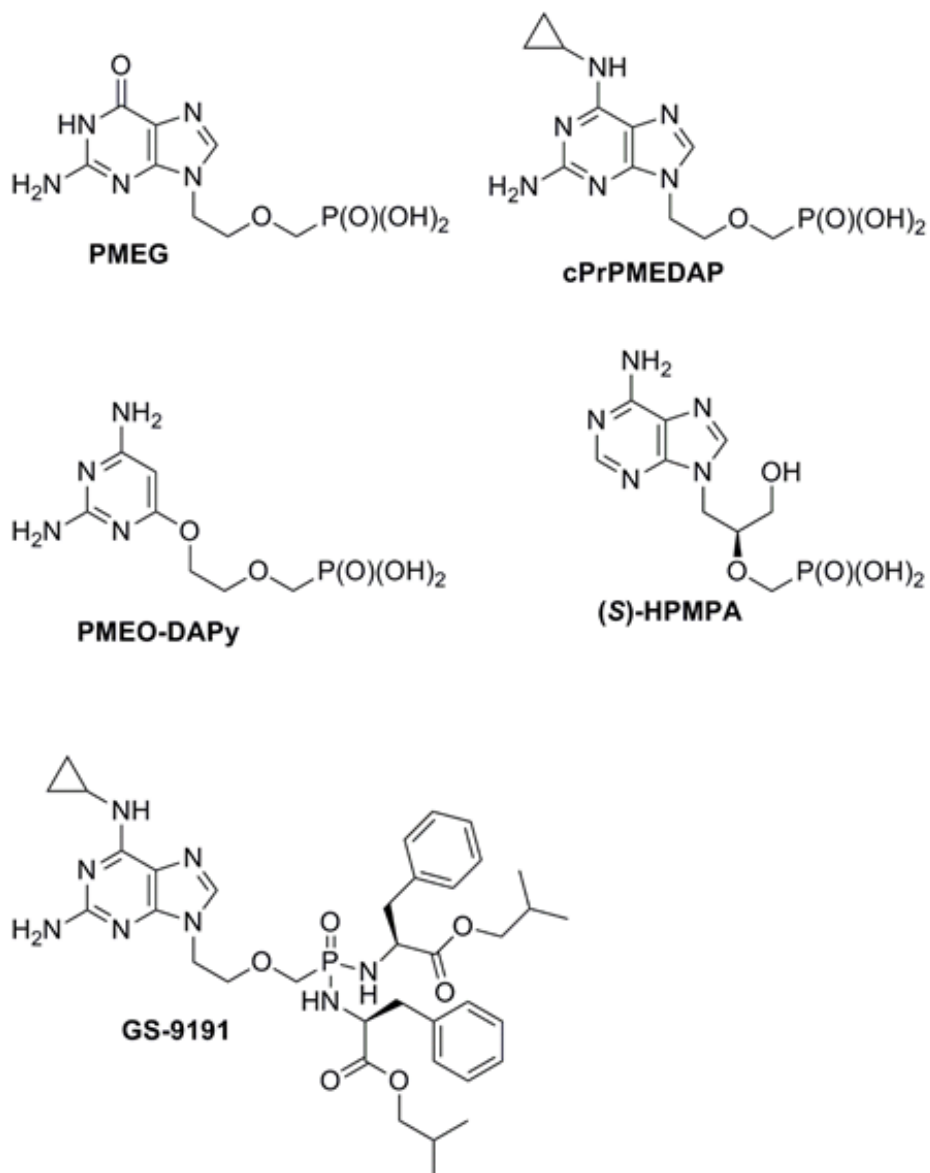
Acyklické nukleosidové fosfonáty (ANPs)

Acyklické nukleosidové fosfonáty jsou nukleotidové analogy pocházející z laboratoře Antonína Holého z Ústavu organické chemie a biochemie v Praze. Strukturní vzorce testovaných ANPs uvádí obr. 5 a 6. ANPs působí proti širokému spektru virů a mají cytostatické a antiproliferativní účinky. Jejich charakteristická fosfonátová skupina je jedinečná tím, že je pevně připojena k nukleosidu prostřednictvím fosfonomethyl etheru a dokáže odolávat působení esteráz a jiných katabolických enzymů (De Clercq, 2007a, b). ANPs jsou vylučovány především ledvinami díky aktivní tubulární sekreci (Cihlar et al., 1999). Transport ANPs v proximálních tubulech ledvin spočívá zejména ve vychytávání přes basolaterální membránu a efluxu přes lumenální membránu. Uptake v proximálních tubulech zprostředkovaný SLC transportéry může být potenciálně zodpovědný za nefrotoxicitu ANPs (Cihlar et al., 2009; Klaassen and Aleksunes, 2010; Minuesa et al., 2011).

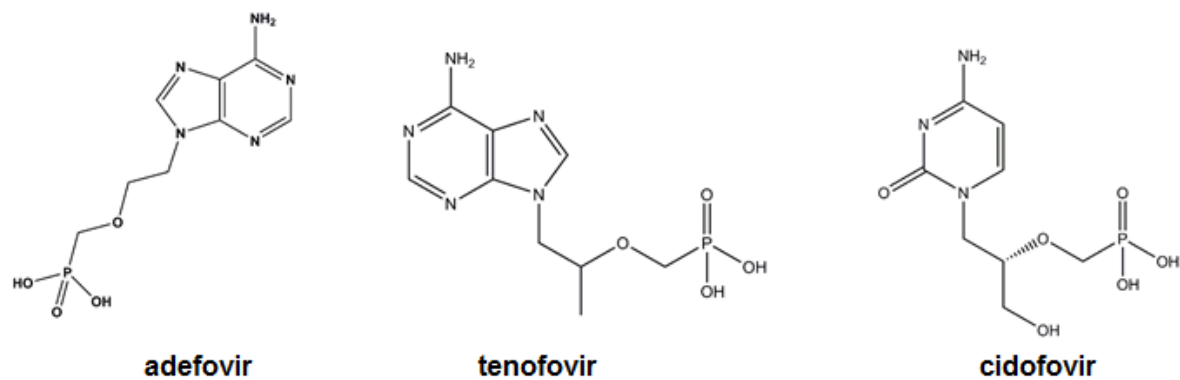
ANPs adefovir, tenofovir nebo cidofovir jsou používány pro léčbu různých DNA virových a retrovirových infekcí (De Clercq, 2007a, b; Holý, 2006). Hlavní indikací adefoviru je léčba infekcí viru hepatitidy B, cidofovir je indikován u léčby cytomegalovirové infekce a tenofovir je používán u infekcí viru lidské imunodeficiencie. Možnými nežádoucími účinky jsou těžké poruchy funkce ledvin, které mohou být zapříčiněny jejich renálním tubulárním transportem (Izzedine et al., 2005a). Adefovir, tenofovir a cidofovir, podobně jako ostatní antivirotyk působící analogy nukleosidových fosfonátů PMEG and PMEDAP, jsou silnými substráty OAT1 (Cihlar et al., 1999, Ho et al., 2000; Uwai et al., 2007). OAT1 a efluxní transportér MRP4 se významně podílí na regulaci hladiny tenofoviru v proximálních tubulech. Narušení činnosti OAT1 snižuje toxicitu tenofoviru, ztráta funkčnosti MRP4 může vést naopak

k zvýšené renální toxicitě léčiva (Kohler et al., 2011). Tenofovir se používá také ve formě ve vodě rozpustného diesterového proléčiva tenofoviru disoproxil fumarátu (TDF), které zlepšuje biologickou dostupnost tenofoviru po perorálním podání (Fung et al., 2002).

Mezi ANPs existuje několik látek ze skupiny PME [2-(fosfonomethoxy)ethyl] a HPMP [3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl] s potenciální účinností při léčbě různých infekcí způsobených DNA virem, retrovirových infekcí nebo neoplazií (Balzarini et al., 2007; Bijsterbosch et al., 1998; Reiser et al., 2008). Příkladem těchto látek je cPrPMEDAP, která je známá jako potenciálně důležité léčivo pro léčbu polyomavirové infekce a infekce způsobené lidským papilomavirem (De Clercq, 2008). (*S*)-HPMPA má široké spektrum anti-DNA virové aktivity a potenciál pro užití při léčbě herpes simplex virových infekcí rezistentních na léčbu běžnými antiherpetickými léčivy (De Clercq, 2007b). PMEODAPy a jeho deriváty reprezentují skupinu prvních pyrimidinových ANPs s antiretrovirální aktivitou v buněčné kultuře (Balzarini et al., 2007; Holý et al., 2001). GS-9191 je lipofilní proléčivo (double prodrug) látky PMEG. Látka GS-9191 byla navržena s cílem zvýšit prostup PMEG a akumulaci jeho metabolitů v cílových buňkách. Klinický význam této látky zůstává předmětem dalších studií (De Clercq, 2011; Wolfgang et al., 2009). Ačkoli se jedná o vysoce aktivní látky, jejich možné interakce s transportéry ledvinných proximálních tubulů zatím nebyly dostatečně objasněny.

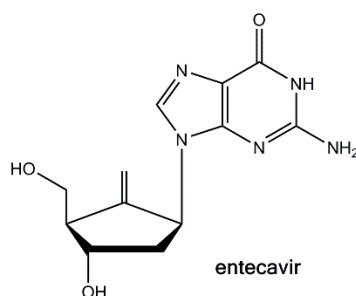


Obr. 5 Struktury studovaných vývojových antivirotik - acyklických nukleosidových fosfonátů.



Obr. 6 Struktury studovaných antivirotik ze skupiny acyklických nukleosidových fosfonátů používaných v klinické praxi.

Entecavir



Obr. 7 Struktura entecaviru

Entecavir (ETV), syntetický guanosinový analog (Obr. 7), je jedním z neúčinnějších a vysoce selektivních léčiv pro terapii chronické hepatitidy B. Aktivní 5'-trifosfát entecaviru inhibuje replikaci viru hepatitidy B (HBV) ve všech krocích (Scott a Keating, 2009). ETV je eliminován převážně do moči glomerulární filtrací a tubulární sekrecí (Matthews, 2006; Razonable, 2011). Pro různé účely může být v klinických podmínkách ETV kombinován s dalšími antiviroty nebo jinými léčivy. Kombinace ETV s dalšími léčivy proti HBV, jako jsou např. adefovir nebo tenofovir, se ukázala vhodná u některých pacientů s rezistencí k antivirové terapii (Chae et al., 2012; Sheng et al., 2011).

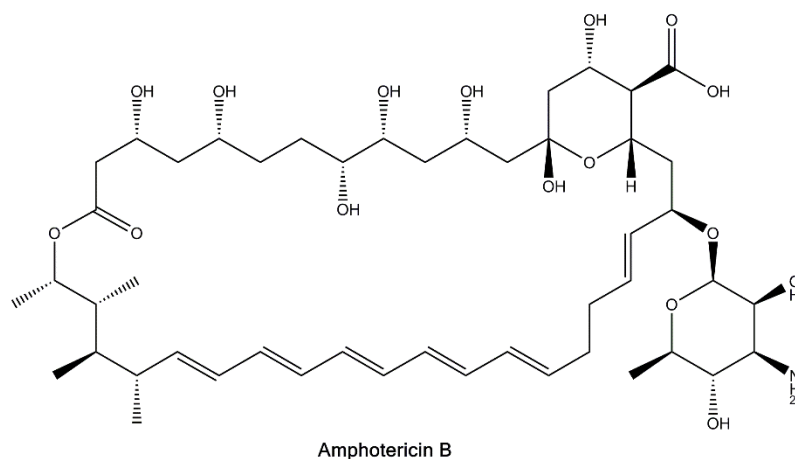
Na reabsorpci ETV z moči se podílí PEPT2 (peptidový transportér 2) (Xu et al., 2013). Ve studii *in vivo* u potkanů bylo zjištěno, že vliv na renální exkreci ETV mohou mít OATs a OCTs (Yanxiao et al., 2011). V nedávné době bylo upřesněno s pomocí geneticky modifikovaných buněk a ledvinných řezů, že OAT1, OAT3 a OCTs se podílejí na transportu ETV (Xu et al., 2013). Určitou strukturní podobnost s ETV má ribavirin, u něhož bylo zjištěno, že je substrátem CNT2 a CNT3 (Cano-Soldado a Pastor-Anglada, 2011; Yamamoto et al., 2007).

3.7.2 AmB

Amfotericin B (AmB) je přírodní antibiotikum patřící do skupiny polyenů (obr. 8). AmB je od roku 1960 oporou antimykotické terapie při léčbě život ohrožujících mykotických infekcí. Léčivo narušuje biologické membrány tím, že se nespecificky váže k ergosterolu mykotických buněk a cholesterolu savčích buněk (Gubbins a Amsden, 2005; Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009).

Přes zavedení nových antimykotik, jako jsou azoly a echinokandiny, je léčba

pomocí AmB stále možností volby u závažných nebo život ohrožujících invazivních systémových onemocnění způsobených vybranými mykotickými patogeny (Chen et al., 2010; Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009). V klinické praxi má AmB stále s vé místo u imunokompromitovaných pacientů s AIDS, pacientů po transplantaci a onkologických pacientů, kteří podstupují intenzivní chemoterapii a vzrůstá u nich riziko závažných mykotických infekcí (Chen et al., 2010; Pagano et al., 2010).



Obr. 8 Struktura amfotericinu B

V čisté formě má AmB malou rozpustnost ve vodných roztocích při fyziologickém pH. AmB se proto používá ve formě komplexu s dalším komponentem, který slouží jako detergent. První látkou použitou k zvýšení rozpustnosti AmB ve vodě byl deoxycholát sodný (DOC) (Klaassen a Aleksunes, 2010; Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009). Pro zlepšení snášenlivosti a zvýšení účinnosti byly do léčby zavedeny nové přípravky obsahující AmB v komplexu s některými lipidy, jako je cholesterol nebo fosfolipidy. AmB v komplexu s DOC (AmB/DOC) se ovšem stále všeobecně používá (Chen et al., 2010; Kleinberg, 2006; Sun et al., 2009), speciálně pro jeho vyšší účinnost a/nebo ekonomické výhody ve srovnání s novějšími lipidovými přípravky (Ascher et al., 2012; Bicanic et al., 2012).

Jedním z limitujících faktorů klinického použití AmB je jeho nefrotoxicita. Novější lipidové formulace AmB působí ve srovnání s AmB/DOC méně nefrotoxicky. U značného počtu pacientů se ovšem vyskytuje tento nepříznivý vliv i při užívání AmB v lipidovém komplexu (Luke a Boyle, 1998; Safdar et al., 2010; Saliba a Dupont, 2008). AmB pravděpodobně způsobuje renální poškození různými mechanismy, ale přesný mechanismus nefrotoxického působení zůstává neobjasněn (Fanos a Cataldi, 2001;

Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009). Koncentrace AmB v jednotlivých segmentech ledvin může být důležitým faktorem jeho nefrotoxického působení. Procesy, které určují distribuci AmB v ledvinách, by proto měly být důkladně studovány.

Žádné podrobnější informace o renálních exkreačních mechanismech AmB a jeho možných interakcích s ledvinnými transportéry zatím nebyly popsány. Vzhledem k tomu, že AmB obsahuje ve své molekule substituenty s kyselou i zásaditou povahou, mohl by interagovat s transportéry pro organické anionty (OATs) a/nebo organické kationty (OCTs). DOC jako součást konvenčního přípravku AmB by tyto interakce mohl také ovlivňovat.

4 Cíle práce

- Zavést na pracoviště experimentální metody pro studium interakcí léčiv s vybranými SLC transportéry (OAT1, OCT2, CNT2, CNT3) *in vitro* na buněčné úrovni s využitím přechodně transfekovaných buněčných linií. Ověřit funkčnost připravených *in vitro* modelů pomocí vhodných testů se standardními substráty studovaných transportních systémů a potvrdit expresi transportérů pomocí metody Western blottingu.
- S využitím buněčných modelů provést inhibiční a akumulaci studie s vybranými antimikrobiálně působícími látkami (antivirotika, amfotericin B) zaměřené na jejich interakce s vybranými ledvinnými transportéry, stanovit kvantitativní parametry interakce a určit úlohu jednotlivých transportérů při transmembránovém přesunu studovaných látek.
- Ověřit souvislost zjištěných interakcí zkoumaných antimikrobiálních látek s transportéry s jejich případným cytotoxickým účinkem a na relevantních transportérech posoudit interakce typu léčivo-léčivo s dalšími, potenciálně v klinické praxi současně podávanými léčivy.
- Vyhodnotit experimentální výsledky, sestavit je do podoby publikovatelné na relevantní odborné úrovni a vypracovat doktorskou disertační práci dle platných požadavků.

5 Experimentální část

5.1 Materiál

5.1.1 Použité přístroje a vybavení

24 jamkové destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

96 jamkové mikrotitrační destičky, čiré (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

96 jamkové mikrotitrační destičky, tmavé (Corning, New York, USA)

Automatická pipeta Discovery series pipettes 50-300 μ l (HTL, Varšava, Polsko)

Automatické pipety Discovery autoclavable 100-1000 μ l, 10-100 μ l, 5-50 μ l (HTL, Varšava, Polsko)

Centrifuga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Osterode, SRN)

Destičkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Männedor, Švýcarsko)

Injekční jehly na jedno použití (B Braun, Melsungen, SRN)

Injekční stříkačky, sterilní (B Braun, Melsungen, SRN)

Inkubátor (Shel Lab, Cornelius, USA)

Jednorázové plastové pipety, 2, 5, 10, 25 ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

Kultivační láhve 25, 75 a 150 cm² (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

Laboratorní třepačka KS – 15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15 (Johanna Otto GmbH, Hechigen, SRN)

Laminární box: Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1,8 (Bioair instruments, Miláno, Itálie)

Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS – 1R (OPTIKA Microscopes, Ponteranica, Itálie)

Mikrozkumavky Eppendorf 0,5; 1,5; 2 ml (Hamburg, SRN)

Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Varšava, Polsko)

Rukavice latexové, nesterilní (VWR, Radnor, USA)

Scintilační lahvičky vnější šroubovací, 4 ml, 20 ml (Kartell, Noviglio, Itálie)

Sterilní, nepyrogenní skleněné pipety 25 ml, 10 ml, 5 ml (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

Špičky Eppendorf 0,1-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l (Hamburg, SRN)

Váhy Kern & Sohn GmbH (Kern & Sohn, Balingen, SRN)

Vodní lázeň, TW 12 water bath (Julabo, Seelbach, SRN)

Vyhřívané magnetické míchadlo IKA RCT basic safety control (Staufen, SRN)

5.1.2 Studované látky a další důležité chemikálie

[³H]amfotericin B ([³H]AmB; specifická radioaktivita 10 Ci/mmol), [³H]methyl-4-fenylpyridinium acetáte ([³H]MPP⁺; specifická radioaktivita 80 Ci/mmol) a entecavir [³H(G)] ([³H]ETV, specifická radioaktivita 10 Ci/mmol) byly získány z American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, USA). [³H]*p*-aminohippurová kyselina ([³H]PAH; specifická radioaktivita 4,56 Ci/mmol) byla získána od Perkin Elmer (Waltham, USA). [Adenin-2,8-³H]-adefovir, ([³H]adefovir, specifická radioaktivita 12,1 Ci/mmol), [adenin-2,8-³H]-tenofovir ([³H]tenofovir, specifická radioaktivita 7,8 Ci/mmol), [5-³H]-cidofovir ([³H]cidofovir, specifická radioaktivita 24 Ci/mmol) a [5-³H]-uridin ([³H]uridin, specifická radioaktivita 16,9 Ci/mmol) byly získány z Moravěk Biochemicals (Brea, USA).

Amfotericin B, AmB/DOC, tetraethylammonium (TEA), cidofovir hydrát, probenecid (*p*-[dipropylsulfamoyl] benzoová kyselina; PB), Hoechst 33342 a specifický ABCG2 inhibitor KO143 byly získány ze Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Tenofovir a entecavir byly dodány firmou Santa Cruz Biotechnology (California, USA).

Adefovir, PMEG {9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin}, cPrPMEDAP {9-(2-fosfonylmethoxyethyl)-N(6)-cyclopropyl-2,6,diaminopurin}, GS-9191 {(L-fenylalanin,N,N'-[[[2-[2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purin-9-yl]ethoxy]methyl]fosphinyliden]bis-,bis(2-methylpropyl)ester)}, (S)-HPMPA, {(S)-9-[3-hydroxy-(2-fosfonomethoxy)propyl]adenin}, PMEO-DAPy {2,4-diamino-6-[(2-fosfonomethoxy)ethyl]purin} byly laskavým darem od Dr. Z. Janeby z ÚOCHB AV ČR v Praze. Quercetin dihydrát byl získán od doc. P. Mladěnký z Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK v Hradci Králové. Specifický ABCB1 inhibitor LY335979 byl dodán firmou Karl Schmid (Munich, Germany).

Pro kultivace buněk bylo použito kultivační médium Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modified Eagle's medium, L-glutamin, neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a fetální sérum (PAA, Pasching, Rakousko). DMSO (dimethylsulfoxid > 99,9 %) a trypsin (0,25 %, Trypsin - EDTA Solution) byly získány od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Chemikálie na fosfátový pufr PBS (Phosphate Buffered Saline) NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7,4 byly získány od firmy PENTA (Chrudim, Česká republika).

Kity pro stanovení cytotoxicity CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay a CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay byly dodány firmou Promega (Fitchburg, USA).

Lidský OAT1 (SLC22A6) expresní plazmid, transcripční varianta 2, lidský OCT2 (SLC22A2) expresní plazmid, lidský CNT2 (SLC28A2) expresní plazmid, lidský CNT3 (SLC28A3) expresní plazmid, transcripční varianta 2 and prázdný vektor pCMV6-Entry byly získány od OriGene Technologies (Rockville, USA) a následně amplifikovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika).

Strukturní vzorce testovaných látek byly vytvořeny v programu ChemBioDraw Ultra 13.0 (Perkin Elmer, Waltham, USA).

5.2 Použité metody

5.2.1 Buněčné kultivace

Všechny použité buněčné linie byly adherentní a byly rutinně kultivovány dle doporučených postupů dodavatele. Konfluentní buňky byly pasážovány každé 4 dny v příslušném kultivačním médiu v buněčném inkubátoru ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO₂ a 37 °C. Stávající kultivační médium bylo odstraněno, buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) o pH 7,4 obsahujícím NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ a NaH₂PO₄ 10 mM. Buňky byly následně rozvolněny roztokem 0,25 % trypsin/EDTA. Činnost trypsinu byla zastavena přidáním čerstvého média k rozvolněným buňkám. Zvolená část takto připravené buněčné směsi byla použita k experimentům a část byla přenesena do nové kultivační lahve, označena číslem pasáže (P + 1) a dále kultivována.

HeLa buněčná linie

Lidské epiteliální buňky z nádoru děložního hrdla (HeLa) byly získány od European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). Buněčná linie (pasáže 12-30) byla rutinně kultivována v 75cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu Eagle's minimum essential medium (EMEM) s L-glutaminem (2 mM), 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % fetálního hovězího séra.

MDCK II buněčná linie

Madin-Darbyho psí ledvinné buňky (Madin-Darby canine kidney cell line, MDCK II) byly získány z European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). Buněčná linie byla použita v pasážích 3-20. MDCK II buněčná linie stabilně transfekovaná

ABCG2 (pasáže 5-11) a MDCK II buněčná linie stabilně transfekovaná ABCB1 (pasáže 5-11) byly získány na základě spolupráce s prof. P. Pávkem z Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK (Hradec Králové, Česká republika). MDCK II buněčné linie byly rutinně kultivovány v 75 cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s L-glutaminem (2 mM) a 10 % fetálního hovězího séra.

HK-2 buněčná linie

Lidské ledvinové buňky (Human kidney cell line, HK-2) byly získány z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Buněčná linie (pasáže 10-11) byla rutinně kultivována v 75 cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu DMEM s L-glutaminem (2 mM) a 10 % fetálního hovězího séra.

LLC-PK1 buněčná linie

Prasečí buňky proximálního tubulu ledvin (LLC-PK1) byly získány z European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). Buněčná linie (pasáže 14-15) byla rutinně kultivována v 75 cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu DMEM s L-glutaminem (2 mM) a 10 % fetálního hovězího séra.

5.2.2 Transfekce

Podle předběžných funkčních testů byly HeLa buňky zvoleny jako optimální model pro přechodnou transfekci plasmidem hOAT1. Obdobně byly také MDCK II buňky vybrány jako nejvhodnější model pro přechodnou transfekci plasmidem hOCT2. HeLa buňky byly sazeny v počtu 7×10^4 buněk na jamku ve 24 jamkové destičce. MDCK II buňky byly sazeny v počtu 2×10^5 buněk na jamku ve 24 jamkové destičce. Následující den byly buňky přechodně transfekovány příslušným plasmidem kódujícím studovaný transportér nebo prázdným vektorem pCMV6-Entry (pCMV6) s použitím transfekčního roztoku Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) a media Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) přesně podle předepsaného protokolu výrobce. Po sérii optimalizačních experimentů doporučených výrobcem byly pro studované transportéry zvoleny následující podmínky transfekce:

- hOAT1 0,4 µg DNA/jamka, DNA : transfekční roztok = 1 : 2,5
- hOCT2 0,5 µg DNA/jamka, DNA : transfekční roztok = 1 : 2
- hCNT2 0,4 µg DNA/jamka, DNA : transfekční roztok = 1 : 3
- hCNT3 0,4 µg DNA/jamka, DNA : transfekční roztok = 1 : 3

Kontrolní buňky byly přechodně transfekovány prázdným vektorem za stejných transfekčních podmínek jako příslušný transportér. Zvýšení exprese studovaných transportérů byla ověřena metodou Western blottingu a správná funkčnost buněčného modelu byla potvrzena funkčními testy se standardními radioaktivně značenými substráty (viz níže). Pro transportní experimenty a pro získání buněčného lyzátu na Western blotting byly použity HeLa buňky přechodně transfekované hOAT1 (24 h po transfekci) nebo MDCK II buňky přechodně transfekované hOCT2, hCNT2 nebo hCNT3 (48 h po transfekci).

Všechny experimenty s geneticky modifikovanými organismy (GMO) byly prováděny v souladu s příslušnými českými právními předpisy v oblasti nakládání s GMO a genetickými produkty.

5.2.3 Western blotting

Homogenizace buněk a příprava proteinového extraktu

Po přechodné transfekci byly HeLa buňky a MDCK II buňky opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) a v kultivačních lahvích zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo aplikováno 600 µl lyzačního roztoku na 75 cm² kultivační lahev s buňkami. Lyzační roztok obsahoval RIPA pufr s 10 % aprotininu, 10 % benzamidinu, 10 leupeptinu a 10 % PMSF (fenylmethansulfonyl fluorid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po 10 min inkubace na ledu byly zlyzované buňky homogenizovány pomocí resuspendace jehlou a v ultrazvukové lázni. Lyzát byl centrifugován v podmínkách $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min, 12000 g. Supernatant byl použit jako konečný proteinový extrakt. U supernatantu byl změřen obsah proteinu pomocí metody BCA podle protokolu výrobce. Jako negativní kontrola sloužil proteinový extrakt z buněk přechodně transfekovaných prázdným vektorem pCMV6. Vzorky byly před aplikací na elektroforetický gel naředěny v poměru 1 : 1 v nanášecím pufru, který obsahoval následující složky:

Nanášecí pufr (skladován při -70 °C)

- Překrývací gelový pufr – 2,5 ml (Stacking gel buffer, Bio-Rad, Hercules, USA)
- 10% dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Glycerol – 2,3 ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-merkptoethanol – 0,5 ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Bromfenolová modř – 1 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- MilliQ destilovaná voda

Elektroforéza a blotování

Aparatura pro elektroforézu a blotování The Mini Trans-Blot® byla získána od Bio-Rad (Hercules, USA). Pro přípravu gelů na elektroforézu byly připraveny následující roztoky:

Roztok pro separační 10% gel (skladován při 8 °C)

- MilliQ destilovaná voda - 4,9 ml
- Separací gelový pufr - 2,5ml (Separating gel buffer, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Akrylamid-bis roztok – 2,5 ml (Bio-Rad, Hercules, USA)
- 10% SDS – 0,1 ml
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED) – 0,015 ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 10% ammonium persulfát (APS) – 0,03 ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Roztok pro překrývací 5% gel (skladován při 8 °C)

- MilliQ destilovaná voda – 6,15 ml
- Překrývací gelový pufr – 2,5 ml (Stacking gel buffer, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Akrylamid-bis roztok – 1,25 ml
- 10% SDS – 0,1 ml
- TEMED – 0,015 ml
- 10% APS – 0,03 ml

Roztoky pro separační a překrývací gel byly napipetovány mezi elektroforetická skla. Do překrývacího gelu byl zasunut hřeben pro aplikaci vzorků. Po polymerizaci byly připravené vzorky (10 µg proteinu/jamka) aplikovány do připraveného gelu. Proteinové

extrakty byly rozděleny pomocí elektroforézy SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) v elektroforetickém systému (tanku) Mini-PROTEAN® Tetra naplněném elektroforetickým pufrem (Bio-Rad, Hercules, USA) na přístroji Power Pac HC apparatus při 15 mA a 200 V po dobu 75 min. Proteiny byly následně ve stejném elektroforetickém tanku naplněném blotovacím pufrem (Bio-Rad, Hercules, USA) za podmínek 100 V a 300 mA po dobu 90 min přeneseny (přebloťovány) na polyvinilidenovou (PVDF) membránu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Přítomnost přenesených proteinů byla ověřena barvením membrány roztokem Ponceau S (SERVA, Heidelberg, Germany). Po blotování byla membrána 1 h blokována v roztoku pufru TBS (tris-buffered saline) s 0,05 % tweenu 20 (TBST) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a 5 % sušeného nízkotučného mléka (blotting grade blocker, non fat dry milk, Bio-Rad, Hercules, USA). Protilátky pro immunoblotting byly rozpuštěny v TBST pufru s 5 % sušeného nízkotučného mléka. Membrána byla inkubována přes noc s primární protilátkou anti-SLC22A6 (AB1) 1:1000, anti-SLC28A2 1:200, anti-SLC28A3 1:200 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), anti-SLC22A2 1:200 (Abcam, Cambridge, UK) nebo anti- β -actin (pro kontrolu zatížení proteinů na gelu) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Po inkubaci byla membrána čtyřikrát promyta TBST pufrem. Následně byla membrána inkubována s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou (GE Healthcare, Little Chalfont, UK; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) po dobu 1 h v TBST pufru s 5 % sušeného nízkotučného mléka. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána dvakrát promyta TBST pufrem. Takto připravená membrána byla překryta chemiluminiscenčním roztokem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA). Vyvíjení signálu probíhalo v tmavé komoře s použitím X-ray filmu, vývojky a ustalovače (FOMA Bohemia, Hradec Kralove, Czech Republic). Vzniklé imunoreaktivní proužky (bandy) byly skenovány na kalibrované CCD kameře Image Quant 400 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

5.2.4 Transportní studie s buněčnými modely

Příprava standardních substrátů pro inhibiční a akumuláčnické studie

Pro transportní studie byl použit standardní substrát [^3H]PAH (1 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$) pro OATs, [^3H]MPP $^+$ (1 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$) pro OCTs a [^3H]juridin (1 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$) pro CNTs. Standardní substrát pro BCRP/ABCG2 a P-gp/ABCB1, Hoechst 33342, byl použit

v koncentraci 8 μM . Standardní substráty byly rozpuštěny v transportním roztoku o pH 7,4, který obsahoval 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5 mM glukózu a 10 mM HEPES.

Příprava testovaných látek

Testované radioaktivní látky byly připraveny v následujících inkubačních koncentracích v transportním roztoku: [³H]adefovir (0,1 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$), [³H]tenofovir (0,5 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$), [³H]cidofovir (70 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$), [³H]amfotericin B (1 μM , 1 $\mu\text{Ci/ml}$).

AmB/DOC, DOC, adefovir, tenofovir, cidofovir, cPrPMEDAP, PMEOD-DAPy a (S)-HPMPA byly do zásobního roztoku rozpuštěny v MilliQ destilované vodě.

AmB, entecavir, PMEG, GS-9191, quercetin a probenecid byly do zásobního roztoku rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Zásobní roztoky testovaných látek byly rozpuštěny na požadované koncentrace v transportním roztoku obsahujícím požadovaný radioaktivní substrát. Inkubační koncentrace rozpouštědel (MilliQ destilované vody nebo DMSO) v transportním roztoku nepřesáhla 1 %.

Akumulační a inhibiční studie s SLC transportéry

Experimenty byly prováděny v triplicátech ve 24 jamkových destičkách na HeLa buňkách přechodně transfekovaných hOAT1, MDCK II buňkách přechodně transfekovaných hOCT2, hCNT2, hCNT3 a na kontrolních buňkách transfekovaných prázdným vektorem (pCMV6). Buňky byly dvakrát opláchnuty transportním roztokem a preinkubovány ve stejném roztoku 10 min při 37 °C. Preinkubační transportní roztok byl odstraněn, následně byl přidán inkubační roztok se standardním radioaktivním substrátem a byl inkubován s buňkami 2 min. Efektivita transfekce byla potvrzena díky porovnání akumulace standardního radioaktivního substrátu v transfekovaných buňkách vůči akumulaci v buňkách transfekovaných prázdným vektorem. V inhibičních studiích byla intracelulární akumulace standardního radioaktivního substrátu snižována postupně se zvyšujícími koncentracemi testovaných látek, čímž byla vyjádřena afinita testované látky k příslušnému transportéru. Kontrolní buňky byly inkubovány vždy se stejnou koncentrací testované látky/rozpuštědla jako buňky přechodně transfekované příslušným transportérem. Po ukončení inkubace byly buňky okamžitě dvakrát

opláchnuty ledovým roztokem obsahujícím 137 mM NaCl a 10 mM HEPES při pH 7,4 (STOP roztok). Buňky byly následně 60 min desintegrovány 100 μ l lyzačního roztoku/jamka, který obsahoval TritonX 0,5 % ve 100 mM NaOH. Ze zlyzovaných buněk bylo odebráno 10 μ l pro měření obsahu proteinu (viz níže). Zbytek (90 μ l) byl pipetován do měřících lahvíček s 1 ml scintilačního roztoku Ultima Gold (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Radioaktivita takto připravených vzorků a radioaktivita standardů (inkubační roztok + scintilační roztok) byla měřena na beta-spektrometru Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, Shelton, USA). Radioaktivita vzorků byla měřena v jednotkách DPM1 (desintegrace za min). Výsledky byly vyjádřeny jako % akumulované dávky standardizované vůči obsahu proteinu v testované jamce. Výpočet byl proveden v programu MS Excel. K výpočtu byla použita rovnice:

$$X = \frac{A \times 100}{D \times m}$$

A....akumulovaná dávka

D....podaná dávka

m....mg proteinu

Pro grafické vyjádření byla hodnota % akumulace/mg proteinu v kontrolních buňkách odečtena od hodnoty % akumulace/mg proteinu v buňkách exprimujících testovaný transportér. Afinita testovaných látek k příslušným transportérům byla vyjádřena jako inhibiční koncentrace IC₅₀ potřebná ke snížení akumulace radioaktivního substrátu na 50 %. IC₅₀ byla vypočítána pomocí nelineární regresní analýzy v programu GraphPad Prism (verze 5 a 6).

Zjištění substrátové specifity entecaviru (ETV)

Experimenty byly prováděny v triplicátech ve 24 jamkových destičkách na HeLa buňkách přechodně transfekovaných hOAT1, MDCK II buňkách přechodně transfekovaných hOCT2, hCNT2, hCNT3. Buňky byly dvakrát opláchnuty transportním roztokem a preinkubovány ve stejném roztoku 10 min při 37 °C. Preinkubační transportní roztok byl odstraněn, k buňkám byl přidán roztok [³H]ETV (0-500 μ M) a inkubován po dobu 5 min při 37 °C. Po inkubaci byly buňky omyty dvakrát ledovým STOP roztokem. Lyzace buněk, odebrání vzorků na měření obsahu proteinu, měření radioaktivity a výpočet

% akumulované dávky standardizované vůči obsahu proteinu v testované jamce byl proveden stejným způsobem popsaným výše. Výpočet kinetického parametru K_m entecaviru byl proveden pomocí nelineární regresní analýzy dle modelu Michaelis-Mentenové v programu GraphPad Prism (verze 6).

Stanovení proteinu

Stanovení proteinu bylo provedeno komerční metodou BCA Protein Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) dle doporučeného postupu výrobce. Tato metoda je založena na redukčních vlastnostech proteinu v alkalickém prostředí, který redukuje Cu^{2+} na Cu^{1+} . Kyselina bicinchonová (BCA) chelatuje Cu^{1+} a tvoří ve vodě rozpustní fialový komplex, který je následně kolorimetricky detekován.

10 μl zlyzovaných buněk z každého vzorku z transportního experimentu bylo pipetováno do 96 jamkové destičky. Do každé jamky pak bylo přidáno 200 μl činidla z použitého kitu a destička byla inkubována 30 min při 37 °C. Absorbance vzniklých barevných komplexů ve vzorcích byla měřena při 562 nm. Jako standardní protein pro kalibrační křivku byl použit hovězí sérový albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v koncentracích 0-2000 $\mu\text{g/ml}$. Naměřená absorbance každé koncentrace BSA a námi připravených vzorků byla snížena o hodnotu absorbance pozadí. Pomocí kalibrační křivky připravené v programu MS Excel byla stanovena koncentrace námi připravených vzorků a následně mg proteinu v každé testované jamce.

Studie lékových interakcí na hOAT1

Studie interakcí adefoviru, tenofoviru nebo cidofoviru s ETV nebo AmB byly prováděny v triplicátech ve 24 jamkových destičkách s připravenými HeLa buňkami přechodně transfekovanými hOAT1 (viz výše). Kultivační medium bylo odstraněno a buňky byly dvakrát opláchnuty transportním roztokem a preinkubovány ve stejném roztoku 10 min při 37 °C. Radioaktivně značené antivirotikum [^3H]adefovir (0,1 μM), [^3H]tenofovir (0,5 μM) nebo [^3H]cidofovir (70 μM) rozpuštěné v transportním médiu s požadovanými inkubačními koncentracemi kompetitoru (ETV, AmB) bylo přidáno k buňkám a inkubováno 2 min při 37 °C. Entecavir byl použit v inkubačních koncentracích 0-1000 μM . AmB v koncentracích 0-345 μM . Po inkubaci byly buňky okamžitě dvakrát opláchnuty ledovým STOP roztokem. Lyzace buněk, měření

radioaktivity vzorků a výpočet % akumulované dávky vztažené na mg proteinu v jamce proběhlo stejným způsobem jako v kapitole Akumulační a inhibiční studie s SLC transportéry. Pro grafické vyjádření byla hodnota % akumulace/mg proteinu v kontrolních buňkách odečtena od hodnoty % akumulace/mg proteinu v buňkách exprimujících testovaný transportér. Afinita testovaných ETV nebo AmB k hOAT1 byla vyjádřena jako inhibiční koncentrace IC₅₀ potřebná ke snížení akumulace radioaktivně značeného antivirotika na 50 %. IC₅₀ byla vypočítána pomocí nelineární regresní analýzy v programu GraphPad Prism (verze 5 a 6).

Stanovení podílu aktivních procesů na transportu

S HK-2 a LLC-PK1 buňkami

HK-2 buňky byly nasazeny na 24 jamkovou destičku v počtu 1×10^4 buněk na jamku a LLC-PK1 buňky v počtu 5×10^4 buněk na jamku. Konfluentní buňky byly dvakrát opláchnuty transportním roztokem o teplotě 4 °C nebo 37 °C a preinkubovány ve stejném roztoku 10 min. [³H]AmB (1 μM) byl inkubován s buňkami při 4°C nebo 37 °C v časových intervalech 0-60 min v triplikátech. Inkubace byla zastavena opláchnutím buněk ledovým STOP roztokem. Testované jamky, kde byl přidán [³H]AmB okamžitě odsán (inkubační interval 0 min), sloužily jako kontrola nespecifické vazby na membránu a jako pozadí radioaktivity. Lyzace buněk, měření radioaktivity vzorků a výpočet % akumulované dávky vztažené na mg proteinu v jamce proběhlo stejným způsobem jako v kapitole Akumulační a inhibiční studie s SLC transportéry. Výsledky byly vyjádřeny jako % akumulované dávky standardizované vůči obsahu proteinu v čase t zmenšené o % akumulované dávky standardizované vůči obsahu proteinu v čase 0 min. Výpočet byl proveden v programu MS Excel. K výpočtu byla použita rovnice:

$$X = \frac{At \times 100}{D \times m} - \frac{Ao \times 100}{D \times m}$$

t = 30 min, nebo 60 min

At...akumulovaná dávka v čase t

Ao...akumulovaná dávka v čase 0

D...podaná dávka

m...mg proteinu

S HeLa buňkami přechodně transfekovanými hOAT1

Studie byly prováděny ve 24 jamkových destičkách s připravenými HeLa buňkami přechodně transfekovanými hOAT1 nebo prázdným vektorem (pCMV6) (viz výše). Kultivační medium bylo odstraněno a buňky byly dvakrát opláchnuty transportním roztokem o teplotě 4 °C nebo 37 °C a ve stejném roztoku byly preinkubovány 10 min. Radioaktivně značené antivirotikum [¹⁴C]adefovir (19 μM) nebo [¹⁴C]tenofovir (19 μM) rozpuštěné v transportním médiu bylo přidáno k buňkám a inkubováno při 4 °C nebo 37 °C v časových intervalech 2, 15 a 30 min v triplicátech. Po inkubaci byly buňky okamžitě dvakrát opláchnuty ledovým STOP roztokem. Lyzace buněk, měření radioaktivity vzorků a výpočet % akumulované dávky vztažené na mg proteinu v jamce proběhlo stejným způsobem jako v kapitole Akumulační a inhibiční studie s SLC transportéry. Pro grafické vyjádření byla hodnota % akumulace/mg proteinu v kontrolních buňkách odečtena od hodnoty % akumulace/mg proteinu v buňkách exprimujících testovaný transportér.

Studie interakcí testovaných látek s ABC transportéry

MDCK II-ABCG2 a MDCK II-ABCB1 buňky byly nasazeny v počtu 2×10^5 buněk na jamku ve 24 jamkové destičce 24 h před experimentem. Kultivační medium bylo odstraněno a buňky byly opláchnuty dvakrát transportním médiem o teplotě 37 °C. Buňky byly poté 30 min preinkubovány v transportním médiu v přítomnosti tří různých koncentrací testované látky při 37 °C a 5 % CO₂. K preinkubaci byly použity testované látky: PMEG, cPrPMEDAP, GS-9191, PMEO-DAPy, (S)-HPMPA, ETV v koncentracích 50 μM, 500 μM a 1000 μM. Následně byl do testovacích jamek přidán standardní substrát Hoechst 33342 (8 μM). Relativní jednotky fluorescence (RFU) při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm byly měřeny okamžitě po přidání Hoechst 33342 v 1 min intervalech až do 30 min inkubace při teplotě 37 °C (Genios Plus, Tecan, Salzburg, Austria). KO143 (240 nM), specifický inhibitor ABCB1 a LY335979 (1 μM), specifický inhibitor ABCG2, byly použity jako komparátory.

5.2.5 Stanovení cytotoxicity

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Experiment byl proveden pomocí komerčně dostupného kitu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96, Pomega, Fitchburg, USA) dle doporučení výrobce. Jedná se o typ stanovení, při kterém je sledován metabolický stav živých buněk. Přidané činidlo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-[3-(karboxymethoxy)fenyl]-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS) jsou živé buňky schopny redukovat na barevný produkt formazan, který je následně kolorimetricky stanovován.

HeLa buňky byly sazeny na 96 jamkovou destičku v počtu $1,5 \times 10^4$ buněk na jamku a byly přechodně transfekovány hOAT1 nebo prázdným vektorem pCMV6 (viz výše). 48 h po transfekci byly k buňkám přidány testované látky ETV, adefovir, tenofovir, cidofovir, PMEG, cPrPMEDAP, GS-9191, PME0-DAPy nebo (S)-HPMPA v koncentracích 50-1000 μM v triplikátech. V dalším experimentu zaměřeném na interakce látek mezi sebou byly stejné testované látky v koncentraci 1000 μM inkubovány současně s probenecidem (500 μM) nebo quercetinem (50 μM) v triplikátech.

MDCK II buňky byly sazeny na 96 jamkovou destičku v počtu 4×10^4 buněk na jamku a byly přechodně transfekovány hOCT2, hCNT2 nebo hCNT3 nebo prázdným vektorem pCMV6. 24 h po transfekci byly k buňkám přidány testované látky ETV v koncentracích 10-500 μM v triplikátech.

Současně byly připraveny kontroly 100 % viability (buňky, ke kterým bylo přidáno 1 % DMSO), 100 % toxicity (buňky, ke kterým bylo přidáno DMSO v koncentraci 10 %) a kontroly pozadí testovaných látek bez buněk. Po 24 h inkubace bylo k buňkám pipetováno 20 μl činidla MTS z kitu CellTiter 96. Po inkubaci 1,5 h (HeLa buňky) nebo 40 min (MDCK II buňky) při 37 °C byla měřena absorbance vzorků na destičkovém analyzátoru (Genios Plus, Tecan, Salzburg, Austria) při 490 nm. Od naměřených hodnot absorbance v testovaných jamkách (buňky + testovaná látka) byla odečtena hodnota absorbance pozadí testovaných látek (kultivační médium bez buněk + testovaná látka) a hodnota absorbance kontroly 100 % toxicity. Získaná hodnota byla vyjádřena v % buněčné životaschopnosti (viability), kdy 100 % představovala hodnota absorbance naměřená u buněk ošetřených pouze 1 % DMSO ponížená o hodnotu absorbance kontroly 100 % toxicity.

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay

Experiment byl proveden pomocí komerčně dostupného kitu CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (CytoTox-ONE, Pomega, Fitchburg, USA) dle doporučení výrobce. Tato fluorescenční metoda je založena na měření uvolněné laktátdehydrogenázy (LDH) z buněk s poškozenou membránou.

MDCK II buňky byly sazeny na 96 jamkovou destičku v počtu 4×10^4 buněk na jamku a byly přechodně transfekovány hOCT2 nebo prázdným vektorem pCMV6. 24 h po transfekci byly buňky dvakrát opláchnuty transportním médiem o teplotě 22 °C a preinkubovány ve stejném médiu 10 min. Poté byly k buňkám přidány testované látky AmB (1-100 μM), AmB/DOC (100 μM) nebo DOC (100 μM). Jako kontrola 100 % životnosti sloužily buňky, ke kterým bylo přidáno pouze rozpouštědlo (DMSO nebo MilliQ destilovaná voda) v koncentraci 1 %, jako porovnávací vzorky reprezentující maximální toxicitu (100 %) sloužily buňky, ke kterým byl přidán lyzačním roztok z použitého kitu. Vždy po uplynutí inkubačního intervalu (2 nebo 10 min) bylo odebráno vícekanálovou pipetou z inkubačního media 10 μl a pipetováno do prázdné 96 jamkové destičky. Ke každému takto získanému vzorku bylo následně přidáno 100 μl činidla CytoTox-ONE a následovala inkubace 10 min při 22 °C. Ke vzorkům bylo přidáno 50 μl činidla z použitého kitu k zastavení reakce. Fluorescence (RFU) vzorků byla měřena při 560nm /590nm na destičkovém analyzátoru (Genios Plus, Tecan, Salzburg, Austria).

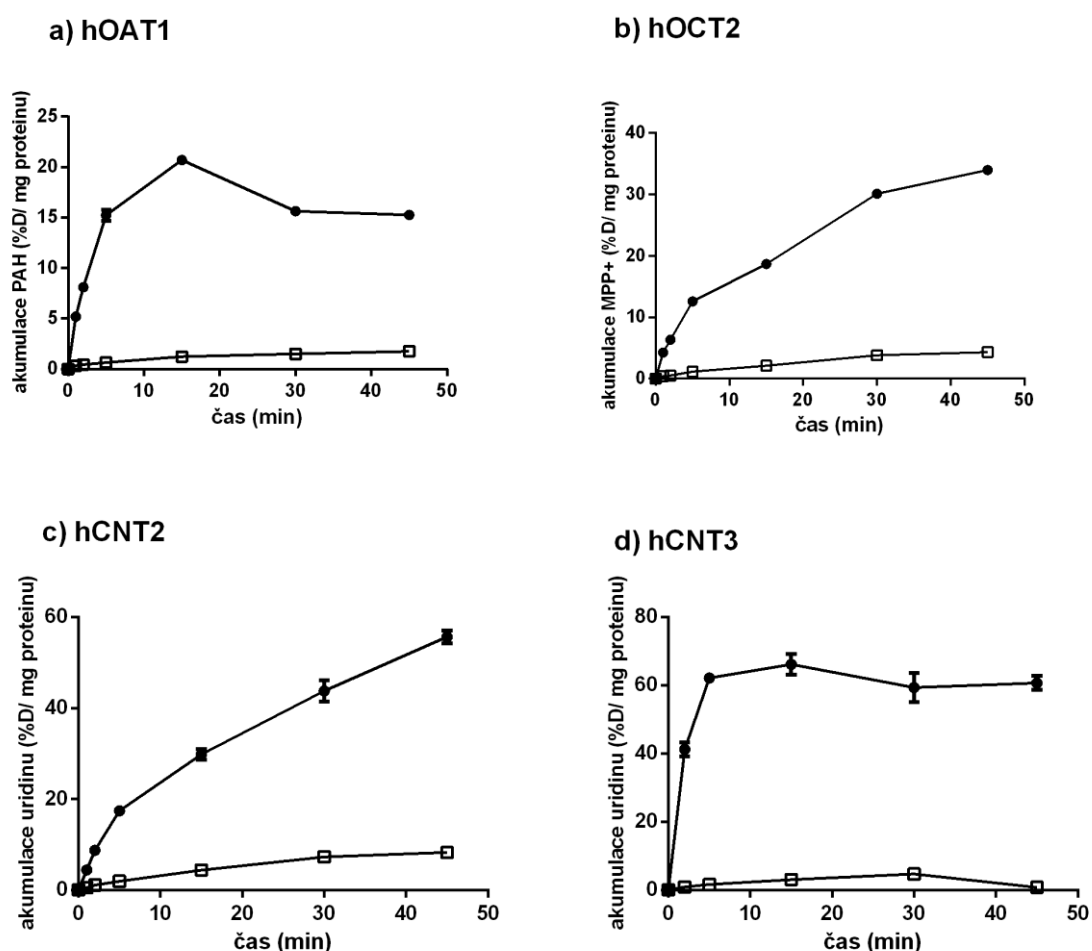
5.2.6 Statistická analýza

Výsledky experimentů jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance rozdílů průměrných hodnot studovaných parametrů byla hodnocena pomocí t-testu, one-way ANOVA testu s následným Bonferoniho testem nebo two-way ANOVA testu. Statistická významnost na hladině $p < 0,05$ je označena *, statistická významnost na hladině $p < 0,01$ je označena ** a statistická významnost na hladině $p < 0,001$ je označena ***.

6 Výsledky

6.1 Ověření funkčnosti transportérů v buněčných modelech

Pro kontrolu funkčnosti transportních studií jsme zjišťovali časový profil akumulace každého ze standardních [^3H] značených substrátů v příslušných transfekovaných buňkách (obr. 9). Intracelulární akumulace [^3H]PAH (obr. 9a), [^3H]MPP $^+$ (obr. 9b) a [^3H]uridinu (obr. 9c, d) byla lineární prvních 5 min a byla několikanásobně vyšší u buněk transfekovaných testovaným transportérem než u kontrolních buněk transfekovaných prázdným vektorem pCMV6.

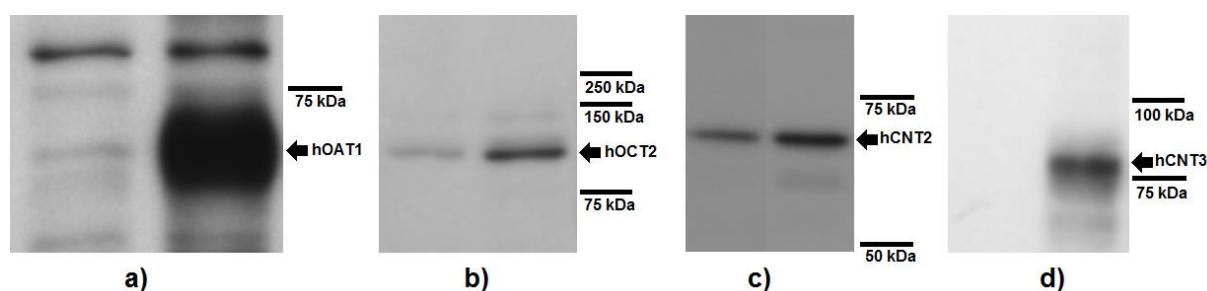


Obr. 9 Časová závislost akumulace typických substrátů studovaných transportérů v přechodně transfekovaných buněčných modelech. Časový profil akumulace [^3H]PAH v HeLa buňkách transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 (černé body) a buňkách transfekovaných prázdným vektorem pCMV6 (bílé čtverce) (a). Časový profil akumulace [^3H]MPP $^+$ v MDCK II buňkách transfekovaných hOCT2 (černé body) a buňkách transfekovaných prázdným vektorem pCMV6 (bílé čtverce) (b). Časový profil akumulace [^3H]uridinu v MDCK II buňkách transfekovaných hCNT2 (černé

body) a buňkách transfekovaných prázdným vektorem pCMV6 (bílé čtverce) (c). Časový profil akumulace [^3H]uridinu v MDCK II buňkách transfekovaných hCNT3 (černé body) a buňkách transfekovaných prázdným vektorem pCMV6 (bílé čtverce) (d). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství radioaktivního substrátu.

6.2 Ověření exprese transportérů v buněčných modelech Western blottingem

Expres testovaných SLC transportérů po přechodné transfekci příslušným expresním plazmidem byla potvrzena metodou Western blottingu. Jako kontrola sloužil proteinový extrakt buněk HeLa nebo MDCK II transfekovaných prázdným vektorem pCMV6. Pomocí této metody jsme potvrdili expresi všech testovaných transportérů, která byla ve srovnání s kontrolou několikanásobně zvýšená (obr. 10).

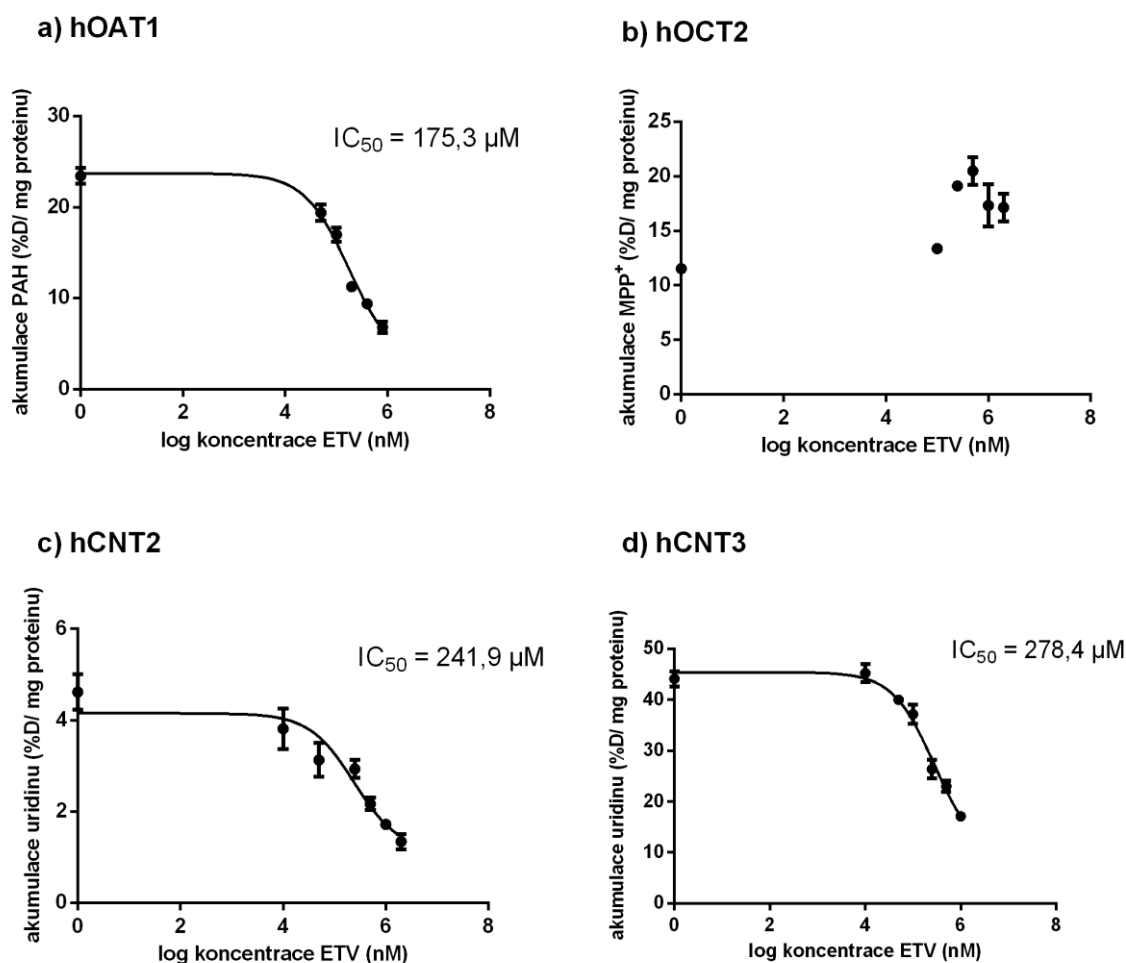


Obr. 10 Demonstrace exprese transportérů v transfekovaných buňkách za použití metody Western blottingu. Western blottová analýza: overexpres hOAT1 (a), hOCT2 (b), hCNT2 (c) a hCNT3 (d) v přechodně transfekovaných buňkách. Linie 1: negativní kontrola (buňky transfekované prázdným vektorem pCMV6), linie 2: zvýšená exprese příslušného transportéru.

6.3 Interakce entecaviru s transportéry

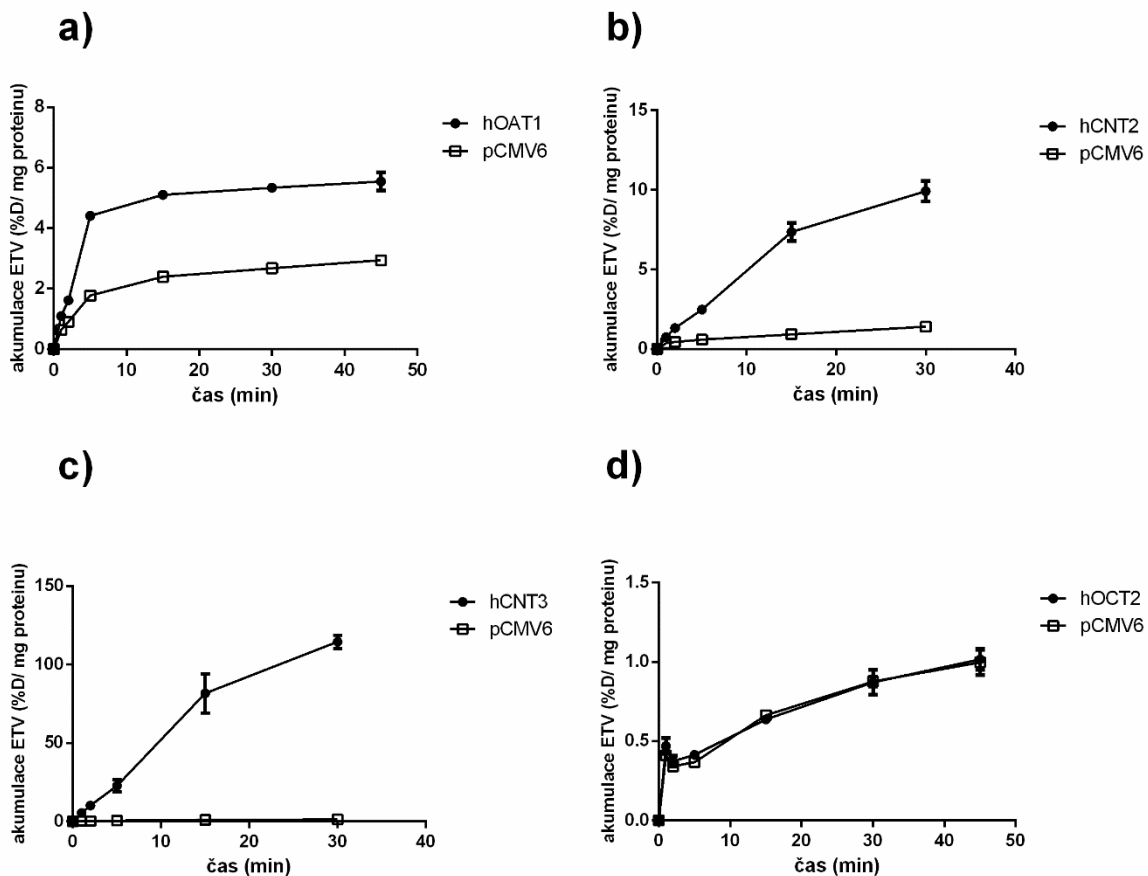
6.3.1 Interakce ETV s SLC transportéry

Pro zjištění afinity ETV k testovaným SLC transportérům jsme inkubovali standardní substráty značené [^3H] současně s ETV v testovacích destičkách s přechodně transfekovanými buňkami. Akumulace standardních substrátů v buňkách transfekovaných hOAT1, hCNT2 nebo hCNT3 byla po přidání postupně se zvyšujících koncentrací ETV snížena (obr. 11). Na základě získaných hodnot jsme stanovili parametr IC_{50} pro entecavir u všech tří transportérů. V našich experimentálních podmínkách nebyla pozorována žádná interakce ETV s hOCT2 (obr. 11b).



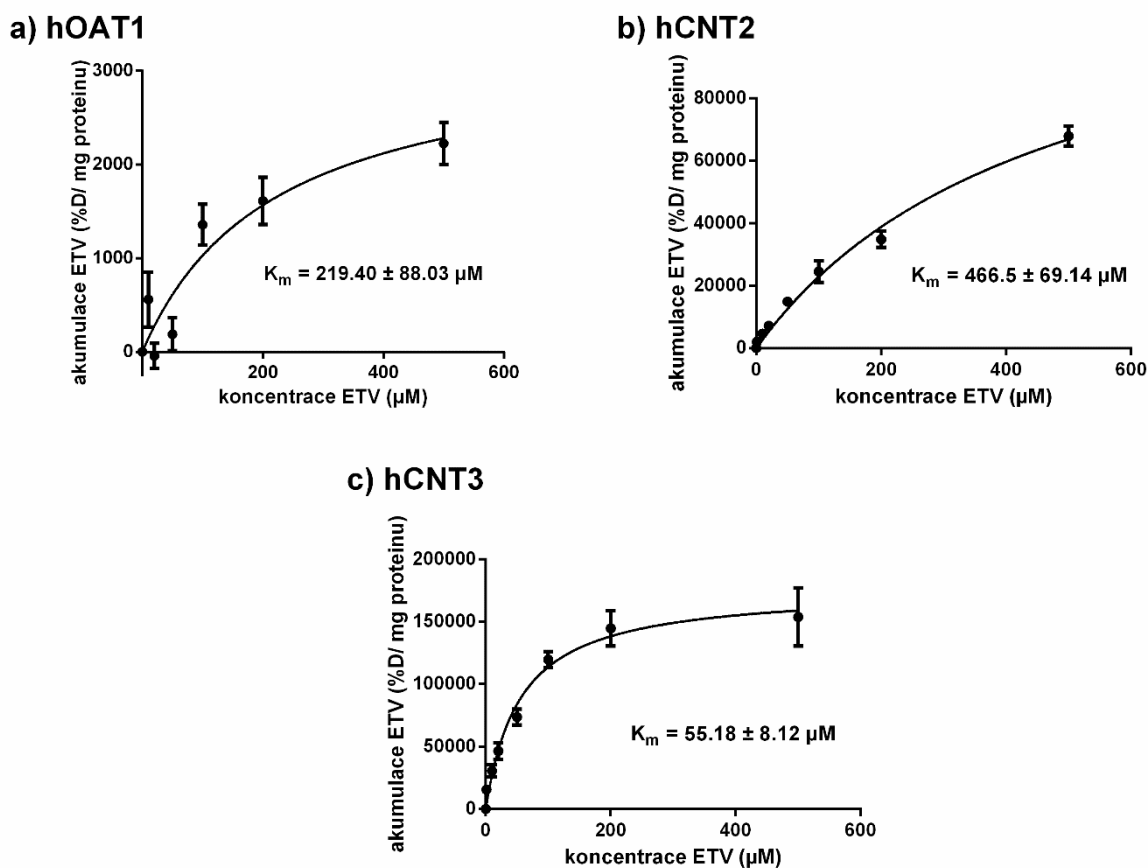
Obr. 11 Srovnání inhibičního vlivu ETV na akumulaci standardních substrátů testovaných transportérů. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 (a) a MDCK II buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOCT2 (b), hCNT2 (c) nebo hCNT3 (d) byly inkubovány s [³H]PAH (a), [³H]MPP⁺ (b) nebo [³H]uridinem (c, d) v přítomnosti postupně se zvyšujících koncentrací ETV (0–2000 μM) po dobu 2 min při 37 °C v triplicátech. Každý bod představuje aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství radioaktivního substrátu. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem pCMV6 byla odečtena.

S použitím [³H]ETV jsme testovali, zda je ETV substrátem testovaných transportérů. Akumulace [³H]ETV v buňkách transfekovaných hOAT1, hOCT2, hCNT2 nebo hCNT3 byla prvních 5 min lineární (obr. 12). Akumulace [³H]ETV v buňkách transfekovaných hOAT1, hCNT2 nebo hCNT3 byla ve všech časových intervalech několikanásobně vyšší než akumulace [³H]ETV v kontrolních buňkách transfekovaných prázdným vektorem (pCMV6) (obr. 12a, b, c). Naopak žádný rozdíl v akumulaci [³H]ETV v buňkách transfekovaných hOCT2 a kontrolních buňkách jsme nepozorovali (obr. 12d).



Obr. 12 Časová závislost akumulace [^3H]ETV v HeLa buňkách transfekovaných hOAT1. [^3H]ETV 0,1 μM byl inkubován s buňkami přechodně transfekovanými expresním vektorem pro hOAT1 (a), hCNT2 (b), hCNT3 (c) nebo hOCT2 (d) (černé body) nebo prázdným vektorem pCMV6 (bílé čtverce) při 37 °C v triplicátech. Akumulace byla lineární během prvních 5 min inkubace. Každý bod reprezentuje aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství [^3H]ETV.

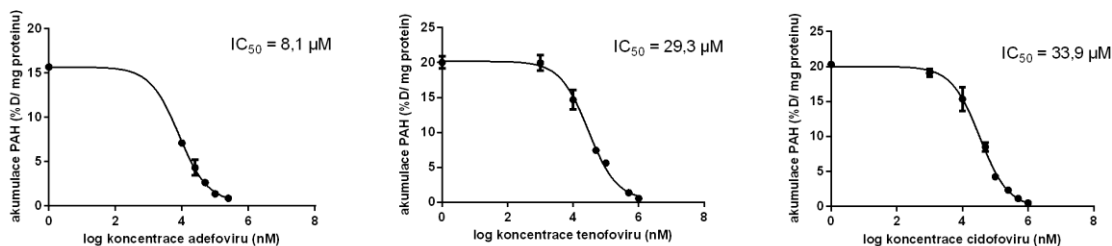
Na základě těchto experimentů jsme provedli transportní studie s postupně se zvyšujícími koncentracemi radioaktivního ETV v transfekovaných buňkách v časovém intervalu 5 min. Získané výsledky dokazují, že ETV je substrátem hOAT1, hCNT2 a hCNT3 (obr. 13).



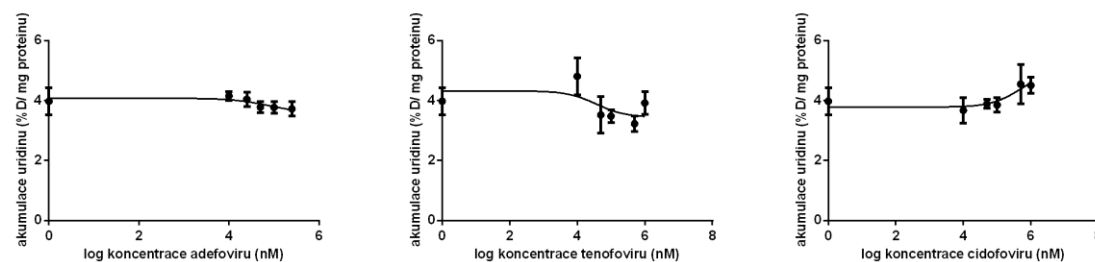
Obr. 13 Koncentrační závislost akumulace [^3H]ETV v buňkách přechodně transfekovaných hOAT1, hCNT2 nebo hCNT3. [^3H]ETV v koncentraci (0-600 μM) byl inkubován s buňkami přechodně transfekovanými expresním vektorem pro hOAT1 (a), hCNT2 (b) nebo hCNT3 (c) po dobu 5 min při 37 °C v triplicátech. Každý bod reprezentuje aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství ETV. Hodnota K_m byla vypočítána pomocí nelineární regresní analýzy dle rovnice Michaelis-Mentenové. Hodnota akumulace ETV v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

Výsledky porovnávající afinitu adefoviru, tenofoviru a cidofoviru k transportérům hOAT1, hCNT2 a hCNT3 v námi použitých buněčných modelech ukazuje obr. 14. Adefovir, tenofovir a cidofovir interagoval pouze s hOAT1 (obr. 14a). Žádnou významnou interakci adefoviru, tenofoviru a cidofoviru s koncentračními nukleosidovými transportéry hCNT2 (obr. 14b) ani s hCNT3 (obr. 14c) jsme nepozorovali.

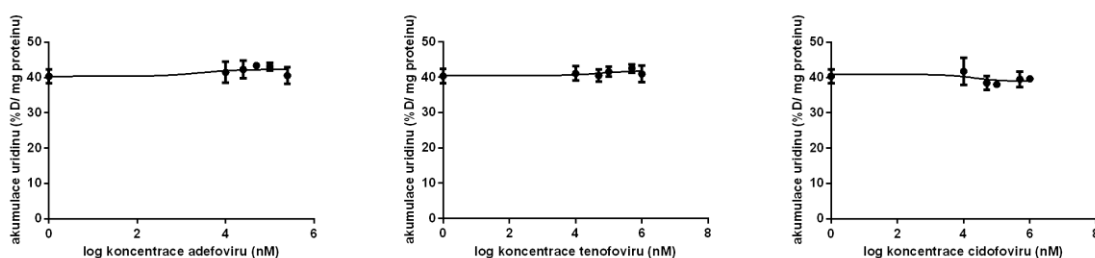
a) hOAT1



b) hCNT2



c) hCNT3

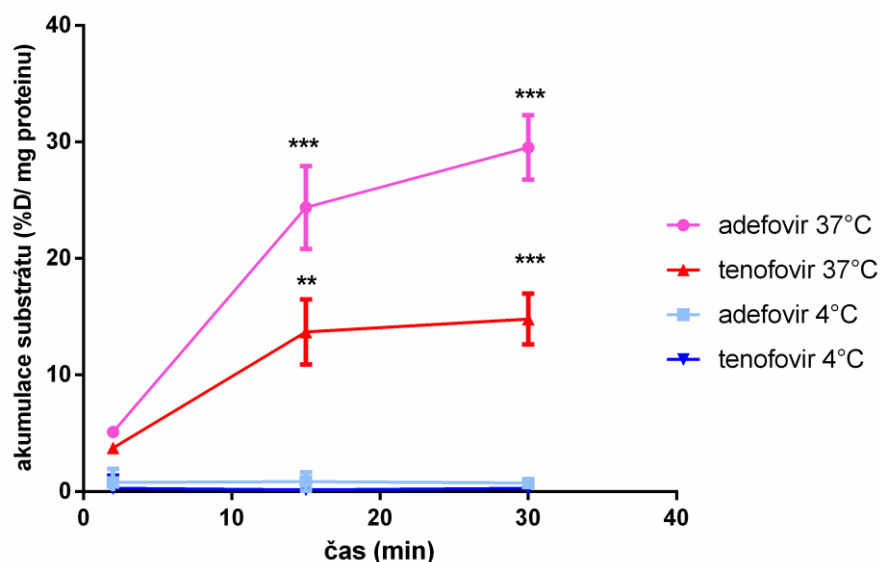


Obr. 14 Srovnání afinity adefoviru, tenofoviru a cidofoviru k transportérům hOAT1, hCNT2 a hCNT3. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 byly inkubovány s [³H]PAH (a). MDCK II buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hCNT2 (b) nebo hCNT3 (c) byly inkubovány s [³H]uridinem v přítomnosti postupně se zvyšujících koncentrací adefoviru, tenofoviru nebo cidofoviru (0-1000 μM) po dobu 2 min při 37 °C v triplicátech. Každý bod představuje aritmetický průměr ± SD akumulovaného množství radioaktivního substrátu. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

Vzájemné interakce ETV s dalšími antiviroty na hOAT1

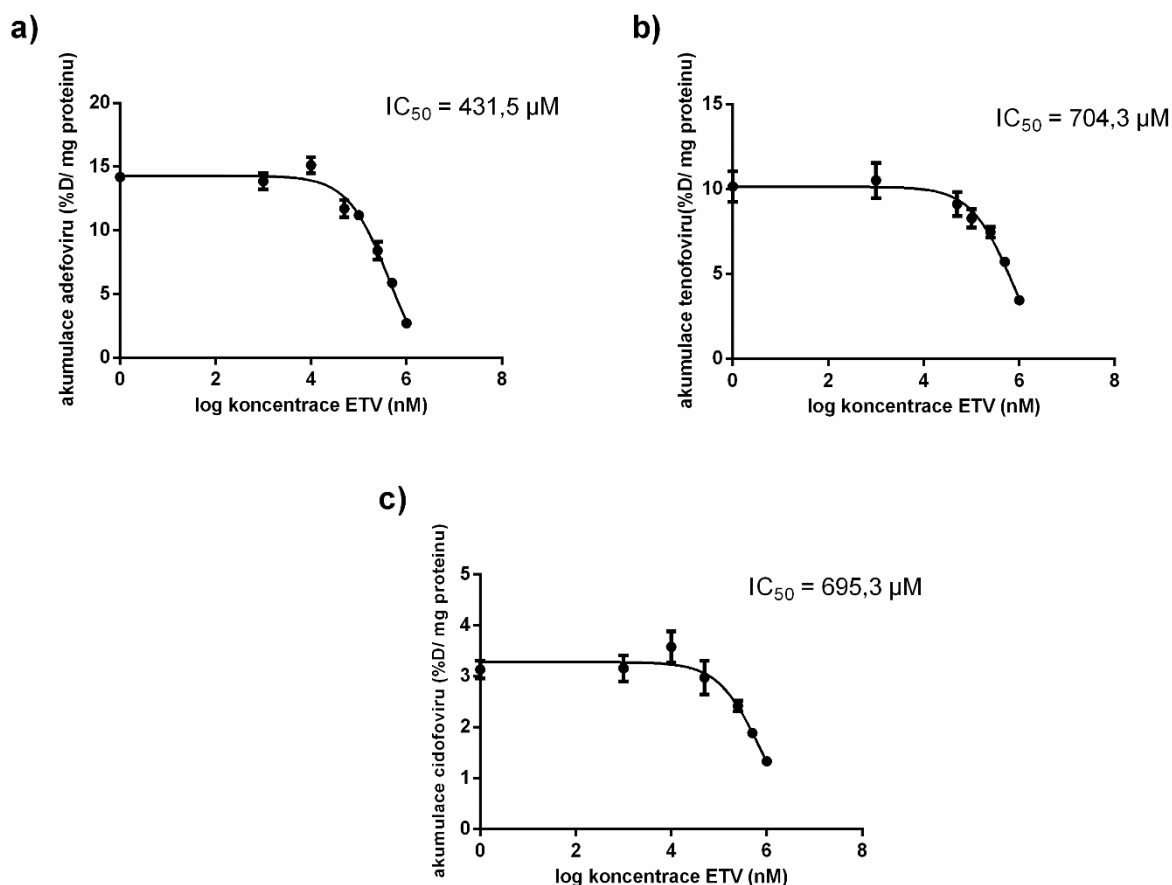
Protože ETV vykazoval významnou inhibici hOAT1, vybrali jsme tento transportér pro kompetitivní studie s klinicky užívanými antiviroty. V první fázi jsme potvrdili zapojení aktivních procesů do jejich buněčného transportu a substrátovou specifitu k hOAT1 v námi použitém buněčném modelu. Pro experiment jsme vybrali

antivirotika adefovir a tenofovir, které jsou známými substráty hOAT1. Při inkubaci při nízkých teplotách se u obou antivirotik více než desetinásobně snížila jejich buněčná akumulace prostřednictvím transportéru hOAT1 (obr. 15).



Obr. 15 Závislost akumulace [^{14}C]adefoviru a [^{14}C]tenofoviru v HeLa buňkách přechodně transfekovaných hOAT1 na inkubační teplotě. [^{14}C]adefovir (19 μM) nebo [^{14}C]tenofovir (19 μM) byl inkubován s HeLa buňkami přechodně transfekovanými expresním vektorem pro hOAT1 při 37 °C nebo 4 °C v časových intervalech 2, 15 a 30 min v triplikátech. Každý bod reprezentuje aritmetický průměr akumulovaného množství [^{14}C] substrátu \pm SD. Hodnota akumulace [^{14}C]adefoviru nebo [^{14}C]tenofoviru v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

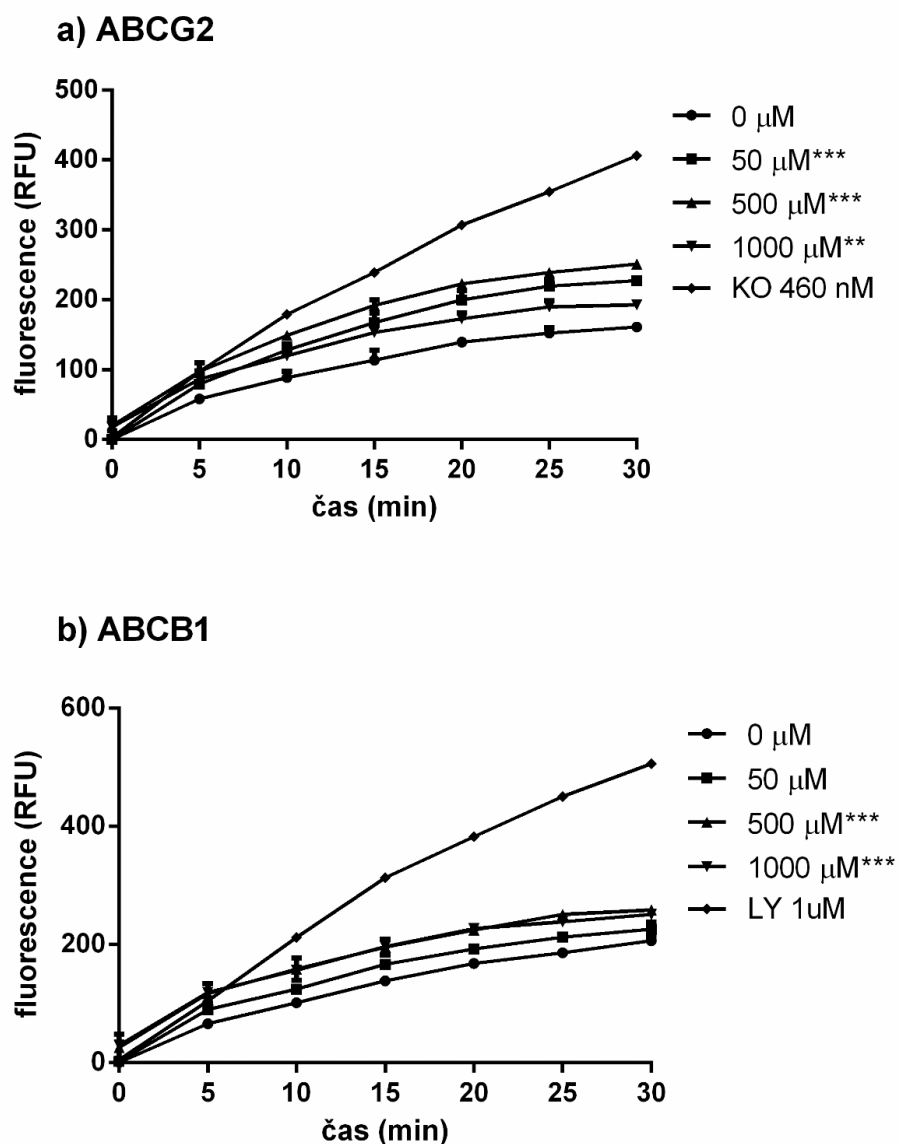
Abychom zjistili možné interakce ETV s potenciálně současně podávanými antivirotiky, provedli jsme inkubaci postupně se zvyšujícími koncentracemi ETV s [^3H] značeným adefovirem, tenofovirem nebo cidofovirem. K tomuto experimentu byl použit buněčný model HeLa přechodně transfeovaný expresním vektorem pro hOAT1. ETV inhiboval akumulaci všech tří antivirotik. Výsledky inhibice jsou vyjádřeny jako IC_{50} ETV při inhibici akumulace jednotlivých antivirotik. (obr. 16).



Obr. 16 Vliv ETV na uptake adefoviru, tenofoviru a cidofoviru v HeLa buňkách přechodně transfekovaných hOAT1. Akumulace [3 H]adefoviru (0,1 μ M) (a), [3 H]tenofoviru (0,5 μ M) (b) a [3 H]cidofoviru (70 μ M) (c) v HeLa buňkách přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 byla inhibována postupně se zvyšujícími koncentracemi ETV (0-1000 μ M) po dobu 2 min při 37 $^{\circ}$ C v triplicátech. Každý bod představuje aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství substrátu. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

6.3.2 Interakce ETV s ABC transportéry

Inhibiční vliv ETV na efluxní transportéry BCRP/ABCG2 nebo P-gp/ABCB1 jsme studovali s pomocí typického substrátu BCRP a P-gp Hoechst 33342 v buněčných modelech MDCK II-ABCG2 a MDCK II-ABCB1 (obr. 17). ETV se projevil v podmínkách experimentu jako inhibitor BCRP/ABCG2 (obr. 17a). ETV při inkubační koncentraci 500 μ M zvýšil akumulaci Hoechst 33342 o 56 % v MDCK II-ABCG2 buňkách. 500 μ M ETV inhiboval akumulaci Hoechst 33342 v MDCK II-ABCB1 buňkách pouze o 20 % (obr. 17b). Vyšší koncentrace ETV (1000 μ M) vedla paradoxně k mírnějšímu inhibičnímu účinku ETV ve srovnání s 500 μ M ETV.

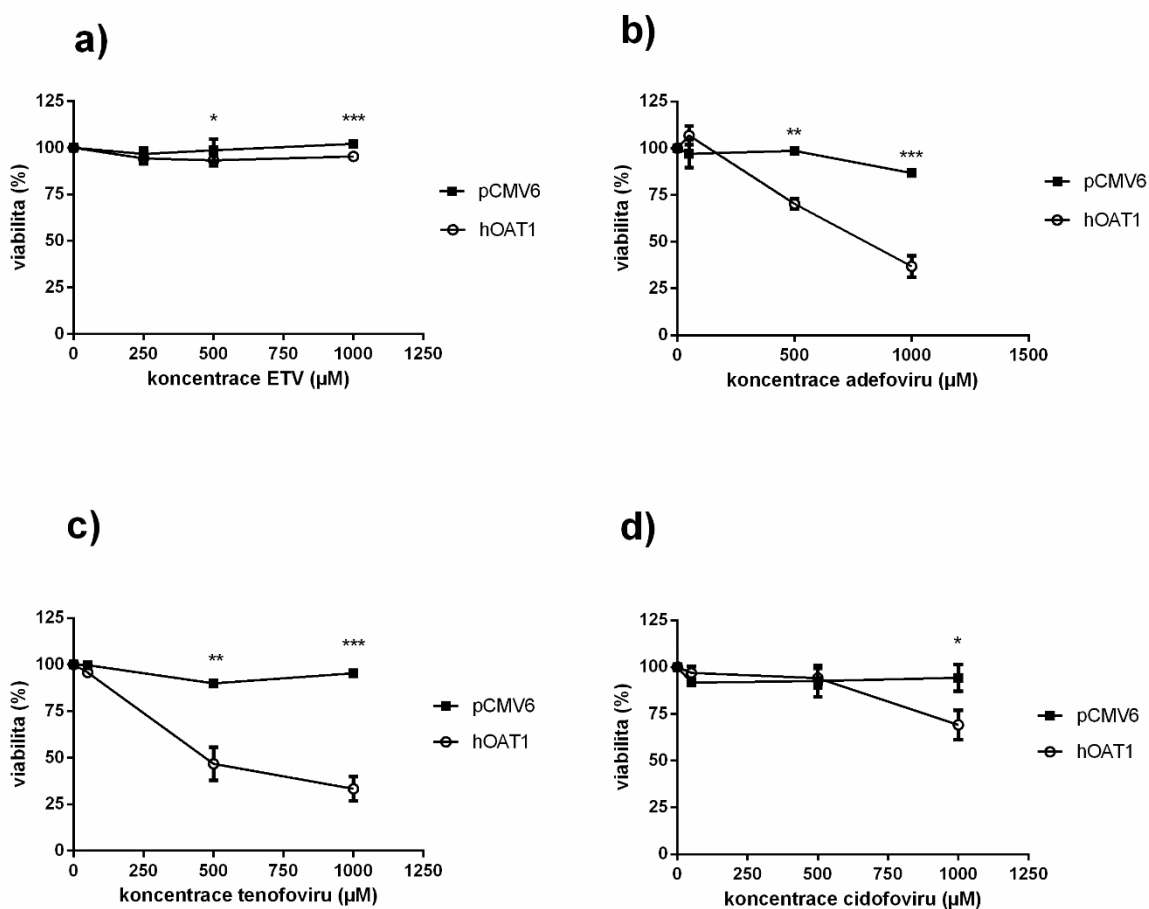


Obr 17 Inhibiční účinek různých koncentrací ETV na funkci BCRP/ABCG2 a P-gp/ABCB1. Byla sledována akumulace standardního substrátu Hoechst 33342 v MDCK II-ABCB1 (a) a v MDCK II-ABCG2 (b) buňkách inkubovaných v nepřítomnosti (kontrola) nebo přítomnosti různých koncentrací ETV (50 μM , 500 μM , 1000 μM). Specifický inhibitor P-gp/ABCB1, LY335979 (LY) a specifický inhibitor BCRP/ABCG2, KO143 (KO), byly použity pro porovnání míry inhibice studovaných transportérů. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD získaný ze tří nezávislých měření.

6.3.3 Cytotoxicita ETV

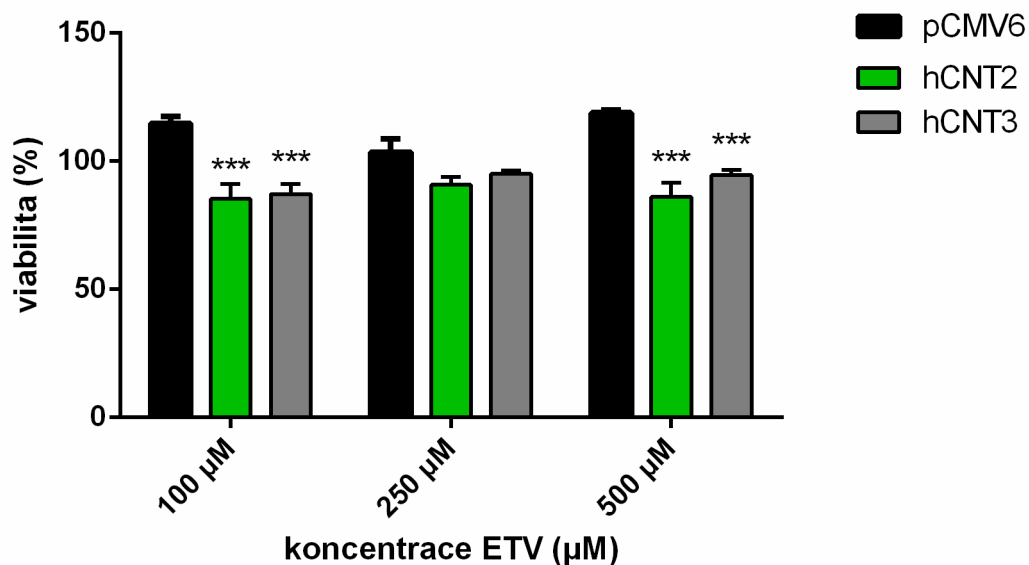
Pro studium vlivu ETV a dalších srovnávacích antivirotik na životnost HeLa buněk transfekovaných transportérem hOAT1 jsme použili standardní kolorimetrickou metodu s barvivem MTS. Přidání ETV v inkubačních koncentracích (250 μM , 500 μM a 1000 μM) nemělo po 24 h téměř žádný cytotoxický účinek na buňky transfekované

hOAT1 ani buňky transfekované prázdným vektorem pCMV6 (kontrola) (obr. 18a). Expres hOAT1 signifikantně zvýšila cytotoxický účinek adefoviru, tenofoviru a cidofoviru ve srovnání s kontrolou (obr. 18b, c, d).



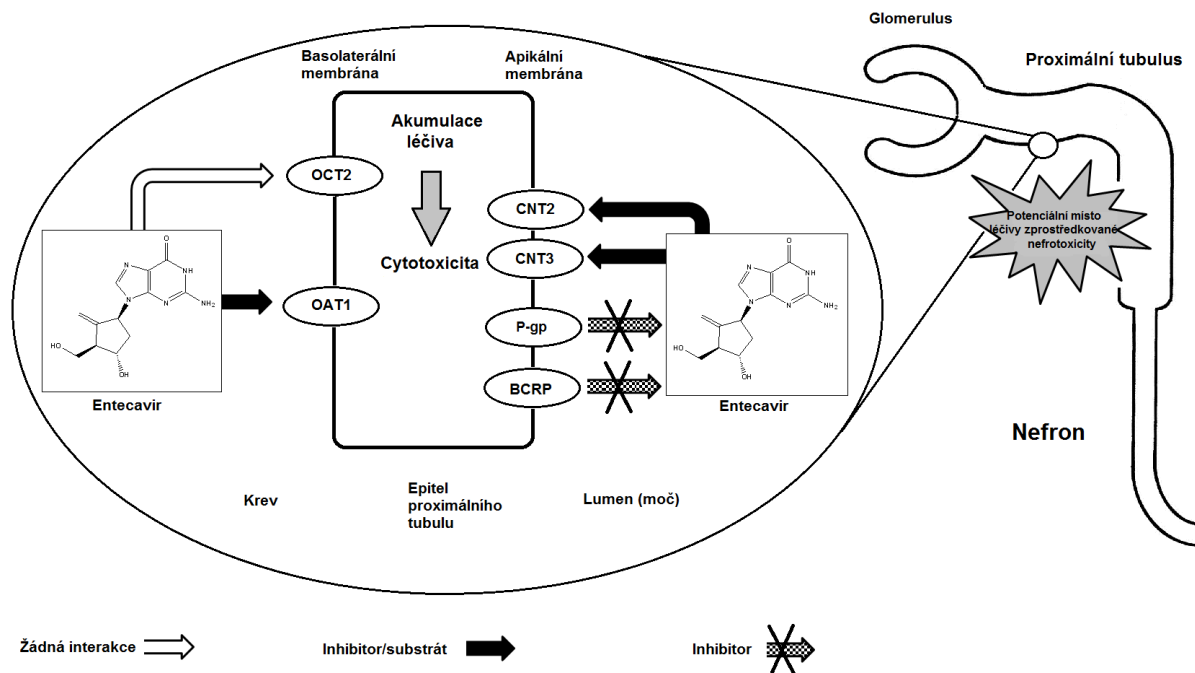
Obr. 18 Vliv exprese hOAT1 na cytotoxicitu testovaných antivirotik. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 (bílé kruhy) nebo prázdným vektorem pCMV6 (černé čtverce) byly inkubovány po dobu 24 h při 37 °C v přítomnosti různých koncentrací ETV (a), adefoviru (b), tenofoviru (c) a cidofoviru (d) v triplicátech. Experimenty byly provedeny souběžně v buňkách transfekovaných hOAT1 a buňkách transfekovaných prázdným vektorem. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD získaný ze tří nezávislých měření.

Abychom zjistili možné cytotoxické působení ETV zprostředkované transportéry hCNT2 nebo hCNT3, nechali jsme ETV v různých koncentracích inkubovat s transfekovanými buňkami po dobu 24 h. Jako kontrola sloužily buňky transfekované prázdným vektorem pCMV6. Cytotoxický účinek byl mírný, ani u jednoho buněčného modelu nedošlo po inkubaci s ETV k poklesu životaschopnosti pod 85 % (obr. 19). Signifikantní snížení životnosti buněk transfekovaných hCNT2 nebo hCNT3 vůči kontrole potvrzuje substrátovou specifitu ETV k těmto transportérům.



Obr. 19 Účinek exprese hCNT2 a hCNT3 na cytotoxicitu ETV. MDCK buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hCNT2 (zelené sloupce), hCNT3 (šedé sloupce) nebo prázdným vektorem pCMV6 (černé sloupce) byly inkubovány po dobu 24 h při 37 °C v přítomnosti tří různých koncentrací ETV v triplikátech. Experimenty byly provedeny souběžně v buňkách transfekovaných testovaným transportérem a buňkách transfekovaných prázdným vektorem (kontrola). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD získaný ze tří nezávislých měření.

Grafické vyjádření možného pohybu entecaviru v ledvinných buňkách, které lze odvodit z dosažených výsledků znázorňuje obr. 20. Dle našich výsledků transportních studií *in vitro* ETV může vstupovat z krve do buňky proximálního tubulu prostřednictvím OAT1 a jeho reabsorpce z moči může být zprostředkována CNT2 a CNT3. ETV je schopen inhibovat efluxní transportéry P-gp a BCRP.

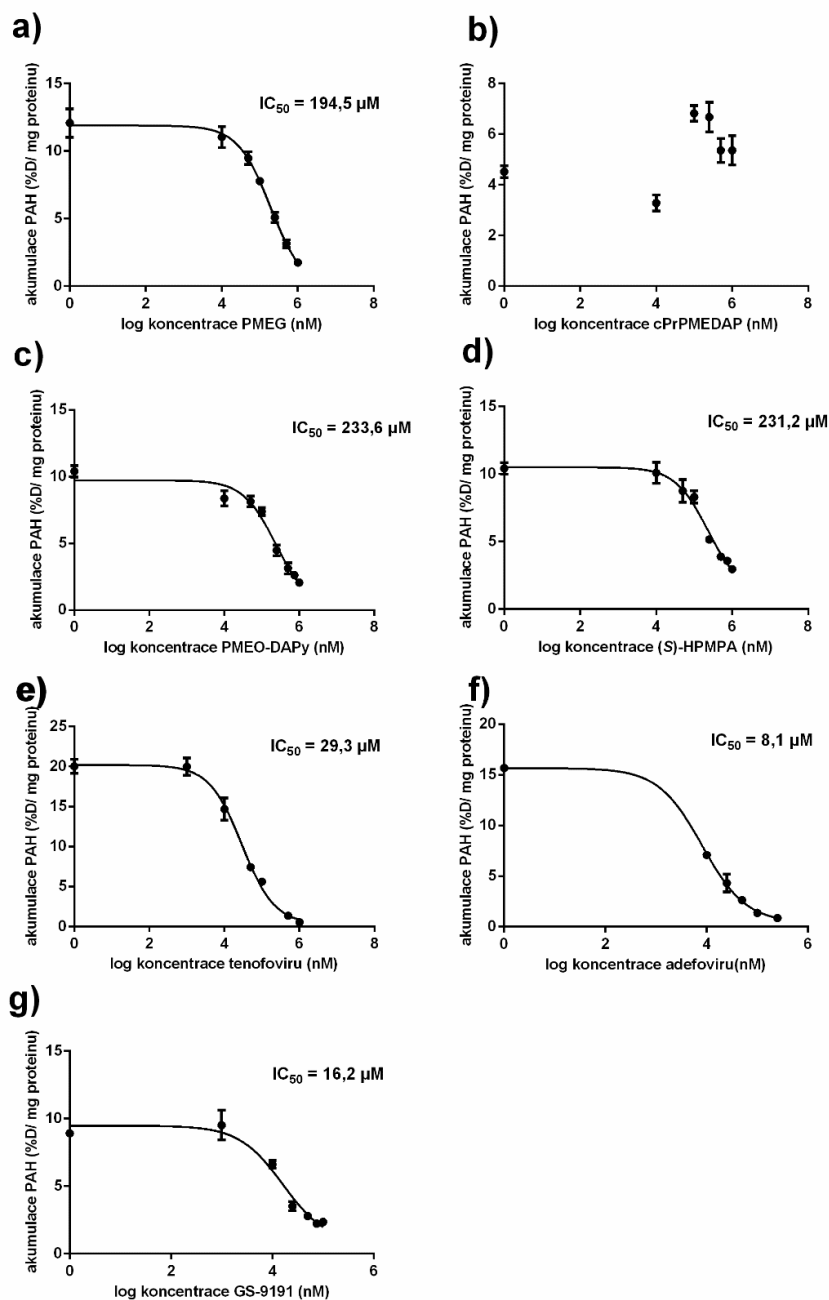


Obr. 20 Schématické znázornění transportu ETV v buňce proximálního tubulu.

6.4 Interakce antivirových ANPs s transportéry

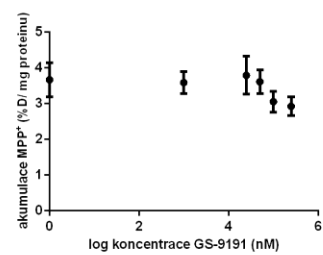
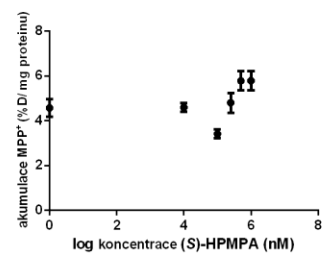
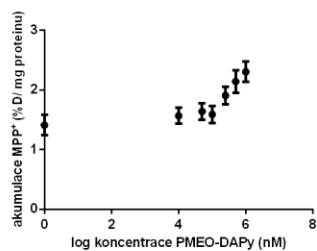
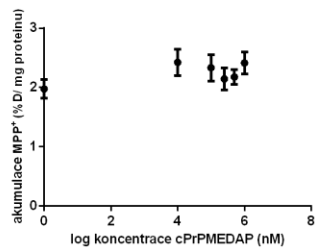
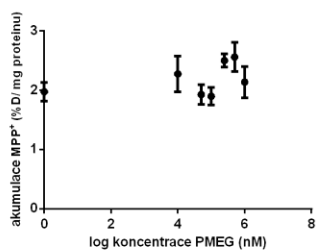
6.4.1 Interakce s SLC transportéry

Studium afinity zkoumaných ANPs k vybraným transportérům jsme prováděli na buněčných modelech přechodně transfekovaných hOAT1, hOCT2, hCNT2 nebo hCNT3 ve srovnání se standardními antivirovými látkami z této skupiny – adefovirem, tenofovirem a cidofovirem. Doba inkubace standardního [³H] značeného substrátu byla 2 min. Zkoumané ANPs vykazovaly inhibiční účinek pouze na akumulaci [³H]PAH v HeLa buňkách transfekovaných hOAT1 (obr. 21). Dle afinity k hOAT1 můžeme rozdělit testované ANPs do tří skupin. V první skupině s relativně nízkou afinitou k hOAT1 se nachází látky PMEG, PMEO-DAPy a (S)-HPMPA. Druhá skupina obsahuje adefovir, tenofovir a GS-9191, které mají vyšší afinitu k hOAT1. Afinita látky GS-9191 k hOAT1 byla asi 15 krát vyšší než afinita testovaných ANPs z první skupiny. Ve třetí skupině je pouze látka cPrPMEDAP, u které jsme interakci s hOAT1 a vliv na kumulaci [³H]PAH neprokázali. Interakce ANPs s hOCT2, hCNT2 ani hCNT3 jsme neprokázali (obr. 22).

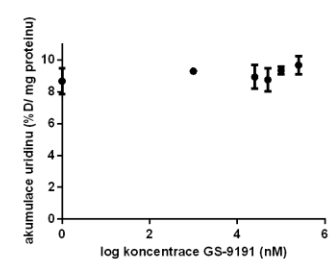
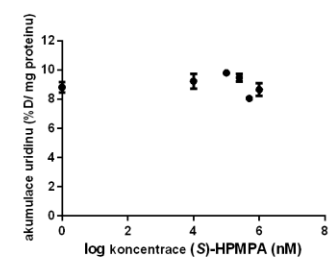
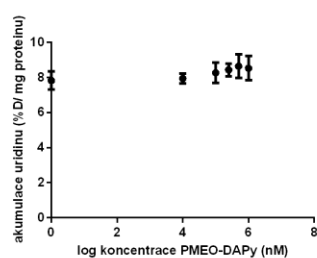
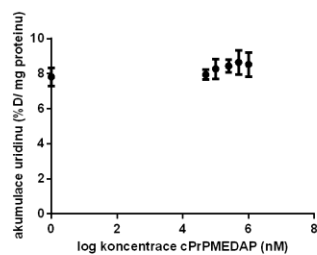
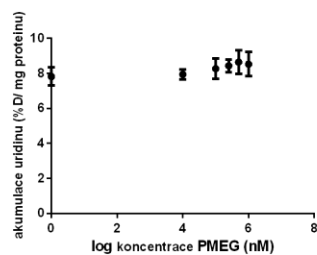


Obr. 21 Srovnání afinity testovaných ANPs k hOAT1. HeLa buňky transientně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 byly inkubovány s $[^3H]$ PAH s postupně se zvyšujícími koncentracemi PMEG (a), cPrPMEDAP (b), PMEO-DAPy (c), (S)-HPMPA (d), tenofoviru (e), adefoviru (f) nebo GS-9191 (g) po dobu 2 min při 37 °C v triplikátech. Každý bod představuje aritmetický průměr \pm SD akumulovaného množství $[^3H]$ PAH. Hodnota akumulace $[^3H]$ PAH v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

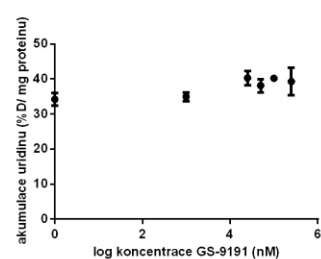
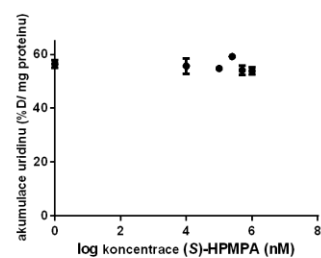
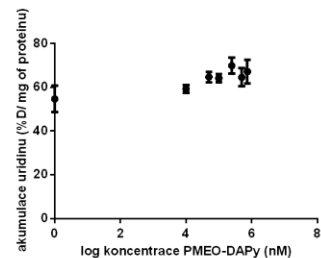
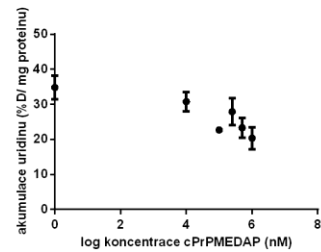
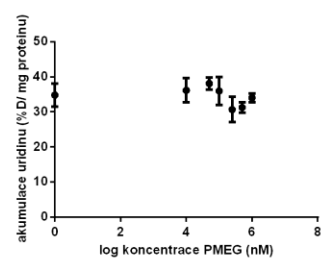
a) hOCT2



b) hCNT2



c) hCNT3

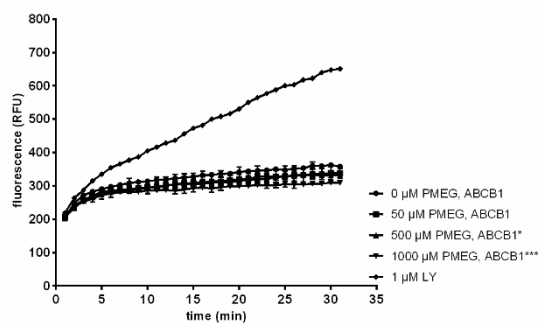


Obr. 22 Inhibiční účinek testovaných ANPs na akumulaci standardního substrátu v MDCK II buňkách transfekovaných hOCT2, hCNT2 nebo hCNT3. MDCKII buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOCT2 (a), hCNT2 (b) nebo hCNT3 (c) byly inkubovány s [³H]MPP⁺ nebo [³H]uridinem v přítomnosti postupně se zvyšujících koncentrací ANPs po dobu 2 min při 37 °C v triplikátech. Každý bod reprezentuje aritmetický průměr akumulovaného množství substrátu ± SD. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

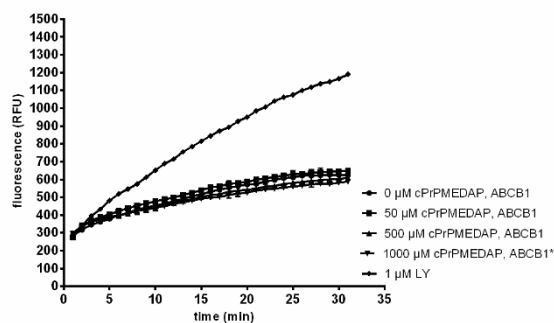
6.4.2 Interakce ANPs s ABC transportéry

Pro stanovení možné interakce testovaných ANPs s P-gp/ABCB1 a BCRP/ABCG2, byl inkubován standardní fluorescenční substrát Hoechst 33342 s buňkami MDCK II-ABCB1 a MDCK II-ABCG2 v přítomnosti různých koncentrací ANPs. Standardní specifický inhibitor pro ABCB1, KO143 a standardní specifický inhibitor pro ABCG2, LY335979 byly použity pro porovnání míry inhibice efluxu Hoechst 33342. Ze všech testovaných ANPs měla v podmínkách našeho experiment nejsilnější inhibiční vliv na P-gp/ABCB1 i na BCRP/ABCG2 látka GS-9191. Tato látka v koncentraci 120 μM zvýšila akumulaci Hoechst 33342 o 74 % v buňkách MDCKII-ABCB1 (obr 23c) a o 78 % v buňkách MDCKII-ABCG2 (obr. 24c). Inhibiční aktivita byla srovnatelná s inhibiční aktivitou specifických inhibitorů P-gp/ABCB1 a BCRP/ABCG2. Látka PME0-DAPy způsobila mírný nárůst akumulace Hoechst 33342 ($p < 0.05$) o 18 % v buňkách MDCK II-ABCB1 (obr. 23d). Její účinek na akumulaci Hoechst 33342 v buňkách MDCK II-ABCG2 byl zanedbatelný (9 %) (obr. 24d). Působení dalších testovaných ANPs směrem ke zvýšení akumulace Hoechst 33342 nebylo vůči kontrole signifikantní (obr. 23-24).

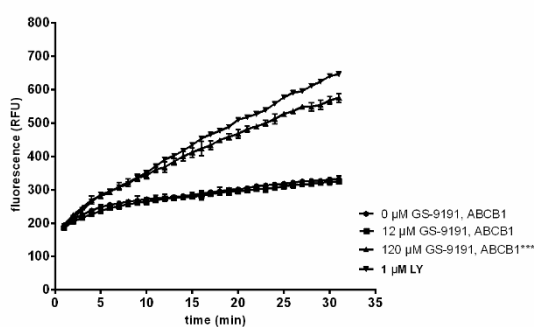
a) PMEG



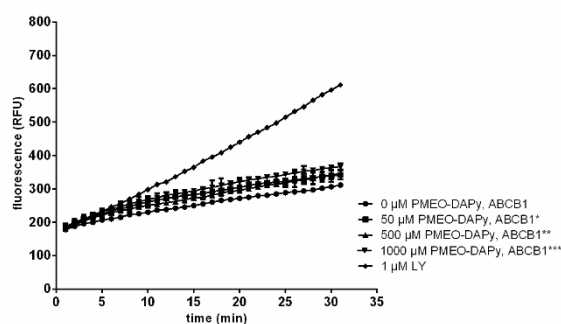
b) cPrPMEDAP



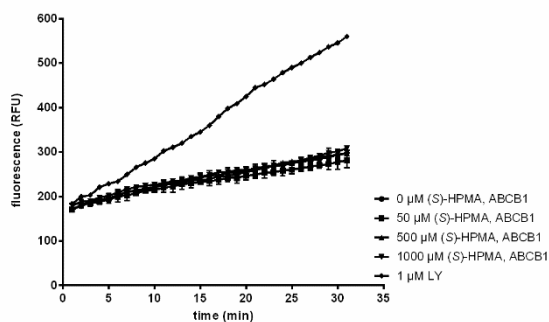
c) GS-9191



d) PMEO-DAPy

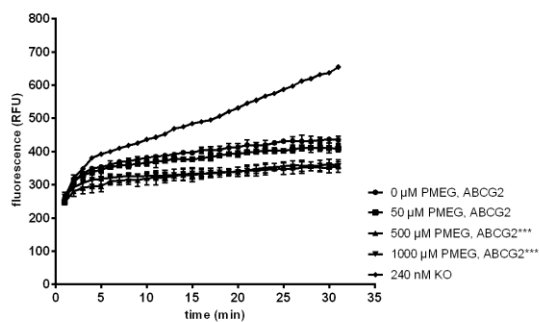


e) (S)-HPMPA

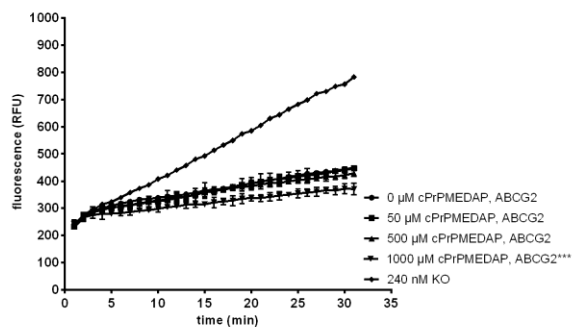


Obr. 23 Inhibice funkce P-gp/ABCB1 testovanými ANPs. Standardní substrát Hoechst 33342 byl inkubován s MDCK-ABCB1 buňkami v nepřítomnosti (kontrola) nebo přítomnosti různých koncentrací PMEG (a), cPrPMEDAP (b), GS-9191 (c), PMEO-DAPy (d) nebo (S)-HPMPA (e). Specifický inhibitor ABCB1, LY335979 (LY), byl použit pro srovnání míry inhibice testovanými látkami. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD získaný ze tří nezávislých měření.

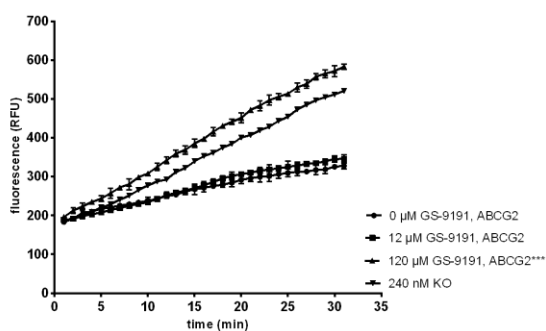
a) PMEG



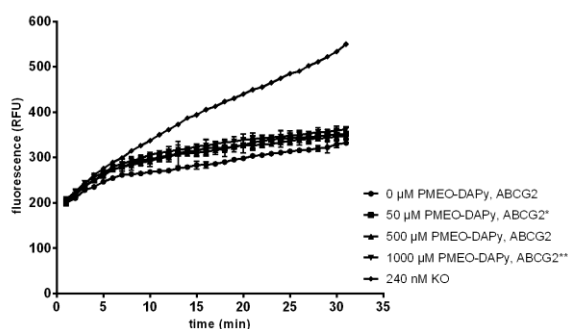
b) cPrPMEDAP



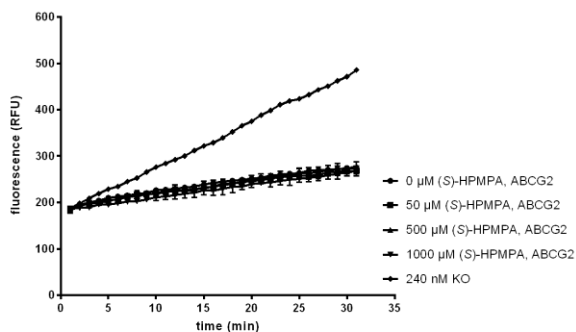
c) GS-9191



d) PMEODAPy



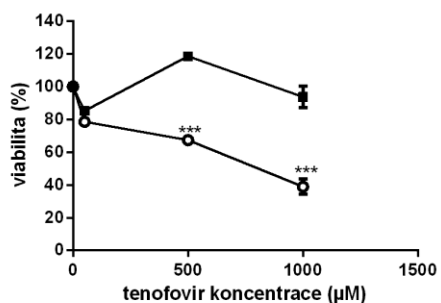
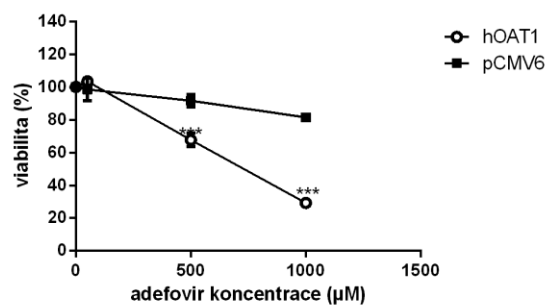
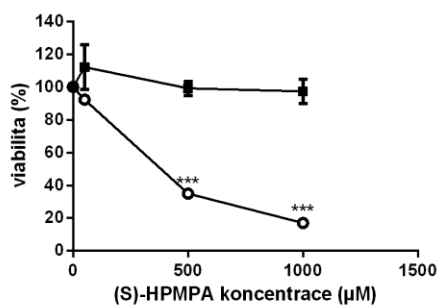
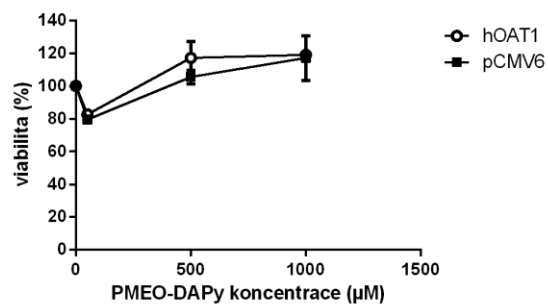
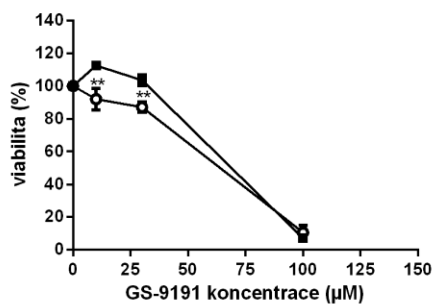
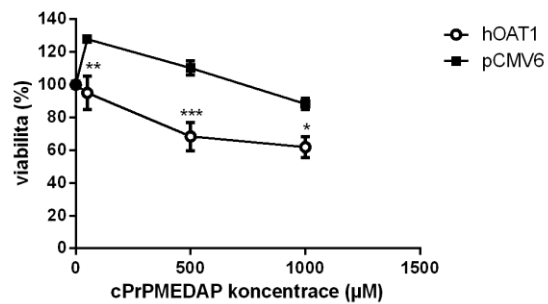
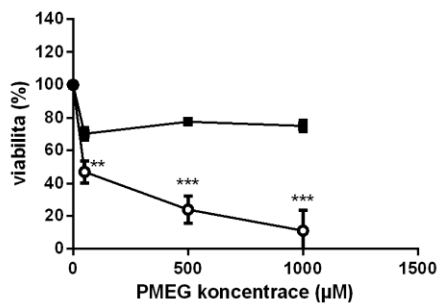
e) (S)-HPMPA



Obr. 24 Inhibice BCRP/ABCG2 testovanými ANPs. Standardní substrát Hoechst 33342 byl inkubován s MDCK-ABCG2 buňkami v nepřítomnosti (kontrola) nebo přítomnosti různých koncentrací PMEG (a), cPrPMEDAP (b), GS-9191 (c), PMEODAPy (d) nebo (S)-HPMPA (e). Specifický inhibitor ABCG2, KO143 (KO), byl použit pro srovnání míry inhibice testovanými látkami. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD získaný ze tří nezávislých měření.

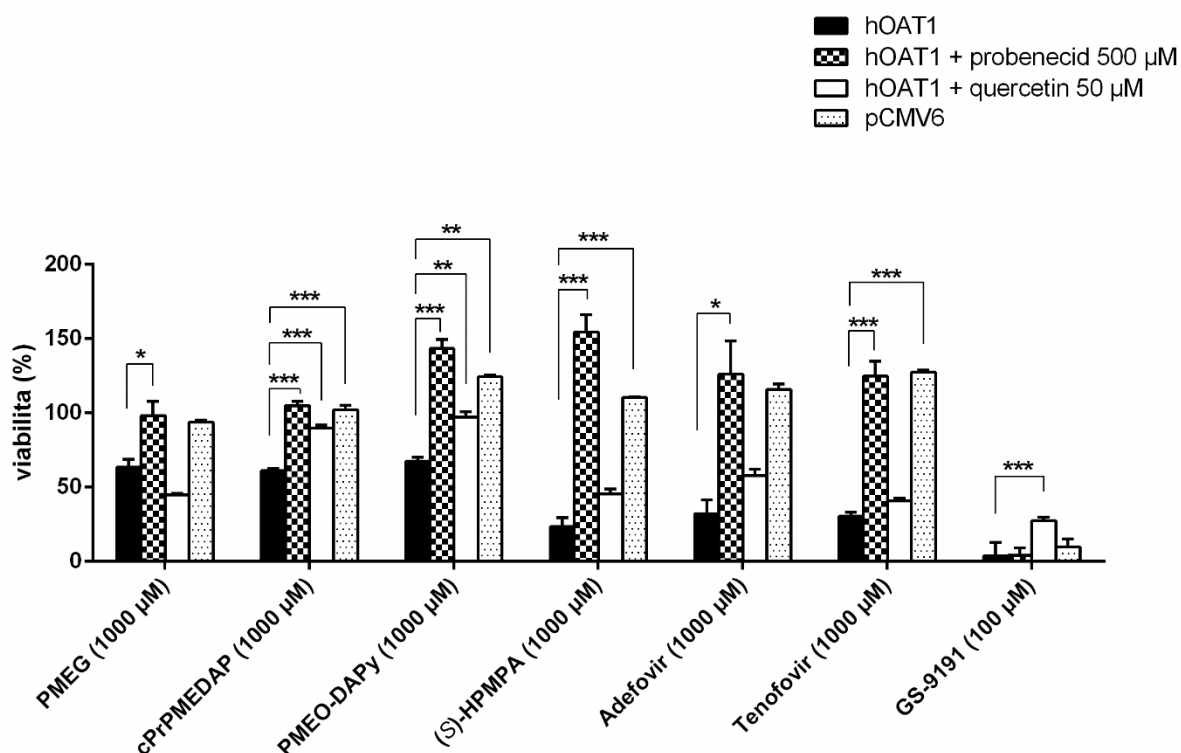
6.4.3 Posouzení transportéry zprostředkované cytotoxicity u ANPs

Ovlivnění buněčné viability po 24 h působení testovaných antivirotických působících látek jsme hodnotili pomocí standardního MTS testu. Jak ukazuje obr. 25, u většiny zkoumaných ANPs byl patrný signifikantní rozdíl v cytotoxickém účinku na buňky transfekované hOAT1 ve srovnání s buňkami transfekovanými prázdným vektorem. Látka GS-9191 při koncentraci 100 μ M snížila viabilitu buněk téměř k 0 % jak v buňkách transfekovaných hOAT1, tak v buňkách transfekovaných prázdným vektorem. Na buňky exprimující hOAT1 působily látky PMEG a (*S*)-HPMPA toxičtěji než na buňky kontrolní. U látky cPrPMEDAP, proléčiva PMEG, jsme pozorovali relativně nízký cytotoxický efekt. Exprese hOAT1 zvýšila signifikantně cytotoxické působení srovnávacích antivirotických adefoviru a tenofoviru. Látka PMEO-DAPy nevykázovala žádný významný cytotoxický účinek jak v buňkách transfekovaných hOAT1, tak ani v kontrolních buňkách.



Obr. 25 Význam hOAT1 pro cytotoxicitu testovaných ANPs. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 (bílé body) nebo prázdným vektorem (černé čtverce) byly inkubovány po dobu 24 h při 37 °C v triplicátech s různými koncentracemi testovaných ANPs. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD.

Současná inkubace testovaných ANPs s inhibitory OATs (probenecidem nebo quercetinem) vedla k výraznému snížení toxicity většiny testovaných látek v buňkách transfekovaných hOAT1 (obr. 26). Lipofilní látka GS-9191 měla nejvyšší cytotoxický účinek i po přidání probenecidu. Kombinace GS-9191 s quercetinem ovšem signifikantně zvýšila viabilitu buněk transfekovaných hOAT1. Samotný probenecid nebo quercetin neměly žádný vliv na buněčnou viabilitu ani v buňkách transfekovaných hOAT1, ani v buňkách transfekovaných prázdným vektorem (data nejsou v grafu uvedena).



Obr. 26 Vliv probenecidu a quercetinu na cytotoxicitu testovaných ANPs v buňkách s vysokou expresí hOAT1. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 (černé sloupce) nebo prázdným vektorem (tečkované sloupce) byly inkubovány po dobu 24 h s testovanými ANPs nebo s ANPs v kombinaci s 500 µM probenecidem (šachovnicové sloupce) nebo 50 µM quercetinem (bílé sloupce) v triplicátech. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD.

6.4.4 Relace afinity k OAT1 a lipofility u ANPs

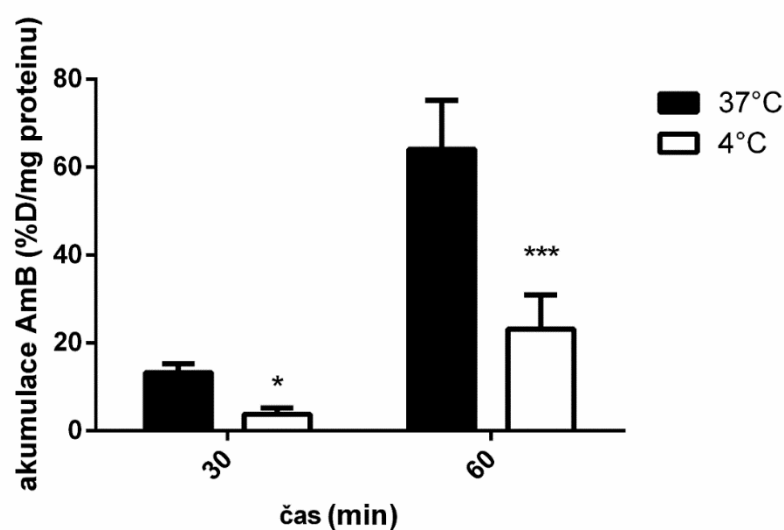
Analýza byla provedena s cílem posoudit vztah mezi afinitou ANPs k hOAT1, zjištěnou v předcházejících pokusech, a jejich lipofilitou. Tento transportér se v našich

studiih nejvíce podílel na interakci s testovanými ANPs. Hodnoty logP testovaných látek vypočítané pomocí softwaru ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada) napovídají, že většina z nich má srovnatelné lipofilní vlastnosti. Hodnoty logP testovaných ANPs se pohybovaly od $-2,52 \pm 0,76$ do $-1,19 \pm 0,95$ a byly podobné s logP adefoviru a tenofoviru. Všechny testované ANPs byly méně lipofilní než látka GS-9191 s $\log P = 6,67 \pm 1,01$. Výsledky výpočtu byly porovnány s údaji zjištěnými pomocí chromatografického stanovení lipofility studovaných ANPs. Hodnoty získané při HPLC stanovení vysoce korelovaly s výpočtem získanými údaji. Následná korelační analýza ukázala, že u dané série ANPs korelace mezi logP a hodnotami IC_{50} pro hOAT1 není statisticky významná. Hodnocení korelace jsme provedli v program GraphPad Prism (verze 6).

6.5 Interakce amfotericinu B s transportéry

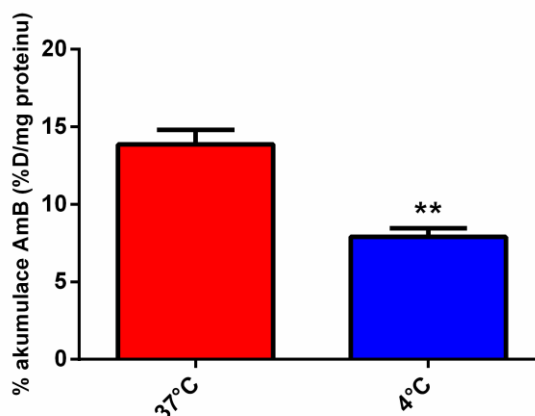
6.5.1 Ověření charakteru transportu AmB

Pro ověření, zda se na transportu AmB do buněk podílí aktivní transportní procesy, byl [3H]AmB inkubován s buněčnou linií lidských ledvinných buněk (HK-2) při teplotě 37 °C a 4 °C. Pro inkubaci jsme použili různé časové intervaly (0, 30 a 60 min). Akumulace [3H]AmB v buňkách při 4 °C byla signifikantně nižší než v buňkách inkubovaných při 37 °C. V časových intervalech 30 a 60 min při 4 °C byla akumulace [3H]AmB snížena asi o 60-70 %, (obr. 27).



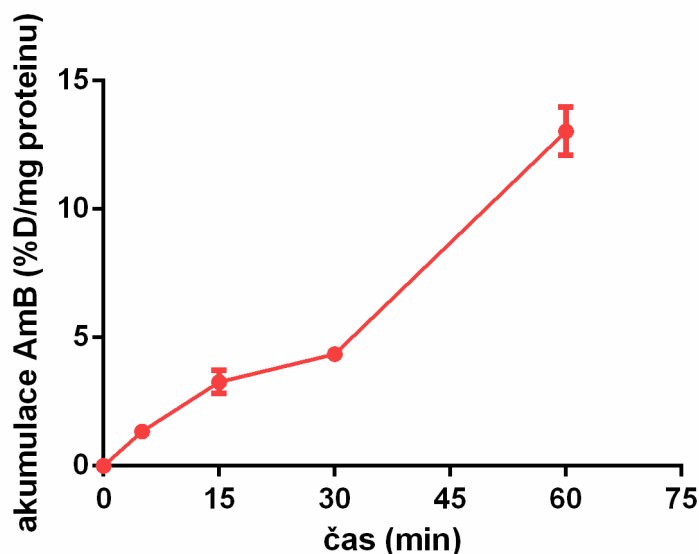
Obr. 27 Závislost akumulace [^3H]AmB v HK-2 buňkách na inkubační teplotě. HK-2 buňky byly inkubovány v triplicátech s [^3H]AmB (1 μM) při 37 °C a 4 °C ve dvou různých časových intervalech (30 a 60 min). Hodnota akumulace [^3H]AmB v čase 0 min byla odečtena. Každý sloupec reprezentuje aritmetický průměr \pm SD části akumulované dávky [^3H]AmB.

Po potvrzení tohoto experimentu jsme použili další buněčnou linii reprezentující ledvinnou tkáň, buňky LLC-PK1. Akumulace [^3H]AmB v těchto buňkách při nízké teplotě 4 °C byla opět výrazně nižší (asi o 50 %) než při 37 °C (obr. 28).



Obr. 28 Závislost akumulace [^3H]AmB v LLC-PK1 buňkách na inkubační teplotě. [^3H]AmB (1 μM) byl inkubován při 37 °C a 4 °C po dobu 60 min s LLC-PK1 buňkami v triplicátech. Hodnota akumulace [^3H]AmB v čase 0 min byla odečtena. Každý sloupec reprezentuje aritmetický průměr \pm SD části akumulované dávky [^3H]AmB.

Další experiment s LLC-PK1 buňkami byl zaměřen na studium linearitu transportu [^3H]AmB v časových intervalech do 60 min. Míra akumulace [^3H]AmB byla ve zvolených časových intervalech téměř lineární ($R^2 = 0,9635$) (obr 29).

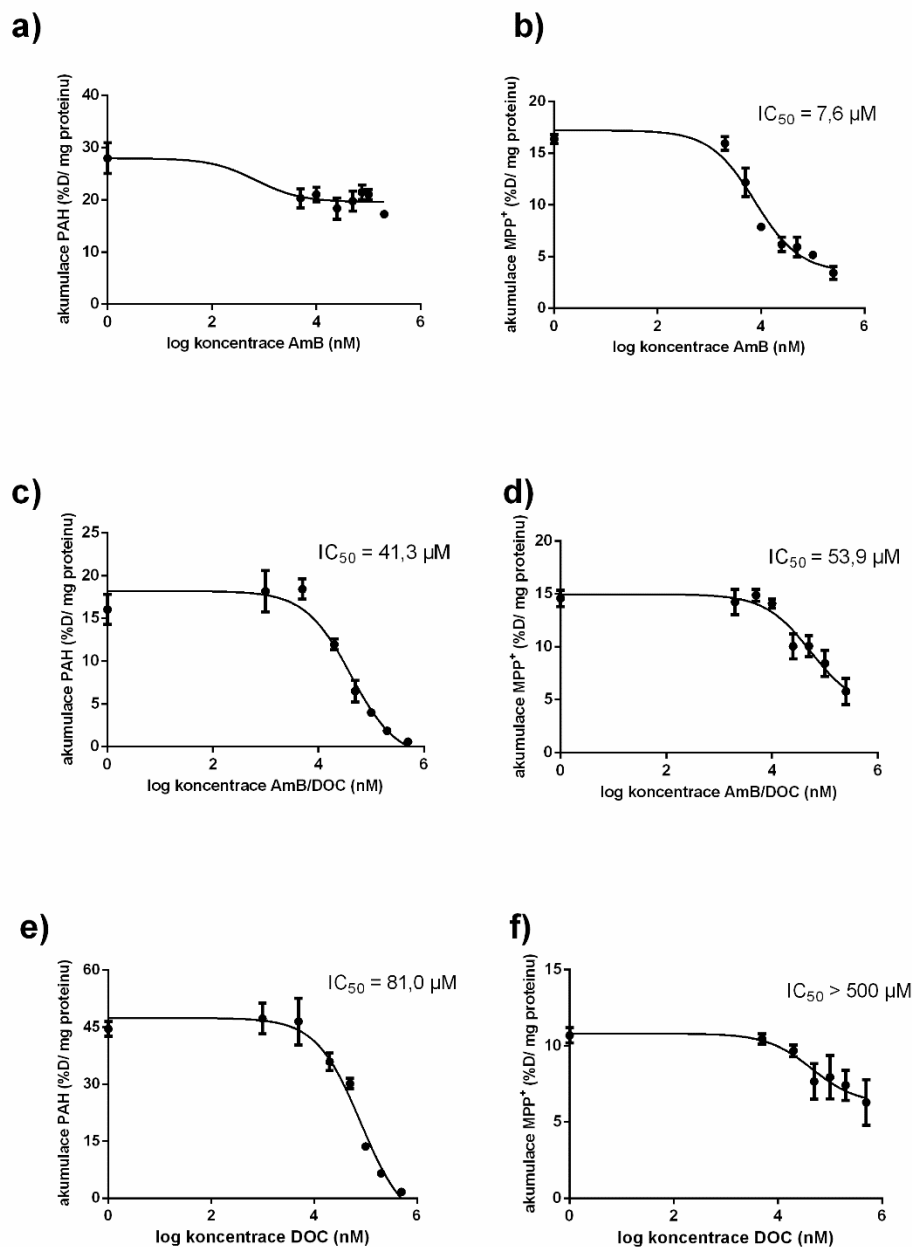


Obr. 29 Časová závislost akumulace [³H]AmB v LLC-PK1 buňkách. [³H]AmB (1 μM) byl inkubován při 37 °C v různých časových intervalech s LLC-PK1 buňkami v triplicátech. Hodnota akumulace [³H]AmB v čase 0 min byla odečtena. Každý sloupec reprezentuje aritmetický průměr ± SD části akumulované dávky [³H]AmB.

6.5.2 Interakce AmB/DOC, AmB a DOC s hOAT1 a hOCT2

Abychom zjistili, jestli komplex AmB/DOC nebo jeho jednotlivé složky (AmB nebo DOC) mají afinitu k studovaným SLC transportérům, provedli jsme transportní experimenty na buněčných modelech přechodně exprimujících hOAT1 nebo hOCT2. Buňky jsme inkubovali s příslušnými standardními substráty v kombinaci s neznačenou testovanou látkou. Zatímco u AmB jsme nepozorovali žádnou interakci s hOAT1 (obr. 30a), AmB/DOC výrazně inhiboval transport standardního substrátu OATs [³H]PAH (obr. 30c). Podobně i DOC samotný také účinně interagoval s testovaným transportérem a inhiboval akumulaci [³H]PAH v transfekovaných buňkách (obr. 30e). Protože samotný DOC inhiboval hOAT1 relativně silně a u AmB jsme interakci nepozorovali, můžeme se domnívat, že rozhodujícím komponentem, odpovědným za inhibiční vliv AmB/DOC na hOAT1, je DOC. Inhibiční účinek AmB/DOC a DOC nebyl úplně shodný. Zjištěná hodnota IC₅₀ AmB/DOC pro hOAT1 se s mírnou signifikancí (p = 0,029) lišila od IC₅₀ samotného DOC.

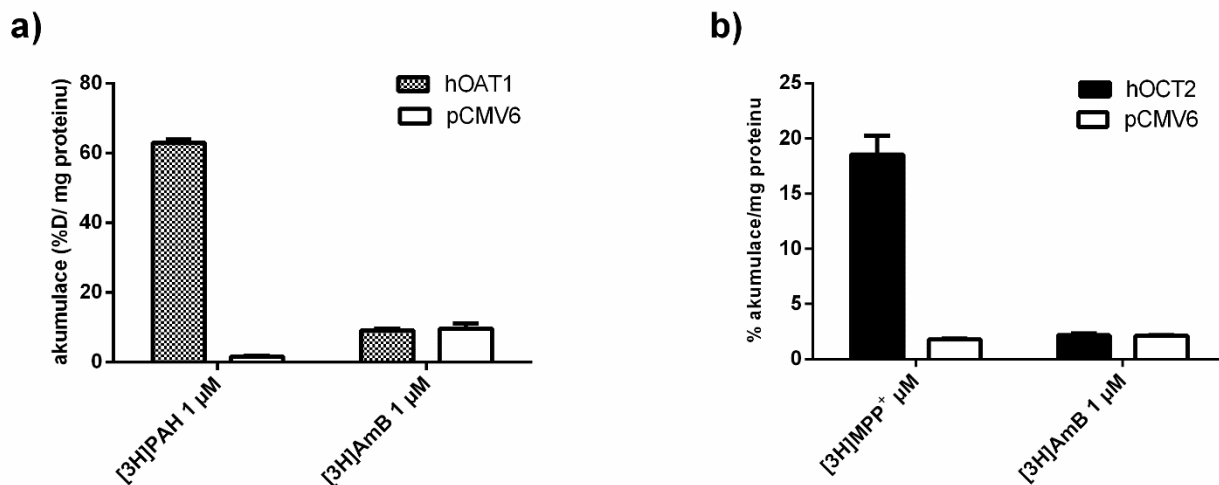
Zajímavé výsledky odhalilo studium interakce s transportérem v buňkách transfekovaných hOCT2. AmB i AmB/DOC významně inhibovaly akumulaci [³H]MPP⁺ v použitém buněčném modelu (obr. 30b, d). Inhibiční vliv DOC na akumulaci [³H]MPP⁺ byl velmi mírný (obr. 30f).



Obr. 30 Vliv AmB, AmB/DOC a DOC na akumulaci standardních substrátů testovaných transportérů. HeLa buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOAT1 a MDCK II buňky přechodně transfekované expresním vektorem pro hOCT2 byly inkubovány s [³H]PAH (a, c, e) a [³H]MPP⁺ (b, d, f) v přítomnosti postupně se zvyšujících koncentrací AmB, AmB/DOC nebo DOC (0-500 μM) po dobu 2 min při 37 °C v triplicátech. Každý bod je vyjádřen jako aritmetický průměr ± SD části akumulované dávky radioaktivního substrátu. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

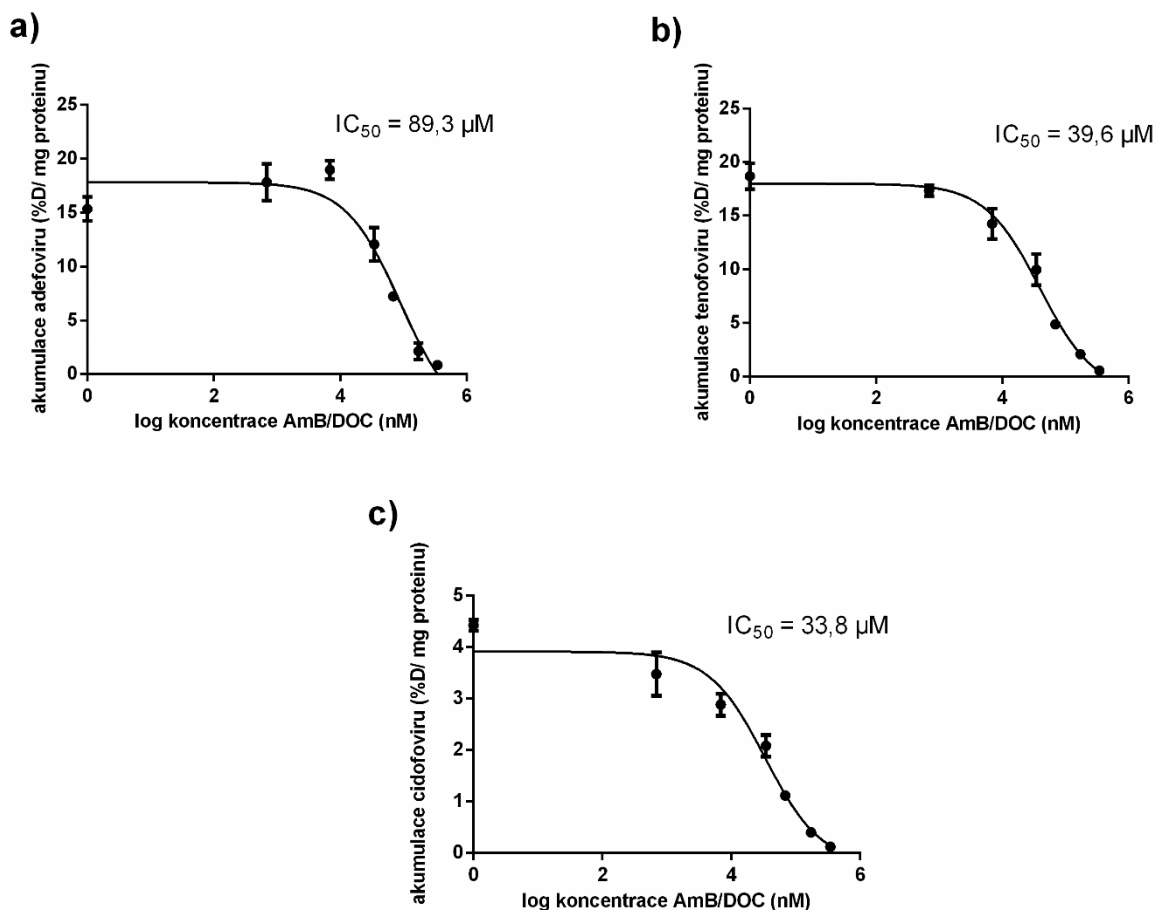
Navazující série akumulčních studií pro zjištění specifického transportu AmB do buněk ovšem neodhalila žádnou signifikantní interakci na transportéru hOAT1 ani na

hOCT2 v transfekovaných buňkách ve srovnání s kontrolními buňkami transfekovanými prázdným vektorem pCMV6 (obr. 31). AmB zřejmě není substrátem hOCT2 ani hOAT1.



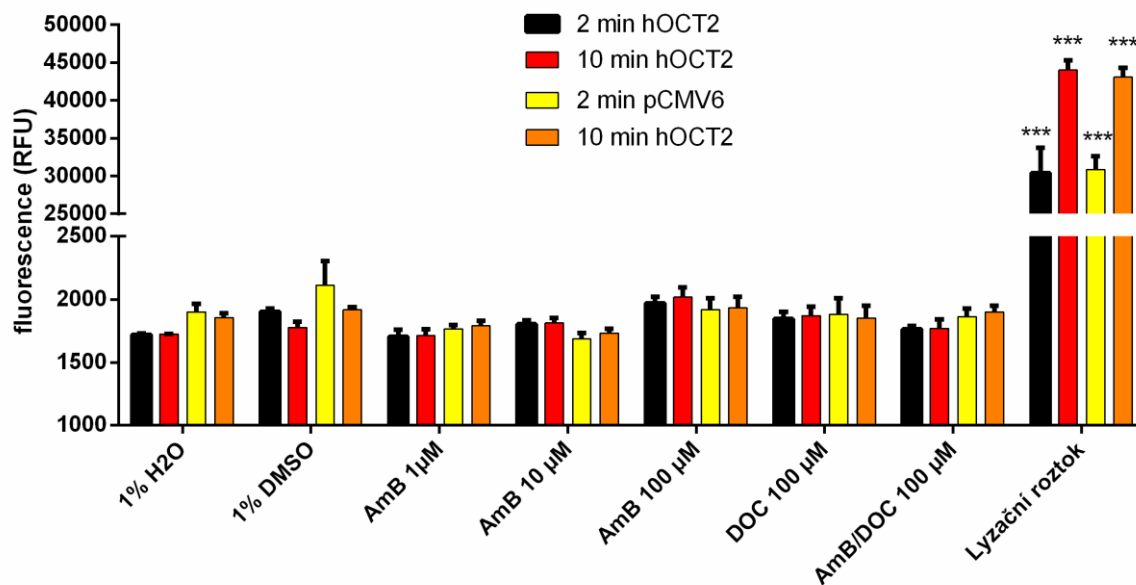
Obr. 31 Akumulace [³H]AmB v buňkách transfekovaných hOCT2 nebo hOAT1. [³H]AmB (1 μM) byl inkubován s buňkami transfekovanými expresním vektorem pro hOAT1 (a), hOCT2 (b) nebo s buňkami transfekovanými prázdným vektorem pCMV6 při 37 °C v triplicátech. [³H]MPP⁺ a [³H]PAH sloužily jako ukazatele funkčnosti modelu po transfekci. Každý sloupec reprezentuje aritmetický průměr ± SD části akumulované dávky substrátu.

Abychom zjistili možné lékové interakce AmB/DOC s potenciálně současně podávanými antiviroty, které jsou substráty hOAT1, provedli jsme řadu interakčních transportních studií s [³H] značeným adefovirem, tenofovirem nebo cidofovirem a různými koncentracemi AmB/DOC. Výsledky naznačují schopnost AmB/DOC ovlivnit akumulaci všech tří testovaných antiviroty v *in vitro* podmínkách, avšak jen při vyšších inkubačních koncentracích (obr. 32).



Obr. 32 Vliv AmB/DOC na akumulaci adefoviru, tenofoviru a cidofoviru v HeLa buňkách transfekovaných hOAT1. Akumulace [3 H]adefoviru (0,1 μ M) (a), [3 H]tenofoviru (0,5 μ M) (b) a [3 H]cidofoviru (70 μ M) (c) v HeLa buňkách přechodně transfekovaných expresním vektorem pro hOAT1 byla inhibována AmB (0-345 μ M) po dobu 2 min při 37 $^{\circ}$ C v triplicátech. Každý bod vyjadřuje aritmetický průměr \pm SD části akumulované dávky substrátu. Hodnota akumulace radioaktivního substrátu v buňkách transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.

Transportní studie s AmB byly prováděny v krátkém časovém intervalu (2 min), kdy jsme neočekávali žádný významný vliv testovaných látek na životaschopnost buněk. Abychom vyloučili možné cytotoxické působení testovaných látek v průběhu experimentu, provedli jsme studii určující uvolnění LDH z buněk po 2 minutách a 10 min působení AmB, AmB/DOC, DOC nebo samotných rozpouštědel. V této studii jsme nepozorovali žádné významné změny v uvolnění LDH z buněk (obr. 33).



Obr. 33 Ověření potenciálního cytotoxického působení různých forem AmB. AmB, AmB/DOC nebo DOC byly inkubovány s MDCK II buňkami přechodně transfekovanými expresním vektorem pro hOCT2 nebo prázdným vektorem pCMV6 v triplicátech. Po inkubaci v časových intervalech 2 a 10 min byla u odebraných vzorků fluorimetricky měřena uvolněná LDH. Každý sloupec reprezentuje aritmetický průměr \pm SD hodnot fluorescence.

7 Diskuze

Pro provádění experimentů na buněčné úrovni bylo nutné na pracoviště zavést kultivaci vhodných buněčných linií použitelných k transportním experimentům a jejich následnou transfekci. Abychom zvolili vhodnou metodu buněčné tranzientní transfekce, bylo třeba provést optimalizační experimenty, které se týkaly řady parametrů této metody. K transfekci jsme vybrali buněčnou linii HeLa a MDCK II z důvodu poměrně rychlého růstu a snadné manipulace. Rozsáhlé optimalizační experimenty byly nutné pro stanovení např. nejvhodnějšího intervalu mezi transfekcí a prováděnými experimenty tak, abychom pracovali v době s nejvyšší funkcí studovaného transportéru. Při vývoji metod jsme prováděli funkční studie se standardními radioaktivně značenými substráty studovaného transportéru, kterými jsme zjistili, jestli dochází v buňkách transfekovaných funkčním plazmidem ke zvýšení akumulace standardu při srovnání s kontrolními buňkami transfekovanými prázdným vektorem (pCMV6). V případě potvrzení dostatečné funkce daného transportéru v transfekovaných buňkách byla exprese ověřována pomocí metody Western blottingu.

Provádění transportních studií a studií cytotoxicity komplikovala nedostatečná rozpustnost některých testovaných látek ve vodě. Abychom omezili možné toxické působení DMSO na buňky na minimum, byly experimenty postaveny tak, aby v inkubačním médiu s požadovanou koncentrací testované látky nebylo přítomno více než 1 % rozpouštědla. Většinu transportních studií jsme prováděli ve velmi krátkých časových intervalech (2 min), kdy je velmi malá pravděpodobnost ovlivnění životnosti buněk, které by mohlo mít významný vliv na výsledky experimentu. U studií cytotoxicity testovaných látek jsme možnost falešně pozitivních/negativních výsledků vyloučili i vhodně zvolenými kontrolami.

Cílem této práce bylo zkoumat interakce vybraných antivirotik a antibiotik s důležitými lidskými ledvinnými lékovými transportéry. Takové zkoumání má význam především u léčiv, která jsou ledvinami významně vylučována nebo se v nich dokonce mohou kumulovat. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na studium léčiv, u kterých je význam ledvinné exkrece znám nebo na látky, u kterých lze předpokládat, že by takto mohly být exkretovány. Výzkum byl orientován třemi základními směry. Prvním bylo zkoumání poměrně důležitého antivirotika entecaviru, určeného pro léčbu virové hepatitidy, u kterého je známo, že je exkretováno ledvinami (Matthews, 2006; Razonable, 2011). Druhou oblastí bylo studium vývojových antivirotik ze skupiny acyklických

nukleosidových fosfonátů. Tato potenciální léčiva jsou strukturně příbuzná klinicky užívaným antivirotikům, jako jsou adefovir, tenofovir či cidofovir, které se vyznačují ledvinnou exkrecí a potenciální nefrotoxicitou (Cihlar et al., 2009; Izzedine et al., 2005b). Zkoumání interakcí důležitého antimykotika amfotericinu B bylo třetím výzkumným směrem, neboť toto léčivo je charakteristické kumulací v ledvinách a rizikem nefrotoxicity (Fanos a Cataldi, 2001; Laniado-Laborín a Cabrales-Vargas, 2009). Z tohoto pohledu je členěna i následující část diskuze.

ETV

Pro studium jednotlivých transportních systémů, které přispívají k manipulaci ETV v ledvinách, jsme vybrali hlavní typy lékových transportérů hojně exprimovaných v lidských proximálních tubulech, které mohou být potenciálně zapojené do transmembránového transportu ETV. Prozatím tak rozsáhlá *in vitro* studie zaměřená na transport ETV v ledvinách nebyla provedena. V naší studii s ETV jsme se zabývali přímým srovnáním transportních vlastností ETV s dalšími klinicky známými antivirotiky u kterých je známo, že významně interagují s ledvinnými transportéry. Také jsme zvažovali možné souvislosti s případnými toxickými účinky, které by mohly být následkem interakcí ETV s příslušným transportérem.

Série našich experimentů s ETV navazuje na nedávné studie *in vivo*, které ukázaly na možné zapojení transportérů pro organické anionty a kationty při ledvinné exkreci ETV (Yanxiao et al., 2011). Autoři prokázali, že inhibitor OATs probenecid (Burckhardt a Burckhardt, 2003; Cihlar et al., 1999) a inhibitor OCTs cimetidin (Dresser et al., 2001; Koepsell et al., 2003) mají inhibiční vliv na renální exkreci ETV u potkanů *in vivo*.

S využitím *in vitro* experimentů s pomocí buněčného modelu se stimulovanou expresí hOAT1 prokázali interakci ETV s důležitým ledvinným transportérem organických aniontů hOAT1. V tomto bodě výsledky *in vitro* podporují výše uvedené údaje zjištěné *in vivo* a potvrzují důležitou úlohu hOAT1 při transportu ETV. Na rozdíl od publikovaných studií u potkanů *in vivo* (Yanxiao et al., 2011) a *in vitro* studií s ledvinnými řezy potkana (Xu et al., 2013), které naznačují účast OCTs na transportu ETV, jsme ovšem v našich experimentech s transfekovaným buněčným modelem *in vitro* nepozorovali žádnou interakci ETV s hOCT2 (obr. 11b, 12d). Tento rozpor může být vysvětlitelný skutečností, že na rozdíl od experimentů s buňkami transfekovanými OCT2, v podmínkách *in vivo* a při použití ledvinných řezů mohou přispívat k ledvinnému

transportu ETV i jiné typy OCTs, které jsou v nativní ledvinné tkáni fyziologicky exprimovány (Karbach et al., 2000; Motohashi et al., 2002). Jiným vysvětlením by mohly být mezidruhové rozdíly v afinitě ETV k OCTs. V našich studiích jsme používali buněčný model exprimující lidský OCT2, zatímco ve zmíněných publikacích autoři pracovali s potkaními experimentálními modely.

Použitý buněčný model nám umožnil provést přímé kvantitativní srovnání schopnosti interakce ETV s hOAT1 s dalšími antiviroty, u kterých je známa interakce s hOAT1. Výsledky těchto studií ukázaly, že schopnost ETV inhibovat transport standardního substrátu [³H]PAH (obr. 11a) v transfekovaných buňkách je podstatně nižší než u adefoviru, tenofoviru a cidofoviru (obr. 14a). Na základě získaných dat mohou být antiviroty seřazena dle afinity k hOAT1 do následujícího pořadí: adefovir > tenofovir ≈ cidofovir >> entecavir.

Na základě prokázané afinity ETV k hOAT1 jsme se v dalších experimentech zaměřili na interakce ETV se třemi známými substráty hOATs - adefovirem, tenofovirem a cidofovirem (Cihlar et al., 1999; Uwai et al., 2007), které mohou být v klinické praxi potenciálně podávány současně s ETV. Tyto experimenty jsme provedli, abychom zjistili, zda ETV může ovlivnit míru jejich transportu těchto antiviroty pomocí hOAT1. Použité inkubační koncentrace adefoviru, tenofoviru a cidofoviru *in vitro* odpovídaly terapeutickým plazmatickým hladinám (Cundy, 1999; Delahunty et al., 2006; Kearney et al., 2005). V experimentech jsme pozorovali výraznou interakci ETV se všemi třemi použitými antiviroty (obr. 16). Nicméně, terapeutické koncentrace ETV v plazmě při běžném dávkování se pohybují maximálně do 50 nM (Matthews, 2006; Yan et al., 2006). Vzhledem k tomu, že zjištěné inhibiční koncentrace ETV byly vyšší o několik řádů, klinický význam těchto lékových interakcí u OAT1 lze očekávat pouze v případě extrémně vysokých plazmatických koncentrací ETV, které by se mohly objevit pouze za mimořádných okolností.

Koncentrační nukleosidové transportéry jsou zodpovědné za vysoce afinitní koncentrační reabsorpci přírodních nukleosidů a jejich analogů v ledvinách (Ritzel et al., 2001; Rodríguez-Mulero et al., 2005). CNT2 zprostředkovává uptake antivirových purinových derivátů, jako jsou kladribin, fludarabin a clofarabin (Cano-Soldado a Pastor-Anglada, 2011; King et al., 2006; Lang et al., 2001). Obecnými strukturními požadavky pro vysoce afinitní substráty nebo inhibitory nukleosidových transportérů jsou 2 hydrofobní centra a hydroxylová skupina v poloze 3'-C na pentozovém kruhu (Chang et al., 2004). Na základě těchto údajů by bylo možné očekávat určité interakce s CNTs

i u ETV. Z tohoto důvodu jsme s pomocí transfekovaných buněčných modelů testovali schopnost ETV interagovat s vybranými nukleosidovými transportéry. Na základě analýzy struktury ETV jsme se zaměřili na transportéry hCNT2 (puriny preferující) a hCNT3 (puriny a pyrimidiny preferující) (Klaassen a Aleksunes, 2010, Mangravite et al., 2003). V těchto experimentech byla zjištěna interakce ETV s hCNT2 i hCNT3 (obr. 11c, d; obr 12 b, c). Získaná data ukazují, že interakce ETV s hCNT2 a hCNT3, které jsou běžně lokalizovány v lidských ledvinách (Mangravite et al., 2003), by mohly hrát roli v jeho ledvinném transportu. I přesto, že inhibiční účinek ETV na transportní funkci CNTs dle stanovených IC_{50} nebyl příliš intenzivní, je důležité mít tento nový poznatek na paměti pro další zkoumání interakcí ETV s nukleosidovými transportéry. Na rozdíl od ETV žádné z testovaných srovnávacích antivirotik (adefovir, tenofovir a cidofovir) v experimentech s MDCK II buňkami přechodně transfekovanými hCNT2 ani s hCNT3 neinteragoval (obr. 14b, c). Významné interakce ETV s těmito antivirotiky na studovaných nukleosidových transportérech není tedy možné očekávat.

Apikálně umístěné efluxní ABC transportéry hrají důležitou roli při kontrole akumulace mnoha antivirotických účinných látek a jiných léčiv v různých tkáních lidského těla, včetně ledvin (Eilers et al., 2008). Ve studii s ETV jsme zjistili, že ETV signifikantně inhibuje BCRP/ABCG2 a P-gp/ABCB1 (obr. 17). Ve srovnání s P-gp/ABCB1 entecavir inhiboval funkci BCRP/ABCG2 relativně méně intenzivně a nekonzistentně ve vztahu k použitým koncentracím. Inhibiční potenciál ETV nebyl srovnatelný s použitými standardními inhibitory. Vliv ETV na efluxní transportéry v ledvinách bychom mohli očekávat pouze mírný, který by se mohl projevit jen při relativně vysokých koncentracích přesahujících terapeutické hladiny. Nicméně vyšší koncentrace může ETV dosáhnout v tenkém střevě po uvolnění z perorální lékové formy. V takových situacích by mohl inhibiční účinek ETV ovlivnit funkci transportéru P-gp/ABCB1, který je lokalizován v membránách enterocytů (Cordon-Cardo et al., 1990; Tiebaut et al., 1987). Vzhledem k tomu, že interakce se střevními P-gp/ABCB1 mohou být důležitým faktorem při intestinální absorpci mnoha léčiv (Glavinas et al., 2004), měla by být lékovým interakcím ETV v GIT na úrovni P-gp věnována pozornost v dalším výzkumu.

Kumulace léčiv v buňkách zprostředkovaná influxními transportéry může mít v toxické následky. Ho et al. (2000) ukázali, že OAT1 je transportérem, který se může podílet na cytotoxickém působení adefoviru a cidofoviru v *in vitro* podmínkách. Je známo, že adefovir, cidofovir a tenofovir po podání pacientům mohou působit nefrotoxicky (Izzedine et al., 2005b). Protože je OAT1 jedním z nejvíce exprimovaných

transportérů v ledvinách (Klaassen a Aleksunes, 2010), můžeme předpokládat jeho částečnou účast na toxickém působení těchto antivirotik. Prezentované experimentální výsledky ukazují výrazně nižší afinitu ETV k hOAT1 a nižší cytotoxický účinek ETV v buňkách transfekovaných hOAT1 ve srovnání s výše uvedenými potenciálně nefrotoxickými antivirotiky (obr. 18). Z tohoto důvodu můžeme očekávat u ETV relativně nízké riziko buněčné akumulace a toxicity v tkáních s vysokou expresí OAT1 v porovnání s adefovirem, tenofovirem a cidofovirem.

U pacientů s poruchou funkce jater by měl být ETV podáván s opatrností. Např. u pacientů s jaterní cirhózou a chronickou hepatitidou B léčených ETV je častým nežádoucím účinkem laktátová acidóza (Lange et al., 2009). V budoucích studiích by proto měl být zkoumán transport ETV prostřednictvím transportérů typicky exprimovaných v játrech.

ANPs

Vývoj nových acyklických nukleosidových fosfonátů trval mnoho let (Holý, 2006). Za tuto dobu bylo objeveno, že excelentní antivirová aktivita ANPs je přičítána přítomnosti katabolicky stabilní fosfonátové vazby. ANPs jsou za fyziologických podmínek záporně nabitě a prostřednictvím OATs se výrazně kumulují v buňkách ledvinných proximálních tubulů (Rizwan a Burckhardt, 2007; Sweet, 2005; VanWert et al., 2010). Byly publikovány různé *in vitro* studie s klinicky významnými ANPs prokazující renální akumulaci některých acyklických nukleosidových fosfonátů pomocí OATs a jejich následný nefrotoxický účinek (Cihlar et al., 2009; Kohler et al., 2011; Uwai et al., 2007). V sérii ANPs ovšem existuje několik sloučenin ze skupiny PME a HPMP s velkou potenciálním účinkem u onemocnění vyvolaných DNA virem, retrovirem nebo u onkologických patologií (Balzarini et al., 2007; Bijsterbosch et al., 1998; Reiser et al., 2008). Příkladem těchto látek je cPrPMEDAP, která je známá jako potenciálně významné antivirové léčivo pro léčbu infekcí způsobených polyomavirem a lidskými papilomaviry (De Clercq, 2008). Z literatury je známo, že látka (*S*)-HPMPA je aktivní vůči širokému spektru DNA virů a má potenciál pro použití v léčbě herpetických infekcí rezistentních k léčbě konvenčními léčivy (De Clercq, 2007b). Interakce uvedených antivirových látek ze skupiny ANPs s ledvinnými lékovými transportéry nebyla dosud zkoumána.

V naší studii jsme zkoumali nukleosidové fosfonáty ze skupin PME a HPMP, jimiž byly látky PMEG, PMEODAPy a (*S*)-HPMPA. Pro srovnání jsme testovali

N⁶-cyklopropylový derivát látky PMEDAP (cPrPMEDAP), který byl připraven jako proléčivo látky PMEG (Holý et al., 1999; Holý et al., 2001) s nižším cytotoxickým působením (Wolfgang et al., 2009). Do našich experimentů jsme také zařadili látku GS-9191, která byla připravena jako lipofilní dvojité proléčivo (double prodrug) látky PMEG. GS-9191 byla navržena tak, aby zvýšila propustnost a akumulaci metabolitů PMEG v cílových buňkách. Intracelulárně je látka GS-9191 hydrolyzována za vzniku cPrPMEDAP. Následně je N⁶-cyklopropylová část cPrPMEDAP deaminována a vzniká PMEG, který je rychle fosforylován a tím vytváří farmakologicky aktivní formy. Možné klinické využití GS-9191 by mělo být předmětem dalších studií (De Clercq, 2011; Wolfgang et al., 2009).

V provedených studiích, ve kterých jsme zkoumali interakce ANPs se studovanými transportéry pomocí transfekovaných buněk, bylo zjištěno, že zkoumané látky vykazují významnou interakci pouze s hOAT1 (obr. 21). Jejich afinitu k hOAT1 jsme porovnali s klinicky používanými antiviroty adefovirem a tenofovirem, které jsou známými substráty hOAT1 (Uwai et al., 2007). Výsledky získané v inhibičních studiích ukázaly, že adefovir a tenofovir nejsou jenom substráty hOAT1, ale také jeho účinné inhibitory. V dřívějších pracích bylo publikováno, že obě tato léčiva jsou také substráty hOAT3, ovšem hOAT1 se na jejich transportu zřejmě podílí nejvyšší měrou (Cihlar et al., 1999; Ho et al., 2000; Uwai et al., 2007). Po srovnání hodnot IC₅₀ testovaných ANPs můžeme dojít k závěru, že většina testovaných ANPs vykazovala mnohem nižší afinitu k hOAT1 než adefovir a tenofovir. Tato skutečnost pravděpodobně vyplývá ze strukturálních rozdílů testovaných ANPs ve srovnání s adefovirem a tenofovirem. Na základě předchozích rozsáhlých studií (Ullrich, 1997) je známo, že velikost, hydrofobicita, síla náboje a schopnost tvořit vodíkové vazby jsou důležitými požadavky při interakci substrátů s OATs (Burckhardt a Burckhardt, 2003). V naší studii zkoumané fosfonáty obecně splňují uvedená kritéria, protože jejich molekulová hmotnost je nižší než 500 (s výjimkou GS-9191 s molekulovou hmotností 734,8), obsahují v molekule hydrofobní oblast a nesou negativně nabitou skupinu. Avšak pouze látka GS-9191 vykazovala srovnatelnou hodnotu IC₅₀ s adefovirem a tenofovirem. Literatura uvádí, že lipofilní vlastnosti některých skupin látek, jako např. derivátů odvozených od kyseliny močové, korelují s afinitou k OAT1 (Sugawara et al., 2005). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zjistit, zda lipofilita námi testovaných ANPs koreluje s afinitou k hOAT1. Dle vypočítaných hodnot (software ACD/Labs) a experimentálně zjištěných hodnot pomocí HPLC má nejvyšší lipofilitu látka GS-9191. Další testované ANPs měly

relativně nižší lipofilitu s hodnotou logP podobnou adefoviru a tenofovirus. Žádný korelační vztah mezi lipofilitou a afinitou k OAT1 jsme ovšem v sérii testovaných sloučenin nezjistili. Stanovení parametrů lipofility lze pokládat za vysoce relevantní, protože hodnoty naměřené experimentálně pomocí chromatografické separace vysoce korelovaly s hodnotami logP vypočtenými pomocí softwaru ACD/Labs (Pearson $r = 0,99$, $p < 0,0001$).

Ačkoliv je N⁶-substituované proléčivo PMEG, cPrPMEDAP, negativně nabitě při fyziologickém pH stejně jako PMEG (Wolfgang et al., 2009), nepozorovali jsme u něj žádnou interakci s transportérem hOAT1 (obr. 21b). Absence této interakce může být způsobena přítomností cyklopropylového substituentu v poloze N⁶ ve 2,6-diaminopurinovém cyklu, který může stericky bránit efektivní interakci cPrPMEDAP s vazebným místem hOAT1. Zjištění, že testované ANPs nevykazují interakci s hOCT2 je v souladu s dříve *in vitro* zjištěnými údaji pro adefovir a tenofovir, které ukazují, že hOCT2 nehraje žádnou roli v jejich přestupu do buněk (Uwai et al., 2007).

Ve studiích ANPs s efluxními transportéry P-gp/ABCB1 a BCRP/ABCG2 byla nejsilnějším inhibítorem látka GS-9191 (obr. 23-24). Její inhibiční aktivita byla srovnatelná se specifickým inhibítorem BCRP/ABCG2 - látkou KO143 a specifickým inhibítorem P-gp/ABCB1 - látkou LY335979. Další testované ANPs vykazovaly v použitých *in vitro* buněčných modelech pouze velmi malou nebo žádnou interakci s efluxními transportéry. Relativně silná interakce GS-9191 s efluxními transportéry by mohla být přičtena lipofilnímu charakteru této látky. Publikované studie, zaměřené na stanovení vztahu mezi molekulárními vlastnostmi látek a interakcemi s efluxními transportéry uvádějí, že pro interakci substrátu s P-gp/ABCB1 je důležité včlenění látky do lipidové membrány (Szakács et al., 2008). Typické substráty P-gp/ABCB1 obsahují ve své molekule akceptorová místa pro vodíkové vazby a hydrofobní skupiny. V dalších požadavcích pro specifické uskupení atomů v molekule (tzv. farmakoforů) pro substráty P-gp/ABCB1 se literatura neshoduje (Sharom, 2008; Szakács et al., 2008). Obecně platí, že mají tendenci mít rovinné aromatické domény a terciární aminoskupiny (Szakács et al., 2008). Bohužel existuje mnoho výjimek z těchto pravidel. Většina ANPs v rámci naší studie má teoreticky odpovídající strukturu, avšak signifikantní interakci s ABC transportéry jsme neprokázali. Rozhodujícím faktorem pro interakci GS-9191 s efluxními transportéry se v tomto případě zdá její vyšší lipofilita.

Několik členů skupiny ANPs působí cytotoxicky vůči proliferujícím buňkám (Holý et al., 2001; Kramata a Downey, 1999). ANPs po přestupu přes buněčnou

membránu tvoří v buňkách aktivní fosforylované metabolity, které jsou schopny ukončit polymerázovou reakci DNA, což vede k inhibici syntézy DNA a/nebo opravě DNA (Balzarini et al., 1991; Kramata a Downey, 1999; Wolfgang et al., 2009). Abychom zjistili, zda za cytotoxický účinek ANPs je odpovědný jejich uptake prostřednictvím hOAT1 jako tomu je u dalších látek z této skupiny – adefoviru a tenofoviru, použili jsme HeLa buňky přechodně transfekované tímto transportérem. Buňky transfekované hOAT1 byly citlivější k cytotoxickému účinku většiny testovaných ANPs při inkubačním intervalu po 24 h (obr. 25). Ve srovnání s kontrolou působily PMEG a (S)-HPMPA na buňky transfekované hOAT1 v našich experimentálních podmínkách relativně silně cytotoxicky. Cytotoxický účinek PMEG a (S)-HPMPA na transfekované buňky byl výrazně intenzivnější než v případě adefoviru či tenofoviru. Tento výsledek je v souladu se skutečností, že PMEG difosfát (intracelulární metabolit PMEG) je silnějším inhibitorem lidské buněčné DNA polymerázy než adefovir difosfát (Pisarev et al., 1997). Vyšší cytotoxicita látek PMEG a (S)-HPMPA v hOAT1 transfekovaných buňkách představuje nepřímý důkaz toho, že tyto látky jsou nejen inhibitory, ale i substráty hOAT1.

Nejvíce cytotoxickou látkou mezi testovanými ANPs byla látka GS-9191. Její toxický účinek na kontrolní buňky transfekované prázdným vektorem pCMV6 od účinku na buňky transfekované hOAT1. Toto zjištění znamená, že neexistuje významný vztah mezi aktivním transportem zprostředkovaným hOAT1 a cytotoxicitou této látky. Pravděpodobné je, že za vyšší cytotoxicitu tohoto léčiva je odpovědná vysoká hydrofobicita látky GS-9191. Na rozdíl od ostatních testovaných ANPs může GS-9191 efektivně vstupovat do buněk pasivní difúzí (Wolfgang et al., 2009), kde může dosahovat nebezpečných koncentrací, vedoucích k toxickému účinku. Zdá se, že transport zprostředkovaný hOAT1 hraje v tomto případě málo významnou roli.

Při testování interakcí testovaných ANPs s SLC transportéry látka cPrPMEDAP neinhibovala akumulaci standardního substrátu [³H]PAH v buňkách transfekovaných hOAT1. Ve studiích zaměřených na cytotoxicitu jsme pozorovali malé zvýšení cytotoxického účinku látky cPrPMEDAP v buňkách transfekovaných hOAT1. Tyto výsledky by mohly naznačovat, že cPrPMEDAP není inhibitor hOAT1, ale mohl by být jeho substrátem s nízkou afinitou. Zjištěná cytotoxicita cPrPMEDAP byla přibližně devětkrát nižší než cytotoxicita PMEG. Zajímavé je, že podobný rozdíl v toxicitě byl zaznamenán i v dříve publikované studii u králíků *in vivo*, ve které lokální podání 1%

cPrPMEDAP bylo zvířaty tolerováno, zatímco podání 0,1% PMEG již zvířaty tolerováno nebylo (Christensen, 2005).

V podmínkách *in vitro* experimentu byla mezi studovanými ANPs jedinou netoxickou látkou PMEODAPy (obr. 25). Toto zjištění je v souladu s publikovanými údaji o nižší toxicitě látky PMEODAPy ve srovnání s adefovirem v experimentech na myších infikovaných virem myšního sarkomu (Balzarini et al., 2007). Přestože PMEODAPy v našich transportních studiích interagovala s hOAT1, nepozorovali jsme u ní žádné cytotoxické působení v buňkách transfekovaných hOAT1 ani v kontrolních buňkách. Tento výsledek by mohl naznačovat, že PMEODAPy je pouze inhibitorem a ne substrátem hOAT1. V experimentech s ABC transportéry PMEODAPy interagovala mírně s P-gp/ABCB1. Relativně netoxický účinek této látky může být částečně vysvětlen efluxem PMEODAPy z buněk prostřednictvím jednoho nebo více efluxních transportérů.

Výše uvedené výsledky studií cytotoxického účinku testovaných ANPs naznačují, že akumulace testovaných látek prostřednictvím hOAT1 může způsobit buněčné poškození. Abychom toto tvrzení potvrdili farmakologicky, provedli jsme navíc testy toxicity ANPs, ve kterých byl zkoumán vliv známého inhibitoru OATs probenecidu a inhibitoru/substrátu OATs quercetinu (Wong et al., 2011). Výsledky této studie prokázaly, že probenecid je schopen efektivně snížit cytotoxicitu testovaných ANPs zprostředkovanou hOAT. Výjimkou byla pouze látka GS-9191. Podobně působil flavonoid quercetin, který měl pozitivní vliv na viabilitu buněk exprimujících hOAT1, které byly vystaveny účinku studovaných ANPs (obr. 26). Ochranný účinek probenecidu a quercetinu lze vysvětlit inhibicí transportu ANPs prostřednictvím hOAT1. Tyto výsledky jsou v souladu s údaji, které dokumentovaly, že flavonoidy mohou omezovat svým inhibičním vlivem na hOAT1 závažnost renálního poškození způsobeného toxickými léčivy (Wong et al., 2011). Zajímavé je, že současné podávání quercetinu snížilo toxicitu látky GS-9191 v buňkách transfekovaných hOAT1, zatímco současné podání probenecidu nemělo žádný vliv. To by mohlo znamenat, že interakce quercetinu s GS-9191 je pravděpodobně nezávislá na inhibici hOAT1. Možným vysvětlením by mohl být účinek flavonoidů na eliminaci volných radikálů nebo jejich vliv na antiapoptotické mechanismy (Sung et al., 2008).

AmB

Působení AmB v ledvinách může být významně ovlivněno membránovými proteiny, které se podílí na transportu léčiv do ledvinných buněk. Vzhledem k tomu, že AmB obsahuje ve své molekule substituenty s kyselou i zásaditou povahou, předpokládali jsme, že by mohl interagovat s transportéry pro organické anionty (OATs) a/nebo organické kationty (OCTs).

Komplex AmB/DOC v našich experimentech relativně silně inhiboval hOAT1. Zatímco samotný AmB s tímto transportérem neinteragoval, u deoxycholátu sodného (DOC) jsme pozorovali výraznou inhibici akumulace [³H]PAH v buňkách transfekovaných hOAT1 (obr. 30). Publikované údaje uvádí, že uptake PAH do buňky zprostředkovaný potkaním OAT1 (rOAT1) byl v buněčné linii lidských ledvinných embryonálních buněk (HEK293) přechodně exprimujících rOAT1 podobně inhibován kyselinou deoxycholovou (Chen et al., 2008). To znamená, že za námi zjištěnou interakci AmB/DOC s hOAT1 je pravděpodobně zodpovědná deoxycholátová (DOC) část komplexu AmB/DOC a samotný AmB se na této interakci významně nepodílí. Na druhou stranu, relativně intenzivní interakci AmB a AmB/DOC byla pozorována v případě transportéru hOCT2 (obr. 30). Při fyziologických hodnotách pH se v molekule AmB díky přítomnosti aminových a karboxylových skupin vyskytují jak pozitivně, tak negativně nabití oblasti. Zatímco AmB nevykázal interakci s OAT1, tak inhibiční účinek na OCT2 byl poměrně silný. Vysvětlením tohoto rozdílu by mohlo být prostorové uspořádání atomů v molekule AmB, které umožňuje interakci pouze s OCT2. Výsledky našich akumulačních studií ukázaly, že AmB není substrátem jak hOAT1, tak ani hOCT2 (obr. 31). Velká molekulová hmotnost AmB (924,08) patrně zabraňuje prostupu přes zmíněné transportéry. Tyto poznatky jsou v souladu s tvrzením, že ideálními kandidáty transportu pomocí OATs jsou sloučeniny o velikosti molekuly do 500 Da (Srimaroeng et al., 2008; Ullrich, 1997).

Akumulace AmB v lidských ledvinných buňkách (HK-2) i v prasečích buňkách proximálního tubulu ledvin (LLC-PK1) byla signifikantně inhibována nízkými teplotami. Tento nálezný demonstruje významný příspěvek aktivních transportních procesů k akumulaci AmB v buňkách. K podobným výsledkům dospěli autoři *in vitro* studie s ovariálními buňkami čínského křečka (CHO), ve kterých se po 1 h inkubace při teplotě 5 °C výrazně snížila akumulace AmB ve srovnání s inkubací při 37 °C (Vertut-Doi et al., 1994). Tito autoři také zjistili, že internalizace AmB v CHO buňkách může být

zprostředkována aktivní endocytózou. V této studii byla zkoumána internalizace AmB v delších časových intervalech. Protože naše buněčné experimenty neukázaly schopnost hOAT1 ani hOCT2 transportovat AmB do buněk, může být aktivní endocytóza považována za jeden z možných mechanismů podílejících se na buněčné akumulaci AmB. V našich experimentech byla časová závislost akumulace [³H]AmB v LLC-PK1 buňkách ve zvolených intervalech do 1 hod téměř lineární, což svědčí spíše o pasivní povaze transportu. Pro detekci průkazu možných aktivních internalizačních procesů je pravděpodobně potřebná inkubace v delších časových intervalech.

Experimenty s využitím perfundované potkaní ledviny ukázaly, že inhibitor OATs probenecid ani inhibitor OCTs TEA nezměnily signifikantně renální clearance AmB ve srovnání se samotným podáním AmB do perfúzního roztoku (Trejtnar et al., 2014). Tento výsledek je v souladu s výsledky experimentů s transfekovanými buněčnými liniemi, ve kterých jsme nedetekovali žádný uptake AmB prostřednictvím transportérů hOAT1 a hOCT2. V buněčných i orgánových experimentech byly použity koncentrace inhibitorů efektivně inhibující transport prostřednictvím studovaných transportérů (Koepsell et al. 2007; Lepsy et al., 2003; Ma et al., 2009; VanWert et al., 2010). Vzhledem k tomu, že jak uptake v buněčných modelech, tak i renální exkrece AmB nebyly ovlivněny přidáním inhibitorů OATs a OCTs, můžeme tvrdit, že tyto transportéry nehrají významnou roli v ledvině exkreci AmB.

Další budoucí výzkumné práce by se měly zaměřit na vliv efluxních transportérů lokalizovaných v ledvinách, jako jsou P-gp/ABCB1 nebo BCRP/ABCG2, (Klaassen a Aleksunes, 2010) na renální exkreci AmB, protože výsledky získané ve studii s perfundovanou ledvinou potkana naznačují mírný příspěvek tubulární sekrece k ledvině exkreci AmB (Trejtnar et al., 2014). Bohužel údaje o interakcích AmB s efluxními transportéry nejsou téměř dostupné. Pouze jedna studie na potkanech *in vivo* uvádí lékové interakce AmB na P-gp v GIT. Autoři pozorovali, že podávání AmB signifikantně zvýšilo expresi P-gp, což vedlo ke snížení biologické dostupnosti cyklosporinu A (Ishizaki et al., 2008).

Publikované studie *in vitro* uvádějí, že AmB může ve vodě disociovat z každé lékové formy obsahující AmB/lipidový komplex bez ohledu na použité typy lipidů (Brajtburg a Bolard, 1996; Legrand et al., 1997). Taková situace může nastat také v tělních tekutinách. Volný AmB (uvolněný z komplexu) je pak distribuován do tělesných tkání a orgánů včetně ledvin. V našich experimentech jsme zjistili, že interakce AmB se studovanými transportéry jsou závislé na formě AmB (obr. 30). Poměr volného AmB

a AmB v komplexu s DOC v krvi nebo moči může být tedy důležitým faktorem při určování interakce s transportéry *in vivo*. Bohužel žádná informace o tomto poměru zjištěná přímým měřením v *in vivo* podmínkách není zatím k dispozici. Po podání AmB/DOC se v organismu pravděpodobně vyskytuje určité množství volného AmB. V literatuře ovšem není žádná zmínka o klinicky významných lékových interakcích AmB způsobených ovlivněním membránových transportních mechanismů (Gubbins a Amsden, 2005; Gubbins a Heldenbrand, 2010). Klinicky známé lékové interakce AmB s cyklosporinem, tacrolimem, digoxinem či aminoglykosidy vyplývají z toxických účinků léčiva, které následně vedou ke změnám farmakokinetiky a účinku současně podávaných léčiv (Gubbins a Amsden, 2005; Gubbins a Heldenbrand, 2010). Celková koncentrace AmB v plazmě při předepsaných terapeutických dávkách se u pacientů pohybuje maximálně mezi 1-5 μM (Bellmann, 2007; Brajtburg a Bolard, 1996). Námí zjištěná IC_{50} AmB pro OCT2 je přibližně 8 μM (obr. 30b). AmB by tedy potenciálně mohl způsobit interakce s jinými léčivy, které jsou v organismu transportovány OCT2. Vysoká vazebnost AmB na proteiny lidské plazmy *in vivo* (Bekersky et al., 2002; Robbie a Chiou, 1998; Wasan et al., 1998) vede pravděpodobně k mnohem nižší koncentraci volného AmB, které mohou efektivně ovlivnit ledvinnou tkáň. To by mohlo být vysvětlením, proč farmakokinetické lékové interakce AmB založené na ovlivnění hOCT2 nebyly zatím v klinické praxi pozorovány. Klinicky významné interakce AmB s OCT2 lze tedy očekávat pouze v případě extrémně vysokých plazmatických koncentrací AmB/DOC způsobených předávkováním nebo intoxikací. Na druhou stranu, v některých studiích na zvířatech a v lidských biodistribučních studiích byly nalezeny koncentrace AmB v ledvinách a játrech mnohem vyšší než v krvi (Bellmann, 2007; Brajtburg a Bolard, 1996). Z tohoto důvodu by v budoucích *in vivo* experimentech bylo žádoucí zjistit, zda akumulace AmB v tkáních může mít vliv na farmakokinetiku léčiv transportovaných OCT2. Protože interakční schopnost látek s transportéry pro organické kationty se může u jednotlivých subtypů OCTs značně překrývat, AmB by mohl také interagovat např. s OCT1 (Ciarimboli, 2011; Nies et al., 2011), což je důležitý transportér, který zprostředkovává membránový transport mnoha látek v játrech (Ciarimboli, 2011; Nies et al., 2011). Experimenty zaměřené na interakci AmB s jaterními OCTs by mohly být dalším námětem pro budoucí výzkumné práce.

Po experimentálním zjištění, že AmB/DOC se chová jako inhibitor hOAT1 jsme se dále zaměřili na studie interakcí AmB/DOC se třemi známými substráty OATs, adefovirem, tenofovirem a cidofovirem (Cihlar et al., 1999; Uwai et al., 2007), které jsou

exkretovány ledvinami prostřednictvím těchto transportérů. Použité inkubační koncentrace adefoviru, tenofoviru a cidofoviru odpovídaly lidským terapeutickým plazmatickým hladinám (Cundy, 1999; Delahunty et al., 2006; Kearney et al., 2005). U všech tří antivirotik jsme prokázali *in vitro* interakci s AmB/DOC v buňkách transfekovaných hOAT1 (obr. 32). Jelikož stanovené inhibiční koncentrace AmB/DOC v tomto experimentu byly o několik řádů vyšší než koncentrace terapeutické, pravděpodobnost vzniku lékových interakcí s testovanými antiviroty založená na hOAT1 by měla být nevýznamná. Toto pozorování je v souladu s absencí klinických údajů o farmakokinetických interakcích mezi AmB a zkoumanými antiviroty. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli dále nepokračovat v *in vitro* experimentech týkajících se určení příspěvku jednotlivých složek komplexu AmB/DOC k interakci s adefovirem, tenofovirem a cidofovirem na hOAT1, neboť by nebyly klinicky relevantní. Z výsledků dříve zmíněných experimentů je ovšem odvoditelné, že za interakci s antiviroty na OAT1 je pravděpodobně odpovědný DOC.

Pro potvrzení, zda zjištěné interakce AmB/DOC se studovanými transportéry nejsou nespecifického charakteru v důsledku poškození experimentálních buněk, byla provedena studie zaměřená na ověření cytotoxického účinku AmB (obr. 33). Tato studie ukázala, že AmB/DOC, AmB a DOC nevykazují v intervalu 2 a 10 min detekovatelné cytotoxické účinky.

8 Závěr

Nezbytným předpokladem pro studium interakcí léčiv a dalších látek s membránovými lékovými transportéry *in vitro* bylo zavedení adekvátních metod na pracoviště. Po rozsáhlé optimalizaci byly úspěšně zavedeny postupy založené na přechodné transfekci vhodných buněčných linií expresními plazmidy pro vybrané lidské SLC transportéry. Byla ověřena funkčnost připravených *in vitro* modelů a potvrzena zvýšená exprese transportérů. Tyto buněčné modely jsou aplikovatelné při výzkumu zaměřeném na ledvinné transportéry hOAT1, hOCT2, hCNT2 a hCNT3. Úspěšné použití těchto modelů při zkoumání interakcí s transportéry u vývojových antivirotik ze skupiny acyklických nukleosidových fosfonátů (látky GS-9191, PME0-DAPy, PMEG, cPrPMEDAP, (S)-HPMPA), antivirotika entecaviru a antimykotika amfotericinu B v komplexu s deoxycholátem (AmB/DOC), prokázalo jejich vhodnost pro daný typ farmakologických *in vitro* studií.

V provedených experimentálních pracích jsme zjistili interakce ETV s některými transportními systémy významně exprimovanými v lidských ledvinách. V případě hOAT1 jsme potvrdili inhibiční potenci ETV a specifický transport tímto transportérem. Novým poznatkem je především zjištění, že ETV je inhibitorem a substrátem hCNT2 a hCNT3. K ovlivnění všech uvedených transportních systémů dochází ovšem až při koncentracích ETV výrazně vyšších, než jsou terapeutické. Ve srovnání se známými substráty hOAT1, adefovirem, tenofovirem a cidofovirem, byl u ETV nalezen nižší toxický účinek zprostředkovaný transportem pomocí hOAT1, což naznačuje nižší nefrotoxický potenciál vázaný na tento transportér než je u srovnávacích antivirotik. ETV vykazoval mírný inhibiční vliv na funkci efluxních transportérů, BCRP/ABCG2 a P-gp/ABCB1, což by mohlo mít význam pro jeho účinky v jiných tkáních exprimujících tyto transportéry. Celkově má ETV ve srovnání s nefrotoxicky působícími antivirotiky mnohem méně intenzivní interakce s ledvinnými transportéry, které pravděpodobně nemohou vyústit *in vivo* při běžném dávkování v toxicitu vázanou na tyto transportéry, ani být za běžných okolností příčinou interakcí s jinými léčivy v ledvinách.

Na rozdíl od dalších zkoumaných influxních transportérů se hOAT1 ukázal být důležitým transportérem pro uptake většiny zkoumaných vývojových ANPs v modelových buňkách, přestože u nich byly nalezeny významné mezilátkové rozdíly. Tento transportér hraje i významnou roli v jejich cytotoxickém působení. Většina zkoumaných ANPs vykazovala cytotoxické účinky, které byly u látek s hydrofilnějším

charakterem zprostředkovány jejich akumulací v buňkách pomocí hOAT1. Lipofilnější látky z této skupiny, přestože výrazně interagovaly s hOAT1, vykazovaly silný cytotoxický efekt nezávislý na transportu pomocí hOAT1. Vyšší cytotoxicita ANPs s afinitou k hOAT1 je nepřímým důkazem, že tyto látky jsou nejen inhibitory, ale i substráty hOAT1. V této skupině látek jsme neprokázali žádnou relaci mezi afinitou k transportéru hOAT1 a lipofilitou zkoumaných molekul. Z testovaných ANPs signifikantně interagovala s efluxními transportéry P-gp/ABCB1 a BCRP/ABCG2 pouze látka GS-9191. Protože zjištěné interakce ANPs s hOAT1 by mohly mít význam pro jejich ledvinnou exkreci *in vivo*, je třeba při dalším vývoji látek ze skupiny ANPs brát v úvahu jejich potenciální nefrotoxický účinek zprostředkovaný těmito membránovými transportéry. V další studii byl prokázán významný inhibiční vliv AmB na hOCT2, AmB/DOC na hOCT2 i hOAT1 a DOC na hOAT1. Tyto výsledky jsou první popsanou interakcí AmB s SLC transportéry. Z nálezů plyne, že každá ze složek v klinické praxi užívaného komplexu má jiný inhibiční potenciál. AmB však není substrátem hOCT2. U AmB jsme však prokázali významný příspěvek aktivních transportních procesů na jeho uptake v buňkách. To znamená, že aktivní transport AmB do buněk je patrně vázán na jiné transportní mechanismy. Přestože se inhibiční účinky AmB na hOCT2 projevíly při koncentracích převyšujících běžné terapeutické plazmatické hladiny, mohl by se možný vliv na transportér a s ním související následky projevit při předávkování či kumulaci léčiva.

9 Literatura

- Abramson J, Wright EM. Structure and function of Na(+)-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol* 2009;19(4):425–32.
- Ahn SY, Eraly S, Tsigelny I, Nigam SK. Interaction of organic cations with organic anion transporters. *J Biol Chem* 2009;284(45):31422–30.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361-98.
- Anzai N, Endou H. Renal drug transporters and nephrotoxicity. *Proc 6th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences* 2007. p. 447–52.
- Ascher SB et al. Antifungal therapy and outcomes in infants with invasive *Candida* infections. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31(5):439-43.
- Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 2001;1(4):277-351.
- Bahn A et al. Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(5):1075–84.
- Baldwin S, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004;447(5):735–43.
- Balzarini J, Hao Z, Herdewijn P, Johns DG, De Clercq E. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(4):1499-503.
- Balzarini J. Pronounced in vitro and in vivo antiretroviral activity of 5-substituted 2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy] pyrimidines. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(1):80-6.
- Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):834-40.
- Bellmann R. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics. *Curr Clin Pharmacol* 2007;2(1):37-58.
- Berns JS, Kasbekar N. Highly active antiretroviral therapy and the kidney: an update on antiretroviral medications for nephrologists. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1(1):117–29.
- Bicanic T, Ogden D, Whitney L, Loyse A, Jarvis J. British HIV Association opportunistic infection guidelines: in defence of amphotericin B deoxycholate. *HIV Med* 2012;13(10):636-7.
- Bijsterbosch MK, Smeijsters LJ, van Berkel TJ. Disposition of the acyclic nucleoside phosphonate (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(5):1146-50.
- Bleasby K et al. Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 2006;36(10-11):963-88.

- Bonate PL, Reith K, Weir S. Drug interactions at the renal level. Implications for drug development. *Clin Pharmacokinet* 1998;34(5):375-404.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002;71:537-92.
- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(4):512-31.
- Burckhardt BC, Burckhardt G. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;146:95-158.
- Burckhardt G, Wolff NA. Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278(6):F853-66.
- Cano-Soldado P et al. Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther* 2004;9(6):993-1002.
- Cano-Soldado P, Pastor-Anglada M. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev* 2011;(2):428-57.
- Ciarimboli G. Role of organic cation transporters in drug-induced toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(2):159-74.
- Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH. The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol* 1999;56(3):570-80.
- Cihlar T et al. Novel nucleotide human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor GS-9148 with a low nephrotoxic potential: characterization of renal transport and accumulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(1):150-6.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38(9):1277-87.
- Cundy KC. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin Pharmacokinet* 1999;36(2):127-43.
- Damaraju VL et al. Localization of broadly selective equilibrative and concentrative nucleoside transporters, hENT1 and hCNT3, in human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(1):F200-11.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42(7):1007-17.
- De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(9):704-20.
- De Clercq E. Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochem Pharmacol* 2007a;73(7):911-22.
- De Clercq E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. *Antiviral Res* 2007b;75(1):1-13.
- De Clercq E. Emerging antiviral drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008;13(3):393-416.

- De Clercq E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond. *Biochem Pharmacol* 2011;82(2):99-109.
- De Clercq E. A Cutting-Edge View on the current state of antiviral drug development. *Med Res Rev* 2013;33(6):1249-77.
- Delahunty T, Bushman L, Fletcher CV. Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;830(1):6-12.
- Ding R et al. Substantial pharmacokinetic interaction between digoxin and ritonavir in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(1):73-84.
- Doyle L et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15665-70.
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM. Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J Pharm Sci* 2001;90(4):397-421.
- Dresser MJ, Xiao G, Leabman MK, Gray AT, Giacomini KM. Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm Res* 2002;19(8):1244-7.
- Eilers M, Roy U, Mondal D. MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233(9):1149-60.
- Elwi AN, Damaraju VL, Baldwin SA, Young JD, Sawyer MB, Cass CE. Renal nucleoside transporters: physiological and clinical implications. *Biochem Cell Biol* 2006;84(6):844-58.
- Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 2006;27(5):501-17.
- Endres CJ, Moss AM, Govindarajan R, Choi D, Unadkat JD. The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1^{-/-} mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331(1):287-96.
- Eraly S, Bush KT, Sampogna RV, Bhatnagar V, Nigam SK. The molecular pharmacology of organic anion transporters: from DNA to FDA? *Mol Pharmacol* 2004;65(3):479-87.
- Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics - renal metabolic and excretion clearance. *J Pharm Pharmacol* 2007;59(11):1463-71.
- Fanos V, Cataldi L. Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 2001;13(5):461-72.
- Feng B, LaPerle JL, Chang G, Varma MV. Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6(8):939-52.
- Filipski KK, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Interaction of cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin Cancer Res* 2008;14(12):3875-80.
- Fisel P, Renner O, Nies AT, Schwab M, Schaeffeler E. Solute carrier transporter and drug-related nephrotoxicity: the impact of proximal tubule cell models for preclinical research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10(3):395-408.

- Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(8):423–9.
- Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* 2002;24(10):1515–48.
- 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.
- Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv* 2004;1(1):27–42.
- Gorboulev V. et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 1997;16(7):871–81.
- Govindarajan R, Leung GP, Zhou M, Tse CM, Wang J, Unadkat JD. Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296(4):G910–22.
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004;447(5):728–34.
- Gubbins PO, Amsden JR. Drug-drug interactions of antifungal agents and implications for patient care. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6(13):2231–43.
- Gubbins PO, Heldenbrand S. Clinically relevant drug interactions of current antifungal agents. *Mycoses* 2010;53(2):95–113.
- Gupta A, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(1):334–41.
- Hall AM. Update on tenofovir toxicity in the kidney. *Pediatr Nephrol* 2013;28(7):1011–23.
- Haritova A. A role of P-glycoprotein in modulation of antibiotic pharmacokinetics. *Trakia J Sci* 2008;6(1):1–6.
- Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(3):1087–97.
- Hashiguchi Y, Hamada A, Shinohara T, Tsuchiya K, Jono H, Saito H. Role of P-glycoprotein in the efflux of raltegravir from human intestinal cells and CD4+ T-cells as an interaction target for anti-HIV agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;439(2):221–7.
- Hediger M, Romero MF, Peng J-B, Rolfs A, Takana H, Bruford E. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch* 2004;447(5):465–8.
- Ho ES, Lin DC, Mendel DB, Cihlar T. Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(3):383–93.
- Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78(3):260–77.

- Holý A et al. Structure-antiviral activity relationship in the series of pyrimidine and purine N-[2-(2-phosphonomethoxy)ethyl] nucleotide analogues. 1. Derivatives substituted at the carbon atoms of the base. *J Med Chem* 1999;42(12):2064-86.
- Holý A., Votruba I., Tloustova E., Masojdkova M. Synthesis and cytostatic activity of N-[2-(Phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of N6-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect Czechoslov Chem Commun* 2001;66:1545-92.
- Holý A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies. *Antiviral Res* 2006;71(2-3):248-53.
- Huang L, Wring SA, Woolley JL, Brouwer KR, Serabjit-Singh C, Polli JW. Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors. *Drug Metab Dispos* 2001;29(5):754-60.
- Huls M et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int* 2008;73(2):220-5.
- Chae HB et al. High efficacy of adefovir and entecavir combination therapy in patients with nucleoside-refractory hepatitis B. *Korean J Hepatol* 2012;18(1):75-83.
- Chang C, Swaan PW, Ngo LY, Lum PY, Patil SD, Unadkat JD. Molecular requirements of the human nucleoside transporters hCNT1, hCNT2, and hENT1. *Mol Pharmacol* 2004;65(3):558-70.
- Chen J, Terada T, Ogasawara K, Katsura T, Inui K. Adaptive responses of renal organic anion transporter 3 (OAT3) during cholestasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295(1):F247-52.
- Chen SC, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(5):522-30.
- Chen Z et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 2003;63(14):4048-54.
- Choo EF et al. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab Dispos* 2000;28(6):655-60.
- Christensen ND. Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) model system to test antiviral and immunotherapeutic strategies. *Antivir Chem Chemother* 2005;16(6):355-62.
- Ishikawa T, Tamura A, Saito H, Wakabayashi K, Nakagawa H. Pharmacogenomics of the human ABC transporter ABCG2: from functional evaluation to drug molecular design. *Naturwissenschaften* 2005;92(10):451-63.
- Ishizaki J et al. Mechanism of decrease of oral bioavailability of cyclosporin A during immunotherapy upon coadministration of amphotericin B. *Biopharm Drug Dispos* 2008;29(4):195-203.
- Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 2005a;45(5):804-17.
- Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Renal tubular transporters and antiviral drugs: an update. *AIDS* 2005b;19(5):455-62.
- Jariyawat S et al. The interaction and transport of beta-lactam antibiotics with the cloned rat renal organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2):672-7.

- Jarvis SM, Thorn JA, Glue P. Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol* 1998;123(8):1587-92.
- Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308(1):2-9.
- Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455(1):152-62.
- Jung KY et al. Involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3) in cephaloridine-induced nephrotoxicity: in comparison with rOAT1. *Life Sci* 2002;70(16):1861-74.
- Jung N et al. Relevance of the organic cation transporters 1 and 2 for antiretroviral drug therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drug Metab Dispos* 2008;36(8):1616-23.
- Karbach U et al. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(4):F679-87.
- Karpowich NK, Wang DN. Structural biology. Symmetric transporters for asymmetric transport. *Science* 2008;321(5890):781-2.
- Kearney BP, Ramanathan S, Cheng AK, Ebrahimi R, Shah J. Systemic and renal pharmacokinetics of adefovir and tenofovir upon coadministration. *J Clin Pharmacol* 2005;45(8):935-40.
- Khamdang S et al. Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2003;465(1-2):1-7.
- Kim E, Dintaman JM, Waddell DS, Silverman J. Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286(3):1439-45.
- King KM et al. A comparison of the transportability, and its role in cytotoxicity, of clofarabine, cladribine, and fludarabine by recombinant human nucleoside transporters produced in three model expression systems. *Mol Pharmacol* 2006;69(1):346-53.
- Kis O, Robillard K, Chan GN, Bendayan R. The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31(1):22-35.
- Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 2010;62(1):1-96.
- Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents* 2006;27(Suppl 1):12-6.
- Koepsell H, Schmitt BM, Gorboulev V. Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;150:36-90.
- Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(7):375-81.
- 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.

- Kohler JJ et al. Tenofovir renal proximal tubular toxicity is regulated by OAT1 and MRP4 transporters. *Lab Invest* 2011;91(6):852–8.
- Kramata P, Downey KM. 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) derivatives of purine nucleotide analogs: A comparison of their metabolism and interaction with cellular DNA synthesis. *Mol Pharmacol* 1999;56(6):1262-70.
- Krishnamurthy P et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 2004;279(23):24218–25.
- Kunze A, Huwylar J, Camenisch G, Gutmann H. Interaction of the antiviral drug telaprevir with renal and hepatic drug transporters. *Biochem Pharmacol* 2012;84(8):1096–102.
- Lai Y, Bakken AH, Unadkat JD. Simultaneous expression of hCNT1-CFP and hENT1-YFP in Madin-Darby canine kidney cells. Localization and vectorial transport studies. *J Biol Chem* 2002;277(40):37711–7.
- Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem* 2004;279(6):4490-7.
- Lang TT, Selner M, Young JD, Cass CE. Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol* 2001;60(5):1143–52.
- Lange CM et al. Severe lactic acidosis during treatment of chronic hepatitis B with entecavir in patients with impaired liver function. *Hepatology* 2009;50(6):2001-6.
- Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009;26(4):223-7.
- Leekha S, Terrell CL, Edson RS. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc* 2011;86(2):156-67.
- Legrand P, Chéron M, Leroy L, Bolard J. Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells. *J Drug Target* 1997;4(5):311-9.
- Lepist EI, Ray AS. Renal drug-drug interactions: what we have learned and where we are going. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(4):433–48.
- Lepsy CS, Guttendorf RJ, Kugler AR, Smith DE. Effects of organic anion, organic cation, and dipeptide transport inhibitors on cefdinir in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(2):689-96.
- Lostao MP, Mata JF, Larrayoz IM, Inzillo SM, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 2000;481(2):137–40.
- Lu R, Chan BS, Schuster VL. Cloning of the human kidney PAH transporter: narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 2):F295–303.
- Luke RG, Boyle JA. Renal effects of amphotericin B lipid complex. *Am J Kidney Dis* 1998;31(5):780-5.
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Farmakologie a toxikologie. Překlad 15., zcela přepracovaného vydání.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2004:77 ISBN 80-247-0836-1.

- Ma Z et al. Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(7):2857-64.
- Maeda K, Sugiyama Y. Transporter biology in drug approval: regulatory aspects. *Mol Aspects Med* 2013;34(2-3):711-8.
- Mandíková J et al. Interactions with selected drug renal transporters and transporter-mediated cytotoxicity in antiviral agents from the group of acyclic nucleoside phosphonates. *Toxicology* 2013;311(3):135-46.
- Mangravite LM, Badagnani I, Giacomini KM. Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *Eur J Pharmacol* 2003;479(1-3):269-81.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 2005;7(1):E118-33.
- Masereeuw R, Russel FG. Mechanisms and clinical implications of renal drug excretion. *Drug Metab Rev* 2001;33(3-4):299-351.
- Masereeuw R, Russel FG. Regulatory pathways for ATP-binding cassette transport proteins in kidney proximal tubules. *AAPS J* 2012;14(4):883-94.
- Matthews SJ. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Clin Ther* 2006;28(2):184-203.
- Michaud V, Bar-Magen T, Turgeon J, Flockhart D, Desta Z, Wainberg M. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition. *Pharmacol Rev* 2012;64(3):803-33.
- Minuesa G, Huber-Ruano I, Pastor-Anglada M, Koepsell H, Clotet B, Martinez-Picado J. Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol Ther* 2011;132(3):268-79.
- Motohashi H et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):866-74.
- Mulato AS, Ho ES, Cihlar T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295(1):10-5.
- Müller F, Fromm MF. Transporter-mediated drug-drug interactions. *Pharmacogenomics* 2011;12(7):1017-37.
- Naughton C. Drug-induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician* 2008;78(6):743-50.
- Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011;(201):105-67.
- Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20(6):452-77.
- Osses N, Pearson JD, Yudilevich DL, Jarvis SM. Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochem J* 1996;317(3):843-8.
- Pagano L, Caira M, Valentini CG, Posteraro B, Fianchi L. Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Rev* 2010;24(2):51-61.

- Pan G, Giri N, Elmquist WF. Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab Dispos* 2007;35(7):1165–73.
- Perazella M. Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(7):1275–83.
- Pisarev VM, Lee SH, Connelly MC, Fridland A. Intracellular metabolism and action of acyclic nucleoside phosphonates on DNA replication. *Mol Pharmacol* 1997;52(1):63-8.
- Polli JW et al. An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metab Dispos* 2009;37(2):439–42.
- Pritchard JB, Miller DS. Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 1993;73(4):765-96.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang and Dale's pharmacology. 6th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2007:119-20 ISBN 0443069116.
- Razonable RR. Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin Proc* 2011;86(10):1009-26.
- Reese MJ et al. In vitro investigations into the roles of drug transporters and metabolizing enzymes in the disposition and drug interactions of dolutegravir, a HIV integrase inhibitor. *Drug Metab Dispos* 2013;41(2):353–61.
- Riedmaier AE, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2012;64(3):421–49.
- Reiser H. GS-9219-a novel acyclic nucleotide analogue with potent antineoplastic activity in dogs with spontaneous non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2824-32.
- Ritzel MW, Yao SY, Huang MY, Elliott JF, Cass CE, Young JD. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):C707-14.
- Ritzel MW, Yao SY, Ng AM, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* 1998;15(4):203-11.
- Ritzel MW et al. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem* 2001;276(4):2914–27.
- Rizwan AN, Burckhardt G. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 2007;24(3):450–70.
- Robbie G, Chiou WL. Elucidation of human amphotericin B pharmacokinetics: identification of a new potential factor affecting interspecies pharmacokinetic scaling. *Pharm Res* 1998;15(10):1630-6.
- Rodríguez-Mulero S et al. Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: effect of diabetes. *Kidney Int* 2005;68(2):665-72.
- Safdar A et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2010;89(4):236-44.

- Saier MH Jr. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64(2):354–411.
- Saier MH Jr, Reddy VS, Tamang DG, Västermark A. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D251–8.
- Saliba F, Dupont B. Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol* 2008;46(2):97-112.
- Scott LJ, Keating GM. Entecavir: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs* 2009;69(8):1003-33.
- Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(2):F251-61.
- Shaik N, Giri N, Pan G, Elmquist WF. P-glycoprotein-mediated active efflux of the anti-HIV1 nucleoside abacavir limits cellular accumulation and brain distribution. *Drug Metab Dispos* 2007;35(11):2076–85.
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008;9(1):105–27.
- Sheng YJ. Lamivudine plus adefovir combination therapy versus entecavir monotherapy for lamivudine-resistant chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis. *Virol J* 2011;8:393.
- Sheps J, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 2004;5(3):R15.
- Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res* 2009;26(9):2039–54.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(1):3–29.
- Schlessinger A et al. Comparison of human solute carriers. *Protein Sci* 2010;19(3):412–28.
- Schlessinger A, Yee SW, Sali A, Giacomini KM. SLC classification: an update. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94(1):19–23.
- Sprowl JA et al. Conjunctive therapy of cisplatin with the OCT2 inhibitor cimetidine: influence on antitumor efficacy and systemic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94(5):585-92.
- Srimaroeng C, Perry JL, Pritchard JB. Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):889-935.
- Srinivas RV, Middlemas D, Flynn P, Fridland A. Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(12):3157–62.
- Storch CH, Theile D, Lindenmaier H, Haefeli WE, Weiss J. Comparison of the inhibitory activity of anti-HIV drugs on P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 2007;73(10):1573–81.
- Sugawara M, Mochizuki T, Takekuma Y, Miyazaki K. Structure-affinity relationship in the interactions of human organic anion transporter 1 with caffeine, theophylline, theobromine and their metabolites. *Biochim Biophys Acta* 2005;1714(2):85–92.

- Sun HY, Wagener MM, Singh N. Cryptococcosis in solid-organ, hematopoietic stem cell, and tissue transplant recipients: evidence-based evolving trends. *Clin Infect Dis* 2009;48(11):1566-76.
- Sung MJ et al. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int* 2008;74(12):1538-47.
- Sweet DH, Pritchard JB. The molecular biology of renal organic anion and organic cation transporters. *Cell Biochem Biophys* 1999;31(1):89-118.
- Sweet DH, Bush KT, Nigam SK. The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic. *Am J Physiol Ren Physiol* 2001;281(2):197-205.
- Sweet DH. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(3):198-215.
- Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008;13(9-10):379-93.
- Štaud F, Pávek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(4):720-5.
- Taubert D, Grimberg G, Stenzel W, Schömig E. Identification of the endogenous key substrates of the human organic cation transporter OCT2 and their implication in function of dopaminergic neurons. *PLoS One* 2007;2(4):e385.
- Thiebaut F, Tsuruot T, Hamadat H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7735-8.
- Trejtnar F, Mandíková J, Kočincová J, Volková M. The renal handling of amphotericin B and amphotericin B/deoxycholate and potential renal drug-drug interactions with selected antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; přijato.
- Tsuda M et al. Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter 1. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(3):1301-5.
- Ullrich KJ. Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol* 1997;158(2):95-107.
- Uwai Y, Ida H, Tsuji Y, Katsura T, Inui KI. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm Res* 2007;24(4):811-5.
- Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(2):F216-32.
- VanWert AL, Gionfriddo MR, Sweet DH. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm Drug Dispos* 2010;31(1):1-71.
- van Herwaarden AE et al. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol* 2007;27(4):1247-53.
- Varma MV et al. Physicochemical determinants of human renal clearance. *J Med Chem* 2009;52(15):4844-52.
- Vertut-Doi A, Ohnishi SI, Bolard J. The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(10):2373-9.

- Vishnuvardhan D, Moltke LL, Richert C, Greenblatt DJ. Lopinavir: acute exposure inhibits P-glycoprotein; extended exposure induces P-glycoprotein. *AIDS* 2003;17(7):1092-4.
- Vokurka et al. *Velký lékařský slovník*. 7. vydání. Praha: Jessenius Maxdorf, 2007:60 ISBN 978-80-7345-130-1.
- Wasan KM et al. Pharmacokinetics, distribution in serum lipoproteins and tissues, and renal toxicities of amphotericin B and amphotericin B lipid complex in a hypercholesterolemic rabbit model: single-dose studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(12):3146-52.
- Weiss J, Haefeli WE. Impact of ATP-binding cassette transporters on human immunodeficiency virus therapy. *Int Rev Cell Mol Biol* 2010;280:219-79.
- Wolfgang GH. GS-9191 is a novel topical prodrug of the nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine with antiproliferative activity and possible utility in the treatment of human papillomavirus lesions. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(7):2777-84.
- Wong CC, Botting NP, Orfila C, Al-Maharik N, Williamson G. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochem Pharmacol* 2011;81(7):942-9.
- Wright SH, Dantzer WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004;84(3):987-1049.
- Xu G, Bhatnagar V, Wen G, Hamilton BA, Eraly SA, Nigam SK. Analyses of coding region polymorphisms in apical and basolateral human organic anion transporter (OAT) genes [OAT1 (NKT), OAT2, OAT3, OAT4, URAT (RST)]. *Kidney Int* 2005;68(4):1491-9.
- Xu Q et al. OAT1 and OAT3: targets of drug-drug interaction between entecavir and JBP485. *Eur J Pharm Sci* 2013;48(4-5):650-7.
- Yamamoto T, Kuniki K, Takekuma Y, Hirano T, Iseki K, Sugawara M. Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol* 2007;557(1):1-8.
- Yan JH et al. Entecavir pharmacokinetics, safety, and tolerability after multiple ascending doses in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2006;46(11):1250-8.
- Yanxiao C et al. Organic anion and cation transporters are possibly involved in renal excretion of entecavir in rats. *Life Sci* 2011;89(1-2):1-6.
- Yao SY, Ng AM, Sundaram M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol* 2001;18(2):161-7.
- Young JD, Yao SY, Sun L, Cass CE, Baldwin SA. Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):995-1021.
- Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 2013;34(2-3):529-47.
- Zhang L, Gorset W, Washington CB, Blaschke TF, Kroetz DL, Giacomini KM. Interactions of HIV protease inhibitors with a human organic cation transporter in a mammalian expression system. *Drug Metab Dispos* 2000;28(3):329-34.

Zhang S et al. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* 2006;66(17):8847–57.

Elektronické dokumenty

Protokoly a manuály

Life Technologies materiál. Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent. Dostupné na URL: http://tools.lifetechnologies.com/Content/SFS/ProductNotes/F_Lipofectamine%202000b-040923-RD-MKT-TL-HL050602.pdf. Přístup 13. 6. 2014.

Promega materiál. Technical buletin. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. TB245. Printed in USA. Revised 12/12. Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf>. Přístup 13. 6. 2014.

Promega materiál. Technical buletin. CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay. TB306. Printed in USA. Revised 5/09. Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/cyto-tox-one%20homogeneous%20membrane%20integrity%20assay%20protocol.pdf>. Přístup 13. 6. 2014.

Thermo Scientific materiál. Instructions. Micro BCA™ Protein Assay Kit. 23235. Rockford, USA. Dostupné na URL: <https://www.piercenet.com/instructions/2160412.pdf>. Přístup 13. 6. 2014.

Internetové stránky

Bioparadigms. Advanced Biomedical Knowledge. SLC Tables. Dostupné na URL: <http://slc.bioparadigms.org/>. Přístup 12. 5. 2014

Transporter Classification Database (TCDB). Dostupné na URL: <http://www.tcdb.org/>. Přístup 12. 5. 2014

10 Seznam publikovaných vědeckých prací

10.1 Práce související s disertační prací

Mandíková J, Volková M, Pávek P, Česnek M, Janeba Z, Kubíček V, Trejtnar F. Interactions with selected drug renal transporters and transporter-mediated cytotoxicity in antiviral agents from the group of acyclic nucleoside phosphonates. *Toxicology* 2013;311(3):135–46. (IF = 4,02)

Trejtnar F, Mandíková J, Kočincová J, Volková M. The renal handling of amphotericin B and amphotericin B/deoxycholate and potential renal drug-drug interactions with selected antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; přijato. (IF = 4,57)

10.2 Seznam publikovaných vědeckých prací

Nový Z, Mandíková J, Trejtnar F. Comparison of renal accumulation of [DOTA0, 1-Nal3]-octreotide labelled with selected radiometals. *Ceska Slov Farm* 2009,58:208-11.

Nový Z, Mandíková J, Trejtnar F. Study on ^{99m}Tc-MAD3 and ^{99m}Tc-DMSA renal accumulation using in vitro cellular model. *Ceska Slov Farm* 2011, 60(1):7-10.

Vavříková E, Mandíková J, Trejtnar F, Horváti K, Bősze S, Stolaříková J, Vinšová J. Cytotoxicity decreasing effect and antimycobacterial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. *Carbohydr Polym* 2011, 83:1901–7. (IF = 3,63)

Neuhaus W, Mandikova J, Pawlowitsch R, Linz B, Bennani-Baiti B, Lauer R, Lachmann B, Noe CR. Blood-brain barrier in vitro models as tools in drug discovery: Assessment of the transport ranking of antihistaminic drugs. *Pharmazie* 2012;67(5):432-9. (IF = 0,96)

Novy Z, Barta P, Mandikova J, Laznicek M, Trejtnar F. A comparison of in vitro methods for determining the membrane receptor expression in cell lines. *Nucl Med Biol* 2012;39(7):893-6. (IF = 2,62)

Nováková L, Gottvald T, Vlčková H, Trejtnar F, Mandíková J, Solich P. Highly sensitive fast determination of entecavir in rat urine by means of hydrophilic interaction chromatography-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1259:237-43. (IF = 4,61)

Krátký M, Vinšová J, Novotná E, Mandíková J, Wsól V, Trejtnar F, Ulmann V, Stolaříková J, Fernandes S, Bhat S, Liu JO. Salicylanilide derivatives block *Mycobacterium tuberculosis* through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012;92(5):434-9. (IF = 2,54)

Zitko J, Paterová P, Kubíček V, Mandíková J, Trejtnar F, Kuneš J, Doležal M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinamide derivatives with benzylamino substitution. *Bioorg Med Chem Lett* 2013;23(2):476-9. (IF = 2,65)

- Imramovský A, Pejchal V, Štěpánková Š, Vorčáková K, Jampílek J, Vančo J, Šimůnek P, Královec K, Brůčková L, Mandíková J, Trejtnar F. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[d]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2013;21:1735-48. (IF = 2,82)
- Krátký M, Vinšová J, Novotná E, Mandíková J, Trejtnar F, Stolaková J. Antibacterial activity of salicylanilide 4-(trifluoromethyl)benzoates. *Molecules* 2013;18(4):3674-88. (IF = 2,43)
- Soukup O, Jun D, Zdarova-Karasova J, Patocka J, Musilek K, Korabecny J, Krusek J, Kaniakova M, Sepsova V, Mandikova J, Trejtnar F, Pohanka M, Drtinova L, Pavlik M, Tobin G, Kuca K. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res* 2013;10(8):893-906. (IF = 3,68)
- Zitko J, Servusová B, Paterová P, Mandíková J, Kubiček V, Kučera R, Hrabcová V, Kuneš J, Soukup O, Doležal M. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* 2013;18(12):14807-25. (IF = 2,43)
- Vinšová J, Kozic J, Krátký M, Stolaříková J, Mandíková J, Trejtnar F, Buchta V. Salicylanilide diethyl phosphates: synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem* 2014;22(2):728-37. (IF = 2,82)
- Servusová B, Paterová P, Mandíková J, Kubiček V, Kučera R, Kuneš J, Doležal M, Zitko J. Alkylamino derivatives of pyrazinamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* 2014;24(2):450-3. (IF = 2,65)
- Volková M, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M, Bárta P, Trejtnar F. The involvement of selected membrane transport mechanisms in the cellular uptake of ¹⁷⁷Lu-labeled bombesin, somatostatin and gastrin analogues. *Nuclear Medicine and Biology*. 2014; přijato (IF = 2,52)
- Novy Z, Laznickova A, Mandikova J, Barta P, Laznicek M, Trejtnar F. The effect of chelator type on in vitro receptor binding and stability in ¹⁷⁷Lu-labeled cetuximab and panitumumab. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014; přijato. (IF = 1,24)

11 Výstupy na odborných konferencích

- Neuhaus W, Stessl M, Strizsik E, Bennani-Baiti B, Wirth W, Mandikova J, Pawlowitsch R, Tögel S, Winkler J, Gabor F, Noe CR. Functionality of P-glycoprotein in the blood-brain barrier mimicking cell line PBMEC/C1-2. 21st Congress of the Austrian Pharmaceutical Society, Vídeň, Rakousko. 16. - 18. 4. 2009. Abstrakt publikován v *Scientia Pharmaceutica*, 77(1):219 (poster).
- Vavříková E, Vinšová J, Mandíková J, Stolaříková J. Chitosan coupling with antituberculous drugs. 6th Meeting of the European Network of Doctoral Studies in Pharmaceutical Sciences, Palermo, Itálie. 16. - 18. 11. 2009. Sborník abstraktů, str.41.
- Mandíková J, Trejtnar F, Nový Z, Lázníčková A. In vitro uptake of radiolabeled receptor-specific peptides in porcine proximal tubular cells. 59. farmakologické dny, Bratislava, Slovensko. 2. - 4. 10. 2009. Sborník abstraktů, str. 96 (poster).
- Trejtnar F, Mandíková J, Nový Z, Kroupová T, Popadičová L, Lázníčková A. Differences in renal uptake of selected radiolabeled receptor-specific peptides. 59. Farmakologické dny, Bratislava, Slovensko. 2. - 4. 10. 2009. Sborník abstraktů, str. 122 (poster).
- Vavříková E, Vinšová J, Mandíková J, Stolaříková J. Vliv chitosanu na antimykobakteriální účinek a toxicitu isoniazidu. 61. zjazd chemikov, Tatranské Matliare, Slovensko. 7. - 11. 9. 2009. Sborník abstraktů, str. 183 (poster).
- Trejtnar F, Nový Z, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Renal accumulation of two somatostatin analogs labeled with lutetium-177 in vitro. Annual Congress of the EANM, 10. - 14. 10. 2009, Barcelona, Spain. Abstrakt publikován v *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(2):309 (poster).
- Mandíková J, Stehnová O, Vavříková E, Nový Z, Trejtnar F. Evaluation of cytotoxicity of newly synthesized chitosan derivatives using in vitro hepatic cell model. 60. farmakologické dny, Hradec Králové. 15. - 17. 9. 2010. Abstrakt publikován v *Acta Medica*, 53(3):182-3 (poster).
- Nový Z, Loužecká J, Trejtnar F, Mandíková J, Lázníčková A. Renal accumulation of radiolabeled somatostatin and gastrin analogs in vitro. 60. farmakologické dny 15. - 17. 9. 2010, Hradec Králové. Abstrakt publikován v *Acta Medica*, 53(3):186-7 (poster).
- Trejtnar F, Kubačková T, Nový Z, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M. Study on renal accumulation of radiolabeled receptor-specific minigastrin analogs in vitro. 60. farmakologické dny 15. - 17. 9. 2010, Hradec Králové. Abstrakt publikován v *Acta Medica*, 53(3):198 (poster).
- Nový Z, Mandíková J, Trejtnar F, Lázníčková A. In vitro comparison of renal accumulation of two gastrin analogs using two renal cell models. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Vídeň, Rakousko. 9. - 13. 10.

2010. Abstrakt publikován v *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(2):369 (poster).
- Trejtner F, Nový Z, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M. Renal accumulation of DOTA-conjugated minigastrin 11 labeled with indium-111 in vitro. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Vídeň, Rakousko. 9. - 13. 10. 2010. Abstrakt publikován v *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(2):371 (poster).
- Mandikova J, Arimany C, Pastor-Anglada M, Trejtner F. Use of in vitro cellular models to study of drug accumulation via organic anion and organic cation transporters. 1. postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 1. – 2. 2. 2011 (ústní prezentace).
- Mandíková J, Volková M, Nový Z, Pávek P, Janeba Z, Trejtner F. In vitro study of potential of selected drugs to interact with antivirals on human organic anion transporter. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 98 (poster).
- Nový Z, Bárta P, Mandíková J, Trejtner F, Lázníček M. Determination of epidermal growth factor receptor (EGFR) number: comparison of two in vitro methods. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 115 (poster).
- Trejtner F, Volková M, Nový Z, Mandíková J, Lázníčková A, Lázníček M. Comparison of renal accumulation of radiopeptides from group of somatostatin and gastrin derivatives in vitro. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 148 (poster).
- Volková M, Mandíková J, Nový Z, Lázníčková A, Lázníček M, Trejtner F. Study of renal transmembrane transport of somatostatin analogues in vitro. 61. česko-slovenské farmakologické dny, Brno. 14. - 16. 9. 2011. Sborník abstraktů, str. 157 (poster).
- Mandíková J, Nový Z, Volková M, Pávek P, Trejtner F. Interactions of selected antivirals with human organic anion transporter 1 in vitro and potential influence of drug competitors. 17th North American Regional Meeting of International Society for the Study of Xenobiotics, Atlanta, USA. 16. - 20. 11. 2011. Abstrakt publikován v *Drug Metabolism Review*, 43(2):185 (poster).
- Nový Z, Bárta P, Mandikova J, Trejtner F, Laznicek M. Determination of epidermal growth factor receptor (EGFR) number: comparison of two in vitro methods. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Birmingham, UK. 9. - 13. 10. 2011. Abstrakt publikován v *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38(2):302 (poster).
- Mandíková J, Volková M, Nový Z, Janeba Z, Pávek P, Trejtner F. Interactions of selected antiviral drugs with human organic anion transporter 1 (hOAT1) in vitro and the influence of potential drug competitors. 2. postgraduální vědecká

konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 31. 1 – 1. 2. 2012 (ústní prezentace).

- Mandíková J, Volková M, Nový Z, Pávek P, Janeba Z, F. Trejtnar F. Interaction of antiviral agent PMEG with SLC transporters. 62. česko-slovenské farmakologické dny, Košice, Slovensko. 25. - 27. 6. 2012. Sborník abstraktů, str. 60 (poster).
- Volková M, Mandíková J, rejtmar F. Receptor mediated endocytosis of albumin in different epithelial kidney cell lines compared to cervical cancer cell line. 62. česko-slovenské farmakologické dny, Košice. 25.-27. 6. 2012. Sborník abstraktů, str. 98 (poster).
- Trejtnar F, Mandikova J, Volkova M, Janeba Z, Pavek P. Interaction of antiviral agent PMEO-DAPy with renal transporters. 13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection, Peking, Čína. 25. - 28. 10. 2012. Sborník abstraktů, str. 239 (poster).
- Volkova M, Mandikova J, Laznickova A, Laznicek M, Trejtnar F. Study of renal transmembrane transport of somatostatin and gastrin analogues using cellular renal models. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Španělsko. 17. - 20.7. 2012. Sborník abstraktů, str. 64. Abstrakt je publikován v elektronické podobě v E-Journal of British Pharmacological Society (poster).
- Mandíková J, Volková M, Nový Z, Pávek P, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of antiviral agent PMEG and its prodrug with selected SLC transporters. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Španělsko. 17. - 20. 7. 2012. Sborník abstraktů, str. 187. Abstrakt je publikován v elektronické podobě v E-Journal of British Pharmacological Society (poster).
- Mandíková J, Volková M, Pávek P, Česnek M, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of Acyclic Nucleoside Phosphonates with Selected Renal SLC and ABC Transporters. 26th International conference of antiviral research ICAR. San Francisco, Kalifornie, 11. - 15. 5. 2013. Sborník abstraktů str. 99-100 (poster).
- Mandíková J, Volková M, Pávek P, Janeba Z, Pavlík J, Trejtnar F. Interactions of entecavir with selected renal SLC and ABC transporters. Konference BioMedical Transporters, Sv. Mořic, Švýcarsko. 11. - 15. 8. 2013. Sborník abstraktů str. 104-5 (poster).
- Mandíková J, Volková M, Pávek P, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of a set of antiviral drugs with organic anion transporter 1 and organic cation transporter. 2. farmakologické dny Olomouc. 11. - 13. 9. 2013. Abstrakt je publikován v Biomedical Papers,157:32-3 (poster).
- Mandíková J, Volková M, Pávek P, Česnek M, Janeba Z, Trejtnar F. Interactions of acyclic nucleoside phosphonates with selected renal SLC and ABC transporters. 4. postgraduální a 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové. 28. - 29. 1. 2014 (ústní prezentace).

12 Recenzované odborné články publikované v časopisech s impakt faktorem a související s tématem disertační práce

Toxicology 311 (2013) 135–146



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Interactions with selected drug renal transporters and transporter-mediated cytotoxicity in antiviral agents from the group of acyclic nucleoside phosphonates



Jana Mandíková^a, Marie Volková^a, Petr Pávek^a, Michal Česnek^b, Zlatko Janeba^b, Vladimír Kubíček^a, František Trejtnar^{a,*}

^a Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic
^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Flemingovo náměstí 2, Prague 166 10, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 8 May 2013
 Received in revised form 1 July 2013
 Accepted 3 July 2013
 Available online 13 July 2013

Keywords:
 hOAT1
 hCNTs
 MDR1
 BCRP
 Nephrotoxicity
 Transmembrane transport

ABSTRACT

Members of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) possess antiviral and antiproliferative activities. However, several clinically important ANPs may cause renal injury, most likely due to their active accumulation in the renal tubular cells. The goal of this study was to investigate *in vitro* relationships between the affinity of several structurally related potent ANPs to selected human transporters and their cytotoxicity. SLC (solute carrier family) transporters (hOAT1, hOCT2, hCNT2, hCNT3) and ABC (ATP-binding cassette) transporters (MDR1, BCRP), which are typically expressed in the kidney, were included in the study. The transport and toxic parameters of the tested compounds were compared to those of two clinically approved ANPs, adefovir and tenofovir. Transport studies with transiently transfected cells were used as the main method in the experiments. Most of the ANPs studied showed the potency to interact with hOAT1. GS-9191, a double prodrug of PMEG, displayed an affinity for hOAT1 comparable with that of adefovir and tenofovir. No significant interaction of the tested ANPs with hOCT2, hCNT2 and hCNT3 was observed. Only GS-9191 was found to be a strong inhibitor for both MDR1 and BCRP. PMEO-DAPy showed the potency to interact with MDR1. Most of the tested substances caused a significant decrease in cellular viability in the cells transfected with hOAT1. Only with the exclusion of GS-9191, a relatively lipophilic compound, did the *in vitro* cytotoxicity of the ANPs closely correspond to their potential to interact with hOAT1. The increased cytotoxicity of the studied ANPs found in OAT1 transfected cells was effectively reduced by OAT inhibitors probenecid and quercetin. The higher cytotoxicity of the compounds with affinity to hOAT1 proved in the inhibitory experiments evidences that ANPs are not only inhibitors but also substrates of hOAT1. Any clear relationship between the potency of ANPs to inhibit the studied efflux transporters and their cytotoxicity was not demonstrated. In conclusion, the study documented that among the studied transporters hOAT1 seems to be the decisive determinant for renal handling in most of the tested ANPs. This transporter may also play an important role in the mechanism of their potential cytotoxic effects. These facts are in good accordance with previous findings in the clinically used ANPs.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) are nucleotide analogs originated at the Antonin Holy Laboratory at IOCB (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Czech Republic) that have been shown to possess broad spectrum antiviral, cytostatic and antiproliferative activities. ANPs such as tenofovir, adefovir or cidofovir have been licensed for the treatment of various DNA virus and retrovirus infections (De Clercq, 2007a,b; Holy, 2006). Their characteristic phosphonate group is unique in that it is attached to the nucleoside analog in the formation of phosphonmethyl ether and thus can withstand an attack by esterases and other catabolic enzymes (De Clercq, 2007a,b). ANPs are excreted predominantly

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; ANPs, acyclic nucleoside phosphonates; BCRP/ABCG2, breast cancer resistance protein; CNTs, concentrative nucleoside transporters; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EMEM, Eagle's minimum essential medium; hCNT2, human concentrative nucleoside transporter 2; hCNT3, human concentrative nucleoside transporter 3; HeLa, human cervical epitheloid carcinoma cell line; hOAT1, human organic anion transporter 1; hOCT2, human organic cation transporter 2; IC₅₀, inhibitory concentration to reduce substrate accumulation to 50%; MDCK II, Madin-Darby canine kidney II cell line; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; MRPs, multidrug-resistance proteins; OATs, organic anion transporters; OCTs, organic cation transporters; PAH, *para*-aminohippuric acid; RFU, relative fluorescence units; SLC, solute carrier family.

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 436; fax: +420 495 067 170.

E-mail address: trejtnar@faf.cuni.cz (F. Trejtnar).

0300-483X/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.07.004>

by the kidney using tubular secretion mechanisms (Cihlar et al., 1999). The transport of ANPs in the renal proximal tubules is mediated specifically by uptake at the basolateral membrane and efflux at the luminal membrane. Treatments that enhance accumulation, such as those that block efflux, may cause a change of excretion equilibrium and thus result in renal damage (Cundy et al., 1996; De Clercq, 2011; Izzedine et al., 2005).

A group of several multispecific drug transporters from the solute carrier family (SLC) such as organic anion and cation transporters (OATs/OCTs), nucleoside transporters (NTs) and numerous others may be an important entrance pathway into cells, and could significantly contribute to the cellular accumulation of antiviral agents. Uptake in the renal tubular cells mediated by these transporters may be potentially responsible for the renal toxicity detected in several ANPs (Cihlar et al., 2009; Klaassen and Aleksunes, 2010; Minuesa et al., 2011). It has been proven that cidofovir and adefovir as well as other antiviral nucleoside phosphonate analogs PMEG and PMEDAP are high-affinity substrates for human organic anion transporter 1 (hOAT1) (Cihlar et al., 1999). Related to toxicity, the expression of hOAT1 has been observed to induce the cytotoxicity of adefovir and cidofovir in Chinese hamster ovary cells stably transfected with hOAT1 (Ho et al., 2000). Transporters from the ABC (ATP-binding cassette) superfamily, multidrug resistance P glycoprotein (Pgp/MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localized to the luminal membrane of the proximal tubular cells have been shown to mediate the efflux of xenobiotics in proximal tubules (Eijlers et al., 2008; Van de Ven et al., 2009; Sarkadi et al., 2006). The goal of this study was to investigate *in vitro* if other members of ANPs with potent antiviral activity may demonstrate a similar affinity to renal drug transporters as the commonly used antivirals adefovir and tenofovir, or if other uptake and efflux transporters abundantly expressed in the kidney may potentially play a role in renal accumulation of these compounds. The study presents data on the interactions of five ANPs from groups of PME, 2-(phosphonomethoxy)ethyl and HPMP, 3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl compounds (Fig. 1), respectively, with selected human uptake (hOAT1, hOCT2, hCNT2, hCNT3) and efflux (ABCB1, ABCG2) transporters, which are typically expressed in the kidney. Our work shows possible relationship between the potency of the agents to interact with the studied transporters and their cytotoxicity. In addition, we have tried to consider the possible significance of lipophilicity in the interaction of the studied agents with the relevant transporters.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents used

PMEG, 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]guanine; cPrPMEDAP, 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-N(6)-cyclopropyl-2,6-diaminopurine, GS-9191, (1-phenylalanine, N,N'-[[[2-(2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purine-9-yl)ethoxy]methyl]phosphinyldiene]bis-, bis(2-methylpropyl) ester), (S)-HPMPA, (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine; PMEO-DAPy, 2,4-diamino-6-[[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purine were synthesized by the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Prague, Czech Republic. For the experiments, GS-9191 and PMEG were dissolved in dimethyl sulfoxide, cPrPMEDAP, (S)-HPMPA and PMEO-DAPy in water and diluted with the incubation medium. Quercetin in the form of dihydrate and probenecid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

[5-³H]-uridine ([³H]-uridine) were obtained from Moravěk Biochemicals (Brea, USA), p-[glycyl-2-³H]-aminohippuric acid ([³H]-PAH) was purchased from Perkin Elmer (Waltham, USA). Methyl-4-phenylpyridinium acetate, N-[methyl-³H] ([³H]-MPP⁺) was obtained from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, USA). Hoechst 33342 and the specific ABCG2 inhibitor KO143 were purchased from Sigma-Aldrich. The specific ABCB1 inhibitor LY335979 was obtained from Karl-Schmid (Munich, Germany).

OAT1 (SLC22A6) expression plasmid, transcript variant 2, cat. number: RC207579; OCT2 (SLC22A2) expression plasmid, cat. number: RC207921; CNT2 (SLC28A2) expression plasmid, cat. number: RC211308; CNT3 (SLC28A3) expression plasmid, transcript variant 2, cat. number: RC210847 and pCMV6-Entry vector, cat. number: PS100001 were obtained from OriGene Technologies (Rockville, USA).

2.2. HeLa cell culture

The human cervical epithelioid carcinoma cell line (HeLa) was purchased from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). The cells (passages 15–25, 28–30) were routinely cultured in 75 cm² cell culture flasks in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C in cell culture Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids and 2 mM L-glutamine. Confluent cells were split every 4 days using 0.25% trypsin/EDTA solution.

2.3. MDCK II cell cultures

The Madin–Darby canine kidney cell line (MDCK II) was purchased from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). The MDCK II cells (passages 11–20), ABCG2-transduced MDCK II subline (passages 5–11), which stably expresses ABCG2 protein (a breast cancer resistance protein) and ABCB1-transduced MDCK II subline (passages 5–11), which stably expresses ABCB1 protein (kindly provided by Assoc. Prof. Petr Pavek) were routinely cultured in 75 cm² cell culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with high glucose, 2 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. Confluent cells were split every 4 days using 0.25% trypsin/EDTA solution.

2.4. Transient transfection

The HeLa cells were seeded at a density 7 × 10⁴ cells/well in 24-well plates. The MDCK II cells were seeded at a density 2 × 10⁵ cells/well in 24-well plates. The following day the cells were transiently transfected with the appropriate plasmid expressing either the studied influx transporter or the empty vector (pCMV6) using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol. Transport assays in the HeLa cells transiently transfected with hOAT1 were performed 48 h after transfection. Transport assays in the MDCK II cells transiently transfected with hOCT2, hCNT2 or hCNT3 were performed 24 h after transfection. The cells transiently transfected with empty vector served as the control.

2.5. Interactions with SLC transporters

Interactions of the tested ANPs with the SLC transporters were carried out in 24-well plates as described previously (Errasti-Murugarren et al., 2010). The transport solution contained 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4. The cultivation medium was removed and the cells were washed with transport solution and preincubated for 10 min at 37 °C. The prototypical substrate or tested radioactive substance dissolved in transport solution was added in triplicates to the cell monolayers and incubated for 2 min. [³H]para-aminohippuric acid ([³H]PAH) was used as a specific substrate for hOAT1, [³H]methyl-4-phenylpyridinium ([³H]MPP⁺) for hOCT2 and [³H]uridine for CNTs. The rate of inhibition of the intracellular accumulation of the radioactive substrates induced by gradually increasing concentrations of PMEG, cPrPMEDAP, (S)-HPMPA or PMEO-DAPy (0–1000 μM) or GS-9191 in concentration (0–250 μM) was used as a measure of the affinity to the transporter. The incubation was terminated by washing the cells twice with an ice-cold solution containing 137 mM NaCl and 10 mM HEPES, pH 7.4. The cells were disintegrated with 0.1 mL of TritonX 0.5% in 100 mM NaOH for 60 min. The radiotracer accumulation in the cells transfected with empty vector was subtracted. After disintegration, cell protein content was measured using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA). Finally, the radioactivity of the samples in scintillation solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was measured with a beta counter (Tri-Carb 2900TR; Perkin Elmer, Shelton, USA). All the values were standardized against protein content, which was determined using the bicinchoninic acid method. The results on affinity were expressed as inhibitory concentration IC₅₀ calculated with a nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software (version 6).

2.6. Interactions with ABC transporters

Interactions of the tested ANPs with the selected ABC transporters were studied using stably transfected MDCK II cells. MDCK-ABCG2 and MDCK-ABCB1 (2 × 10⁵) cells were seeded on a 24-well plate 24 h before the experiment. The cell culture medium was removed and the cells were washed twice with pre-warmed transport medium containing NaCl 130 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, glucose 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4. The cells were then preincubated in transport medium with a three-point concentration scale of ANPs at 37 °C in 5% CO₂ for 30 min before Hoechst 33342 (8 μM) was added. Specific ABCG2 inhibitor KO143 as well as LY335979 as a specific inhibitor of ABCB1 were used as the comparators for inhibition. Relative fluorescence units (RFU) in bottom mode (excitation = 360 nm, emission = 465 nm) were measured immediately after the addition of Hoechst 33342 in 1 min intervals for 31 min at a constant temperature of 37 °C (Genios Plus, Tecan, Salzburg, Austria).

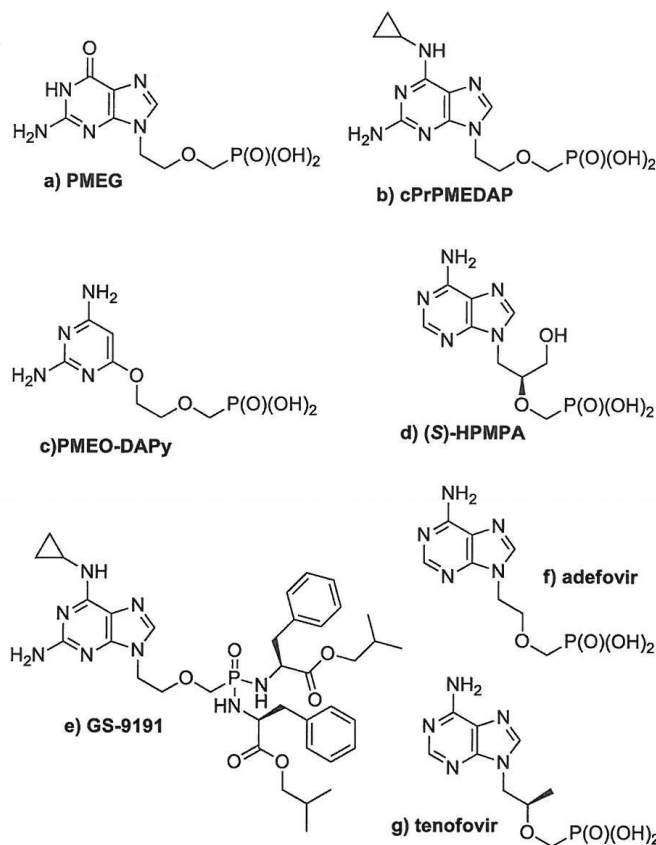


Fig. 1. Chemical structure of ANPs tested in the study: PMEG (a), cPrPMEDAP (b), PMEO-DAPy (c), (S)-HPMPA (d), GS-9191 (e), adefovir (f), tenofovir (g).

2.7. Cell viability assays

The HeLa cells were seeded in density 1.5×10^4 cells per well in a 96-well plate. On the following day the cells were transiently transfected with plasmid expressing hOAT1 or empty vector as described above. Experiments were carried out simultaneously for the hOAT1 and empty vector-transfected cells. 48 h after transfection, the cells were treated with each of the tested ANPs dissolved in water or in DMSO by dilution, so that the final solution contained less than 1% DMSO in the medium. The tested compounds were prepared in incubation concentrations 50, 500 and 1000 μM in triplicates. GS-9191 was prepared in concentrations 10, 30, 100 μM in triplicates. In addition, the transfected and control cells were incubated with the tested ANPs at concentration 1000 μM (GS-9191 at concentration 100 μM) in presence of probenecid (500 μM) or quercetin (50 μM). The controls: 100% cell viability, 0% cell viability (the cells treated by 10% DMSO), no cell control and vehiculum controls were also prepared in triplicates. After a 24 h incubation period in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 °C, the reagent from the kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96; PROMEGA, USA) was added. After a 1 h incubation at 37 °C the absorbance was recorded at 490 nm. For the evaluation, the final viability of the cells transfected with hOAT1 was compared to that of the control cells transfected with empty vector.

2.8. Data analysis

Data obtained in the transport experiments are expressed as means \pm SD. The statistical significance of the difference in the parameters was determined using two way analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA followed by Bonferroni's

test (GraphPad Prism software, version 6). Differences were considered significant at p -value < 0.05.

2.9. Relation of lipophilicity and affinity to transporters

Lipophilicity parameter $\log P$ of the tested compounds was calculated using software Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada (ACD/Labs). Lipophilicity was also measured experimentally by means of chromatographic separation on a RP-HPLC C_{18} column (Šerušová et al., 2012) and expressed as the $\log k$ value derived from the retention time of the individual compounds. Correlations between the lipophilicity parameters and IC_{50} were evaluated using the software GraphPad Prism (version 6).

3. Results

3.1. Interaction with SLC transporters

To prove whether the studied ANPs have an affinity to the tested transporters, the cell lines transiently transfected with hOAT1, hOCT2, hCNT2 or hCNT3 were incubated for 2 min with [^3H] labeled prototypical substrates in combination with a selected unlabeled ANP. The time dependent uptake of [^3H] labeled prototypical substrates in all tested cell models was linear within the first 5 min

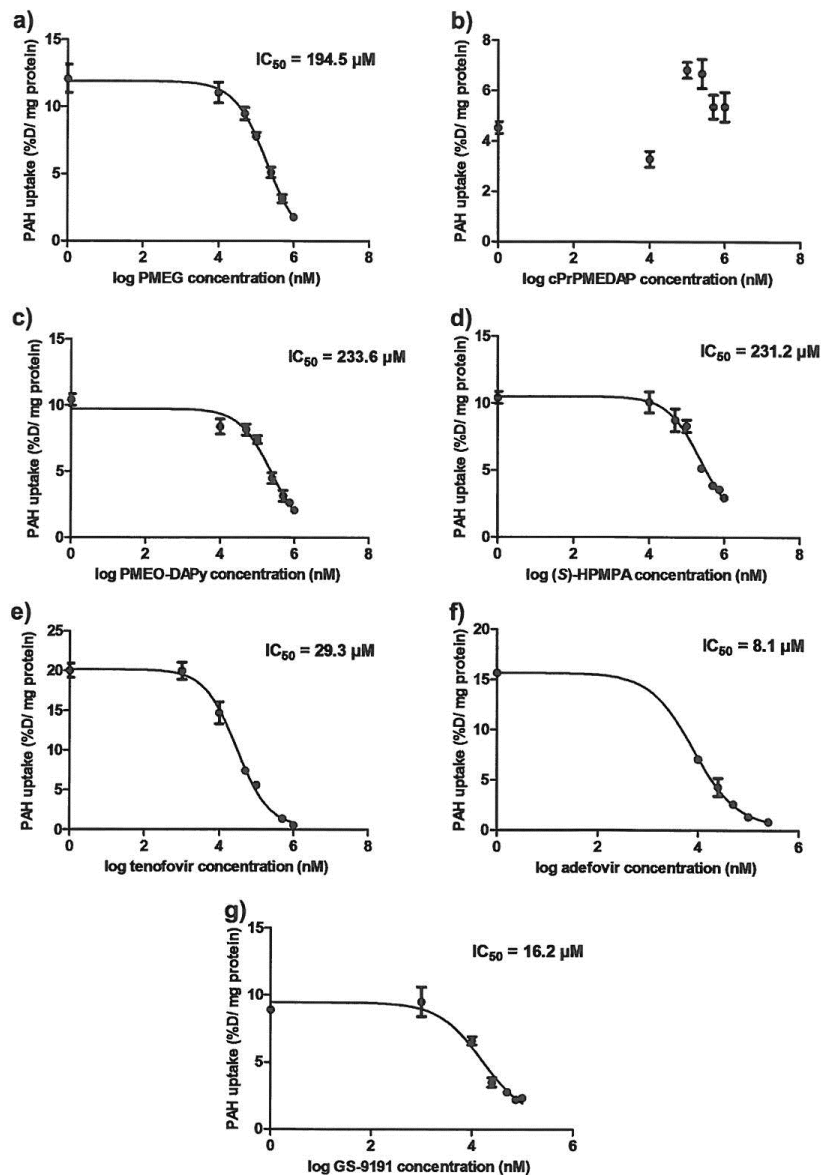


Fig. 2. Comparison of affinity of the tested ANPs for hOAT1 in transiently transfected HeLa cells. HeLa cells transiently transfected with expressing vector for hOAT1 were incubated with $1 \mu M$ [3H] PAH in gradually increasing concentrations of PMEG (a), cPrPMEDAP (b), PMEO-DAPy (c), (S)-HPMPA (d), tenofovir (e), adefovir (f) or GS-9191 (g) for 2 min at 37 °C in triplicates. Each point represents means \pm SD of three independent experiments of the accumulated amounts of $1 \mu M$ [3H] PAH. IC_{50} value represents inhibitory concentration of the studied antiviral agent calculated using nonlinear regression analysis. Value of $1 \mu M$ [3H] PAH accumulation in the cells transfected with empty vector was subtracted.

of incubation (data not shown). In the experiments, the studied ANPs showed a potency to inhibit only the accumulation of [3H]-PAH in transiently transfected cells with hOAT1 (Fig. 2). The tested ANPs could be divided into three groups according to the affinity for

hOAT1. The first group included ANPs with a relatively low affinity to hOAT1: PMEG, PMEO-DAPy and (S)-HPMPA. The second group, including adefovir, tenofovir and GS-9191, exhibited a comparable and relatively strong affinity to hOAT1. The affinity of GS-9191 was

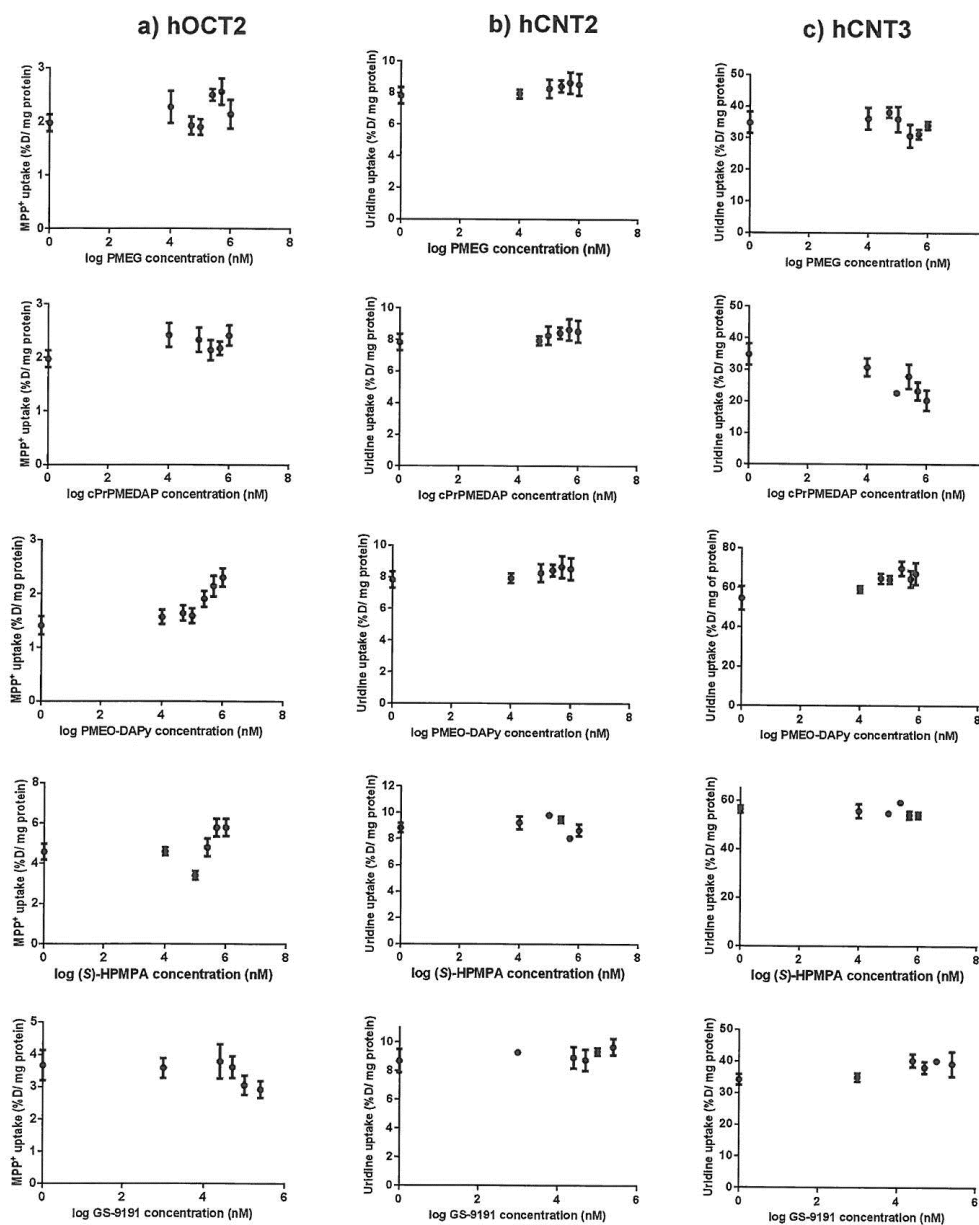


Fig. 3. Effect of the tested ANPs on inhibition of typical substrate accumulation mediated by hOCT2 or CNTs in transfected cells. The MDCK II cells transiently transfected with expressing vector for hOCT2 (a), hCNT2 (b) or hCNT3 (c) were incubated with $1 \mu\text{M}$ [^3H] MPP⁺ or $1 \mu\text{M}$ [^3H] uridine in the presence of gradually increasing concentrations of ANPs for 2 min at 37 °C in triplicates. Each point represents means \pm SD of three independent experiments of the accumulated amounts of radiotracer. Value of radiotracer accumulation in the cells transfected with empty vector was subtracted.

found to be approximately 15-fold higher than that of the ANPs from the first group. The third group contained only cPrPMEDAP, which did not show any significant potency to inhibit the accumulation of [^3H]-PAH in the cells transfected with hOAT1. Moreover, no significant interactions of the tested ANPs with hOCT2, hCNT2 and hCNT3 were observed under the used conditions (Fig. 3).

3.2. Interactions with ABC transporters

To test the possible inhibition of ABCB1 and ABCG2 by the tested ANPs, the accumulation of Hoechst 33342 was investigated in MDCK II–ABCB1 and MDCK II–ABCG2 cells. KO143 and LY335979, standard specific inhibitors of ABCB1 and ABCG2, respectively, were used as comparators. GS-9191 was shown to be the strongest ABCB1 and ABCG2 inhibitor under the used experimental conditions. GS-9191 at concentration 120 μM increased Hoechst 33342 accumulation by 74% in MDCK II–ABCB1 cells and by 78% in MDCK II–ABCG2 cells. Such inhibitory activity was comparable with that of the standard specific inhibitors of ABCB1 and ABCG2, respectively (Figs. 4 and 5). PMEO-DAPy caused a slight increase in Hoechst 33342 accumulation ($p < 0.05$) by 18% in MDCK II–ABCB1 cells; the effect of Hoechst 33342 accumulation in MDCK II–ABCG2 cells was negligible (9%) (Figs. 4 and 5). Other ANPs did not show any significant potency to increase the accumulation of Hoechst 33342 in MDCK II–ABCB1 and MDCK II–ABCG2 cells (Figs. 4 and 5).

3.3. Cell viability assays

The effect on cell viability of the tested antiviral substances was determined in a standard MTS colorimetric assay after a 24 h exposure of the tested ANPs. As shown in Fig. 6, most of the tested substances showed significant differences in cytotoxic effect in the cells transiently transfected with hOAT1 as compared with the cells transfected only with empty vector. Among the tested ANPs, the most cytotoxic compound was found to be GS-9191, which at a concentration 100 μM strongly decreased the viability of the cells to almost 0% both in the cells transfected with hOAT1 and with empty vector. PMEG and (S)-HPMPA exhibited relatively strong cytotoxic effects related to hOAT1. The expression of hOAT1 significantly increased the cytotoxicity of PMEG and (S)-HPMPA in comparison with the empty vector transfected cells. In the case of cPrPMEDAP, a prodrug of PMEG, a relatively low cytotoxic effect was observed. For comparison, the expression of hOAT1 enhanced significantly the cytotoxic effect of adefovir and tenofovir. In contrast, PMEO-DAPy did not show any significant cytotoxic effect in the cells transfected with hOAT1 or in the control cells transfected with empty vector.

The co-incubation of the tested ANPs with probenecid or quercetin resulted in a marked reduction of toxicity of the most of the tested substances in hOAT1 transfected cells (Fig. 7). The lipophilic compound GS-9191 showed the highest cytotoxic effect even after the addition of probenecid. Combination of GS-9191 with quercetin significantly increased the viability of hOAT1 transfected cells. Probenecid or quercetin alone had no effect on cell viability either in the cells transfected with hOAT1 or in the cells transfected with empty vector (data not shown).

3.4. Relation of lipophilicity and affinity to transporters

The analysis was performed only on OAT1, the most relevant transporter. The calculated $\log P$ values indicated that most of the tested compounds exhibit a comparable lipophilic character. Their $\log P$ values ranged between -2.52 ± 0.76 and -1.19 ± 0.95 and were similar to the $\log P$ of adefovir and tenofovir. All tested ANPs were found less lipophilic than GS-9191, with $\log P = 6.67 \pm 1.01$. The results regarding lipophilicity ($\log k$) measured experimentally

by means of chromatographic separation significantly correlated with $\log P$ values calculated by ACD/Labs software (Pearson $r = 0.99$; $p < 0.0001$). In the series of all tested ANPs, the correlation between $\log P$ and IC_{50} values for OAT1 was not significant.

4. Discussion

The development of ANPs compounds took place over the course of many years (Holy, 2006). The excellent antiviral activity of ANPs is attributed to a catabolic stable phosphonate linkage. ANPs are negatively charged under physiological conditions and express a significant potential to accumulate via OATs in the renal proximal tubules (Rizwan and Burckhardt, 2007; Sweet, 2005; VanWert et al., 2010). Various *in vitro* studies demonstrating renal accumulation via organic anion transporters as well as the subsequent nephrotoxic effect of clinically important ANPs have been published (Cihlar et al., 2009; Kohler et al., 2011; Uwai et al., 2007). Nevertheless, in the series of ANPs there are several compounds from the PME and HPMP group with a great potency for the treatment of various DNA virus and retrovirus infections or cancers (Balzarini et al., 2007; Bijsterbosch et al., 1998; Reiser et al., 2008). One example of these compounds is cPrPMEDAP, which is known as a potentially important antiviral drug for the treatment of polyomavirus and human papillomavirus infections, with further investigations recommended (De Clercq, 2008). (S)-HPMPA has been described to express broad-spectrum anti-DNA virus activity and the potential for use in the treatment of herpes simplex virus infections resistant to treatment with the conventional antiherpes drugs (De Clercq, 2007b). However, the potential of the mentioned agents to interact with renal drug transporters has not as yet been sufficiently described.

For drug-transporter interaction assays, we selected nucleoside phosphonates from the PME and HPMP groups: PMEG, PMEO-DAPy and (S)-HPMPA. For comparison, we tested the N⁶-cyclopropyl derivative of PMEDAP (cPrPMEDAP), a prodrug of PMEG (Holy et al., 1999, 2001) found to have a lower cytotoxic potential (Wolfgang et al., 2009). In our experiments we also included GS-9191, a lipophilic double prodrug of PMEG. GS-9191 was designed to increase the permeability and accumulation of PMEG metabolites into target cells. The ultimate clinical potential of GS-9191 will remain the subject of further studies (De Clercq, 2011; Wolfgang et al., 2009).

Among the tested renal influx transporters, the studied ANPs demonstrated interaction only with hOAT1. Therefore, we compared their affinity to hOAT1 with that of the clinically approved ANPs adefovir and tenofovir, which are known substrates for hOAT1 (Uwai et al., 2007). The results we have obtained in competitive inhibitory studies suggest that adefovir and tenofovir are not only substrates but also efficient inhibitors of hOAT1. Both drugs are also substrates of hOAT3, but quantitatively hOAT1 is the major renal transporter for these drugs (Cihlar et al., 1999; Ho et al., 2000; Uwai et al., 2007). After comparing IC_{50} values of the tested ANPs, we may conclude that most of the tested compounds exhibited a much lower affinity for hOAT1 than adefovir and tenofovir. This probably results from structural differences of the tested ANPs as compared to adefovir and tenofovir. Based on previous extensive studies (Ullrich, 1997), size, hydrophobicity, charge strength, and the ability to form hydrogen bonds have been described as important parameters for substrate interactions with OATs (Burckhardt and Burckhardt, 2003). The evaluated phosphonates generally meet the mentioned criteria since their molecular size is below 500 (except GS-9191 with molecular weight 734.8), they contain in the molecule a hydrophobic region and bear a negatively charged group. In the presented study, only GS-9191 exhibited an IC_{50} value comparable to adefovir and tenofovir. In this case the lipophilic

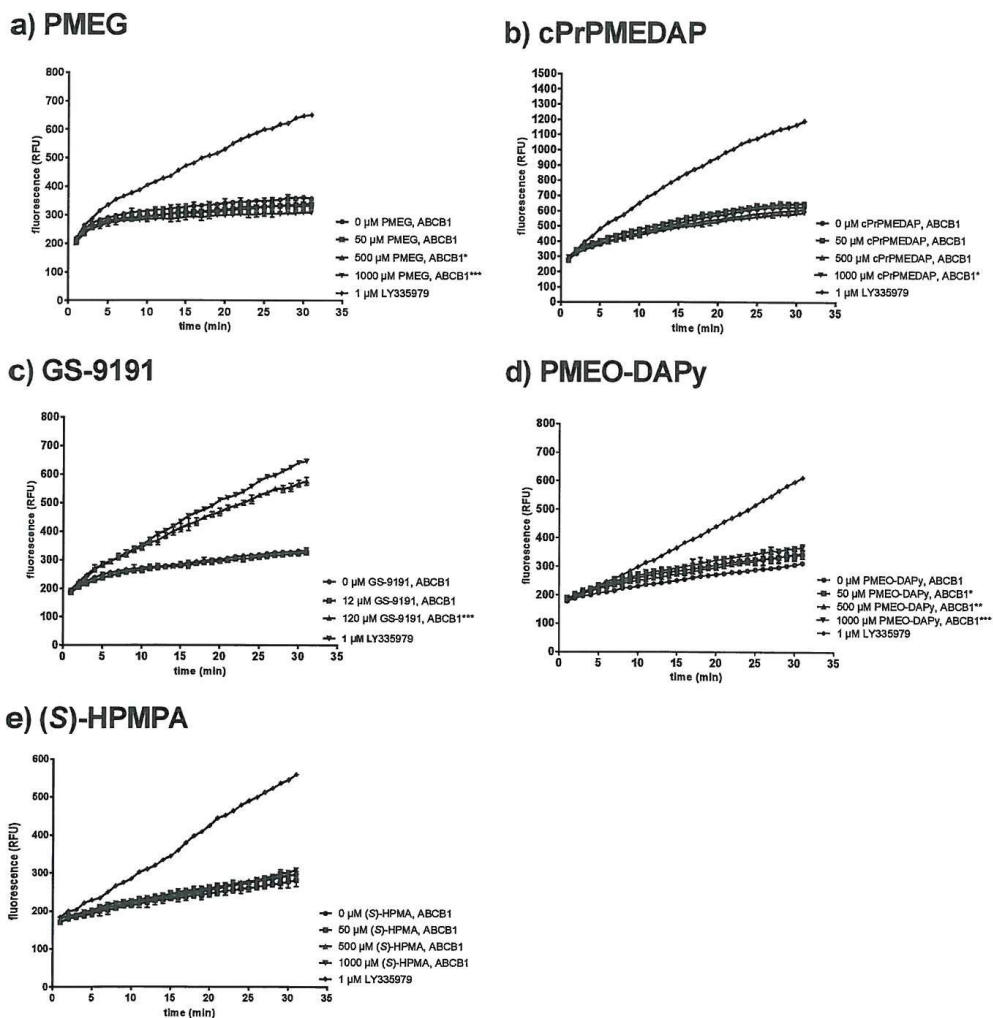


Fig. 4. Inhibition of ABCB1 by the tested ANPs. Accumulation of 8 μM Hoechst 33342 in MDCK II-ABCB1 cells incubated in the absence (control) or presence of various concentration of PMEG (a), cPrPMEDAP (b), GS-9191 (c), PMEO-DAPy (d) or (S)-HPMPA (e). Specific inhibitor of ABCB1, LY335979, was used as a comparator for inhibition. Data are presented as means \pm SD obtained in three independent experiments. Values from the end point were subjected to statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with control.

character of GS-9191 apparently plays a major role. According to the calculated $\log P$ and experimentally determined $\log k$ the highest lipophilicity of GS-9191 was confirmed among the tested compounds. For the other tested ANPs, we found a relatively low lipophilicity, with $\log P$ similar to that of adefovir and tenofovir. Contrary to the other group of substances such as uric acid-related compounds (Sugawara et al., 2005) we did not detect any correlation between lipophilicity and affinity to the OAT1 in the series of the tested compounds.

Although a N⁶-substituted prodrug of PMEG, cPrPMEDAP is negatively charged at physiologic pH, like PMEG (Wolfgang et al., 2009),

it did not show any significant interaction with hOAT1. Thus, it can be suggested that the interaction may be affected by the cyclopropyl substituent at the N⁶ position of the 2,6-diaminopurine ring, which could prevent sterically the effective interaction of cPrPMEDAP with the binding site of hOAT1. The finding of no identifiable interaction of the tested ANPs with hOAT2 is in agreement with the previous experimental *in vitro* data demonstrating no significance of this transporter in the uptake of adefovir and tenofovir into cells (Uwai et al., 2007).

Apical efflux ABC transporters are important in the control of the accumulation of many antiviral agents (Kis et al., 2010). Among

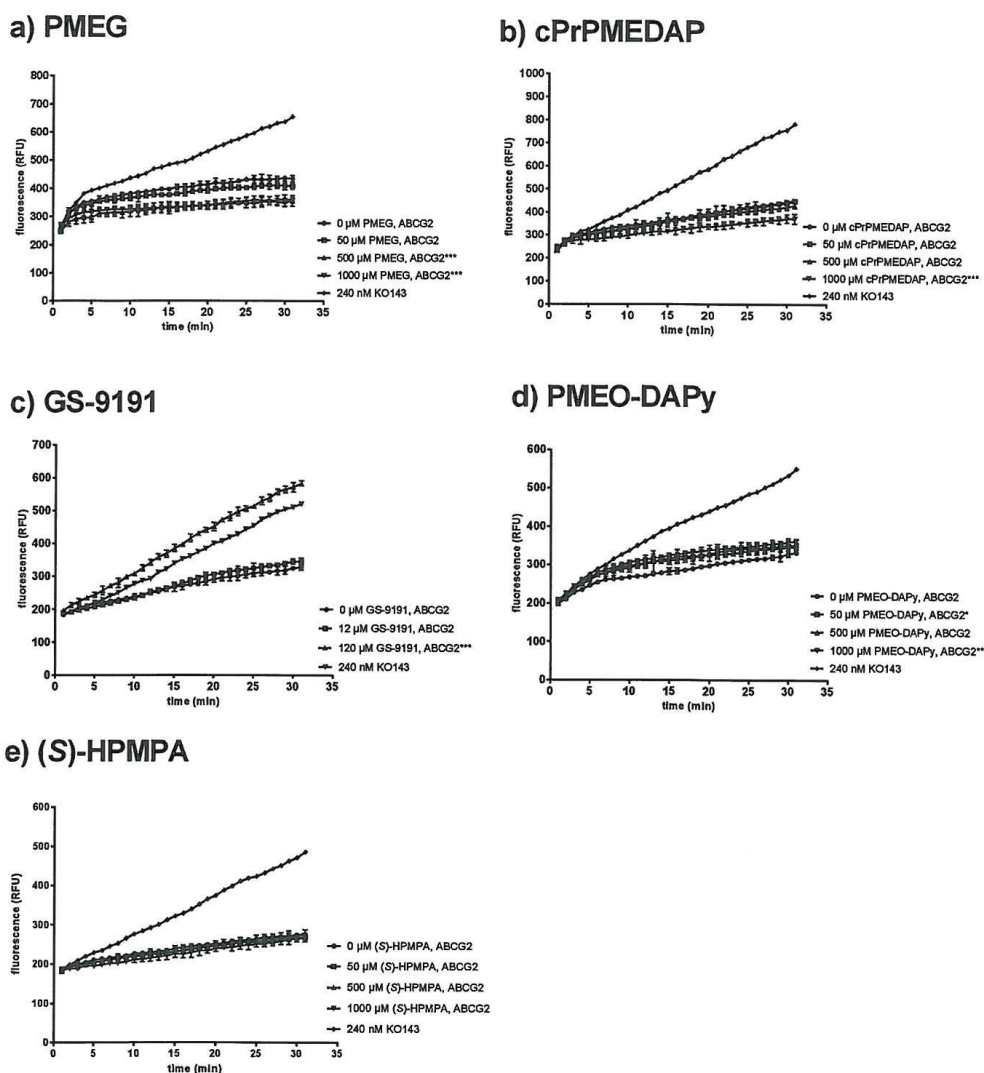


Fig. 5. Inhibition of ABCG2 by the tested ANPs. Accumulation of 8 μM Hoechst 33342 in MDCK II-ABCG2 cells incubated in the absence (control) or presence of various concentration of PMEG (a), cPrPMEDAP (b), GS-9191 (c), PMEO-DAPy (d) or (S)-HPMPA (e). Specific inhibitor of ABCG2, KO143 was used as a comparator for inhibition. Data are presented as means \pm SD obtained in three independent experiments. Values from the end point were subjected to statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with control.

the tested efflux transporters present in proximal tubules, only GS-9191 displayed relatively strong ABCG2 and ABCB1 inhibition. The inhibitory activity was comparable with that of the specific ABCG2 inhibitor KO143 and the specific ABCB1 inhibitor LY335979. The other compounds demonstrated only very low or no interaction with the efflux transporters in the used *in vitro* cellular models. The relative strong interaction of GS-9191 with the efflux transporters could be a consequence of the relative higher lipophilicity

of this compound. The published studies aimed at determining a relation between the molecular characteristics of drugs and interactions with the efflux transporters have documented that the rate-limiting step for the interaction of a substrate with ABCB1 is the partitioning of the compound into the lipid membrane (Szakács et al., 2008). ABCB1 substrates typically contain hydrogen bond acceptors and hydrophobic groups, however, there is no clear consensus regarding the pharmacophore of ABCB1 substrates (Szakács

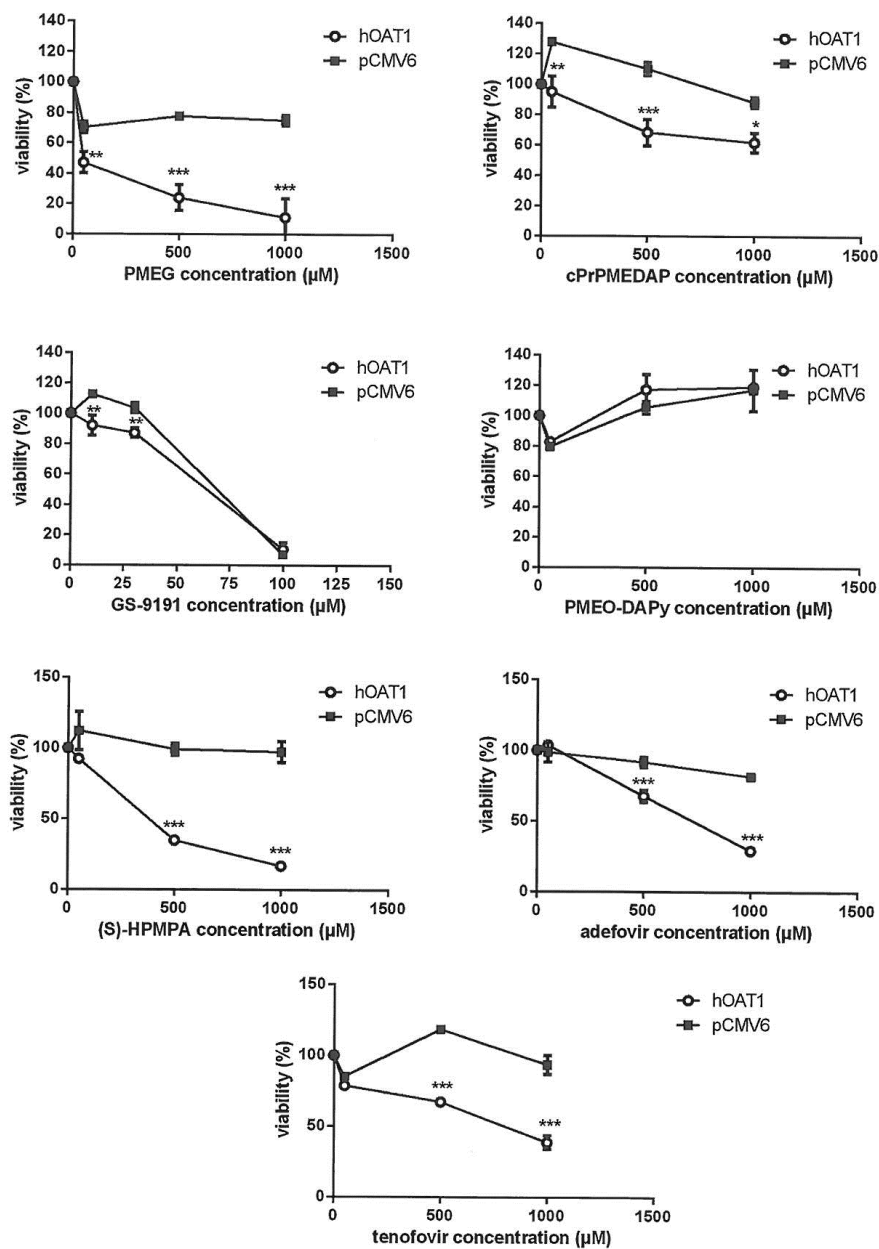


Fig. 6. Effect of hOAT1 expression on cytotoxicity of the tested ANPs. HeLa cells transiently transfected with hOAT1 (open circles) or empty vector pCMV6 (closed squares) were incubated for 24 h with various concentrations of the tested ANPs. The experiments were carried out simultaneously for hOAT1 and empty vector transfected cells. Data are presented as means \pm SD obtained in three independent experiments. Values from the end point were subjected to statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with control.

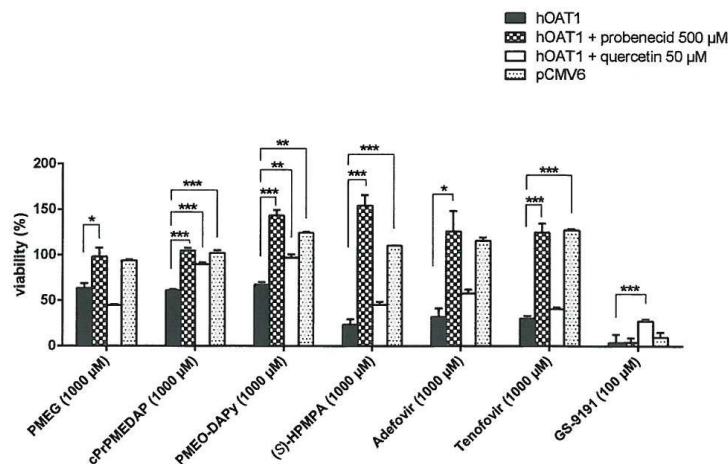


Fig. 7. Effect of probenecid and quercetin on cytotoxicity of the tested ANPs in hOAT1 transfected cells. HeLa cells transiently transfected with hOAT1 (black bar) or empty vector pCMV6 (point patterned bar) were incubated for 24 h with the tested ANPs alone or with ANPs in combination with 500 µM probenecid (patterned bar) or 50 µM quercetin (white bar). Values from the end point were subjected to statistical analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with control.

et al., 2008; Sharom, 2008). Generally, they tend to have planar aromatic domains and tertiary amino groups (Szakács et al., 2008). Unfortunately, many exceptions to this rule exist. Since the other agents under study with a very similar structure did not interact with the efflux transporters significantly, the higher lipophilicity seems to be the decisive factor for the significant interaction of GS-9191.

Several members of ANPs exhibit cytotoxicity toward proliferating cells (Holy et al., 2001; Kramata and Downey, 1999). ANPs form in the cells active phosphorylated metabolites, which act as terminators of the DNA polymerase reaction resulting in the inhibition of DNA synthesis and/or DNA repair (Balzarini et al., 1991; Kramata and Downey, 1999; Wolfgang et al., 2009). To investigate whether cytotoxic effect could be related to the uptake of the tested ANPs via hOAT1, we used HeLa cells transiently transfected with this transporter. The cells transfected with hOAT1 exhibited an increased sensitivity to cytotoxic effect after 24 h exposure to most of the tested ANPs. PMEG and (S)-HPMPA showed a relatively strong cytotoxic effect in the cells transfected with hOAT1 compared with the control. The observed cytotoxic effect of PMEG and (S)-HPMPA was much stronger than that of adefovir and tenofovir. This result is consistent with the finding that PMEG diphosphate, the intracellular metabolite of PMEG, is a more potent inhibitor of cellular DNA polymerases than adefovir diphosphate (Pisarev et al., 1997). In addition, the higher cytotoxicity in hOAT1 transfected cells presents an indirect indication that PMEG and (S)-HPMPA are not only inhibitors of hOAT1 but also hOAT1 substrates.

The most cytotoxic compound was found to be GS-9191. However, the toxic effect was not different in the control and in the hOAT1 transfected cells. This finding means that there is no significant relationship between hOAT1 mediated active transport and cytotoxicity of this compound. Probably, the high hydrophobicity of GS-9191 may be responsible for the higher cytotoxicity of the drug. In contrast to the other tested compounds, GS-9191 can efficiently enter into the cell by passive diffusion (Wolfgang et al., 2009), reaching hazardous concentrations resulting in the toxic effect. The OAT1 mediated transport into cells seems to play a minor role in this case.

In drug-transporter interaction studies, cPrPMEDAP did not present any inhibition of standard [3 H]-PAH uptake in the cells transfected with hOAT1. Interestingly, in the cell viability assays, we observed a small increase of the cytotoxic effect of cPrPMEDAP in the cells transfected with hOAT1. These results could indicate that cPrPMEDAP is not an inhibitor of hOAT1, but could be a low affinity substrate of the transporter. The cytotoxicity of cPrPMEDAP was found to be approximately 9-fold lower than the cytotoxicity of PMEG. Similarly, it has been reported that cPrPMEDAP shows lower toxicity *in vivo* than PMEG (Wolfgang et al., 2009).

In the tested conditions, the only non-toxic compound was found to be PMEO-DAPy. This finding seems to be in accordance with the literature, since PMEO-DAPy was less toxic than adefovir in experiments *in vivo* using murine sarcoma virus infected mice (Balzarini et al., 2007). Despite the observed interaction with hOAT1 the agent was devoid of any cytotoxic effect both in the control and hOAT1 transfected cells. Such an observation could suggest that the compound is only an inhibitor, not a substrate of hOAT1. In addition, as low PMEO-DAPy interaction with ABCB1 was proved in our experiments in the MDCK-ABCB1 transduced cell model, the relative insignificant cytotoxicity of the agent may be explained at least partly by PMEO-DAPy extrusion from the cells via one or more efflux transporters.

The above mentioned results of the studies on cytotoxicity of the tested ANPs suggested an involvement of hOAT1 mediated accumulation in the cellular damage. To confirm this concept pharmacologically, a cell viability assay combining a known inhibitor of OATs probenecid or inhibitor/substrate of OATs quercetin (Wong et al., 2011) with the tested ANPs was performed. The study demonstrated that probenecid effectively reduced hOAT1 mediated toxicity of the tested ANPs except lipophilic drug GS-9191. Similarly, the flavonoid agent quercetin exhibited also a positive effect on cell viability in hOAT1 expressing cells. The protective effect of both OAT inhibitors can be explained by the inhibition of ANP uptake via hOAT1. The results confirmed the suggested potential of flavonoids to limit the severity of drug-induced renal injury via the inhibition of OAT1 (Wong et al., 2011). Interestingly, the co-administration of quercetin decreased the toxicity of GS-9191 in hOAT1 transfected cells whereas the co-administration of

probencid had no effect. This fact could mean that the interaction of quercetin with GS-9191 is likely not dependent on hOAT1 inhibition. A possible explanation may be participation of the flavonoid in free radical scavenging or anti-apoptotic mechanisms (Sung et al., 2008). In conclusion, the obtained findings markedly demonstrated the suggested role of hOAT1 in the cytotoxic effect of the studied compounds.

5. Conclusions

This study demonstrated that, similar to the clinically used ANPs adefovir and tenofovir, hOAT1 may have a considerable impact on the transmembrane transport and disposition of the tested ANPs as well as may play an important role in the mechanism of their cytotoxicity. The relevance of this transporter, however, varies in the individual agents. Cytotoxicity of the relative hydrophilic agents may depend on hOAT1 mediated active transport into cells. However, despite their significant interaction with hOAT1, compounds with high lipophilicity may exert a strong cytotoxic action independent of this interaction. Other tested renal influx transporters hOCT2, hCNT2 and hCNT3 seem to be insignificant for the uptake of the tested ANPs in the renal tubular cells. Among the tested ANPs we established that only GS-9191 exhibits a potent interaction potential with the efflux transporters ABCB1 and ABCG2. In the other tested ANPs, the role of the studied efflux transporters in transmembrane cellular transport seems to be insignificant. The presented transport characteristics of the studied compounds regarding potential nephrotoxicity should be considered during further development in the group of acyclic nucleoside phosphonates.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

This work was supported by Charles University in Prague (Project SVV 267 003), by Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i., Prague (RVO:61388963), grant GAUK No. 360811/FaF/C-LEK and grant IGA MZ No. NT12398-4/2011.

We gratefully acknowledge Prof. Pastor-Anglada for his generous hosting of members of our group with his research team at the University of Barcelona in Spain and for methodological help with some of the experiments.

References

- Balzarini, J., Hao, Z., Herdewijn, P., Johns, D.G., De Clercq, E., 1991. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retroviral action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1499–1503.
- Balzarini, J., Schols, D., Van Laethem, K., De Clercq, E., Hockova, D., Masojdjkova, M., Holy, A., 2007. Pronounced in vitro and in vivo antiretroviral activity of 5-substituted 2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy] pyrimidines. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 80–86.
- Bijsterbosch, M.K., Smeijsters, L.J., van Berkel, T.J., 1998. Disposition of the acyclic nucleoside phosphonate (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1146–1150.
- Burckhardt, B.C., Burckhardt, G., 2003. Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 146, 95–158.
- Cihlar, T., Lin, D.C., Pritchard, J.B., Fuller, M.D., Mendel, D.B., Sweet, D.H., 1999. The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol. Pharmacol.* 56, 570–580.
- Cihlar, T., Laflamme, G., Fisher, R., Carey, A.C., Vela, J.E., Mackman, R., Ray, A.S., 2009. Novel nucleotide human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor GS-9148 with a low nephrotoxic potential: characterization of renal transport and accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 150–156.
- Cundy, K.C., Bidgood, A.M., Lynch, G., Shaw, J.P., Griffin, L., Lee, W.A., 1996. Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism, and tissue distribution of cidofovir (HPMPC) and cyclic HPMPC in rats. *Drug Metab. Dispos.* 24, 745–752.
- De Clercq, E., 2007a. Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochem. Pharmacol.* 73, 911–922.
- De Clercq, E., 2007b. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. *Antiviral Res.* 75, 1–13.
- De Clercq, E., 2008. Emerging antiviral drugs. *Exp. Opin. Emerg. Drugs* 13, 393–416.
- De Clercq, E., 2011. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond. *Biochem. Pharmacol.* 82, 99–109.
- Eilers, M., Roy, U., Mondal, D., 2008. MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233, 1149–1160.
- Errasti-Murugarren, E., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M., 2010. The human concentrative nucleoside transporter-3 CG02R variant shows impaired sorting to lipid rafts and altered specificity for nucleoside-derived drugs. *Mol. Pharmacol.* 78, 157–165.
- Ho, E.S., Lin, D.C., Mendel, D.B., Cihlar, T., 2000. Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 383–393.
- Holy, A., Günter, J., Dvorakova, H., Masojdjkova, M., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J., De Clercq, E., 1999. Structure-antiviral activity relationship in the series of pyrimidine and purine N-[2-(2-phosphonomethoxy)ethyl] nucleotide analogues: 1. Derivatives substituted at the carbon atoms of the base. *J. Med. Chem.* 42, 2064–2086.
- Holy, A., 2006. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies. *Antiviral Res.* 71, 248–253.
- Holy, A., Votruba, I., Tloustova, E., Masojdjkova, M., 2001. Synthesis and cytostatic activity of N-[2-(phosphonomethoxy)alkyl] derivatives of N₆-substituted adenines, 2,6-diaminopurines and related compounds. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 66, 1545–1592.
- Izzedine, H., Launay-Vacher, V., Deray, G., 2005. Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 45, 804–817.
- Kis, O., Robillard, K., Chan, G.N., Bendayan, R., 2010. The complexities of antiretroviral drug–drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 22–35.
- Klaassen, C.D., Aleksunes, L.M., 2010. Xenobiotics, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62, 1–96.
- Kohler, J.J., Hosseini, S.H., Green, E., Abuin, A., Ludaway, T., Russ, R., Santoianni, R., Lewis, W., 2011. Tenofovir renal proximal tubular toxicity is regulated by OAT1 and MRP4 transporters. *Lab. Invest.* 91, 852–858.
- Kramata, P., Downey, K.M., 1999. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl) derivatives of purine nucleotide analogs: a comparison of their metabolism and interaction with cellular DNA synthesis. *Mol. Pharmacol.* 56, 1262–1270.
- Minuesa, G., Huber-Ruano, I., Pastor-Anglada, M., Koepsell, H., Clotet, B., Martinez-Picado, J., 2011. Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol. Ther.* 132, 268–279.
- Pisarev, V.M., Lee, S.H., Connelly, M.C., Fridland, A., 1997. Intracellular metabolism and action of acyclic nucleoside phosphonates on DNA replication. *Mol. Pharmacol.* 52, 63–68.
- Reiser, H., Wang, J., Chong, L., Watkins, W.J., Ray, A.S., Shibata, R., Birkus, G., Cihlar, T., Wu, S., Li, B., Liu, X., Henne, I.N., Wolfgang, G.H., Desai, M., Rhodes, G.R., Fridland, A., Lee, W.A., Plunkett, W., Vail, D., Tham, D.H., Jeraj, R., Tumas, D.B., 2008. GS-9219—a novel acyclic nucleotide analogue with potent antineoplastic activity in dogs with spontaneous non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 14, 2824–2832.
- Rizwan, A.N., Burckhardt, G., 2007. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm. Res.* 24, 450–470.
- Sarkadi, Z.S., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemotherapeutic defense system. *Physiol. Rev.* 86, 1179–1236.
- Servusova, B., Eibinova, D., Dolezal, M., Kubicek, V., Paterova, P., Pesko, M., Kralová, K., 2012. Substituted N-benzylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules* 17, 13183–13198.
- Sharom, F.J., 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9, 105–127.
- Sugawara, M., Mochizuki, T., Takekuma, Y., Miyazaki, K., 2005. Structure-affinity relationship in the interactions of human organic anion transporter 1 with caffeine, theophylline, theobromine and their metabolites. *Biochim. Biophys. Acta* 1714, 85–92.
- Sung, M.J., Kim, D.H., Jung, Y.J., Kang, K.P., Lee, A.S., Lee, S., Kim, W., Davatseren, M., Hwang, J.-T., Kim, H.-J., Kim, M.S., Kwon, D.Y., Park, S.K., 2008. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney Int.* 74, 1538–1547.
- Sweet, D.H., 2005. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 198–215.
- Szakács, G., Váradi, A., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13, 379–393.
- Ullrich, K.J., 1997. Renal transporters for organic anions and organic cations: Structural requirements for substrates. *J. Membr. Biol.* 107, 95–107.
- Uwai, Y., Ida, H., Tsuji, Y., Katsura, T., Inui, K., 2007. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm. Res.* 24, 811–815.

- VanWert, A.L., Gionfriddo, M.R., Sweet, D.H., 2010. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm. Drug Dispos.* 31, 1–71.
- Van de Ven, R., Oerlemans, R., van der Heijden, J.W., Scheffer, G.L., de Grijpl, T.D., Jansen, G., Scheper, R.J., 2009. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1075–1087.
- Wolfgang, G.H., Shibata, R., Wang, J., Ray, A.S., Wu, S., Doerrfler, E., Reiser, H., Lee, W.A., Birkus, G., Christensen, N.D., Andrei, G., Snoeck, R., 2009. GS-9191 is a novel topical prodrug of the nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine with antiproliferative activity and possible utility in the treatment of human papillomavirus lesions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2777–2784.
- Wong, C.C., Botting, N.P., Orfila, C., Al-Maharik, N., Williamson, G., 2011. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochem. Pharmacol.* 81, 942–949.