

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**TRANSPORTNÍ STUDIE *IN VITRO* NA 2D A 3D BUNĚČNÉ
ÚROVNI**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Ramos Mandíková, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Johana Urbanová

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

.....

Johana Urbanová

Chtěla bych velice poděkovat své školitelce PharmDr. Janě Ramos Mandíkové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu, trpělivost, cenné rady a zkušenosti, které se mi snažila předat po celou dobu vypracovávání této diplomové práce.

Velmi bych chtěla poděkovat také své rodině za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Johana Urbanová

Školitelka: PharmDr. Jana Ramos Mandíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Transportní studie *in vitro* na 2D a 3D buněčné úrovni.

Trojrozměrné (3D) buněčné modely lépe napodobují buněčné podmínky *in vivo* než tradičně používané dvourozměrné (2D) buněčné modely. Transportéry pro organické anionty (OATs) a kationty (OCTs) hrají důležitou úlohu v ledvinné eliminaci léčiv a mají vliv na jejich farmakokinetické vlastnosti. Cílem práce bylo vytvořit 2D a 3D buněčný model z embryonálních ledvinných buněk HEK293, oba modely přechodně transfekovat transportérem hOAT1, transfekci optimalizovat a provést transportní inhibiční studie s vybranými NSAIDs (diklofenakem, ibuprofenem, indometacinem a naproxenem). 2D buněčný model jsme vytvořili ve 24jamkové destičce ve formě monovrstvy, jako 3D buněčný model jsme používali sféroidy, které jsme zhotovili na Petriho misce metodou visící kapky. Při transportních studiích jsme buňky inkubovali s radioaktivním substrátem OATs *p*-aminohippurovou kyselinou ($[^3\text{H}]\text{PAH}$) s nebo bez příslušného inhibitoru. Inhibiční vliv NSAIDs jsme porovnávali pomocí parametru IC_{50} . 2D i 3D model z buněk HEK293 se nám povedlo vytvořit, ale následná transfekce byla úspěšná pouze v monovrstvě buněk. Funkčnost 3D modelu se pomocí transportní studie nepodařilo prokázat. Sféroidy jsme se ještě pokusili vytvořit z psích ledvinných buněk MDCK II stabilně transfekovaných hOCT1, ale sféroidy se nezformovaly. Inhibiční vliv NSAIDs na hOAT1 jsme proto zkoumali jen ve 2D modelu HEK293 buněk. Nejvyšší inhibiční potenciál k transportéru hOAT1 vykazoval indometacin ($\text{IC}_{50} = 1,78 \mu\text{M}$), nejnižší ibuprofen ($\text{IC}_{50} = 38,02 \mu\text{M}$). Závěrem lze říci, že jsme úspěšně zavedli 2D model, na kterém jsme stanovili IC_{50} všech testovaných látek a vytvořili netransfekovaný 3D buněčný model metodou visící kapky. I přes obtížnost provedení některých experimentů na 3D úrovni je důležité ve vývoji 3D modelů nadále pokračovat.

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Johana Urbanová

Supervisor: PharmDr. Jana Mandíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Transport studies *in vitro* on 2D and 3D cellular level

Three-dimensional (3D) cell models simulate *in vivo* cellular conditions better in comparison with traditional two-dimensional (2D) cell culture systems. Organic anion transporters (OATs) and organic cation transporters (OCTs) play important role in renal elimination of drugs and affect their pharmacokinetic properties. The aim of this study was to create 2D and 3D cell model from embryonic kidney cells HEK293, to transfect transiently both models by lipofection with hOAT1 and empty vector for control, to optimize transfection and to perform transport inhibition studies with selected NSAIDs (diclofenac, ibuprofen, indomethacin and naproxen). 2D cell model was created in a 24-well plate in the form of a monolayer, spheroids were used as a 3D cell model. Spheroids were made by hanging drop method on the Petri dish. The cells were incubated with the radioactive substrate of OATs *p*-aminohippuric acid ($[^3\text{H}]\text{PAH}$) with or without the appropriate inhibitor in the transport studies. The inhibitory effect of NSAIDs was compared using the parameter IC_{50} . Both 2D and 3D models from HEK293 cells were created, but the subsequent transfection was successful only in monolayer of cells. The functionality of 3D model has not been proven by the transport study. Therefore we have attempted to create spheroids from dog renal cells MDCK II stably transfected with hOCT1, but spheroids did not form. Therefore the inhibitory effect of NSAIDs on hOAT1 has only been investigated in the 2D HEK293 cell model. The highest inhibition potential for the hOAT1 transporter had ibuprofen ($\text{IC}_{50} = 38.02 \mu\text{M}$), lowest indometacin ($\text{IC}_{50} = 1.78 \mu\text{M}$). In conclusion, we have successfully created 3D cell model by hanging drop method. Because experiments on 3D cell models simulate conditions in human organism better than on 2D models, it is important to continue developing 3D cells models.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	8
2	Úvod.....	10
3	Teoretická část.....	12
3.1	Buněčné modely ve 2D a 3D.....	12
3.2	Transfekce.....	15
3.2.1	Transfekční metody.....	15
3.2.2	Vektory.....	17
3.3	Transportéry pro organické anionty a kationty.....	18
3.3.1	OAT transportéry.....	19
3.3.2	OCT transportéry.....	21
3.4	Použitá NSAIDs.....	22
3.5	Principy použitých metod.....	24
3.5.1	Transfekce.....	24
3.5.2	Stanovení proteinu.....	24
3.5.3	CellTiter 96 [®]	25
4	Cíle práce.....	27
5	Experimentální část.....	28
5.1	Materiál.....	28
5.1.1	Přístroje a vybavení.....	28
5.1.2	Chemikálie.....	29
5.1.3	Studované látky a transportéry.....	29
5.1.4	Použité kity.....	30
5.1.5	Použité buněčné modely.....	30
5.2	Metody.....	30
5.2.1	Buněčná kultivace.....	30
5.2.2	Příprava sféroidů a stanovení optimální buněčné koncentrace sféroidu... 31	
5.2.3	Transfekce.....	33
5.2.4	Transportní studie.....	34
5.2.5	Statistické hodnocení.....	39
6	Výsledky.....	40

6.1	Focení sféroidů.....	40
6.2	Stanovení optimálního počtu buněk ve sféroidu.....	40
6.3	Optimalizace a ověření efektivity transfekce.....	41
6.4	Optimalizace doby inkubace s [³ H]PAH ve 2D modelu.....	42
6.5	Optimalizace doby inkubace s [³ H]PAH ve 3D modelu.....	43
6.6	Inhibice chladem.....	45
6.7	Interakce NSAIDS s transportérem hOAT1.....	46
6.8	Transportní studie s buňkami MDCK II ve 2D a 3D modelu.....	48
7	Diskuze.....	50
8	Závěr.....	55
9	Literatura.....	56

1 Seznam zkratek

BCA	kyselina bicinchonová (Bicinchonic Acid)
BSA	fetální hovězí sérum (Bovine Serum Albumin)
COX	cyklooxygenáza
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid (Dimethyl Sulfoxide)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ELP-RGD	arginin-glycin-aspartát obsahující elastin-like proteiny
EMEM	Eaglovo minimální esenciální médium (Eagle's Minimal Essential Medium)
HEK293	buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk (Human Embryonic Kidney 293 Cells)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IC₅₀	inhibiční koncentrace, při které dojde k inhibici z 50 %
MDCK II	Madin-Darbyho psí ledvinné buňky (Madin Darby Canine Kidney Cells II)
MEM	minimální esenciální médium (Minimal Essential Medium)
MPP⁺	1-methyl-4-fenylpyridinium
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-[3-(karboxymethoxy)fenyl]-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
NAD⁺	nikotinamidadenindinukleotid - oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadenindinukleotid – redukovaná forma
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma

NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukovaná forma
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
mRNA	messenger RNA
OATs	transportéry pro organické anionty (Organic Anion Transporters)
OCTs	transportéry pro organické kationty (Organic Cation Transporters)
OCTNs	transportéry pro organické kationty, nový (Organic Cation Transporters, Novel)
PAH	<i>p</i> -aminohippurová kyselina (<i>p</i> -Aminohippuric Acid)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PES	fenazin ethosulfát
SLC	nosiče rozpustných látek (Solute Carrier)

2 Úvod

Většina laboratorních experimentů s buňkami se stále provádí ve dvourozměrné (2D) formě v monovrstvě. 2D buněčný model se využívá již od poloviny 20. století. Vytvoření 2D buněčné kultury bývá ekonomicky méně náročné, lze ji lépe analyzovat než buněčnou kulturu ve 3D. Nicméně buňky *in vivo* nerostou ve 2D, ale vytvářejí 3D struktury. Buňky ve 2D a 3D se liší morfologií, proliferací, fází buněčného cyklu, expresí proteinů, v přístupu k živinám atd. Proto ve 2D nelze vždy správně předpovědět děje probíhající v živých tkáních. Farmaceutické společnosti investují mnoho finančních prostředků do vývoje nových léčiv, která následně nemusí projít klinickým hodnocením. Využívání 3D buněčných kultur v preklinické fázi výzkumu by proto mohlo být značně ekonomičtější (*Edmondson et al. 2014*).

Transportní studie, kterými se práce zabývá, mohou být charakterizovány transportem radioaktivně značeného substrátu do transfekovaných buněk prostřednictvím určitého lidského transportéru. Transportéry jsou proteiny, které umožňují přenos látek s nízkou až střední permeabilitou přes membrány (*Solvobiotech Assay 2017*). Tím ovlivňují farmakokinetiku (absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci) mnoha léčiv. V této práci jsme zkoumali transportéry pro organické anionty a kationty (nejvíce OAT1 a doplňkově také OCT1) a to na 2D a 3D buněčném modelu. Tyto transportéry se podílejí na exkreci a reabsorpci mnoha látek včetně léčiv. Léčiva, mající afinitu k těmto transportérům, se mohou hromadit v ledvinách a poškozovat je. Pokud podáme současně dvě léčiva, která interagují se stejným transportérem, může dojít k lékovým interakcím, které mění farmakokinetiku léčiva a mohou vyústit v nežádoucí účinky.

Diplomová práce experimentálního charakteru zjišťuje inhibiční vliv vybraných nesteroidních antiflogistik (NSAIDs) na transportér OAT1. Důležitou součástí diplomové práce je metodická část, která se zabývá zavedením nového buněčného modelu ve 2D i 3D formě. V současné době bylo publikováno několik studií, které zkoumaly interakce mezi NSAIDs a OATs či OCTs *in vitro* i *in vivo* (*Khamdang et al. 2002, Masuda et al. 1997*). Transportní studie na 3D buněčném modelu se v odborných zdrojích vyskytují velmi zřídka (*Achilli et al. 2014*) nebo jsou obtížně dostupné. Studium nových “vylepšených” 3D modelů a získání dalších poznatků z této oblasti by

mohlo přispět k lepší identifikaci a hodnocení potenciálních léčiv ve farmaceutickém vývoji. Proto jsme se rozhodli pokusit vytvořit takový buněčný model, na kterém by bylo možné studovat interakce testovaných látek s OATs, popř. OCTs, ve 3D formě. Zabývali jsme se dvěma skupinami NSAIDs. První skupinou byly fenaky a druhou profeny. Fenaky jsou deriváty heteroaryl- nebo aryloctové kyseliny (diklofenak a indometacin). Profeny jsou deriváty heteroaryl- či arylpropionové kyseliny (ibuprofen, naproxen). NSAIDs se běžně používají při horečce a jako slabá analgetika např. při bolesti hlavy, zubů atd. Významná jsou též v tlumení projevů zánětlivých onemocnění zejména pohybového aparátu. Některá jsou v určité koncentraci i volně prodejná. Většina NSAIDs patří mezi antirevmatika. Kromě toho, že působí na akutní fázi zánětu, jsou schopny zpomalit degenerativní změny v pojivové tkáni.

3 Teoretická část

3.1 Buněčné modely ve 2D a 3D

Většina experimentů s buňkami je dnes stále prováděna ve 2D, kde buňky rostou v monovrstvě přichyceny k pevnému povrchu. Monovrstva je většinou tvořena proliferujícími buňkami, protože nekrotické buňky se snadno uvolňují od povrchu a jsou odstraněny při výměně média. Mezi přednosti buněčného systému ve 2D patří jednoduchá a méně ekonomicky náročná realizace, kratší doba formování buněčné kultury v řádu minut až hodin, vysoká rychlost proliferace, reprodukovatelnost, snadná interpretace. Nicméně 2D provedení přináší řadu nevýhod (*Edmondson et al. 2014*).

Morfologie buněk, způsob jejich dělení, interakce mezi buňkami navzájem a mezi buňkami a extracelulárním prostředím se neshodují s přirozeným prostředím živého organismu. Změna tvaru buněk (buňky jsou plošší, více protáhlé) ovlivňuje mnoho buněčných procesů včetně proliferace, diferenciaci, viability, buněčné signalizace, exprese genů a proteinů. Buňky ztrácí svoji polaritu, což vede ke změnám reakcí buněk na různé jevy jako je např. apoptóza. Dále byly zjištěny odchylky ve splicingu (sestříhu) mRNA, topologii a biochemii buněk. Na rozdíl od *in vivo* ve 2D provedení mají buňky neomezený přístup ke komponentám média (kyslík, živiny, metabolity atd.). Proto byly zavedeny 3D buněčné kultury, které lépe napodobují podmínky v živém organismu (*Edmondson et al. 2014, Kapalczyńska et al. 2016*).

Ve 3D provedení buňky vytvářejí agregáty nebo sféroidy. Formování sféroidu se skládá ze tří částí. Nejdříve rozptýlené buňky vytvářejí agregáty díky vazbám mezi integriny na povrchu buněk a extracelulární matrix. S určitým zpožděním dochází k expresi kadherinu. Následně se formují sféroidy díky vazbám mezi kadherinem dvou buněk (*Edmondson et al. 2014, Lin et al. 2008*).

Mezi významné 3D buněčné kultivační metody se řadí:

- a) **Metoda visící kapky** – Sféroidy, které byly použity při experimentech v rámci předložené diplomové práce, byly zhotoveny touto metodou. Technika je využívána hlavně pro přípravu sféroidů o dané velikosti, počtu buněk či složení. Buněčná suspenze se ve formě kapky nanese na spodní stranu víčka kultivační misky. Víčko se převrátí o 180 stupňů, kapky se neroztečou působením

povrchového napětí. Buňky se hromadí ve špičce kapky na rozhraní kapaliny a vzduchu a vytváří sféroidy.

b) Kultivace buněk na nepřilnavých substrátech – Buněčná suspenze je sazena do 96jamkové destičky nebo speciální Petriho misky, které jsou potaženy nepřilnavým materiálem jako je např. poly(2-hydroxyethylmetakrylát). Nepřilnavý materiál zabraňuje usazování buněk a následně sféroidů na povrchu jamky či misky.

c) Bioreaktory

1) Třepací baňka (Spinner flask) – Používá se k přípravě obrovského množství sféroidů. Do kontejneru bioreaktoru se dá buněčná suspenze, která je neustále promíchávána míchadlem, což zajišťuje efektivnější transport živin k buňkám a odvod odpadních látek. Konstrukce bioreaktoru umožňuje výměnu média. Během kultivace je kontrolováno složení média, rychlost otáčení, čas kultivace. Všechny tyto faktory přispívají k prodloužení buněčné viability.

2) Rotující bioreaktor – Je podobný třepací baňce. Není použito míchadlo, dochází k otáčení celého kontejneru s buněčnou suspenzí.

d) Kultivace v gelu – Gel vytvářející extracelulární matrix, která ovlivňuje buněčné funkce, lépe napodobuje podmínky v tkáních živých organismů. Nejčastěji používaným gelem je matrigel. Sféroidy v extracelulární matrix rostou buď v gelu, nebo na povrchu gelu.

e) Lešení – Lešení se také využívá jako extracelulární matrix. Bývá z biodegradabilních materiálů jako je např. alginát, kolagen, laminin atd. Buňky se pohybují mezi strukturami lešení a mohou se na ně zavěsit. Vyplňují intersticiální prostory, kde mohou vytvářet 3D struktury (*Breslin et al. 2012, Lin et al. 2008*). Tabulka 1 shrnuje přednosti a nedostatky jednotlivých modelů.

Tab. 1 Výhody a nevýhody 3D buněčných modelů (modifikováno z Breslin et al. 2012, Lin et al. 2008).

Typ 3D metody	Výhody	Nevýhody
Kultivace buněk na neadherentních substrátech	Levné Jednoduché provedení Snadný přístup k sféroidům	Variabilní velikost a tvar sféroidů
Metoda visící kapky	Levné Homogenní tvar a velikost sféroidů Rychlé formování sféroidů	Některé buněčné linie vyžadují speciálně potažené destičky (vyšší cena) Obtížná výměna média
Bioreaktory	Jednoduché provedení Masivní produkce Dlouhá životnost kultury Snadný přístup k sféroidům	Speciální vybavení Variabilita ve velikosti a počtu buněk Velká smyková síla (třepací baňka)
Gely a lešení	Poskytují buňkám ve 3D mechanickou oporu Některé obsahují růstové faktory	Dražší při velké produkci Obtížné získávání buněk po vytvoření 3D kultury

Ve 3D buněčných systémech tvar buněk, interakce mezi nimi a mezi nimi a prostředím lépe napodobují přirozené prostředí v těle. Sféroidy neobsahují pouze proliferující buňky, ale také buňky v klidovém stádiu, apoptické, hypoxické, nekrotické. Vnější vrstvy sféroidů jsou tvořeny převážně proliferujícími buňkami, které jsou nejvíce vystaveny médiu. Vnitřní vrstvy mají menší přísun živin a kyslíku, proto často bývají v klidovém či hypoxickém stádiu. Toto uspořádání je podobné jako *in vivo*. Exprese genů a proteinů, splicing mRNA, topologie a biochemie buněk se také shodují s *in vivo*. Morfologie sféroidů je závislá především na typu buněčné linie, ovlivňuje ji ale také použitý 3D buněčný model. I buněčné modely ve 3D mají své nevýhody. Hlavním

záporem především pro větší sféroidy je, že neobsahují cévní systémy, které by zásobovaly tkáň živinami a kyslíkem a odváděly odpadní látky. To je uskutečňováno pouze difuzí (*Edmondson et al. 2014, Kapalczyńska et al. 2016*).

3.2 Transfekce

Transfekce vyjadřuje zavedení cizích nukleových kyselin do živočišných buněk. Transfekce se dělí na stálou a přechodnou. V případě přechodné transfekce se DNA nezačleňuje do genomu, proto se cizorodé geny mohou exprimovat po omezenou dobu. Obecně je možné požadovaný gen detekovat v průběhu 1 až 7 dnů po transfekci. Ke ztrátě přechodně transfekovaného genetického materiálu může dojít buněčným dělením nebo působením faktorů životního prostředí. Při stabilní transfekci se cizorodá DNA buď začlení do genomu, nebo je volně v cytoplazmě ve formě plazmidu. Stabilní transfekce umožňuje dlouhodobou expresi transgenů (*Kim et al. 2010, Thermo Scientific Transfection 2017*).

Transfekce se využívá především ke studiu funkce genů nebo genových produktů zvýšením nebo inhibicí specifické genové exprese v buňkách, k objasnění regulace jejich exprese, k tvorbě rekombinantních proteinů, které se využívají např. v imunologii (*Khan et al. 2010, Kim et al. 2010*).

3.2.1 Transfekční metody

Při výběru transfekční metody se zohledňuje účel daného experimentu a typ použité buněčné linie. Ideální metoda by se měla vyznačovat vysokou transfekční účinností, nízkou buněčnou toxicitou, minimálním vlivem na fyziologii použité buněčné linie, jednoduchým provedením a reprodukovatelností (*Kim et al. 2010*). Mezi faktory ovlivňující transfekční účinnost kromě typu transfekční metody a druhu buněčné linie patří: životaschopnost a celkový stav buněčné linie (viabilita by měla být minimálně 90 %, buňky musí mít dostatek času na zotavení po pasážování), počet pasáží (buňky by neměly podstoupit více jak 30 pasáží, nadměrné pasážování snižuje expresi požadovaného genu), stupeň konfluence (měl by být stanoven pro každou buněčnou linii), množství a kvalita použité nukleové kyseliny, přítomnost séra v médiu (obecně platí, že přítomnost séra v buněčném médiu zvyšuje účinnost transfekce s DNA,

nicméně při lipofekci (viz dále) je vhodné použít médium bez séra, protože některé sérové proteiny mohou narušovat tvorbu komplexu mezi DNA a lipidem) (*Thermo Scientific Transfection 2017*).

Transfekční metody se dělí na fyzikální, chemické a biologické. Mezi fyzikální metody se řadí:

- a) **Elektroporace** – Nejpoužívanější fyzikální transfekční metoda, jejíž mechanismus není přesně znám. Elektrický impuls s vysokým napětím působí na buněčné membrány, ve kterých vytváří póry, přes které je dopravována DNA dovnitř buněk. Elektroporace je relativně jednoduchá a rychlá, proto je vhodná k transfekci velkého množství buněk během krátkého časového intervalu.
- b) **Mikroinjekce** – Nukleová kyselina je vpravena do jádra nebo cytoplazmy buněk úzkou skleněnou kapilárou. Metoda je velice náročná na zručnost a pracovní sílu.
- c) **Biolistická transfekce** – DNA se obalí částicemi zlata. Takový konjugát je vysokou rychlostí vstřelen do jádra recipientních buněk. Předností biolistické transfekce je její jednoduchost a spolehlivost, na druhou stranu vyžaduje drahé přístroje a může fyzicky poškodit buněčnou kulturu.
- d) **Laserfekce** – Ozařováním buněčné membrány laserem v ní vznikají přechodně póry, kterými je přenášena nukleová kyselina v médiu do buňky na základě osmotického rozdílu mezi médiem a cytosolem. Výhodou je vysoká transfekční účinnost, záporem vysoká cena laserového mikroskopu.
- e) **Magnetofekce** – DNA je spojena s magnetickými nanočásticemi a pomocí magnetického pole je dopravena do cílové buňky (*Karra et al. 2010, Kim et al. 2010*).

Při laboratorních pokusech se dnes nejvíce využívají chemické transfekční metody. Princip všech chemických metod je podobný. Jelikož záporně nabitá molekula DNA nemůže procházet přes záporně nabitou buněčnou membránu, vytváří komplexy s kladně nabitými chemikáliemi, které náboj celého komplexu zneutralizují nebo ho změní na kladný. Způsob, jakým komplex prochází skrz buněčné membrány, není přesně znám. Vědci se domnívají, že se na přenosu komplexu do buňky podílí fagocytóza a endocytóza. Z chemikálií se používají především:

- a) **Kationické lipidy** – Transfekci za použití kationických lipidů se říká lipofekce. Lipofekce byla použita při experimentech v této práci pro transfekování buněk HEK293 plazmidem kódující transportér OAT1. Je vhodná pro širokou škálu buněčných linií a vyznačuje se širokou transfekční účinností, nicméně každá buněčná linie vyžaduje optimalizaci transfekčních podmínek.
- b) **Kationické polymery** – Nejčastěji se používá diethylaminoethyl-dextran. Tato metoda je levná a relativně jednoduchá, není ale vhodná pro přechodné transfekce. Dalšími nevýhodami jsou cytotoxicita a nízká transfekční účinnost.
- c) **Fosforečnan vápenatý** – Jednoduchá metoda s vysokou účinností, nicméně vzniklý komplex je nestabilní kvůli vysoké citlivosti na změny pH. Fosforečnan vápenatý může působit cytotoxicky (*Kim et al. 2010, Thermo Scientific Transfection 2017*).

Biologické postupy zahrnují infekci zprostředkovanou virem, známou pod pojmem transdukce, která probíhá i přirozeně. Transdukce je nejpoužívanější metodou v klinickém výzkumu. Bakterie je infikována bakteriofágem s vloženou cizorodou DNA, která se replikuje reduplikací společně s fágovou DNA. Metoda je charakteristická velmi vysokou transfekční účinností. Virové vektory (nejčastěji retroviry a adenoviry) pronikají do hostitelského genomu náhodně, což může narušit funkci tumor supresorových genů a aktivovat onkogeny, a tak vyvolat nádorové bujení. Dalším záporem je omezená klonovací kapacita každého druhu viru, tj. maximální možné množství bází, které lze vložit do genomu viru (*Kim et al. 2010*).

3.2.2 Vektory

Do hostitelských buněk se zavádí buď volná cizorodá DNA, nebo je cizorodá DNA součástí klonovacího vektoru. Klonovací vektory jsou molekuly DNA schopné autonomní replikace. Obecně se klonovací vektory vyznačují několika vlastnostmi. Jednak jsou schopné samostatně se replikovat v hostitelské buňce. Dále obsahují jedinečné klonovací místo obsahující sekvenci, která je rozpoznána restriční endonukleázou. Po rozštěpení vektoru restričním enzymem se může cizorodá DNA začlenit do vektoru. Některé vektory mají před klonovacím místem silný promotor zajišťující transkripci cizorodého genu a tvorbu jeho produktů. Takovéto vektory se nazývají expresní (v rámci této práce byly

prováděny experimenty s expresním vektorem (plazmidem) kódující transportér OAT1). Vektory také obsahují selekční markery, geny, podle jejichž specifického fenotypového projevu lze buňky nesoucí vektor snadno vyselektovat. Jako vektory se používají plazmidy, kosmidy, bakteriofágy atd. (*Rosypal et al. 2003*).

3.3 Transportéry pro organické anionty a kationty

Transportéry pro organické anionty (OATs) a kationty (OCTs) patří mezi solute carrier transportéry (SLC). SLC je rozsáhlá skupina membránových proteinů, která zprostředkovává přenos velkého množství endogenních i exogenních látek (aminokyseliny, cukry, léčiva, toxiny a mnohé další) přes cytoplazmatické i intracelulární membrány. Nacházejí se především ve dvou hlavních eliminačních orgánech, ledvinách a játrech. Z pohledu této práce je významný jejich výskyt v proximálních tubulech ledvin, kde se podílejí na eliminaci a vstřebávání látek včetně léčiv.

Nadrodina SLC zahrnuje více jak 450 členů rozdělených do 52 rodin. Zástupci stejné rodiny vykazují afinitu k podobným substrátům a jejich genová sekvence je nejméně z 20 - 25 % shodná s genovou sekvencí minimálně jednoho dalšího člena rodiny. Transportéry pro organické anionty a kationty se řadí do rodiny SLC22 spolu s transportéry pro organické zwitterionty/kationty (OCTNs) (*Höglund et al. 2011*).

Struktura SLC22 transportérů je tvořena 12 transmembránovými doménami a dvěma velkými extracelulárními smyčkami, které spojují domény 1 a 2 a domény 6 a 7. První smyčka je lokalizována extracelulárně, druhá intracelulárně (*Kuze et al. 1999, You et al. 2002*).

SLC22 transportéry zprostředkovávají přenos přes membrány různými mechanismy, mezi které patří: a) facilitovaná difuze (OCTs) b) antiport (OATs konkrétně OAT1, OAT3, c) symport (symport sodíku a karnitinu OCTN2) (*Koepsell et al. 2004*). Difuze je typ pasivního transportu, při kterém přechází látka přes membránu bez dodání energie po směru koncentračního gradientu, facilitovaná difuze je usnadněná pomocí přenašeče, který je specifický, saturabilní a inhibovatelný. Aktivní transport je uskutečněn pomocí přenašeče proti směru koncentračního gradientu. Přenašeč je také saturabilní a inhibovatelný. Na rozdíl od pasivního transportu se spotřebovává energie

a to buď volná (primární aktivní transport) nebo získaná přenosem jiné látky ve směru koncentračního gradientu (sekundární aktivní transport). Pokud jsou látky přenášeny stejným směrem, jedná se o symport, pokud opačným směrem, jedná se o antiport (*Rosypal et al. 2003*).

3.3.1 OAT transportéry

Při prováděných experimentech jsme studovali převážně transportér OAT1. Z hlediska exkrece léčiv ledvinami a interakčního potenciálu s NSAIDs hraje roli i transportér OAT3. NSAIDs v menší míře interagují také s OAT2 a OAT4. Zajímavou vlastností genů, které kódují OATs transportéry, je, že mají tendenci se vyskytovat v párech (geny leží na chromozomu bezprostředně vedle sebe). Jako příklad můžeme uvést transportéry OAT1 a OAT3 nebo OAT4 a URAT1. Členové páru jsou spjaty i fylogeneticky, vzájemně spolu spolupracují (*Eraly et al. 2003*).

OAT1 až OAT4 se vyskytují hlavně v ledvinách a to v proximálním tubulu. OAT1, OAT2 a OAT3 se nacházejí na bazolaterální membráně proximálního tubulu. Transportéry na bazolaterální membráně přenášejí substráty z krve do epiteliálních buněk. Zato transportéry na apikální membráně (OAT4) přepravují látky z buněk do moči. (*Cha et al. 2001*). Látky mohou být i zpětně vstřebávány z moči do buněk pomocí transportérů na apikální membráně. Příkladem je přenašeč URAT1, který zajišťuje zpětné vstřebávání kyseliny močové. Okolo 90 % kyseliny močové je reabsorbováno zpět do krve (*Bobulescu et al. 2012*). OATs se nacházejí v játrech, choroidním plexu v mozku, placentě, kosterních svalech. Zásadně ovlivňují farmakokinetiku léčiv, se kterými interagují. Léčiva vykazující afinitu k těmto transportérům se v daném orgánu mohou kumulovat a indukovat nežádoucí účinky (*Bleasby et al. 2006*).

Většina zástupců této skupiny pracuje na základě antiportu s dikarboxyláty (především s α -ketoglutarátem). Když transportéry přenášejí substrát do buňky proximálního tubulu, výměnou přechází dikarboxylát ven z buněk. Intracelulární koncentrace dikarboxylátu je udržována díky Na^+ -dikarboxylátovému kotransportu. Kotransport je poháněn gradientem sodíku vytvářeným sodno-draselnou pumpou (*Sweet et al. 2001*).

Léčiva vykazující afinitu k těmto transportérům mohou být jejich substráty, inhibitory nebo substráty a inhibitory zároveň. Významné substráty a inhibitory transportéru OAT1 uvádí tabulka 2. Léčiva inhibující tyto transportéry mohou změnit farmakokinetiku i farmakodynamiku léčiv, která jsou substráty těchto transportérů, což může vyústit v lékové interakce. K významným lékovým interakcím dochází u substrátů, které jsou aktivně vylučovány ledvinami, jejich renální clearance zprostředkovaná transportérem tvoří podstatnou část celkové clearance a plazmatická koncentrace inhibitoru je vyšší než inhibiční konstanta.

Ačkoliv jsou lékové interakce často nechtěné, občas se inhibitor s daným léčivem podává záměrně jednak k prodloužení času, po který léčivo dosahuje terapeutické plazmatické koncentrace, jednak ke snížení nefrotoxicity léčiva, které se musí vyloučit jiným způsobem než pomocí transportéru. (*Yin et al. 2016*).

Tab. 2 Přehled důležitých substrátů a inhibitorů receptoru OAT1 (modifikováno z Duan et al. 2012, Khamdang et al. 2002, Riedmaier et al. 2012).

Transportér	Substrát	Inhibitor
OAT1 (SLC22A6)	<p>Antivirotika acyklovir, adefovir, cidofovir, gancyklovir, zidovudin</p> <p>Antibiotika cefadroxil, cefaloridin, cefalotin, cefoperazon, ciprofloxacin, tetracyklin</p> <p>NSAIDs ibuprofen, indometacin, ketoprofen,</p> <p>Diuretika furosemid</p> <p>H₂-antagonisté cimetidin, ranitidin</p> <p>Cytostatika metotrexát</p> <p>Antidyslipidemika Pravastatin</p>	<p>Antiuratika probenecid</p> <p>Antibiotika novobiocin</p> <p>NSAIDs indometacin, mefenamová kyselina, meklofenamová kyselina, parekoxib, ketoprofen, oxaprozin</p> <p>Antagonisté na AT₁ receptorech angiotensinu II telmisartan</p>

3.3.2 OCT transportéry

Mezi OCT řadíme transportéry OCT1, OCT2 a OCT3. Transportéry OCT1 a OCT2 se vyskytují hlavně na bazolaterální membráně buněk proximálního tubulu a hepatocytů, pro transportér OCT3 je typický výskyt v mnoha tkáních lidského těla. Tyto transportéry se pomocí facilitované difuze podílí na transmembránovém přenosu mnoha organických kationtů včetně léčiv a toxinů. (*Jonker et al. 2004, Nies et al. 2011*).

OCTs přenášejí převážně malé hydrofilní sloučeniny s molekulovou hmotností 60–350 Da a s minimálně jednou amoniou skupinou. Afinita substrátu k receptoru závisí na stupni ionizace, proto vykazují substráty vyšší afinitu při nižším pH. Mezi významné substráty OCTs patří neurotoxin 1-methyl-4-fenylpyridinium (MPP⁺) způsobující Parkinsonovu chorobu, antiparkinsonika amantadin a memantin, antidiabetika ze skupiny biguanidů, antagonisty H₂-receptorů cimetidin, biogenní aminy jako dopamin nebo endogenní sloučenina kreatinin (*Jonker et al. 2004, Roth et al. 2012*).

Stejně jako transportéry pro organické anionty i transportéry pro organické kationty mohou být inhibovány, což může vést k významným lékovým interakcím. Mezi důležité inhibitory transportéru OCT1 řadíme např. tropanový alkaloid atropin, antihypertenzivum prazosin nebo antiarytmikum disopyramid. Inhibitor OCT2 může být inhibován např. antialergikem cetirizinem, antibiotikem rifampicinem či antivirotikem ritonavirem. Mezi inhibitory patří i NSAIDs (*Solvobiotech Transporters 2017*).

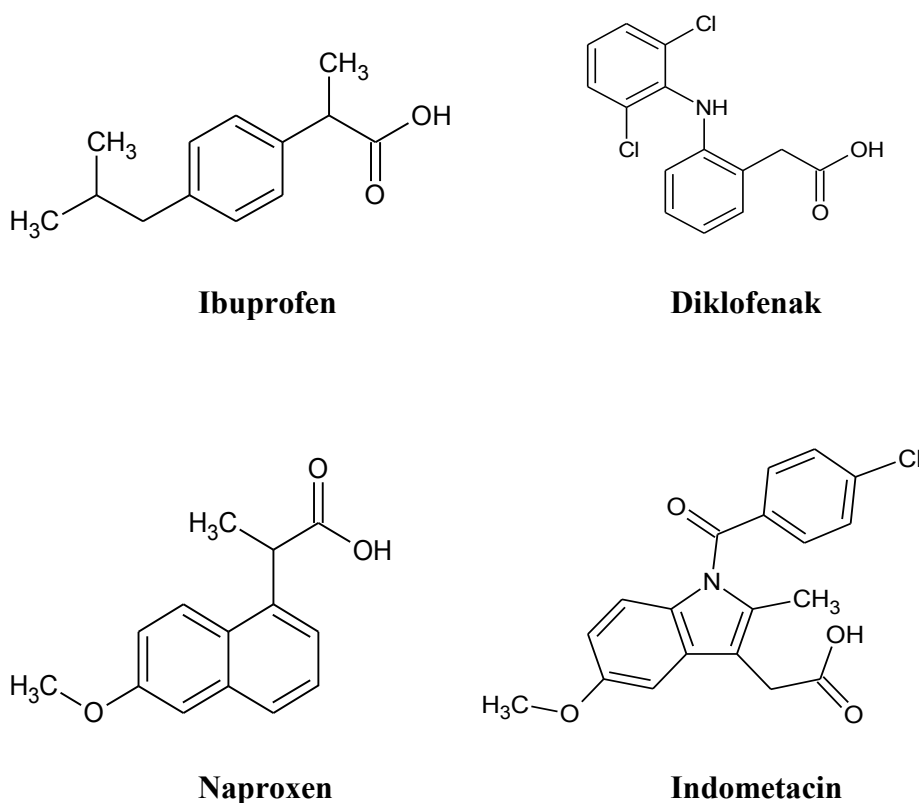
3.4 Použitá NSAIDs

Nesteroidní antiflogistika (NSAIDs) působí proti bolesti, zánětu a horečce. Uplatňují se i v léčbě závažnějších onemocnění (nádorové bolesti, revmatoidní artritidy, žlučnickové koliky atd.). Dnes se zkoumá také vliv chronického užívání NSAIDs na Alzheimerovu nemoc (*Khamdang et al. 2002*).

Existuje nejspíše více mechanismů účinku NSAIDs, všechny ale nejsou zcela objasněny. Základní mechanismus účinku je založen na inhibici enzymu cyklooxygenázy (COX), která přeměňuje arachidonovou kyselinu na prostanoidy (prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany). Je známo několik izoform cyklooxygenázy, tj. COX-1, COX-2 a COX-3. COX-1 je konstitutivní izoforma vyskytující se v ledvinách, kde reguluje průtok krve, jejím působením vznikají prostaglandiny chránící sliznici žaludku a střev, tvorbou tromboxanu v krevních destičkách zvyšuje jejich adhezivitu. COX-2 je indukovatelná izoforma aktivovaná při zánětu. Jejím působením vznikají prostaglandiny, které podporují zánět, horečku a vnímání bolesti. NSAIDs inhibují obě izoformy v různém poměru, na němž záleží výskyt určitých nežádoucích účinků (*Vane et al. 1998*). COX-3 se nachází

v hypotalamu. Podílí se na analgetickém a antipyretickém účinku paracetamolu. Přesný mechanismus účinku COX-3 se stále zkoumá (Botting *et al.* 2005).

Většina NASIDs vykazuje střední až vysokou afinitu k transportéru OAT1. S OAT3 nejvíce interagují diklofenak, ibuprofen a indometacin, střední afinitu vykazují etodolak, fenacetin a salicyláty, nejnižší acetylsalicyláty (Khamdang *et al.* 2002). V této práci byl mj. zkoumán inhibiční vliv nesteroidních antiflogistik diklofenaku, ibuprofenu, indometacinu a naproxenu na ledvinový transportér OAT1. Obrázek 1 znázorňuje struktury studovaných nesteroidních antiflogistik.



Obr. 1 Chemické vzorce studovaných nesteroidních antiflogistik.

Nežádoucí účinky NSAIDs často vychází z inhibice enzymu cyklooxygenázy (poškození gastrointestinálního traktu, ledvin, kardiovaskulárního systému, zvýšená krvácivost...) (Teslim *et al.* 2014). Některé nežádoucí účinky se ale mohou objevit na základě interakcí NSAIDs s transportéry pro organické anionty a kationty. NSAIDs, která mají afinitu k daným transportérům, se mohou v určité tkáni kumulovat

a poškozovat ji. (Např. transport NSAIDs do mozku zprostředkovává transportér OAT3, což může vést k nežádoucím účinkům zahrnující ospalost, zmatenost atd. OAT3 se vyskytuje také v kosterních svalech, kde může interagovat např. s diklofenakem a způsobit rhabdomyolýzu) (*Khamdang et al. 2002*).

3.5 Principy použitých metod

3.5.1 Transfekce

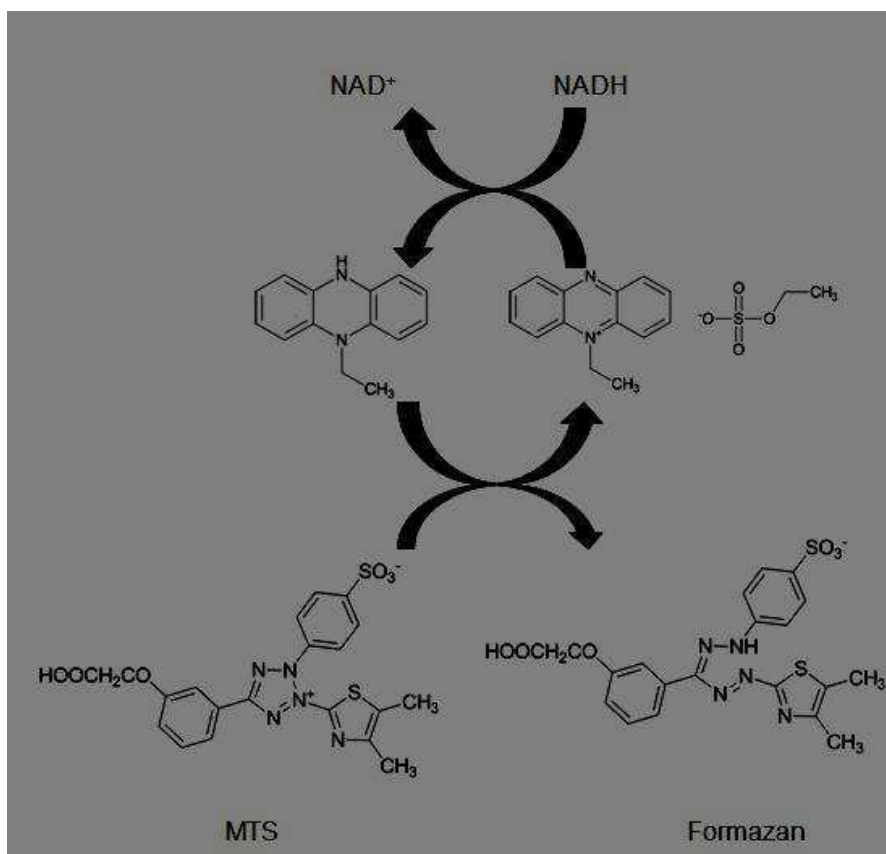
Buňky HEK293 byly transfekovány transportérem hOAT1 lipofekcí. Jako transfekční činidlo byl použit Lipofectamine, jako transfekční médium Opti-MEM. Transfekční činidlo Lipofectamine je kationtový liposom, který zvyšuje účinnost transfekce nukleových kyselin. Díky elektrostatickým silám se váže na negativně nabitě nukleové kyseliny, čímž se vytvoří elektricky neutrální komplex, který je schopen fúzovat plasmatickou membránou, nebo se přes ni dostává endocytózou. Není přesně známo, jakým způsobem se komplex v buňce rozkládá (*Dalby et al. 2004, (ThermoFisher Protocol 2004)*). Transfekční médium Opti-MEM je minimální esenciální médium (MEM) doplněné o stopové prvky, insulin, transferin, hypoxanthin a thymidin, které umožňují snížit množství PBS v MEM alespoň o 50% (*ThermoFisher 2014*).

3.5.2 Stanovení proteinu

Proteiny byly stanovovány metodou Pierce BCA Protein, která byla zavedena v roce 1985 P. K. Smithem. Základem metody je redukce Cu^{2+} iontů na Cu^{1+} ionty proteinem v alkalickém prostředí. Měďné ionty jsou chelátovány kyselinou bicinchonovou (BCA). Vzniklý fialově zbarvený ve vodě rozpustný komplex je následně stanovován kolorimetricky. Komplex vykazuje nejvyšší absorbanci při vlnové délce 562 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná množství proteinu. Metoda je velmi citlivá (20-2000 $\mu\text{g/ml}$) (*Thermo Scientific*).

3.5.3 CellTiter 96[®]

Kolorimetrická metoda CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay byla v této práci použita ke stanovení počtu životaschopných buněk ve sféroidech. Uvedená metoda je založena na redukcí tetrazoliové sloučeniny 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-[3-(karboxymethoxy)fenyl]-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS) vitálními buňkami na fialově zbarvený formazan, který se rozpouští v buněčném médiu (obr. 2). Množství formazanu se stanovuje kolorimetricky měřením jeho absorpance na spektrofotometru a je přímo úměrné počtu živých buněk (*Promega 2012*).



Obr. 2 Schéma redukce tetrazoliové sloučeniny MTS na formazan pomocí fenazin ethosulfátu (PES), který je uvnitř životaschopných buněk redukován pyridinovým nukleotidem NADH. PES přenáší elektrony získané při redukcí na sloučeninu MTS, kterou tím redukuje na fialově zbarvený formazan (modifikováno z Riss et al. 2004).

Činidlo MTS je záporně elektricky nabitě, tudíž špatně proniká přes membrány buněk. Proto se spolu s MTS používá fenazin ethosulfátu (PES), který jednak zvyšuje chemickou stabilitu roztoku obou látek, jednak snadno proniká přes membrány živých buněk. Po průchodu membránou PES přijímá elektrony při redukci pyridinovými nukleotidy NADH nebo NADPH, které se zároveň oxidují na NAD^+ či NADP^+ . Při návratu z buňky předává PES elektrony MTS a tím ho redukuje na formazan (*Riss et al. 2004*).

4 Cíle práce

- Vytvořit *in vitro* buněčný model ve 2D a 3D provedení.
- Připravený buněčný model se pokusit transfekovat transportérem hOAT1, optimalizovat metodu transfekce a ověřit účinnost transfekce 2D a 3D buněčného modelu pomocí transportní studie s vhodným prototypickým substrátem.
- S vytvořenými modely provést základní transportní studie se známými substráty a inhibitory (vybraní zástupci NSAIDs). Pro transportní studie vybrat vhodné koncentrace testovaných látek, vypočítat ředění, připravit testované látky ve zvolených koncentracích a aplikovat je na připravené buněčné modely.
- Vyhodnotit naměřené výsledky, porovnat testované látky mezi sebou pomocí vhodného inhibičního parametru, konfrontovat výsledky se současnými teoretickými poznatky a sepsat diplomovou práci dle platných požadavků.

5 Experimentální část

5.1 Materiál

5.1.1 Přístroje a vybavení

- 24jamkové destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- 96jamkové mikrotitrační destičky, číré (NUNC, dodavatel Schoeller, Praha)
- Analytické váhy (Boeco, SRN)
- Destičkový analyzátor TECAN Infinite 200 M (Švýcarsko)
- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- konfokální mikroskop Olympus
- Jednokanálová pipeta s nastavitelným objemem Transferpette S 0,1-1 μ l (Brand, SRN)
- Jednokanálové pipety s variabilním objemem Eppendorf Research a Eppendorf Research Plus (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.)
- Kultivační láhve 75 cm² (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1,8 (Bioair instruments, Miláno, Itálie)
- Míchačka Bio Vortex V1 (Biosan, Lotyšsko)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes XDS – 1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Mikrozkmavky Eppendorf 0,6 ml, 2 ml (Sigma-Aldrich, USA)
- Petriho misky (TPP, Švýcarsko)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Scintilační lahvičky šroubovací, 2 ml (Kartell, Noviglio, Itálie)
- Sterilní, nepyrogenní skleněné pipety 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Špičky Eppendorf s variabilním objemem (Hamburg, SRN)
- Vícekanálové pipety Discovery Comfort (HTL, Polsko)
- Vodní lázeň, TW 12 (Julabo, SRN)

5.1.2 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)
- Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) s 1 % L-glutaminu (Sigma-Aldrich, USA) a 10 % fetálního hovězího séra (PAA Laboratories, Biotech, Praha)
- Eaglovo minimální esenciální médium (Eagle's Minimal Essential Medium, EMEM) (Sigma-Aldrich, USA) s 10 % fetálního bovinního séra (PAA Laboratories, Biotech, Praha), 1 % L-glutaminu (Sigma-Aldrich, USA) a 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr PBS (Phosphate Buffered Saline, pH = 7,4) s NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, (PENTA, ČR)
- Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- STOP roztok s 137 mM NaCl (PENTA, ČR) a 10 mM HEPES o pH 7,4 (Sigma-Aldrich, USA)
- Transportní roztok s 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 5 mM glukózy (PENTA, ČR) a 10 mM pufrovacího činidla HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
- TritonX-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin/EDTA roztok (0,25 %, Trypsin/EDTA solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ultima Gold (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.3 Studované látky a transportéry

- [³H]MPP⁺ 1 μM (American Radiolabeled Chemicals, USA)
- [³H]PAH 1 μM (USA)
- Expresní vektor pro lidský OAT1 (OriGene Technologies, USA)
- pCMV6-Entry (pC) (OriGene Technologies, USA)
- Sodná sůl diklofenaku, ibuprofen, indometacin, naproxen (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.4 Použité kity

- CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)

5.1.5 Použité buněčné modely

- Madin-Darbyho psí ledvinné buňky MDCK II (Madin-Darby canine kidney cell line) (European Collection of Cell Culture , UK), MDCK II stabilně transfekované hOCT1 (model vytvořený kolegy ze stejného pracoviště)
- Embryonální ledvinné buňky HEK293 (Human embryonic kidney cells) (European Collection of Cell Culture , UK)

5.2 Metody

5.2.1 Buněčná kultivace

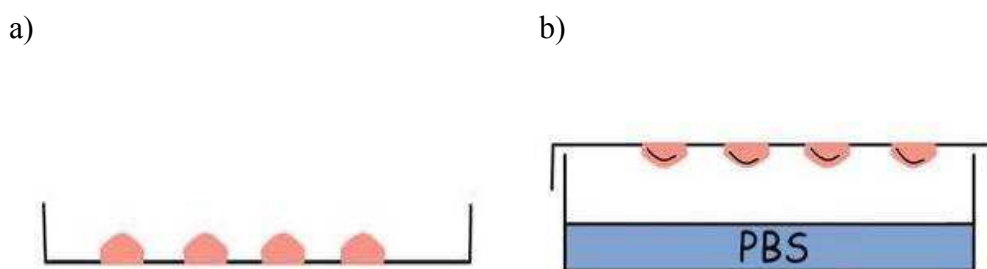
Použité buněčné linie byly adherentní a byly rutinně kultivovány v 75 cm² kultivačních lahvích v médiu v buněčném inkubátoru při 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Buněčná linie HEK293 (pasáže 3–18) byla kultivována v buněčném médiu Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) s 10 % fetálního hovězího séra, 1 % L-glutaminu a 1 % neesenciálních aminokyselin. Pro buněčnou linii MDCK II stabilně transfekovanou transportérem OCT1 (pasáže 4–7) bylo použito Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) s 1 % L-glutaminu a 10 % fetálního hovězího séra.

Kultura byla pasážována před dosažením 100 % konfluence přibližně každé 4 dny. Z kultivační lahve bylo odsáto staré médium. Byl přidán fosfátový pufr (PBS) na oplach buněk. PBS obsahoval NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.12H₂O 10 mM a NaH₂PO₄.2H₂O 10 mM. Celkové pH pufru bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí NaOH. Po odsátí PBS byly adherentní buňky rozvolněny roztokem 0,25 % trypsin/EDTA. Činnost roztoku byla zkontrolována pod mikroskopem. Rozvolnění buněk napomohlo také poklepání rukou na stěnu kultivační lahve. Působení trypsinu bylo zastaveno přidáním čerstvého média. Po řádném zhomogenizování buněčné

suspenze byla požadovaná část napipetována do nové kultivační lahve s čerstvým médiem a dále kultivována. Ve zbývající části buněčné suspenze byl zjištěn počet buněk v jednom mililitru pomocí Bürkerovy komůrky. Následně byla suspenze naředěna odpovídajícím buněčným médiem na určitý počet buněk, který byl potřeba pro daný experiment.

5.2.2 Příprava sféroidů a stanovení optimální buněčné koncentrace sféroidu

Nejdříve byly připraveny sféroidy metodou visící kapky. Na dno Petriho kultivační misky bylo dáno 10 ml PBS k hydrataci sféroidů. Na spodní stranu víka misky byly automatickou pipetou se špičkou o objemu 20 μ l napipetovány kapky buněčné suspenze (obr. 3a). Bylo třeba dbát na to, aby se kapky vzájemně nedotýkaly a aby se neroztekly. Na jednu misku bylo umístěno 12 až 16 kapek. Víko se sféroidy bylo opatrně převráceno tak, aby kapky zůstaly na svém místě, a nasazeno na spodní část Petriho misky s PBS. Buňky se kumulovaly ve špičce kapky (obr. 3b). Misky byly inkubovány v buněčném inkubátoru při 37 °C s 5 % CO₂. Růst sféroidů byl pravidelně kontrolován pod mikroskopem. Podle potřeby bylo pipetou vyměňováno buněčné médium. Cílem bylo, aby se všechny buňky shlukly, vytvořily agregát a následně sféroid.



Obr. 3 Zhotovení sféroidů na Petriho misce. Pipetování buněčné suspenze na spodní stranu víka Petriho misky (a), převrácení víka s kapkami buněčné suspenze a růst sféroidů ve 3D (b) (modifikováno z Foty et al. 2011).

Pro experimenty ve 3D bylo nutné nejdříve zjistit optimální počet buněk utvářející jeden sféroid. Nejdříve byly vytvořeny sféroidy o různém počtu buněk naředěním zásobní buněčné suspenze o známé buněčné koncentraci 44 000 buněk na kapku (zjištěné pomocí Bürkerovy komůrky) buněčným médiem (viz tabulka 3). Z každé suspenze bylo utvořeno 3 až 6 sféroidů.

Tab. 3 Příprava suspenzí o určité buněčné koncentraci

Ředění	Počet buněk na kapku	Objem zásobní suspenze (μl)	Objem média (μl)
0×	44 400	200	0
2×	22 200	100	100
3×	14 800	67	133
4×	11 100	50	150
5×	8 880	40	160
7×	6 343	29	171
8×	5 550	25	175
9×	4 933	22	178
10×	4 400	20	180

Ke zjištění počtu životaschopných buněk ve sféroidech byl použit kit CellTiter 96[®]. Každý sféroid byl pomocí automatické pipety se špičkou s objemem 10 μl opatrně přenesen do jamky 96jamkové destičky, kde bylo napipetováno 90 μl buněčného média. Ke každému sféroиду i ke kontrolám (100 μl čistého média) bylo přidáno 20 μl činidla. Destička byla inkubována 1 h při 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Následně se pomocí destičkového spektrofotometru změřila absorbance při vlnové délce 490 nm. Absorbance sféroidů o stejném počtu buněk byly zprůměrovány, byla vypočtena směrodatná odchylka a vytvořen graf závislosti absorbance na počtu buněk v programu GraphPad Prism (verze 6).

5.2.3 Transfekce

Ve 2D provedení byly buňky HEK293 sazeny do 24jamkových destiček v počtu 250 000 na jamku. Po inkubaci v délce 24 h při 37 °C a 5 % CO₂ byly buňky transfekovány. Těsně před transfekcí bylo odsáto staré médium a přidáno 0,5 ml nového média do každé jamky.

Ve 3D provedení byly nejdříve na Petriho miskách zhotoveny sféroidy, na jeden sféroid bylo sazeno 12 000 buněk HEK293. Sféroidy byly inkubovány po dobu jednoho týdne při 37 °C v atmosféře syčené 5 % CO₂. Průběžně podle potřeby bylo opatrně odsáto staré médium a přidáno 10 µl nového. Po 7 dnech bylo do mikrozkušavek Eppendorf napipetováno 0,5 ml čistého média a jednotlivé sféroidy do nich opatrně přeneseny automatickou jednokanálovou pipetou se špičkou s objemem 10 µl.

Pro transfekci HEK293 byl použit expresní vektor (plazmid) kódující transportér OAT1. Do kontrolních jamek byl pipetován prázdný vektor pCMV6 Entry (pC). Jako transfekční činidlo byl zvolen Lipofectamine2000 (Lipofectamin) a jako transfekční médium Opti-MEM.

Postup transfekce

Před transfekcí byly připraveny do mikrozkušavek Eppendorf roztoky o následujícím složení:

Roztok 1: Lipofectamin, Opti-MEM 50 µl na jamku, která po transfekci obsahuje DNA

Roztok 2: DNA, Opti-MEM 50 µl na jamku, která po transfekci obsahuje DNA

Roztok 3: Lipofectamin, Opti-MEM 50 µl na jamku, která po transfekci obsahuje pC

Roztok 4: pC, Opti-MEM 50 µl na jamku, která po transfekci obsahuje pC

Roztoky s Lipofectaminem byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Po té byl přenesen pipetou roztok 1 do roztoku 2 a následně roztok 3 do roztoku 4. Nově vzniklé roztoky byly důkladně zhomogenizovány pipetou a 20 minut inkubovány při pokojové teplotě. Po 20 minutách byly buňky transfekovány přidáním 100 µl nově vzniklé transfekční směsi s příslušnou DNA na jamku či eppendorfku, ke kontrolním buňkám bylo přidáno 100 µl směsi obsahující prázdný vektor pC. Pouze při

optimalizaci transfekce bylo do každé z kontrolních jamek dáno pouze 100 μ l čistého média Opti-MEM. Transfekované buňky jsme inkubovali 24 h při 37 °C a 5 % CO₂.

Poměr použité DNA v μ g a Lipofectaminu v μ l by měl být podle protokolu výrobce mezi 1 : 2 a 1 : 3, proto byla transfekce ve 2D modelu optimalizována. Poměr a množství DNA a Lipofectaminu byl zvolen podle tabulky 4 (hodnoty jsou uvedeny na jednu jamku). Aby byla zjištěna účinnost transfekce, 24 h po optimalizační transfekci jsme provedli transportní studii s typickým substrátem pro daný transportér (viz dále). Po vyhodnocení transportní studie byl jako nejlepší poměr vybrán 1 : 2,5 s 0,4 μ g DNA a 1 μ l Lipofectaminu na jamku či mikrozkušavku Eppendorf (viz výsledky). Při dalších transfekcích byl stejný poměr používán i pro prázdný vektor pC a Lipofectamin.

Tab. 4 Optimalizace transfekce – poměr a množství použité DNA a činidla

DNA (μ g)/Lipof. (μ l)	DNA (μ g)	Lipofectamin (μ l)
1 : 2	0,4	0,8
1 : 2	0,8	1,6
1 : 2,5	0,4	1
1 : 2,5	0,8	2
1 : 3	0,4	1,2
1 : 3	0,8	2,4

5.2.4 Transportní studie

Příprava roztoků inhibitorů

Abychom mohli určit hodnotu IC₅₀ látek použitých při transportních studiích (diklofenak, indometacin, ibuprofen a naproxen), byly připraveny jejich roztoky o různých koncentracích uvedených v tabulce 5. Rozmezí koncentrací jednotlivých látek byla zvolena na základě vyhledaných hodnot IC₅₀ v literatuře.

Tab. 5 Inkubační koncentrace vybraných NSAIDs

Léčivo	Diklofenak	Ibuprofen	Indometacin	Naproxen
	0	0	0	0
Inkubační	0,5	1	1	0,5
koncentrace	2,5	5	5	1
(μM)	5	10	10	2,5
	10	50	50	5
	50	100	100	10
	100			50

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky inhibitorů. Z molární hmotnosti a koncentrace zásobního roztoku byla zjištěna rozpustnost inhibitorů. S ohledem na rozpustnost látky byla provedena navážka. Potřebný objem rozpouštědla byl vypočítán podle vztahu:

$$V = \frac{m}{s}$$

V... objem rozpouštědla v μl

m... navážka inhibitoru v mg

s... rozpustnost inhibitoru v mg/ μl

Rozpouštědla a molární hmotnosti použitých látek uvádí tabulka 6.

Tab. 6 Rozpouštědla a molární hmotnosti inhibitorů

	Rozpouštědlo	Molární hmotnost [g/mol]
Diklofenak	H ₂ O	318,13
Indometacin	DMSO	357,79
Ibuprofen	DMSO	206,28
Naproxen	DMSO	230,26

Roztoky o zvolených koncentracích inhibitorů byly připraveny smísením zásobního roztoku a transportního radioaktivního roztoku. Objemy zásobních roztoků o nižších koncentrací roztoků inhibitorů (pod 10 μM) by byly velmi malé, proto byl nejdříve zásobní roztok zředěn. Objem zásobního roztoku potřebný k přípravě roztoků inhibitorů o dané koncentraci byl vypočítán podle vztahu:

$$V_z = V_c \times \frac{c}{c_{\text{zás.}}} \times \text{zředění}$$

V_z ...objem zásobního roztoku v μl

V_c ...celkový objem roztoku (zásobního a transportního roztoku) v μl

c ...požadovaná koncentrace roztoku inhibitoru [μM]

$c_{\text{zás.}}$...koncentrace zásobního roztoku [μM]

Zásobní roztok byl do celkového objemu doplněn transportním roztokem.

Transportní studie

Experimenty byly prováděny s buňkami HEK293 transfekovanými transportérem OAT1 ve 2D i 3D provedení. Ve 2D provedení byly transportní studie prováděny ve 24jamkových destičkách, ve 3D provedení v mikrozkuvkách Eppendorf. Jeden experiment byl proveden i na buňkách MDCK II, které byly stabilně transfekované přenašečem OCT1. Pokus byl uskutečněn pouze ve 2D provedení na 24jamkové destičce. Transportní studie s HEK293 byla prováděna 24 h po transfekci v triplicátech (transportní studie s MDCK II 48 h po transfekci). Jako kontroly sloužily buňky s transfekovaným prázdným vektorem pC.

Nejdříve byly buňky řádně dvakrát opláchnuty transportním médiem, potom byly ve stejném roztoku preinkubovány po dobu 5 minut při pokojové teplotě (byl použit 1 ml roztoku na jamku či eppendorfku). Transportní roztok se skládal z 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 5 mM glukózy a 10 mM pufovacího

činidla HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonová kyselina) o pH 7,4. Po 5 minutách byl transportní roztok z destiček odstraněn a z eppendorfků opatrně odsán.

Následně byl na buňky napipetován transportní roztok s radioaktivním substrátem (250 μ l směsi transportního roztoku a radioaktivně značeného substrátu na jamku či eppendorfků). Pro buňky HEK293 transfekované OAT1 byla použita jako substrát radioaktivně značená kyselina *p*-aminohippurová 1 μ M [³H]PAH. U buněk MDCK II stabilně transfekovaných OCT1 byl jako substrát zvolen radioaktivně značený 1-methyl-4-phenylpyridinium 1 μ M [³H]MPP⁺. Při experimentech, ve kterých byl zkoumán inhibiční potenciál NSAIDs, byly testované látky naředěny přímo radioaktivním transportním roztokem tak, aby byla dosažena požadovaná inkubační koncentrace testované látky.

Aby byl zjištěn optimální čas inkubace, byla provedena optimalizace doby inkubace s buňkami HEK293 ve 2D i 3D provedení. Buňky byly inkubovány po dobu 2, 5, 12, 15, 30 a 45 minut. Jako vhodný časový interval bylo určeno 5 minut (viz výsledky), který byl pak uplatňován při dalších experimentech. Buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C s výjimkou jednoho experimentu, kdy byla inkubační teplota snížena na 4 °C (inhibice chladem). Po uplynutí daného časového intervalu byl inkubační roztok odstraněn a byl přidán 1 ml STOP roztoku na jamku či eppendorfků vychlazený na 8 °C. Buňky byly STOP roztokem posléze opláchnuty ještě jednou. STOP roztok obsahoval 137 mM NaCl a 10 mM HEPES o pH 7,4. STOP roztok zabraňuje nespecifické vazbě radioaktivně značeného roztoku na membrány. Nakonec byly odsáty zbytky tekutin a destičky či eppendorfků byly zamraženy na -20 °C.

Další den byly buňky rozmraženy a následně inkubovány po dobu 30 minut s dezintegračním roztokem, který se skládal z 0,5 % Triton X-100 v 100 mM NaOH. Bylo pipetováno 100 μ l dezintegračního roztoku na jamku či eppendorfků. Zlyzované buňky byly pečlivě pipetou zhomogenizovány. Bylo nutné dbát na to, aby žádné buňky nezůstaly přilnuté v jamce. Z každé jamky či eppendorfků byla přendána pipetou desetina (10 μ l) zlyzovaných buněk pro stanovení proteinu do 96jamkové destičky. Zbytek zlyzovaných buněk (90 μ l) byl napipetován do lahvíček s 1 ml scintilačního roztoku Ultima Gold, ve kterých byla měřena jejich radioaktivita. Roztoky standardů zhotovené v triplicátu obsahovaly 1 ml scintilačního roztoku Ultima Gold a 5 μ l základního radiačního roztoku, který byl použit při inkubaci.

Radioaktivita vzorků i standardů byla měřena na beta spektrometru, doba měření jedné lahvičky byla nastavena na jednu minutu. Výsledky byly vyhodnoceny v triplikátech. Ze spektrometru byly získány hodnoty v jednotkách DPM1, což vyjadřuje počet desintegrací za minutu, které byly zprůměrovány jak u vzorků, tak standardů. Hodnoty DPM1 byly převedeny na % akumulované dávky vůči obsahu proteinu podle následujícího vztahu:

$$\% \text{ akumulace/mg proteinu} = \frac{A \times 100}{D \times m}$$

A...akumulovaná dávka v DPM1

D...celková podaná dávka v DPM1

m...obsah proteinu v mg

Akumulovaná dávka A byla vypočítána vynásobením počtu desintegrací za minutu ve vzorku hodnotou 100/90 (byla měřena radioaktivita jen 90 % vzorku, 10 % bylo použito na stanovení obsahu proteinu). Celková podaná dávka D byla získána vynásobením počtu desintegrací za minutu ve standardu hodnotou 50, která vyjadřuje poměr podané radioaktivní dávky ve vzorcích a standardu – ke standardům bylo přidáno 5 μ l radiačního roztoku, ale vzorky byly inkubovány ve 250 μ l radiačního roztoku).

V programu GraphPad byly vytvořeny grafy charakterizující závislosti mezi % akumulace/mg proteinu a koncentrací použitých inhibitorů. Z grafu byly získány hodnoty IC₅₀ jednotlivých inhibitorů.

Stanovení proteinu

Proteiny byly stanovovány metodou Pierce BCA Protein. 10 μ l z každého vzorku rozrušeného v předchozím kroku desintegračním roztokem tritonu X-100 s NaOH bylo napipetováno do 96jamkové destičky. Kalibrace byla provedena na standardy hovězího sérového albuminu (BSA), které byly použity v koncentracích 0 μ g/ml, 25 μ g/ml, 100 μ g/ml, 125 μ g/ml, 200 μ g/ml, 250 μ g/ml, 400 μ g/ml, 500 μ g/ml,

750 µg/ml, 1 000 µg/ml, 1 500 µg/ml a 2 000 µg/ml. Do stejné destičky bylo napipetováno 10 µl od každé koncentrace standardů BSA vždy v triplicátu. Ke vzorkům i standardům bylo dále přidáno 200 µl na jamku směsi činidla A a činidla B v poměru 50 : 1. Destička byla inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byla měřena absorbance na destičkovém analyzátoru TECAN při vlnové délce 562 nm.

Naměřené absorbance každé koncentrace BSA byly zprůměrovány a od každé zprůměrované hodnoty se odečetla hodnota absorbance pozadí, tj. absorbance při nulové koncentraci BSA. Z hodnot absorbancí BSA snížených o absorbanci pozadí a koncentrací BSA byla vytvořena v MS Excel kalibrační křivka. Z rovnice kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace proteinu v µg/ml jednotlivých vzorků podle následujícího vztahu:

$$x = \frac{(y - b)}{a}$$

a, b...koeficienty charakterizující regresní křivku (**a** je posunutí a **b** směrnice křivky)

x...koncentrace proteinu ve vzorku v µg/ml

y...absorbance vzorku snížená o absorbanci pozadí

Z koncentrace proteinu ve vzorku byla vypočítána hmotnost proteinu na jamku v mg.

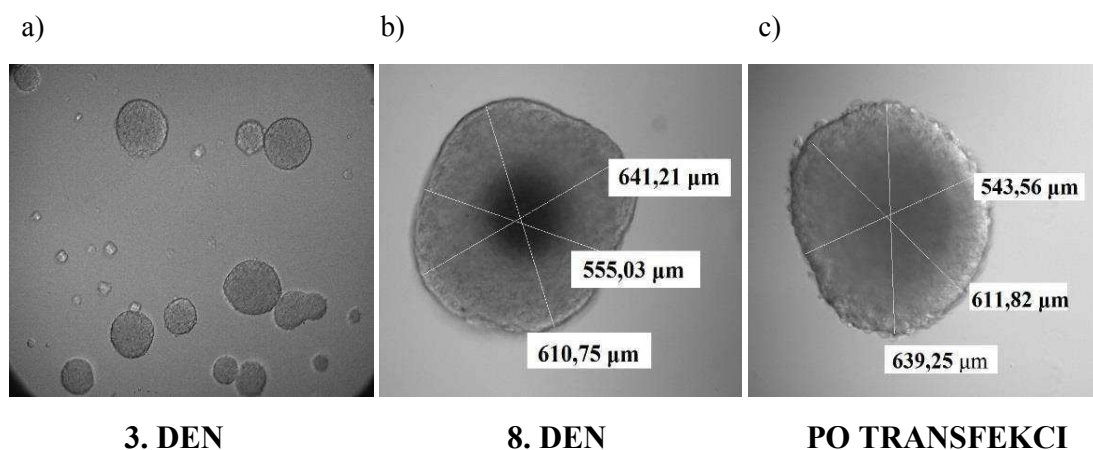
5.2.5 Statistické hodnocení

Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická signifikance byla hodnocena pomocí t-testu v programu MS Excel 2013. Statistická významnost na hladině $p < 0,05$ je označena *, na hladině $p < 0,01$ je označena ** a na hladině $p < 0,001$ je označena ***.

6 Výsledky

6.1 Focení sféroidů

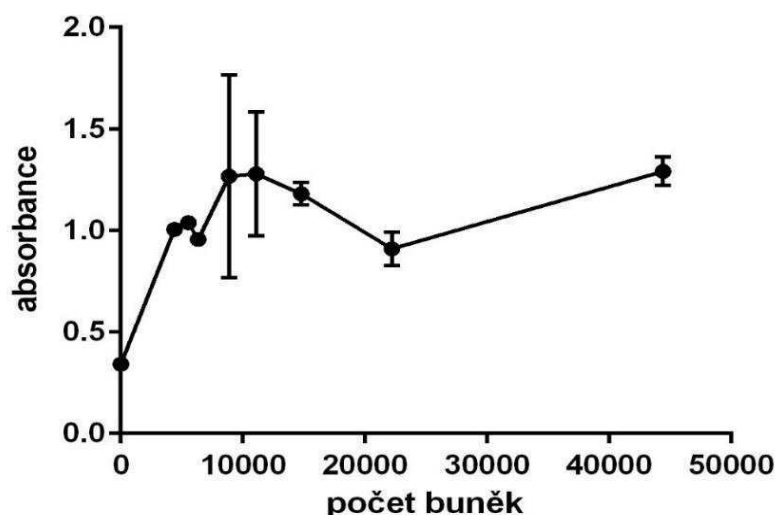
Sféroidy byly zhotoveny metodou visící kapky z buněk HEK293. Bylo sazeno 12 000 buněk na sféroid. Sféroidy byly inkubovány v buněčném inkubátoru při 37 °C s 5 % CO₂ a foceny 3. den po nasazení (obr. 4a), 8. den po nasazení (obr. 4b) a 24 h po transfekci, tj. 9. den po nasazení (obr. 4c).



Obr. 4 Sféroidy připravené metodou visící kapky z buněčné linie HEK293. Bylo pipetováno 12 000 buněk na sféroid. Sféroidy byly foceny 3. den po nasazení (a), 8. den po nasazení (b) a 24 h po transfekci (9. den po nasazení) (c).

6.2 Stanovení optimálního počtu buněk ve sféroidu

Pro zjištění optimálního počtu buněk v jednom sféroidu byla použita kolorimetrická metoda CellTiter 96[®]. Experiment byl prováděn s buněčnou linií HEK293. Absorbance s rostoucím počtem buněk nejdříve lineárně stoupala, přibližně od 12 000 buněk již nebyla lineární (obr. 5). Na základě těchto výsledků jsme proto při přípravě sféroidů pro další experimenty použili 12 000 buněk na sféroid.



Obr. 5 Závislost absorbance na počtu životaschopných buněk HEK293 v jednom sféroidu metodou CellTiter 96[®]. Po přípravě sféroidů s různým počtem buněk byly sféroidy dále inkubovány s činidlem 60 min při 37 °C a poté měřena absorbance. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr absorbance sféroidů ± SD.

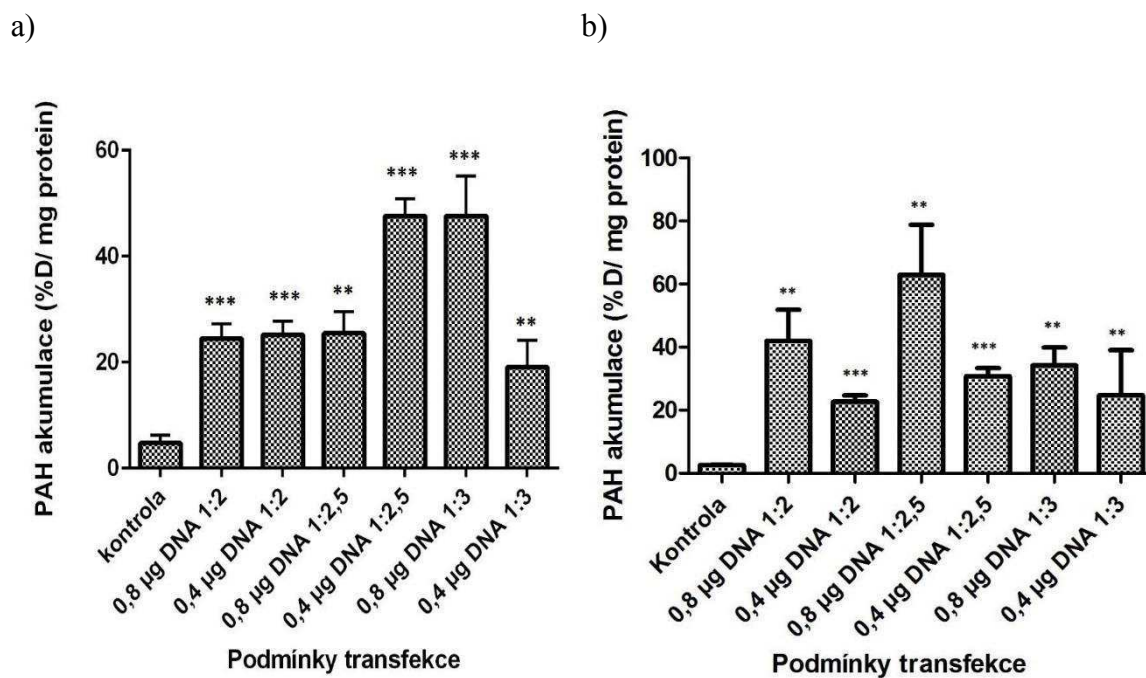
Optimální počet buněk potřebný k obdobným experimentům ve 2D modelu HEK293 buněk (250 000 buněk/jamka) jsme převzali z předchozích prací provedených na stejném pracovišti.

6.3 Optimalizace a ověření efektivity transfekce

Pro zjištění vhodného množství DNA a poměru mezi DNA a transfekčním činidlem jsme museli provést optimalizaci transfekce. Efektivitu transfekce jsme následně potvrdili provedením transportní studie s buňkami HEK293 ve 2D formě přechodně transfekovanými expresním vektorem (plazmidem) kódující transportér hOAT1. Jako substrát byla použita [³H]PAH 1 μM. Transportní studie byly provedeny 24 h po transfekci (obr. 6a) a 48 h po transfekci (obr. 6b).

Z obrázku 6a je patrné, že akumulace [³H]PAH v buňkách HEK293 je nejvyšší při použití 0,4 μg DNA a 1 μl Lipofectaminu (poměr 1 : 2,5) a při 0,8 μg DNA a 2,4 μl Lipofectaminu (poměr 1 : 3) na jamku či mikrozukmavku. V těchto případech je množství [³H]PAH v buňkách téměř 10× vyšší s porovnáním s kontrolními buňkami

HEK293. Při dalších transfekcích jsme proto používali 0,4 μg DNA a 1 μl Lipofectaminu na jamku. Akumulace [^3H]PAH získané z transportní studie provedené 48 h po transfekci (obr. 6b) nedosahují hodnot zásadně vyšších s porovnáním s hodnotami získaných z transportní studie provedené 24 h po transfekci, některé jsou dokonce nižší. Proto jsme následující transportní studie prováděli pouze 24 h po transfekci. Tyto podmínky transfekce byly následně aplikovány i ve 3D modelu.

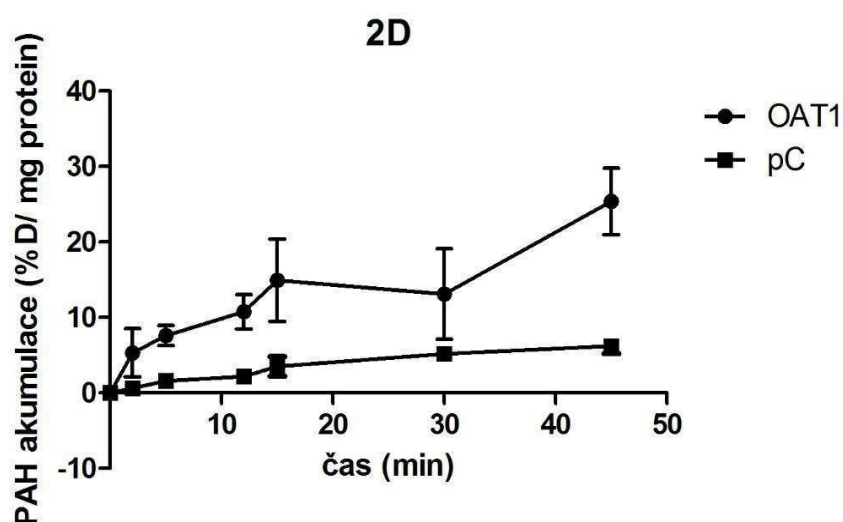


Obr. 6 Optimalizace transfekce. Porovnání akumulace [^3H]PAH v buňkách HEK293 ve 2D přechodně transfekovaných hOAT1 při různém množství a poměru DNA a transfekčního činidla. [^3H]PAH 1 μM byla s buňkami inkubována 5 min při pokojové teplotě. Transportní studie byla provedena 24 h po transfekci (a) a 48 h po transfekci (b). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného [^3H]PAH v buňkách HEK293.

6.4 Optimalizace doby inkubace s [^3H]PAH ve 2D modelu

Pro zjištění nejvhodnějšího inkubačního času buněk HEK293 s [^3H]PAH 1 μM byly buňky přechodně transfekované transportérem hOAT1 a pro kontrolu i buňky transfekované prázdným vektorem pC inkubovány s tímto substrátem v různých časových intervalech (obr. 7). Intracelulární akumulace [^3H]PAH byla lineární přibližně

do 12. min. Aby byl experiment spolehlivější, vybrali jsme kratší inkubační čas 5 min. Akumulace [³H]PAH v buňkách HEK293 transfekovaných hOAT1 byla ve všech časových intervalech mnohonásobně vyšší než v buňkách transfekovaných prázdným vektorem (pC), čímž byla potvrzena funkčnost transportní studie ve 2D modelu v den experimentu.

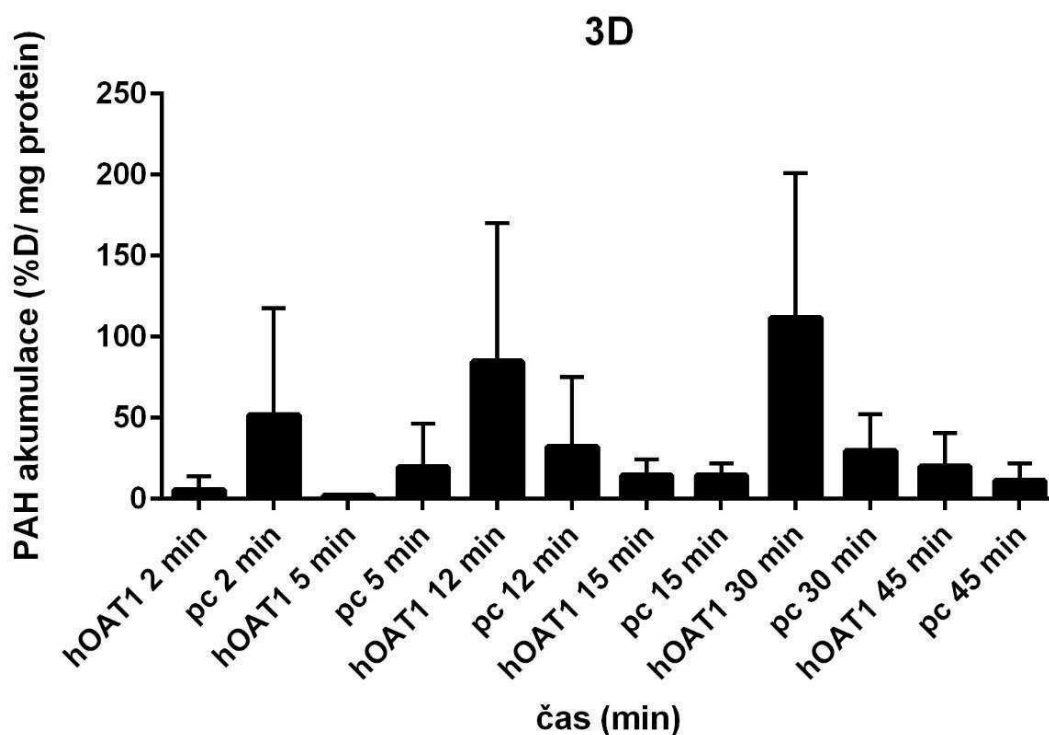


Obr. 7 Závislost akumulace [³H]PAH 1 μ M v buňkách HEK293 na čase ve 2D. Buňky byly přechodně transfekovány hOAT1 (horní křivka) a prázdným vektorem pC (dolní křivka). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného [³H]PAH v buňkách HEK293.

6.5 Optimalizace doby inkubace s [³H]PAH ve 3D modelu

Pokus č. 1

Optimální inkubační čas bylo nutné zjistit i ve 3D modelu. Z obrázku 8 lze vyčíst, že tato transportní studie není validní. Při inkubaci po dobu 2 a 5 min byla akumulace [³H]PAH 1 μ M v buňkách přechodně transfekovaných transportérem hOAT1 nižší než v kontrolních buňkách transfekovaných prázdným vektorem (pC).

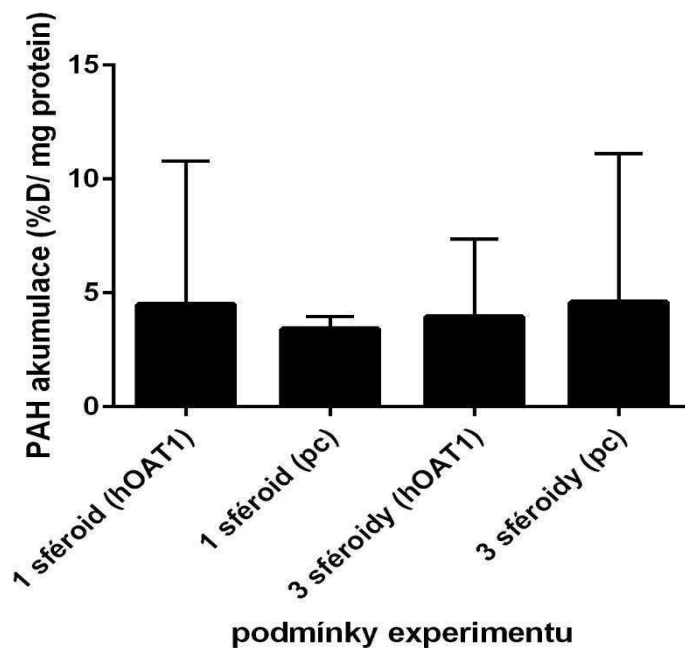


Obr. 8 Časová závislost akumulace $[^3\text{H}]\text{PAH}$ $1 \mu\text{M}$ v buňkách HEK293 přechodně transfekovaných transportérem OAT1 a prázdným vektorem pC ve 3D. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného $[^3\text{H}]\text{PAH}$ v buňkách HEK293.

Pokus č. 2

Abychom zjistili, jestli výsledky studie může ovlivnit počet sféroidů, transportní studii ve 3D modelu jsme se stejnou buněčnou linií HEK293 a se stejným transportérem hOAT1 provedli znovu s větším počtem sféroidů v mikrozkuhavce. Kontrolní sféroidy byly opět transfekovány prázdným vektorem pC. Jednak jsme použili jeden sféroid na mikrozkuhavku (12 000 buněk) stejně jako v předchozí transportní studii, jednak 3 sféroidy (36 000 buněk) na mikrozkuhavku. Buňky byly s $[^3\text{H}]\text{PAH}$ inkubovány pouze v jednom časovém intervalu (5 min).

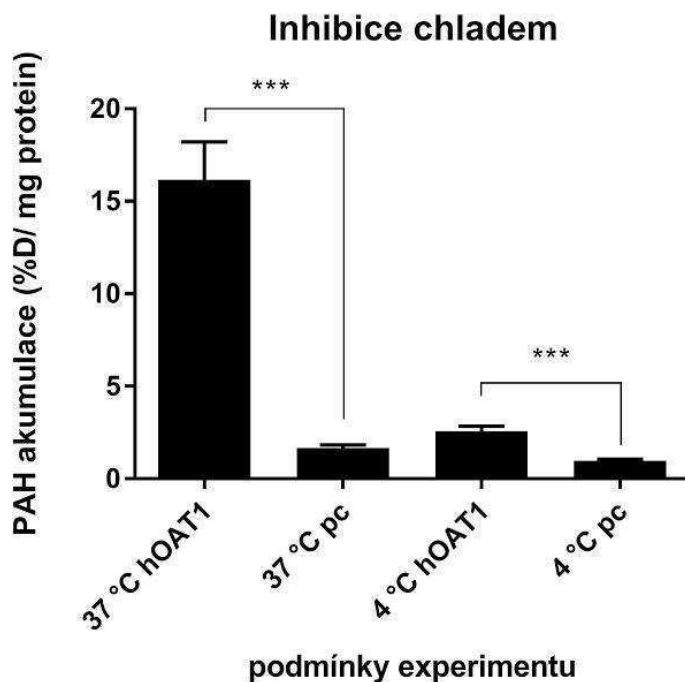
Jak ukazuje obr. 9, funkčnost transportní studie nebyla opět potvrzena. Akumulace $[^3\text{H}]\text{PAH}$ v jednom sféroidu přechodně transfekovaným prázdným vektorem pC byla jen o 1 % nižší než akumulace v jednom sféroidu transfekovaném hOAT1. Tři sféroidy s pC dokonce vykazovaly vyšší akumulaci $[^3\text{H}]\text{PAH}$ než tři sféroidy s hOAT1.



Obr. 9 Porovnání akumulace [³H]PAH 1 μM v jednom sféroиду a ve třech sféroidech. Sféroidy byly vytvořeny z buněk HEK293 a přechodně transfekovány transportérem hOAT1. Pro kontrolu byly sféroidy transfekovány také prázdným vektorem pC. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství kumulovaného [³H]PAH v buňkách HEK293.

6.6 Inhibice chladem

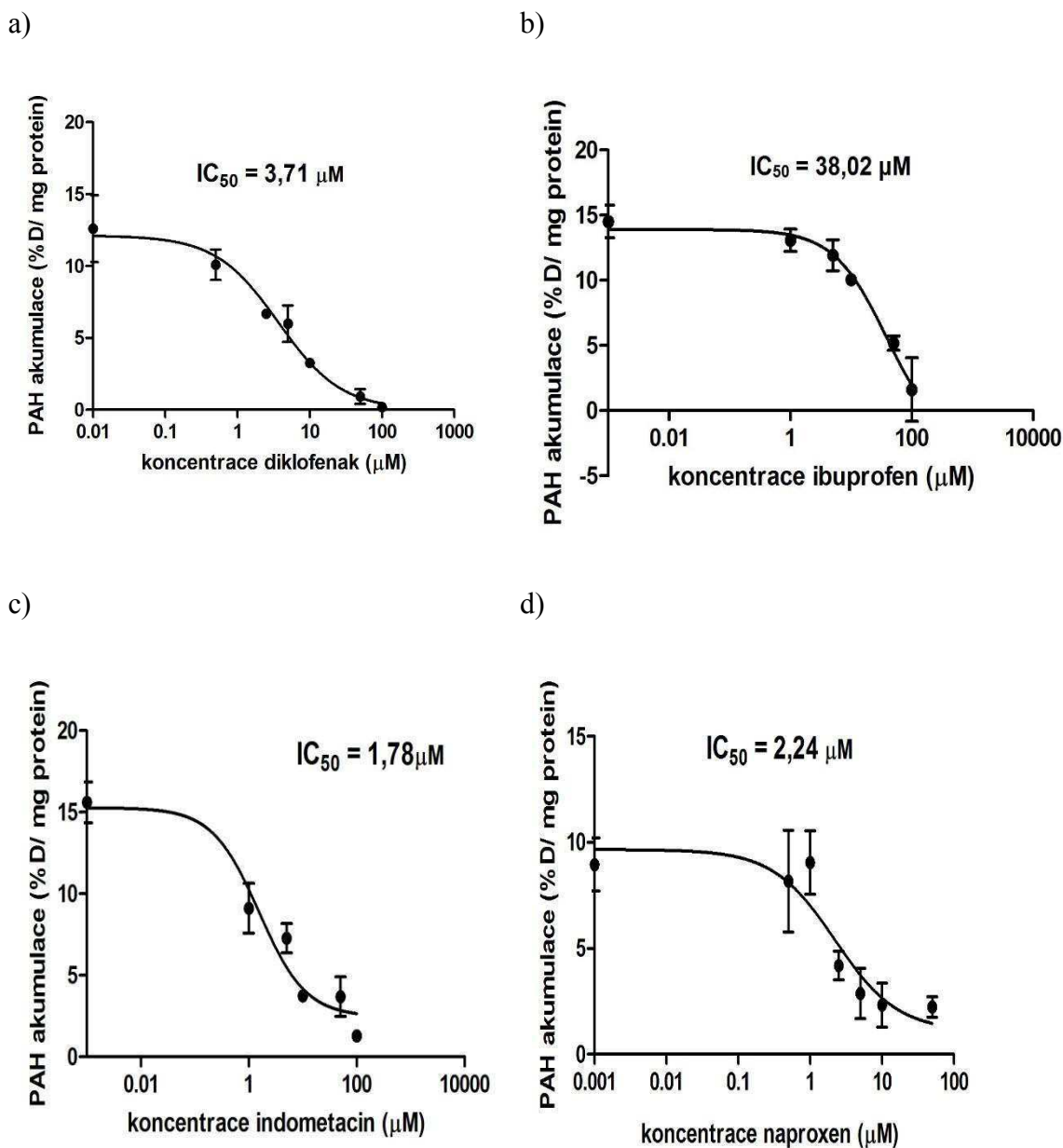
Abychom potvrdili zapojení aktivního transportu v námi vytvořeném buněčném modelu, buňky HEK293 ve 2D přechodně transfekované transportérem hOAT1 a pro kontrolu funkčnosti experimentu i buňky transfekované prázdným vektorem pC byly inkubovány s [³H]PAH 1 μM po dobu 5 min při teplotách 37 °C a 4 °C (obr. 10). Množství substrátu v buňkách s hOAT1 při inkubační teplotě 37 °C bylo přibližně 5,6× vyšší než při inkubační teplotě 4 °C.



Obr. 10 Porovnání akumulace [³H]PAH 1 μM v buňkách HEK293 ve 2D přechodně transfekovaných hOAT1 a prázdným vektorem pc při teplotě 37 °C a při snížené teplotě 4 °C. Inkubační čas byl 5 min. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± SD množství kumulovaného [³H]PAH v buňkách HEK293.

6.7 Interakce NSAIDS s transportérem hOAT1

Pro zjištění míry interakce nesteroidních antiflogistik (diklofenaku, ibuprofenu, indometacinu a naproxenu) s transportérem hOAT1 byla jednotlivá NSAIDS v různých koncentracích inkubována společně se substrátem OATs [³H]PAH a s buňkami přechodně transfekovanými hOAT1 a kontrolou po dobu 5 min při 37 °C. S rostoucí koncentrací dané testované látky se akumulace [³H]PAH v buňkách HEK293 transfekovaných hOAT1 snižuje (obr. 11). Inhibiční vliv NSAIDS na transportér hOAT1 byl posuzován pomocí parametru IC₅₀ (tabulka 7). Nejvyšší inhibiční potenciál má indometacin (nejnižší hodnota IC₅₀), nejnižší ibuprofen (nejvyšší hodnota IC₅₀). Hodnota kontrolní akumulace [³H]PAH v buňkách HEK293 přechodně transfekovaných prázdným vektorem byla odečtena.



Obr. 11 Závislost akumulace $[^3H]PAH$ v buňkách HEK293 ve 2D přechodně transfekovaných hOAT1 na logaritmu koncentrace NSAIDs diklofenaku (a), ibuprofenu (b), indometacinu (c) a naproxenu (d). Buňky byly inkubovány s $[^3H]PAH$ 1 μM s postupně se zvyšujícími koncentracemi NSAIDs po dobu 5 min při 37 °C. Data jsou prezentována jako aritmetický průměr akumulace $[^3H]PAH$ v buňkách přechodně transfekovaných hOAT1 snižený o aritmetický průměr akumulace $[^3H]PAH$ v buňkách transfekovaných prázdným vektorem pC. Z grafů byla odečtena hodnota IC_{50} jednotlivých NSAIDs.

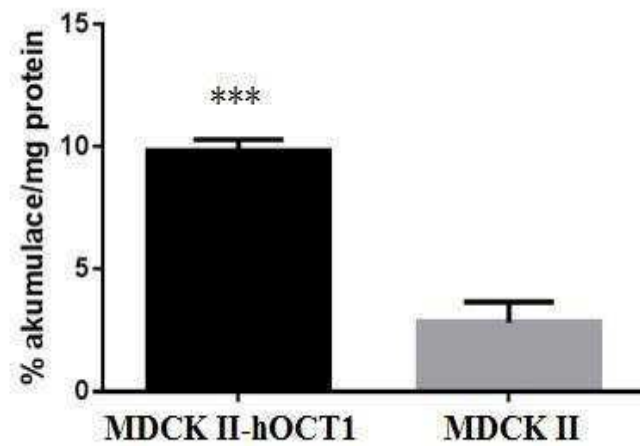
Tab. 7 Přehled hodnot IC₅₀ vybraných NSAIDs získaných při transportní studii

NSAIDs	IC ₅₀ (μM)
Indometacin	1,78
Naproxen	2,24
Diklofenak	3,71
Ibuprofen	38,02

6.8 Transportní studie s buňkami MDCK II ve 2D a 3D modelu

Pro neúspěch transportní studie s buňkami HEK293 ve 3D modelu jsme chtěli vytvořit sféroidy metodou visící kapky z odlišného typu buněk. Pro experiment jsme vybrali Madin-Darbyho psí ledvinné buňky MDCK II stabilně transfekované transportérem hOCT1. Sadili jsme 12 000 buněk na sféroid. Nicméně sféroidy se nepodařilo vytvořit. Po dvou týdnech od nasazení byly buňky stále rozptýlené a nedržely pohromadě. S dalšími experimenty ve 3D formě jsme se rozhodli nepokračovat.

Pro kontrolu funkčnosti transportéru hOCT1 v MDCK II buňkách jsme dle podmínek převzatých od kolegů ze stejného pracoviště provedli transportní studii 48 h po nasazení buněk do monovrstvy (2D model). Pipetovali jsme 200 000 buněk na jamku. Buňky byly inkubovány se standardním radioaktivním substrátem OCTs [³H]MPP⁺ 1 μM po dobu 5 min při 37 °C. Akumulace [³H]MPP⁺ v buňkách s hOCT1 (MDCK II-hOCT1) byla přibližně 3,5× vyšší než akumulace v buňkách kontrolních (parentní MDCK II) (obr. 12). Tímto jsme potvrdili správnou funkčnost tohoto buněčného modelu ve 2D formě.



Obr. 12 Akumulace $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ $1 \mu\text{M}$ v buňkách MDCK II stabilně transfekovaných transportérem hOCT1 a buňkách parentních. Buňky byly ve 2D modelu sazeny v počtu 200 000 na jamku a inkubovány s radioaktivním substrátem po dobu 5 min při 37°C . Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm SD množství akumulovaného $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ v buňkách MDCK II.

7 Diskuze

V posledních letech přibývá laboratorních experimentů prováděných na 3D buněčných modelech vytvořených různými metodami. Pro vytvoření 3D buněčné kultury v této diplomové práci jsme zvolili metodu visící kapky. Je to jednoduchá metoda, pomocí níž by měly vzniknout tvarově a velikostně homogenní sféroidy. Limitací metody je ztížený přenos sféroиду z kultivační misky. „Vylovit“ drobný sféroid z kapky buněčného média špičkou s objemem 10 μ l vyžaduje manuální zručnost a zkušenosti. Po krátké době jsme byli schopni si tuto metodiku osvojit do takové míry, abychom mohli se sféroidy bez problémů pracovat. Obecným nedostatkem 3D buněčných modelů je absence cévního systému. V důsledku toho může dojít při delší inkubaci (sféroidy z buněk HEK293 se formovaly týden) k vyčerpání živin a ke hromadění zplodin metabolismu v buňkách, což má za následek jejich odumírání. Tomuto nežádoucímu ději jsme se snažili předcházet pravidelnou a šetrnou výměnou média pipetou v každém sféroиду. Neopatrnou manipulací by mohlo dojít k odstranění i rozptýlených buněk, které se ještě nespojily do sféroиду.

Pro transfekci buněk a následnou transportní studii bylo důležité zjistit vhodný počet buněk v jednom sféroиду, což jsme provedli metodou CellTiter 96[®]. Závislost mezi absorbcí a počtem buněk HEK293 v jednom sféroиду asi od 12 000 buněk již nebyla lineární. Příčinou můžou být poznatky uvedené v předchozím odstavci. Možné také je, že činidlo dobře pronikalo do obvodových buněk sféroidu, ale hůře se dostávalo do vrstev blízkých středu, kde mohly být buňky v pevnějším spojení (*Mairs et al. 1991*). Proto jsme se rozhodli pro další experimenty vybrat 12 000 buněk na sféroid, kde byla závislost ještě lineární.

Před provedením transportní studie jsme přechodně transfekovali buňky HEK293 expresním vektorem pro transportér hOAT1 lipofekcí. Pro vyšší účinnost transfekce jsme jako transfekční médium použili Opti-MEM s minimálním množstvím séra, protože sérové proteiny mohou narušit vznik komplexu mezi DNA a lipidem, pomocí kterého je DNA dopravena do buňky. Bylo nutné optimalizovat množství a poměr DNA a transfekčního činidla. Nižší množství DNA by mohlo negativně ovlivnit účinnost transfekce, vyšší množství Lipofectaminu může působit cytotoxicky

(*ThermoFisher Protocol 2004*). Optimalizaci jsme pro zjednodušení prováděli pouze ve 2D formě buněk HEK293, jako kontrolu jsme na rozdíl od dalších experimentů zvolili z ekonomických důvodů pouze transfekční médium Opti-MEM. Efektivitu transfekce jsme vyhodnotili pomocí transportní studie za použití [³H]PAH, prototypického substrátu pro OATs. Za optimální parametry transfekce jsme zvolili 0,4 µg DNA a 1 µl Lipofectaminu.

Získané optimální parametry transfekce jsme chtěli následně aplikovat i do 3D modelu. Abychom dosáhli co nejlepšího průběhu transportní studie, bylo nutné zjistit vhodný interval mezi transfekcí a transportní studií. Vybrali jsme kratší časový interval 24 h pro menší časovou náročnost experimentu. Při vyjádření výsledků jsme brali v potaz počet buněk v každé jamce či mikrozkuhavce přepočítáním akumulace [³H]PAH v buňkách na mg proteinu.

Inhibicí chladem jsme potvrdili, že se na transportu [³H]PAH do buněk HEK293 podílí aktivní transportní procesy. Při nižších teplotách dochází k potlačení dějů v buňkách, které jsou závislé na energii, tedy i k inhibici sekundárního aktivního transportu, kterým se substrát [³H]PAH transportéru OAT1 přepravuje do buňky.

Důležitým faktorem transportní studie je inkubační doba s radioaktivně značeným substrátem. Ve 2D modelu byla závislost lineární přibližně do 12. min, proto jsme se v dalších experimentech rozhodli používat interval v mezích linearit 5 min. Ve 3D nebyla optimalizační studie validní. Nenalezli jsme žádnou závislost množství akumulace [³H]PAH v buňkách (ani u kontrol) se zvyšující se inkubační dobou. Hodnocení výsledků komplikovala i velká směrodatná odchylka. Největší vliv mohla hrát volba buněčné linie (buňky rostly v pevném shluku a byly tak transfekovány nejspíše pouze po obvodu sféroidu) nebo také obtížné pronikání transfekčního činidla do vnitřních částí sféroidu. Embryonální ledvinné buňky HEK293 jsme vybrali z důvodu snadné kultivace, transfekovatelnosti v monovrstvě a schopnosti tvořit sféroidy (*Eunjoo a Won, 2013*). Vliv na neúspěšnost experimentu mohla hrát také nestejnorodost vytvořených sféroidů. Dále na některých buňkách při transportní studii mohlo ulpět větší množství radioaktivity, která mohla vytvořit falešně pozitivní výsledky. Nicméně nespécifické vazbě na buněčné membrány jsme se snažili zabránit několikanásobným oplachem buněk vychlazeným STOP roztokem bezprostředně po experimentu.

Sféroidy vytvořené různými metodami z buněk HEK293 se dle současné literatury běžně používají k experimentům na 3D úrovni (*Jack et al. 2005*). K rychlejšímu vytvoření sféroidů (do 3 dnů) může být použita kultivační nádoba se speciálně potaženým dnem (např. látkou ELP-RGD – arginin-glycin-aspartát obsahující elastin-like proteiny) (*Eunjoo a Won, 2013*). Použitím odlišných metod kultivace 3D buněk by se mohla zabývat navazující experimentální práce.

Abychom se přesvědčili, jestli lze transportní studie provést na sféroidech formovaných z jiné buněčné linie, rozhodli jsme se použít Madin-Darbyho psí ledvinné buňky MDCK II, které byly již stabilně transfekované hOAT1. Sféroidy se ale nepodařilo vůbec vytvořit, čímž jsme potvrdili náš předpoklad, že největší vliv na neúspěchu transportní studie ve 3D modelu HEK293 buněk pravděpodobně neměla transfekce.

Dalším cílem práce bylo zkoumat interakční potenciál vybraných NSAIDs (diklofenak, ibuprofen, indometacin a naproxen) s transportérem hOAT1 ve 2D i 3D formě. Jelikož se 3D model ukázal jako nefunkční, studovali jsme tento interakční potenciál pouze ve 2D úrovni na HEK293 buňkách transfekovaných hOAT1. OATs se vyznačují širokou substrátovou specifitou. Mají schopnost přenášet oběma směry jednak různorodé organické anionty, ale také organické kationty a látky bez náboje. Bylo zjištěno, že OATs transportéry rozpoznávají látky s určitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako jsou hydrofobicita, molekulová hmotnost do 500 Da, jeden nebo více vodíků v molekule, ionizovaná molekula nebo částečně negativní náboj molekuly. Těmito vlastnostem odpovídají běžně užívaná léčiva včetně NSAIDs (*Van Aubel et al. 2000*).

Na eliminaci NSAIDs se podílejí zejména játra. V nezměněné formě ledvinami se vylučuje méně než 5 % podané dávky NSAIDs. Výjimku tvoří salicyláty, které se vylučují ledvinami z 2 % až 30 %, a indometacin (přibližně 16 % z podané dávky je exkretováno ledvinami). Na jejich vylučování se významně podílí OATs transportéry. Vylučování léčiva v nezměněné formě ledvinami může způsobit jejich poškození. Substráty transportérů pro organické anionty ze skupiny nesteroidních antiflogistik (hlavně ibuprofen) také mohou způsobit renální papilární nekrózu, která je vyvolaná kumulací v lumen ledvin, což vede ke zvýšené koncentraci léčiva na vrcholku ledvinných papil (*Khamdang et al. 2002*).

Inhibiční vliv NSAIDs na transportér hOAT1 jsme zkoumali na buňkách HEK293 ve 2D za použití substrátu [³H]PAH. Výsledky jsme vyjádřili pomocí parametru IC₅₀, který umožňuje kvantitativně porovnat inhibiční potenciál NSAIDs mezi sebou. Výsledky potvrdily závěry studie (*Khamdang et al. 2002*), že hydrofobní NSAIDs (včetně všech našich studovaných) silně inhibují transport PAH pomocí hOAT1. Studie (*Khamdang et al. 2002*) dále dokazuje, že hydrofilní NSAIDs (ta v naší studii nebyla zahrnuta) inhibují PAH prostřednictvím OAT1 v mnohem menší míře. Z testovaných NSAIDs má podle literatury (*Khamdang et al. 2002*) nejvyšší inhibiční potenciál indometacin, který má největší molekulovou hmotnost (357,79 Da) a nejvyšší hydrofobicitu ($\log P_{o/v} = 3,93$) (*Pubchem*). IC₅₀ jednotlivých NSAIDs se v obou studiích mírně lišily v řádu jednotek (diklofenak, indometacin, naproxen), IC₅₀ ibuprofenu v řádu desítek. Tyto rozdíly mohly být způsobeny použitím odlišné buněčné kultury. My jsme použili lidské embryonální ledvinné buňky, ve zmíněné studii pracovali s S2 myšimi buňkami. Výsledky mohla ovlivnit také odlišná inkubační doba NSAIDs s radioaktivním substrátem (my jsme inkubovali 5 minut oproti 2 minutám). Důvodem také mohla být nepřesnost v pipetování.

Podle další literatury (*Mulato et al. 2000*) má největší schopnost inhibovat hOAT1 opět indometacin (IC₅₀ = 3 μM), nejméně inhiboval hOAT1 ibuprofen (IC₅₀ = 8 μM). Experiment byl prováděn na buňkách vaječníků čínského křečka stabilně transfekovaných hOAT1. Jako substrát byl tentokrát použit [³H]adefovir.

Inhibice OATs transportérů může vést k interakcím se současně podanými léčivy, které se vylučují pomocí těchto transportérů. Inhibice OATs chrání ledviny před poškozením, protože se dané léčivo musí vylučovat jinou cestou. Nicméně se může léčivo hromadit v organismu a vyvolat nežádoucí účinky. NSAIDs (nejvíce indometacin a ketoprofen) vykazují klinicky významnou lékovou interakci s metotrexátem, léčivem užívaným k léčbě nádorů, lupénky, revmatoidní artritidy atd. Metotrexát je eliminován hlavně aktivní tubulární sekrecí transportéry pro organické anionty. Při současném podání NSAIDs a metotrexátu NSAIDs zablokují tyto transportéry, vzroste plazmatická koncentrace metotrexátu, která vyvolá nežádoucí účinky metotrexátu (*Uwai et al. 2000*). NSAIDs (nejvíce opět ketoprofen a indometacin) také inhibují renální exkreci antivirotika adefoviru prostřednictvím hOAT1, čímž snižují jeho nefrotoxicitu (*Mulato et al. 2000*). Z našich testovaných látek je právě indometacin nejsilnějším inhibitorem

hOAT1 ($IC_{50} = 1,78 \mu M$), což je v souladu s výše zmíněnými publikacemi o klinicky významných interakcích s metotrexátem a adefovirem. Ze studovaných NSAIDs se právě indometacin nejvýše vylučuje ledvinami a má nejvyšší afinitu k hAOT1.

Nicméně NSAIDs se z velké části vážou na plazmatické proteiny a volná plazmatická koncentrace může být nižší než hodnota IC_{50} jednotlivých nesteroidních antiflogistik, proto se interakční potenciál těchto látek *in vitro* a *in vivo* může značně lišit. U transportérů OAT3 je tento vliv nižší, protože hodnoty IC_{50} NSAIDs u tohoto transportéru jsou nižší (*Khamdang et al. 2002, Mulato et al. 2000, Nozaki et al. 2007*).

8 Závěr

- Z buněčné linie HEK293 jsme vytvořili 2D buněčný model ve formě monovrstvy a 3D buněčný model ve formě sféroidu pomocí metody visící kapky.
- 2D buněčný model jsme po optimalizaci transfekovali lipofekcí expresním vektorem kódujícím transportér hOAT1 a pro kontrolu prázdným vektorem. Úspěšnost transfekce byla potvrzena pomocí transportní studie se značeným substrátem [³H]PAH.
- Vytvořili jsme 3D buněčný model z buněk HEK293 metodou visící kapky. Po pokusu o transfekci transportérem hOAT1 ovšem transportní studie neprokázala funkčnost takto připraveného 3D modelu.
- Na 2D modelu jsme pomocí transportní studie stanovili inhibiční potenciál NSAIDs (diklofenaku, ibuprofenu, indometacinu a naproxenu) k transportéru hOAT1. Inhibiční potenciál jsme vyjádřili pomocí parametru IC₅₀.
- Pořadí studovaných NSAIDs podle vzrůstajícího inhibičního potenciálu bylo: ibuprofen, diklofenak, naproxen, indometacin.

9 Literatura

- Achilli TM, McCalla S, Meyer J, Tripathi A, Morgan JR. Multilayer Spheroids To Quantify Drug Uptake and Diffusion in 3D. *Mol. Pharm* 2014;11:2071-2081.
- 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;36:963-988.
- Bobulescu IA, Moe OW. Renal Transport of Uric Acid: Evolving concepts and uncertainties. *Adv Chronic Kidney Dis* 2012;19(6):358-371.
- Botting R, Ayoub S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;72:85-87.
- Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2012;18:240-249.
- Cha SH et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 2001;59:1277-1286.
- Dalby B et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004;33(2):95-103.
- Duan P, Li S, Ai N, Hu L, Welsh WJ, You G. Potent inhibitors of human organic anion transporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization. *Mol Pharm* 2012;9(11):3340-3346.

- Edmondson R, Broglie J, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12(4):207-218.
- Eunjoo K, Won BJ. Expression Analysis of 3D Spheroid Culture of Human Embryonic Kidney Cells. *Toxicol Environ Health Sci* 2013; 5(2):97-106.
- Eraly SA, Hamilton BA, and Nigam SK. Organic anion and cation transporters occur in pairs of similar and similarly expressed genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:333-342.
- Foty R. Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Vis Exp* 2011;(51):2720.
- Höglund P, Nordström K, Schiöth H, Fredriksson R. The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Mol Biol Evol* 2011;28(4):1531-1541.
- Jack GD et al. Long term metabolic arrest and recovery of HEK293 spheroids involves NF- κ B signaling and sustained JNK activation. *J Cell Physiol* 2005; 206: 526-536.
- Jonker J, Schinkel A. Pharmacological and Physiological Functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308(1):2-9.
- Karra D, Dahm R. Transfection Techniques for Neuronal Cells. *J Neurosci* 2010;30(18):6171-6177.
- Kapalczyńska M et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* přijato, 2016.

- Khamdang S et al. Interactions of Human Organic Anion Transporters and Human Organic Cation Transporters with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 303(2):534-539.
- Khan KH. Gene Transfer Technologies and their Applications: Roles in human diseases. *J Exp Biol* 2010;1(1):208-218.
- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010;397(8):3173–3178.
- Koepsell H, Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 2004;447(5):666-676.
- Kuze K et al. Heterologous expression and functional characterization of a mouse renal organic anion transporter in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999;274: 1519-1524.
- Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 2008;3(9-10):1172-1184.
- Mairs RJ, Angerson WJ, Babich JW, Murray T. Differential penetration of targeting agents into multicellular spheroids derived from human neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res* 1991;366:495-501.
- Masuda S, Saito H, Inui KI. Interactions of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs with Rat Renal Organic Anion Transporter, OAT-K1. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1039-1042.
- Mulato AS, Ho ES, and 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;295:10-15.

- 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):105-167.
- Nozaki et al. Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:1162-1170.
- Riedmaier AE, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M, Koulu M. Organic Anion Transporters and Their Implications in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2012;64 (3):421-449.
- Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol* 2004;2:51-62.
- Rosypal S a kolektiv. *Nový přehled biologie*. Praha 2003, 59-60, 643-648. ISBN 80-7183-268-5.
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 2012; 165(5):1260-1287.
- Sweet DH, Bush KT, and Nigam SK. The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic. *Am J Physiol* 2001;281:197-205.
- Teslim OA et al. Side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: The experience of patients with musculoskeletal disorders. *Am J Health Res* 2014;2(4):106-112 .
- Uwai Y, Saito H, Inui K. Interaction between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in organic anion transporter. *Eur J Pharmacol* 2000;409(1): 31-36.

Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(2):216-232.

Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998;104(3):2-8.

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

You G. Structure, function and regulation of renal organic anion transporters. *Med Res Rev* 2002;22: 602-616.

Elektronické dokumenty

Promega materiál. Technical bulletin. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. 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 15. 3. 2017

Citace v textu: (*Promega 2012*)

ThermoFisher materiál. Manuals. Opti-MEM® I Reduced Serum Media. USA. Dostupné na URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/OPTI_MEM_I_reduced_serum_PI.pdf. Přístup 28. 2. 2017.

Citace v textu: (*ThermoFisher 2014*)

ThermoFisher materiál. Protocol. Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent.

Dostupné na URL:

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/lipofectamine-reagent-suitable-for-the-transfection-of-dna-into-eukaryotic-cells.html>. Přístup 28. 2. 2017.

Citace v textu: (*ThermoFisher Protocol 2004*)

Thermo Scientific materiál. Instructions. Micro BCA™ Protein Assay Kit. 23235. USA.

Dostupné na URL:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011237_Micro_BCA_Protein_Asy_UG.pdf. Přístup 2. 5. 2017.

Citace v textu: (*Thermo Scientific*)

Internetové stránky

Pubchem. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Přístup 5. 5. 2017.

Citace v textu: (*Pubchem*)

Solvo Biotechnology. All about transporters. Revised 2017. Dostupné na URL:

<http://www.solvobiotech.com/knowledge-center/all-about-transporters>.

Přístup 2. 5. 2017.

Citace v textu: (*Solvobiotech Transporters 2017*)

Solvo Biotechnology. Uptake Transporter Assay. Revised 2017. Dostupné na URL:

<http://www.solvobiotech.com/technologies/uptake-transporter-assay>. Přístup 2. 5. 2017.

Citace v textu: (*Solvobiotech Assay 2017*)

Thermo Scientific. Technical Reference Library. Transfection Basics. Dostupné na

URL: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics.html>. Přístup 2. 5. 2017.

Citace v textu: (*Thermo Scientific Transfection 2017*)