

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

***IN VITRO* TESTOVANIE CYTOTOXICITY A HEMATOTOXICITY
VYVÍJANÝCH LIEČIV**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vedúca diplomovej práce: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Anna Ďurinová

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

Anna Ďurinová

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala svojej vedúcej diplomovej práce PharmDr. Lucii Hyršovej, Ph.D. za odborné vedenie pri vykonávaní experimentálnej časti, cenné rady, trpezlivosť, ochotu a čas pri vypracovávaní diplomovej práce. Ďalej ďakujem PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D. za poskytnutie chemických podkladov k tejto práci.

V neposlednom rade patrí vďaka mojej rodine, ktorá mi bola veľkou podporou.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Anna Ďurinová

Školiteľ: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: *In vitro* testovanie cytotoxicity a hematotoxicity vyvíjaných
liečiv

Predklinické hodnotenie liečiv je dôležitou fázou zrodu nového lieku, popisuje testovania látok pred tým, ako sa podajú ľuďom. Táto práca sa zameriava na experimentálne meranie cytotoxicity a hematotoxicity, ktoré sú dôležitými súčasťami predklinického výskumu. Testy *in vitro* cytotoxicity predstavujú jednu zo vstupných metód skúmania budúcich liekov. Viabilita, živitascnosť, bola sledovaná na modelovej bunkovej línii HepG2. Hodnotenie viability bolo prevádzané získaním parametru IC_{50} , tj. koncentrácie látky, pri ktorom stráca životnosť polovica kultivovaných buniek. Ďalej bola študovaná stabilita červených krviniek potkanej krvi po podaní testovaných látok, čiže bola pozorovaná *in vitro* hemolýza, ktorá je dobrým ukazovateľom efektu a bezpečnosti látok. Pri stanovovaní hemolytického efektu sa sleduje hodnota EC_{50} , ktorá spôsobí hemolytický účinok na 50 % skúšaných erytrocytoch. Taktiež boli pozorované najvyššie koncentrácie, ktoré nevyvolávali hemolytický účinok, teda kedy nedošlo k prekročeniu medze 10 % hemolytickej aktivity pozitívnej kontroly. Hemolytický účinok bol stanovený na základe štruktúrnej podobnosti so sulfonamidmi. Testované látky, rovnako ako sulfonamidy, sa z chemického hľadiska definujú ako deriváty *p*-aminobenzoovej kyseliny, jedná sa o jedenásť látok s antimikrobiálnym účinkom.

Väčšina skúšaných látok vykazovala hemolytický účinok porovnateľný s HEPES pufrom, nehemolytickým štandardom. Hemolytický účinok bol pozorovaný u celkom troch látok. Všetky skúmané látky vykázali so zvyšujúcou sa koncentráciou negatívny vplyv na viabilitu HepG2 bunkovej línii, avšak hodnoty IC_{50} boli vždy nad 100 μ M. Vo veľkom množstve klinicky používaných liečiv sa však účinná koncentrácia pohybuje v jednotkách až desiatkach μ M, z toho vyplýva, že látky môžeme z tohto hľadiska považovať za vhodné pre ďalšie testovanie.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anna Ďurinová

Supervisor: PharmDr. Lucie Hyršová, PhD.

Title of diploma thesis: *In vitro* testing of cytotoxicity and hematotoxicity of drugs in development

Preclinical drug evaluation is an important stage in development of new drug, it describes testing substances before they may be carried out in humans. This work is focused on the experimental measurement of cytotoxicity and hematotoxicity, which are parts of preclinical research. *In vitro* cytotoxicity tests are one of the first methods used for investigating novel drugs. Viability was monitored in the HepG2 model cell line. The viability evaluation was performed by obtaining parameter IC_{50} , the concentration of substance at which half of the cultured cells lose their viability. We studied the stability of rat red blood cells after administration of the tested substances, so we observed *in vitro* hemolysis, which is a good indicator of substances effect and safety. The EC_{50} value is monitored to determine the hemolytic effect. The EC_{50} concentration causes a hemolytic effect on 50% of tested erythrocytes. The no observed effective concentration parameter was also observed, when the 10% limit of positive control's hemolytic activity was not exceeded. The hemolytic effect was determined on basis of structural similarity to sulfonamides. Antibacterial sulfonamides are structural analogues of our investigated substances. The test substances, as well as sulphonamides, are chemically defined as *p*-aminobenzoic acid derivatives, there are eleven potential substances with antimicrobial activity. Most of the tested substances showed a hemolytic effect comparable to HEPES buffer, a non-hemolytic standard. Three of substances appear to have hemolytic effect. HEPES buffer is needed for reading of the background absorbance. All test substances showed a negative effect on the viability of the HepG2 cell line with increasing concentration, but IC_{50} values were always above 100 μ M. However, in a large number of clinically used drugs, the effective concentration is in the range of units up to tens of μ M. This implies that the substances can be considered suitable for further testing.

Obsah

1	Zoznam skratiek.....	8
2	Úvod.....	9
3	Teoretická časť.....	10
3.1	Predklinické skúšky	10
3.2	Využitie laboratórných zvierat.....	11
3.3	Zaradenie tkaninových kultúr a počítačových modelov do štúdií	12
3.4	Testy toxicity.....	14
3.4.1	Testy akútnej toxicity	14
3.4.2	Test na chronickú toxicitu	15
3.4.3	Testy teratogenity	15
3.4.4	Draizov očný test.....	16
3.4.5	Test kožnej dráždivosti.....	17
3.4.6	Testy mutagenity	18
3.4.7	Testy kancerogenity	19
3.5	Význam testovania hemolytických vlastností.....	20
3.6	Rozdiely medzi potkaními a ľudskými erytrocytmi	20
3.6.1	Hematologické parametre.....	21
3.6.2	Vlastnosti krvi a erytrocytov	21
3.7	Hemolýza	22
3.7.1	Hemolyzujúce látky.....	24
3.7.2	Rozdelenie hemolýzy podľa príčiny	24
3.7.3	Hemolýza <i>in vivo</i>	25
3.8	Stanovenie cytotoxicity.....	29
4	Ciele práce	33
5	Experimenálna časť	34
5.1	Materiál	34

5.1.1	Prístroje a zariadenia	34
5.1.2	Ďalší použitý materiál	34
5.1.3	Ďalšie použité chemikálie	34
5.1.4	Použitá bunková línia	35
5.2	Testované látky	35
5.3	Metódy	38
5.3.1	Príprava roztoku HEPES	38
5.3.2	Príprava 2 % suspenzie erytrocytov	38
5.3.3	Proces prípravy vzoriek a meranie absorbancie	39
5.3.4	Kultivácia buniek	40
5.3.5	Stanovenie vplyvu vývojových látok na viabilitu HepG2 buniek...	40
6	Výsledky	42
6.1	Hodnotenie hemolytickej aktivity testovaných potencionálnych liečiv	42
6.2	Hodnotenie vplyvu testovaných potencionálnych liečiv na bunkovú viabilitu	49
7	Diskusia	56
8	Záver	60

1 Zoznam skratiek

AIHA	autoimunitné hemolytické anémie
ATC	metóda akútnej toxickej kategórie
ATP	adenozíntrifosfát
BK	biele krvinky
ČK	červené krvinky (erythrocyty)
DIHA	Imunitná hemolytická anémia vyvolaná liečivom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDP	procedúra fixnej dávky
G6PD	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
HA	hemolytická anémia
IC₅₀	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia
IgG	imunoglobulín G
LD₀₅	minimálne smrteľná dávka
LD₅₀	stredná smrteľná dávka
LDH	laktátdehydrogenáza
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium
NADH	nikotínamidadeníninukleotid
NADPH	nikotínamidadeníninukleotidfosfát
UDP	metóda nahor-dole
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

2 Úvod

Proces vývoja nových liečiv prešiel v poslednom storočí silným rozvojom. Bolo objavené obrovské množstvo nových účinných látok i celá rada nových farmakologických skupín. Inovatívny liek má prinášať možnosti vyliečenia doposiaľ neliečiteľných chorôb alebo kvalitatívne nové možnosti terapie, očakáva sa taktiež väčšia bezpečnosť liečby a pozitívne ovplyvnenie kvality života. Jeho použitie by malo byť prínosom i z hľadiska farmakoekonomického. Vývojový program lieku spočíva v hľadaní dôkazov o účinnosti a bezpečnosti lieku v podmienkach experimentálnych a následne i klinických (Suchý, Hora et al. 2009).

Antibiotiká sú významné v liečbe bakteriálnych ochorení a prispievajú k zníženiu úmrtnosti na infekcie. Vzrastajúca rezistencia však ohrozuje pacientov a je významnou verejne-zdravotníckou hrozbou (Demitrovičová 2017). Začiatkom roku 2017 vydala WHO (Svetová zdravotnícka organizácia) globálne prioritný zoznam antibioticky rezistentných baktérií, pre ktoré sú potrebné nové antibiotiká. Jedná sa napríklad o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a iné (WHO 2017). Vďaka nárastu počtu ťažko imunokompromitovaných pacientov stúpa aj počet invazívnych mykotických infekcií (Demitrovičová 2017).

Existuje však široká škála parametrov, predklinických skúšok, ktoré je potrebné otestovať a vyhodnotiť ešte pred tým, než bude potencionálne nové liečivo podané prvým ľudským dobrovoľníkom v rámci prvej fáze klinického hodnotenia liečiv. Bezpečnosť subjektov hodnotenia je najdôležitejší parameter a vždy sa naň musí brať ohľad (Suchý, Hora et al. 2009).

Testovanie cytotoxicity je jedným z prvých biologických hodnotení, ktoré sa využíva v *in vitro* testovaní. V priebehu tohto náročného procesu sa sleduje rast, reprodukcia a morfológické zmeny buniek vplyvom skúmaných látok. Zisťovanie cytotoxicity potenciálnych nových liečiv je preferované ako jeden z pilotných testov (Li, Zhou et al. 2015). Taktiež mechanická stabilita červených krviniek, čiže sledovanie hemolýzy, je dobrým indikátorom efektu a bezpečnosti látok pri ich testovaní (Sharma and Sharma 2001).

3 Teoretická časť

3.1 Predklinické skúšky

Predklinické skúšanie liečiv je charakterizované hľadáním dôkazov o účinnosti novej substancie (farmakodynamický „screening“) a riziku (toxikologický „screening“) (Suchý, Hora et al. 2009). Predklinické štúdie prebiehajú na rôznych úrovniach výskumu a delia sa na dve základné skupiny – *in vitro* a *in vivo* experimenty (Součková, Kostková et al. 2015).

Vývoj nových liečiv prechádza niekoľkými fázami, z nich každá je nezastupiteľná a zásadná pre ďalšie testovanie (Švihlovec et al. 2018). Vývoj nového lieku prebieha obvykle v troch na seba nadväzujúcich štádiách:

1. Štádium základného výskumu
2. Štádium predklinického výskumu
3. Štádium klinického výskumu (Součková, Kostková et al. 2015).

Skôr ako môže byť nová látka skúmaná v klinických skúškach u ľudí, musia sa získať rozsiahle dáta o celom spektre jej účinkov a tiež o možných vedľajších účinkoch z výskumu na zvieratách. Okrem dôkazu účinnosti v predklinických modeloch, ktoré majú pochopiteľne obmedzenú validitu, sa predklinické testovanie snaží odhaliť riziká, ktoré by s používaním danej látky mohli byť spojené. Predklinické testovanie tak zahŕňa predovšetkým testy farmakodynamiky, farmakokinetiky (Švihlovec et al. 2018) (u sľubných látok sú prevádzané farmakokinetické skúšky (Suchý, Hora et al. 2009). Okrem iných sa jedná o nasledujúce testy:

- akútna toxicita – dosiahnutie letálneho účinku po podaní jednej dávky
- subakútna a chronická toxicita – účinok opakovaných dávok liečiva, dôležité predovšetkým u liečiv určených na dlhodobé užívanie
- účinky na reprodukčné funkcie vrátane teratogenity
- kancerogenita
- mutagenita
- špeciálne toxikologické testy (do tejto kategórie spadajú napr. testy na miestnej dráždivosti)

Okrem vyššie uvedených testov je treba doplniť ešte ďalšie údaje: maximálna tolerovateľná dávka (= maximálna dávka bez špecifikovaného toxického účinku),

minimálna smrteľná dávka (= najmenšia dávka, ktorá spôsobí letálny účinok; táto hodnota môže byť nahradená hodnotou LD₀₅, tj. dávka, ktorá usmrtí 5 % pokusných zvierat) apod. Rozšírenou kvantitatívnou hodnotou je tzv. LD₅₀, tj. stredná smrteľná dávka, pri ktorej je usmrtených 50 % pokusných zvierat. Táto hodnota je stále využívaná k porovnaniu toxicity rôznych látok vo vzťahu k terapeutickým dávkam (Starobová, Landa et al. 2006).

3.2 Využitie laboratórnych zvierat

K prevedeniu testov toxicity je potreba spravidla 2-5 rokov. Predklinické testovanie je stále nutné vykonávať na laboratórnych zvieratách, pretože iba živý organizmus môže poskytnúť spoľahlivé údaje, ktoré je možné extrapolovať na človeka (Švihlovec et al. 2018).

Tieto predklinické štúdie sa prevádzajú obvykle na zdravých zvieratách, ale v niektorých prípadoch taktiež i na zvieratách s modelovým ochorením, u ktorých sa navodzuje patologický stav (Součková, Kostková et al. 2015). Na patologicky zmenenom organizme môžeme sledovať účinok takýchto potenciálnych liečiv, ktoré by u zdravého zvieratá nevyvolali žiaden efekt. Vhodným príkladom môžu byť látky s potenciálne antihypertenzným, antipyretickým účinkom, ďalej analgetickým a antiflogistickým pôsobením, rovnako látky z obsiahlej skupiny psychofarmák a mnoho ďalších (Starobová, Landa et al. 2006).

Prenos toxikologických údajov zo zvierat na človeka nie je úplne spoľahlivý. Súhrnné toxikologické dáta pre akúkoľvek látku, získané na rôznych druhoch laboratórnych zvierat, však majú veľkú predpovednú hodnotu pre odhad toxicity u človeka. Je veľmi málo pravdepodobné, že sa podarí odhaliť veľmi vzácne nežiadúce účinky. Toto žiaľ platí i pre oblasť klinických skúšok (Starobová, Landa et al. 2006).

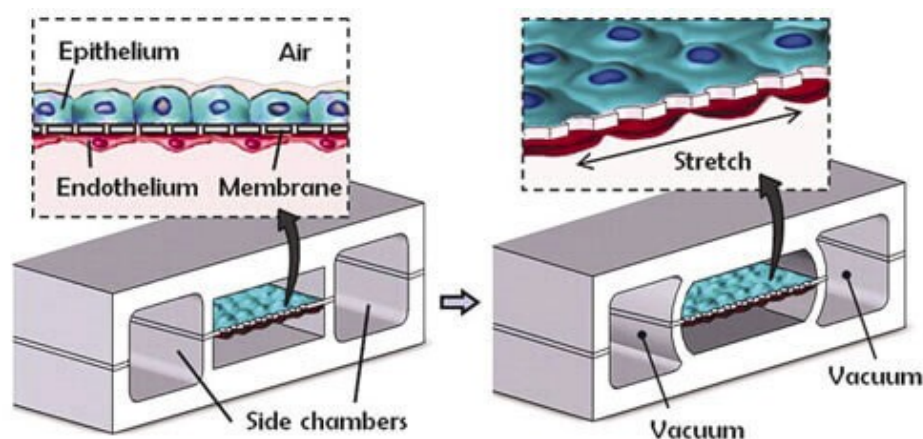
Na *in vivo* modeloch sa študujú a overujú základné farmakokinetické vlastnosti, vyvíjajú sa analytické metódy na stanovenie danej látky z plazmy/moču, slúžiace ako podklad pre nastavenie metodiky detekcie u ľudí. Prevádzajú sa štúdie subchronickej a chronickej toxicity, špeciálnej toxikológie so zameraním na mutagenitu, teratogenitu, kancerogenitu. Stanovujú sa vodné dávky a sleduje sa vzťah medzi dávkou a výskytom nežiadúcich účinkov. Vždy je potreba vykonať vyššie spomenuté testy minimálne na dvoch zvieracích druhoch. Z hlodavcov sa často využíva myš domová, škrečok zlatý, potkan hnedý alebo morča domáce. Z nehlodavcov sa potom volí najčastejšie medzi

králikom domácim, mačkou domácou, psom domácim alebo sviňou domácou. Definuje sa maximálne tolerovateľná dávka, ktorá následne slúži k odvodeniu dávky, ktorá bude po prvýkrát podaná ľuďom v rámci klinického hodnotenia fázy I. Cieľom predklinických štúdií je zhodnotenie novej účinnej látky z hľadiska bezpečnosti, účinnosti a potenciálu pre klinické použitie. Všetky predklinické štúdie sú prevádzané za dodržania etických štandardov zachádzania s laboratórnymi zvieratami v súlade so správnou laboratórnou praxou v akreditovanom zariadení (Součková, Kostková et al. 2015).

3.3 Zaradenie tkaninových kultúr a počítačových modelov do štúdií

Stále viac sú využívané i tkaninové kultúry či počítačové modely, ich využitie pre predikáciu účinku liečiva u človeka je však obmedzené (Švihlovec et al. 2018).

Existujú matematické a počítačové 3D modely, ktoré znázorňujú orgány, tkanivá a bunky živého organizmu. Za využitia vhodných programov je možné potom na takýchto modeloch simulovať napr. vzájomné chovania určitej látky a zvieracieho či ľudského organizmu. Významnou alternatívou k pokusom na zvieratách sú taktiež *in vitro* modely. (Starobová, Landa et al. 2006). Príkladom môže byť nová *in vitro* metóda tzv. organ on chip mikrofluidné aparatúry, ktoré simulujú relevantnejšie fyziologické prostredie. Príkladom môže simulácia dýchajúcich pľúc na čipe (viz. Obr. 1), baktériami obývané črevo na čipe alebo simulácia aterosklerózy. Paleta orgánových systémov využívajúcich organ on chip je široká a je stále viac a viac rozširovaná (van der Helm, van der Meer et al. 2016) alebo co-culture systém, vďaka ktorému je umožnená kultivácia viacerých druhov tkanív naraz, sledujúc ich vzájomný efekt vedúci k priblíženiu fyziologických podmienok (Carter and Shieh 2015). Paleta *in vitro* metód je široká a zahrňuje bunkové a tkanivové kultúry ľudských a zvieracích buniek, ako i systémov s nízkymi organizmami ako sú baktérie alebo huby, metódy biochemických analýz apod. (Starobová, Landa et al. 2006).



Obr. 1 *In vitro* metóda organ on chip simulujúca alveo-kapilárnu membránu počas dýchania. Prevzaté z: Mauriac et al. (2017)

Například vyššie uvedené stanovenie hodnoty LD_{50} , tj. strednej letálnej dávky, pri ktorej je usmrtených 50 % pokusných zvierat, môže byť dnes v určitých prípadoch nahradit' testovaním na bunkových kultúrach. Princíp spočíva v tom, že ľudské alebo iné cicavčie kultúry buniek sú vystavené pôsobeniu testovanej látky. Aby sa odkrylo široké spektrum možného škodlivého pôsobenia látky, je vhodné použiť viac druhov buniek vykazujúcich rozdielne vlastnosti, funkcie a stupeň diferenciácie. Za účelom stanovenia toxicity danej látky sú zvlášť vhodné hepatocyty, pretože pečeň je najvýznamnejším metabolickým orgánom zodpovedným za biotransformáciu rady liekov a xenobiotík obecné. Týmto spôsobom potom môže byť stanovená tzv. IC_{50} (= polovičná maximálna inhibičná koncentrácia), tj. množstvo látky, pri ktorom stráca životnosť polovica kultivovaných buniek. K testovaniu môžu byť využité nielen bunky zvieracie, ale taktiež ľudské, ktoré sú preferované. Testy s bunkovými kultúrami môžu byť ďalej kombinované s inými *in vitro* metódami (Starobová, Landa et al. 2006).

Taktiež vhodným materiálom pre výskum sú nádorové bunkové línie. Nádorové bunky sa líšia od normálnych buniek, spravidla sa lepšie množia a obecné ľahšie kultivujú. Kultúry normálnych buniek majú obmedzenú životnosť, po niekoľkých pasážach dochádza k tzv. zostarnutiu kultúry – bunky zmenia svoje vlastnosti a prestanú sa deliť. Nádorové bunky väčšinou starnutiu nepodliehajú (Vejražka, 2008). Aj napriek stále pokračujúcemu vývoju nových vedeckých metód a s tým súvisiacou redukciou počtu pokusov na zvieratách, majú a do budúcnosti stále budú mať svoje nezastupiteľné miesto pri vývoji nového liečiva (Starobová, Landa et al. 2006).

3.4 Testy toxicity

3.4.1 Testy akútnej toxicity

Testy akútnej toxicity sú prevádzané na stanovenie efektu jednej dávky na konkrétny druh zvierat'a. Vo všeobecnosti je odporúčané, aby testy akútnej toxicity boli uskutočnené na dvoch rozličných druhoch zvierat (jeden hlodavec a jeden nehlodavec). Pri testoch akútnej toxicity je testovaná látka podávaná v rozličných dávkach a efekt je sledovaný počas 14 dní. Všetky úmrtia spôsobené skúmanou látkou počas experimentálneho obdobia sú zaznamenané a sú skúmané morfológické, biochemické, patologické a histologické zmeny v mŕtvych zvieratách. Hodnota LD₅₀, známa ako stredná smrteľná dávka, po podaní spôsobuje smrť u 50-% testovaných zvierat. LD₅₀ bola používaná v minulosti ako indikátor akútnej toxicity. Determinácia LD₅₀ zahŕňa veľké množstvo zvierat a percento uhynutých zvierat je vysoké. Kvôli týmto limitom boli vyvinuté nové metódy:

- Procedúra fixnej dávky (The fixed dose procedure, FDP),
- Metóda akútnej toxickéj kategórie (The acute toxic category method, ATC),
- Metóda nahor-dole (The up-and-down method, UDP).

FDP metóda sa používa na stanovenie nonletálnej toxicity radšej ako podanie letálnej dávky. Skúmaný produkt je podaný v dávkach 5, 50, 500 a 2000 mg/kg a experimentálne zviera je pozorované počas konkrétneho obdobia.

ATC metóda je sekvenčná procedúra v ktorej tri zvieratá rovnakého pohlavia sú použité v každom kroku. V tejto metóde môžu byť použité štyri vopred určené dávky a testovaná dávka by mala byť vybraná na základe globálne harmonizovaného systému.

UDP testovanie je taktiež poznané ako „schodiskový“ dizajn. Tento toxikologický prístup je najviac odporúčaný rôznymi regulačnými agentúrami, pretože táto metóda redukuje počet stavovcových zvierat vo výskume. Dávka, ktorá je menšia ako odhadnutá dávka LD₅₀ je vybraná a podaná zvierat'u, ktoré je následne pozorované počas 48 hodín. Ak prežije, štúdia pokračuje s vyššou dávkou (dvojnásobok pôvodnej dávky), ak zviera zomrie, testovanie je prevádzané s nižšou dávkou a iným zvierat'om rovnakého pohlavia ako bolo pôvodné zviera (Parasuraman 2011).

3.4.2 Test na chronickú toxicitu

Chronická toxicita je definovaná ako nežiadúci účinok po opakovanom alebo pretrvávajúcom podaní testovanej vzorky. U hlodavcov toto obdobie trvá zvyčajne 6 mesiacov. Kvôli dlhšiemu trvaniu štúdie narastá aj počet zvierat, ktoré sú zúčastnené tejto štúdie. Deje sa to z dôvodu snahy zvýšenia štatistickej významnosti (De Jong et al., 2012).

Presná povaha a trvanie chronických testov závisí od povahy zamýšľaného použitia skúmanej látky. Základom chemicky indukovanej toxicity je, že toxicita súvisí priamo s koncentráciou chemikálie v mieste efektor. Preto by mala byť dostatočne nízka koncentrácia akejkoľvek chemikálie kompatibilná s biologickým systémom na neurčitú dobu. Tvrdenie, že ak daná koncentrácia chemickej látky vyvolá toxicitu za 1 mesiac, potom polovica tejto danej koncentrácie by spôsobila rovnakú toxicitu za 2 mesiace neplatí.

Klinické testy krvi, analýza moču a počet krviniek by sa mali vykonávať v 6 až 12 týždňových intervaloch alebo v prípade, že zvieratá ochoreli, alebo by sa mali prejaviť účinky testovanej chemikálie.

Často je žiaduce získať dôkaz o reverzibilnej povahe chronicky vyvolaných toxických látok. Ak sa v priebehu štúdií o chronickej toxicite zistí, že zvieratá v skupine s vysokou dávkou postupujú k smrteľným účinkom, môže byť táto skupina zvierat rozdelená na párové skupiny, v ktorých je podávanie chemikálie prerušené u jedného z páru. V čase smrti jedného z páru je druhý zabitý; u zvierat sa vykoná úplné patologické hodnotenie a vykoná sa hodnotenie týkajúce sa reverzibilnej povahy toxicity. Všetky zvieratá v štúdiách chronickej toxicity sa nakoniec podrobia úplnému patologickému vyhodnoteniu (Loomis and Hayes 1996).

3.4.3 Testy teratogenity

Teratogény sú xenobiotiká a ďalšie látky, ktoré spôsobujú malformácie vo vyvíjajúcom sa zárodku. Ukázalo sa, že mnoho chemikálií spôsobuje embryotoxicitu. Niektoré látky sú prevažne smrteľné, zatiaľ čo iné sú väčšinou schopné vyvolať malformácie plodu. Rozdiel v type embryotoxického účinku vyvolaného rôznymi

chemickými látkami je hlavne v dávkach a v štádiu tehotenstva, kedy je plod vystavený testovanej zlúčenine.

Preukázalo sa, že aj iné faktory ako chemické látky, vyvolávajú abnormálny vývoj plodu počas gravidity u laboratórných zvierat. Niektoré z týchto faktorov sú diétne nedostatky, vírusové infekcie, hypertermia, hormonálna nerovnováha a rôzne stresové stavy.

Aj keď je známych veľa chemických látok, ktoré sú schopné vyvolať teratogénne zmeny u laboratórných zvierat, dokázalo sa, že u ľudí vyvoláva takéto účinky iba niekoľko zlúčenín. Myši, potkany a králiky sú najčastejšie používané zvieratá pri testoch teratogenity. Využívajú sa nielen z dôvodu predchádzajúcich skúseností s týmito druhmi, ale aj z dôvodu ich dostupnosti vo väčšine laboratórií a preto, že použitý počet môže byť dosť veľký na to, aby vyhovel štatistickým požiadavkám. Rozsah dávok, ktorý sa vyberie pre túto skupinu, by mal byť taký, aby najvyššia dávka nebola pre matku vážne toxická a najnižšia dávka bez ovplyvniteľného účinku na matku

Poradie všetkých teratologických testov je: (1) vyvolať tehotenstvo, (2) potvrdiť tehotenstvo a podať testované látky, (3) preukázať teratogénny účinok. Testy by sa mali vykonávať na dvoch druhoch zahŕňajúcich najmenej tri koncentrácie dávok v rôznych skupinách zvierat. Potkanom a myšiam sa podáva dávka (testovaná chemická látka, placebo alebo pozitívna kontrolná látka) denným dávkovaním od 7. do 15. dňa gravidity. Tehotenstvo sa preruší tesne pred vypočítaným dátumom narodenia odstránením mláďat cisárskym rezom. Matka podstúpi úplnú pitvu. Všetky plody sú dôkladne a systematicky vyšetrované na výskyt malformácií. Ak sa u pokusných zvierat nenájdu žiadne plody, má sa za to, že došlo k potratom a pokus by sa mal opakovať s použitím menších dávok (Loomis and Hayes 1996).

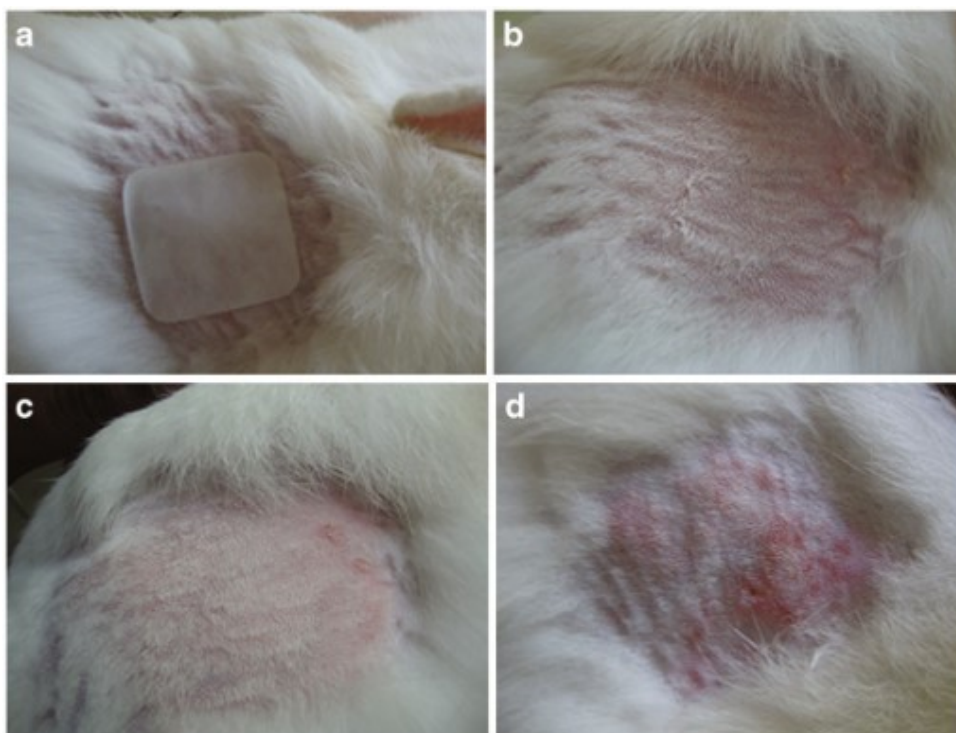
3.4.4 Draizov očný test

Draizov očný test, ktorý zahŕňa aplikáciu testovanej zlúčeniny do oka znehybneného, vedomého zviera (zvyčajne králik), je kontroverzným testom toxicity s pochybnou aplikovateľnosťou na ľudské oko. Na základe snahy vyhnúť sa tomuto testu je to veľký záujem o nájdenie alternatívnych testovacích stratégií, vrátane *in silico* modelov. Rôzne *in silico* programy, vrátane Dereka Nexusa, MCASE, ToxTree

a TOPKAT, hlásili vysokú špecifickosť (do 80 %) pri predikcii podráždenia očí (Ford 2016).

3.4.5 Test kožnej dráždivosti

Dráždivosť kože je hlavným toxikologickým koncovým ukazovateľom pre dermatológiu a kozmetické výrobky (Ford 2016). V oboch prípadoch sa látka podáva na vyholené, prípadne vydepilované miesto (viz Obr. 2). Malo by sa dbať, aby počas tohto procesu nedošlo k poškodeniu kože. Taktiež pred a po teste je zvieratá odvážené (OECD 1992). Buehlerov test morčat'a a maximalizačný test na morčatách sa bežne uskutočňujú na hodnotenie potenciálu molekuly dráždiť kožu, hoci aplikácia výsledkov pre ľudí nie je istá. Okrem toho testy na dráždivosť kože často zahŕňajú podávanie adjuvans, ktoré môžu spôsobiť bolesť zvierat, takže je potrebné tieto testy nahradiť. Niekoľko *in silico* programov vrátane Derek Nexus, MCASE, ToxTree a TOPKAT bolo hlásených, že predpovedajú dráždivosť kože s pôsobivým stupňom presnosti až 90 % (Ford 2016).



Obr. 2 Fotky testov kožnej dráždivosti: (a) aplikácia náplaste na vyholenú časť kože; (b) pokožka zajaca v deň aplikácie; (c) pokožka testovaného zajaca po siedmych

dňoch aplikácie (d) pokožka štandardnej skupiny zajacov po siedmych dňoch aplikácie s vyvolaným edémom. Prevzaté z: Panchaxari, Pampana et al. (2013)

3.4.6 Testy mutagenity

Mutagény sú skupinou látok na ktoré sa kladie dôraz pri bezpečnostných hodnoteniach, kvôli ich potenciálnemu vplyvu na ľudské zdravie, hlavne na prispievanie formácie tumoru (Ford 2016). Pod termínom mutagenita rozumieme permanentné zmeny v štruktúre a/alebo množstve genetického materiálu organizmu, ktoré môžu viesť k dedičným zmenám vo funkcii, zahŕňa tiež mutácie ako štrukturálne a početové chromozómové zmeny (Eastmond, Hartwig et al. 2009).

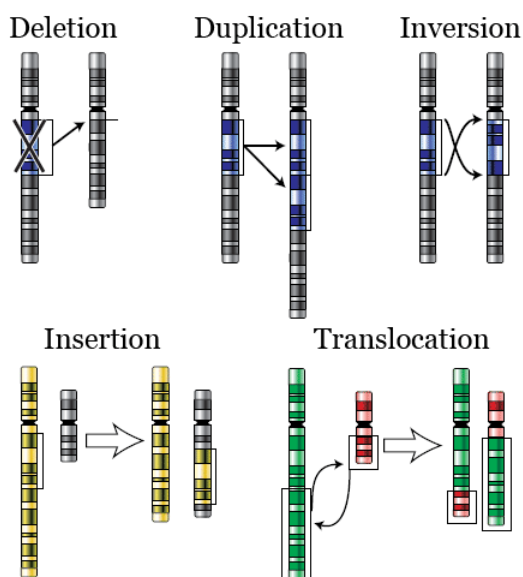
In vivo testovanie

In vivo testy mutagenity sú finančne a časovo náročné a vyžadujú veľký počet zvierat, kvôli štatistickým výsledkom (Ford 2016). Predtým ako sa pristúpi k *in vivo* testom, pokračuje sa v *in vitro* štúdiách na optimalizáciu *in vivo* testovania. Testy *in vivo* by sa mali byť vyberané starostlivo, aby sa predišlo neinformatívnym výsledkom a bral sa ohľad na podmienky zvierat. Preto je potrebné starostlivo zvážiť toxikokinetiku, metabolizmus a chemickú reaktivitu. Testy *in vivo* sa môžu použiť aj na vyhodnotenie reakcie na dávku, rozdielov druhov alebo spôsobu určenia účinku. Použitie takýchto testov sa musí posudzovať od prípadu k prípadu na účely posúdenia rizika (Eastmond, Hartwig et al. 2009).

In vitro testovanie

Testy mutagenity sa používajú na zistenie submikroskopických zmien v bazických častiach DNA zahrňujúce duplikácie, insercie, inverzie a translokácie (viz Obr. 3) (Parasuraman 2011). Určité typy mutácií končia karcinogenezou a inými dedičnými ochoreniami, determinácia mutagenity je nevyhnutná vo vývoji lieku (Eastmond, Hartwig et al. 2009). *In vitro* testovanie je prevádzané v dvoch alebo troch rozličných baktériách a cicavčích bunkách (Parasuraman 2011). Testy mutagenity sú vo všeobecnosti založené na kombinácii testov na stanovenie troch hlavných koncových bodoch génových poškodení asociovaných s ľudskými ochoreniami: génová mutácia,

klastogenicitu a aneuploidiu. Test vo všeobecnosti zahŕňa bakteriálnu reverznú správu o mutácii. Rozhodnutie o pridaní testov závisí na chemickej štruktúre/triede látky. *In vivo* mutagenita, ktorá je závislá na dávke sa používa k dôkazu case-by-case základných rizík hodnotenia testovanej látky. Testy mutagenity s transgénovými zvieratami sú viac vhodné techniky na dokázanie toxicity testovanej substancie (Eastmond, Hartwig et al. 2009)



Obr. 3 Chromozómové mutácie: delécia, duplikácia, inverzia, inzercia, translokácia. Prevzaté z: Wilkin, and Brainard (2012)

3.4.7 Testy kancerogenity

Hlodavce i nehlodavce môžu byť použité v testoch karcinogenity. Testy sú prevádzané na väčšom počte živočíchov (Parasuraman 2011). Zahrňujú okolo 860 zvierat (Ford 2016). Počas a po vystavení k testovanej látke, experimentálne zvieratá sú sledované pre znaky toxicity a rozvoj tumorov. Ak nie sú nájdené, test môže byť ukončený po 18 mesiacoch v prípade myši a škrečka, po 24 mesiacoch v prípade potkana. Ak sú zvieratá zdravé, hematologická analýza je prevedená po 12 a 18 mesiacoch samostatne a štúdia je napokon ukončená. Zvieratá sú usmrtené, patologické zmeny sú zaznamenané a taktiež sú prevedené histopatologické štúdie na všetkých tkanivách (Parasuraman 2011).

Veľké množstvo zvierat použitých v štúdiu učinili predikciu kancerogenity jednou z hlavných ohnísk výpočtovej toxikológie počas posledných 30 rokov. Rada *in silico* modelov bola publikovaná s líšiacim sa stupňom presnosti. Porovnávacia štúdia siedmich

in silico modelov odkryla, že chyba v predpoklade v každom programe bola vysoká (presnosť bola menšia alebo rovná 70 %), avšak, vyhodnotenie taktiež poukázalo, že programy boli úspešné v rozlišovaní genotoxických od negenotoxických karcinogenov (Ford 2016).

3.5 Význam testovania hemolytických vlastností

Pri hemolýze dochádza k poškodeniu červených krviniek, ktoré vedie k uvoľneniu intracelulárneho obsahu erytrocytov do krvnej plazmy. Erytrocyty tvoria približne 45 % objemu krvi. Ak dôjde k hemolýze *in vivo*, môže to viesť k anémii, žltacke a ďalším patologickým stavom, ktoré by mohli ohroziť život. Hemoglobín je dominantný intracelulárny proteín erytrocytov. Hrá kľúčovú úlohu pri prenose kyslíka do iných buniek a tkaniva. Extracelulárny hemoglobín uvoľňovaný po hemolýze je však toxický a môže ovplyvniť tkanivá ciev, myokardu, obličiek a centrálného nervového systému. Preto všetky zdravotnícke pomôcky a lieky, ktoré prichádzajú do styku s krvou, sa musia testovať na potenciálne hemolytické vlastnosti (Neun, Ilinskaya et al. 2015).

3.6 Rozdiely medzi potkaními a ľudskými erytrocytmi

V posledných rokoch sa evolučná biológia stala dôležitou súčasťou medicínskej dedukcie. Evolúciou podmienenými faktormi existujú medzidruhové rozdiely či už vo fyziologických dejoch alebo v konkrétnych vlastnostiach orgánov, buniek (Baskurt and Meiselman 2013).

Erytrocyty boli študované do hĺbky ako modelové bunky kvôli viacerým dôvodom:

- sú zjednodušeným modelom bunkových plazmatických membrán kvôli neprítomnosti jadra a organel;
- ich hemolýza sa dá ľahko monitorovať pomocou spektrofotometrie v dôsledku uvoľňovania hemoglobínu,
- ich veľké množstvo; a ich význam v hematológii (Manaargadoo-Catin, Ali-Cherif et al. 2016).

3.6.1 Hematologické parametre

Príkladom medzidruhových rozdielov môže byť počet červených krviniek. V štúdiu, kde bolo porovnávaných viacero druhov (zahŕňala aj ľudské a potkanie erythrocyty) bol sledovaný výskyt väčšieho počtu červených krviniek u potkanov ($7,84 \pm 1,12 \times 10^{12}/l$) ako u človeka ($5,09 \pm 0,6 \times 10^{12}/l$). Taktiež stredný objem erythrocytov bol výrazne nižší u potkanov ($58,5 \pm 4,17$ fl) v porovnaní s človekom ($92,78 \pm 8,13$ fl). Priemerná koncentrácia hemoglobínu v červenej krvinke bola vyššia oproti ľudským hodnotám (potkan: $27,54 \pm 3,45$ g/dl; človek: $26,24 \pm 2,65$ g/dl) (Kiss, Toth et al. 2016).

Hematokritové hodnoty u človeka i potkana sú $0,4$ l / l (40 %), hoci počet ČK potkanov bol podstatne vyšší ako u ľudskej vzorky; dôvodom tohto rozdielu je oveľa menší stredný objem erythrocytu potkana (Baskurt, Farley et al. 1997).

3.6.2 Vlastnosti krvi a erythrocytov

Bolo pozorované, že reologické vlastnosti krvi sa môžu medzi druhmi výrazne líšiť, hoci základná štruktúra ich krvi je relatívne podobná. U všetkých cicavcov je krv zložená z hemoglobín nesúcich červených krviniek (ČK a malého množstva bielych krviniek (BK) suspendovaných v plazme. U takmer všetkých cicavcov, ČK sú pri normálnych fyziologických podmienkach bikonkávne disky, zatiaľ čo ich priemerná veľkosť sa môže medzi druhmi líšiť. Veľkosť zvieratá rovnako ako veľkosť ich ČK nie sú jediné determinanty hemoreologického správania. Zistilo sa, že zloženie plazmy sa líši medzi druhmi, no tento faktor sám o sebe neposkytuje uspokojivé vysvetlenie hemoreologických zmien. Stupeň agregácie rôznych druhov závisí na ich pohybovej kapacite - je vyšší u atletických druhoch (Baskurt, Farley et al. 1997).

Tendencia k agregácii potkaních červených krviniek v plazme a taktiež v dextrane 70 je výrazne nižšia v porovnaní s človekom. Ostatné reologické nálezy zahŕňajú menšie zmeny v deformačných indexoch červených krviniek za rovnakých hodnôt rozsahu šmykového napätia a nižšiu časovú konštantu rekonvalescencie tvaru. Potkanie ČK mali tiež vyššie rozdeľovacie koeficienty dvojfázového vodného polyméru, čo naznačuje vyšší povrchový náboj (Baskurt, Farley et al. 1997).

Metabolizmus výrazne závisí na veľkosti tela, väčšie zvieratá majú pomalší metabolizmus vzhľadom na ich veľkosť. Tým pádom, menšie cicavce potrebujú väčší

kyslíkový transport do ich tkanív a tak potrebujú viac efektívne prúdenie krvi. Z toho vyplýva, že druhy s menšou veľkosťou tela môžu mať výhodu z redukovanej agregácie červených krviniek – hlavný determinant krvnej viskozity (Baskurt and Meiselman 2013).

Erytrocyty môžu taktiež rozlične reagovať na rôzne časti postupov pri úprave. Z pokusov bolo zistené, že pri centrifugácii nastávajú zmeny v agregáčnych faktoroch. Pri štúdiu agregácie červených krviniek, ak je možné, by sa malo vyhnúť centrifugácii počas prípravky vzorku (Kiss, Toth et al. 2016).

Membránové proteíny: hlavné membránové proteíny sa nachádzali u oboch druhov a mali takmer identickú molekulárnu váhu. Pri elektroforéze sa ale jedine u človeka našiel pás 6 (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), ktorý u potkana chýbal (Baskurt, Farley et al. 1997).

Potkanie membrány červených krviniek majú veľmi vysoký pomer poly- k mononenasýteným mastným kyselinám a majú vysoký rozdeľovací koeficient v dvojfázových systémoch, ktoré nie sú citlivé na náboj. Potkanie ČK majú tiež vysoký rozdeľovací koeficient v dvojfázovom systéme citlivom na náboj, čo naznačuje vysoký povrchový náboj, ktorý môže byť zodpovedný za nízku tendenciu k agregácii. [21]

Zotavenie tvaru pre potkanie ČK bolo tiež nižšie v porovnaní s ľudskými ČK, pretože zotavenie tvaru je úmerné pomeru povrchovej viskozity membrány ČK k membránovému šmykovo -elastickému modulu (Baskurt, Farley et al. 1997).

3.7 Hemolýza

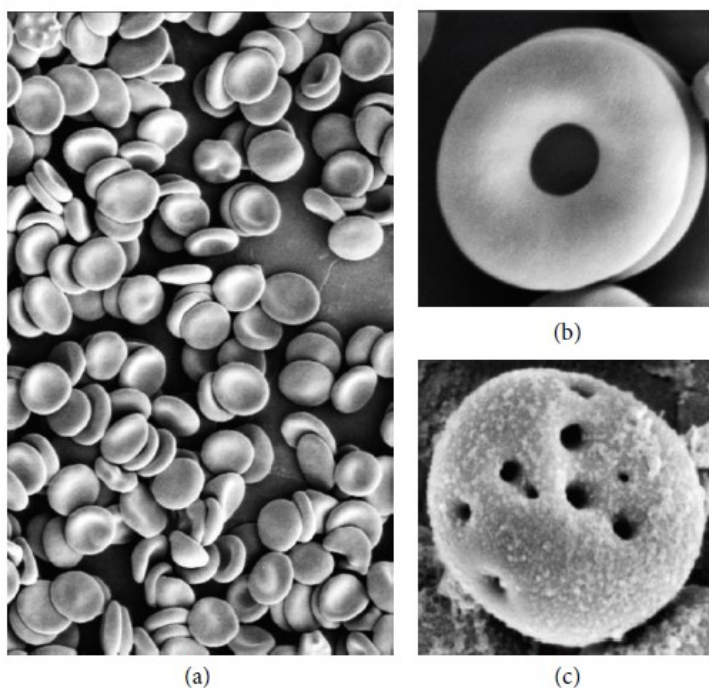
Červené krvinky sú i napriek svojej značnej pružnosti a deformovateľnosti citlivé voči rôznym vplyvom. Ich membrána sa reverzibilne alebo ireverzibilne porušuje niektorými fyzikálnymi a chemickými činiteľmi a obsah erytrocytu vyteká von z bunky. Tento jav sa nazýva hemolýza (viz Obr.4) (Trojan et al. 2003).

Mechanická stabilita membrány erytrocytov je dobrým ukazovateľom účinku rôznych zlúčenín za cieľom skríningu cytotoxicity a závisí na fyzikálnych a štrukturálnych vlastnostiach. Je taktiež známe, že pri infekčných ochoreniach sa vyskytuje hemolýza kvôli pôsobeniu mikrobiálnych produktov a parazitov. Membrána erytrocytov, sama o sebe, je dynamickou štruktúrou, ktorá môže diktovať významné

zmeny v jej interakciách, najlepšie viditeľné s detergentami a známou, liekmi indukovanou hemolýzou.

Hemolýza sa najlepšie hodnotí pomocou metódy *in vitro*, ktorá môže preukázať účinok zvyšujúcej sa koncentrácie a sigmoidálny súvis s logaritmom kontaktného času, ako sa skúmalo u rôznych povrchovo aktívnych látkach. Kinetika takejto časovej závislosti môže byť určená celkom pokojne a presne pomocou rýchlostných konštánt prvého rádu, ktoré sa získajú vypočítaním sklonov a môže zachytávať rôzne činidlá. Význam tohto porovnania je zvýraznený väčším rozdielom medzi dávkami s pozorovateľným účinkom a hemolytickými aktivitami *in vitro* (Sharma and Sharma 2001).

Nevyhnutnou súčasťou predklinického vývoja je hodnotenie biologickej kompatibility lieku s krvnými zložkami v podmienkach *in vitro*. Väčšina *in vitro* štúdií hemolýzy indukovanej časticami hodnotí percentuálnu hemolýzu spektrofotometricky detegovaním derivátov hemoglobínu bez plazmy po inkubácii častíc s krvou a potom oddelením nepoškodených buniek odstredením. Inkubačná doba, vlnová dĺžka, pri ktorej sa kvantifikuje hemoglobín, a krvné podmienky (napr. použitie čistených erytrocytov namiesto celej krvi a zahrnutie rôznych antikoagulancií) sa medzi jednotlivými štúdiami významne líšia. Okrem týchto premenných môžu rozdiely v relatívnej odstredivej sile, čase, podmienkach uchovávaní krvi a zdrojoch krvi následne komplikovať porovnanie výsledkov z rôznorodých štúdií (Dobrovolskaia, Clogston et al. 2008).



Obr. 4 Sledovanie ĆK so znakmi hemolýzy elektrónovým mikroskopom. Obrázok (a) ukazuje ĆK s normálnym bikonkávnyim tvarom bez známok poškodenia; (b) a (c) vykazujú známky hemolýzy, punkčné diery v membráne ĆK. Prevzaté z: (Mustafa, Al Marwani et al. 2016).

3.7.1 Hemolyzujúce látky

Stav a vitalita erytrocytov môže byť ovplyvnená viacerými vplyvmi. Hemolýza nastáva za rozličných podmienok ako je zmena fyzikálnych vlastností okolia, vystavenie toxickým látkam, atď.

3.7.2 Rozdelenie hemolýzy podľa príčiny

Osmotická hemolýza – V hypotonickom prostredí prijímajú krvinky vodu, zdurujú sa a v dôsledku toho sa menia na guľu. Dôjde k vzniku membránových defektov, ktorými uniká hemoglobín a ďalšie látky. Normálne erytrocyty majú voči hypotonickým roztokom odolnosť, t.j. začnú hemolyzovať až pri určitom stupni hypotonického prostredia, ktorému sú vystavené. Staršie erytrocyty sú fragilnejšie a hemolyzujú skôr.

V hypertonicom roztoku naopak krvinky vodu odovzdávajú a zvrášťujú sa. Táto zmena tvaru môže byť tak intenzívna, že dôjde takisto k poškodeniu membrány.

Fyzikálna hemolýza – Nastáva napr. pri silnom trepaní, šľahaní, pôsobení ultrazvuku, vysokej alebo nízkej tepote a pod.

Chemická hemolýza – Spočíva v účinku látok, ktoré rozpúšťajú alebo chemicky reagujú s lipidmi v membráne erytrocytu. Sem patrí vplyv tukových rozpúšťadiel, silných kyselín a zásad, látok silno znižujúcich povrchové napätie, rastlinných glykozidov saponínov a pod.

Toxická hemolýza – Môžu ju spôsobiť niektoré bakteriálne toxíny, hadie, protozoárne či rastlinné jedy.

Imunologická hemolýza – Nastáva hlavne ako patologický fenomén pôsobením komplementu. Jeho lytickými účinkami vznikajú membránové defekty a z bunky unikajú makromolekuly i bez osmotického zdurenia (napr. pri inkompatibilnej transfúzii) (Trojan et al. 2003).

3.7.3 Hemolýza *in vivo*

Pomocné látky

Nielen účinná látka môže spôsobovať hemolýzu, ale taktiež pomocné látky. Napríklad pri podávaní liečiv injekčnou formou podania, je dôležité aby kosolvent nespôsovoval bolesť. Bolesť môže byť pripisovaná intravenóznemu podaniu lieku vyplývajúca z uvoľnenia hemoglobínu z erytrocytov do plazmy. Uvoľnený hemoglobín môže mať za následok vaskulárne podráždenie, flebitídu, anémiu, žltacku, kernicterus, akútne zlyhanie obličiek a v niektorých prípadoch smrť. Niektoré lieky samotné sú hemolytické, ale o vodnej formulácii je tiež známe, že spôsobuje hemolýzu. Hodnotenie hemolytického potenciálu parenterálnej formulácie je dôležité. Napriek významu hemolytického potenciálu rôznych formulácií existujú v literatúre značne protichodné informácie týkajúca sa hemolytického potenciálu rôznych pomocných rozpúšťadiel. Nezrovnalosti vyplývajú z rozdielov v testovacích metódach, najmä v objemových pomeroch krvi na rozpúšťadle, časoch kontaktu a statických dynamických testovacích metódach. Rozdiely môžu súvisieť aj s krvnými bunkami rôznych druhov a ich citlivosťou na túto hydrolyzu (Amin and Dannenfels 2006).

Tri z deviatich formulácií naznačujú hemolýzu *in vivo*, čo zodpovedá 61 – 100 %, 37 – 97 % a 30 – 53 % hemolýzy u ľudí, králikov a psov. Vo všetkých prípadoch je možné pozorovať vyššie percento hemolýzy u ľudí, po ktorých nasleduje králik a pes. Hemolytické medzné hodnoty pre rôzne druhy sú len približné a sú zastúpené percentuálnou hemolýzou: ľudia 10 % alebo viac, psi medzi 10 % a 29 % a pre králiky medzi 0 % a 37 %. Všeobecne platí, že 10 % a 25 % hemolýza je relatívna hranica, inými slovami, akákoľvek hodnota hemolýzy pod 10 % sa považuje za nehemolytickú, zatiaľ čo hodnoty nad 25 % sa považujú za hemolytické (Amin and Dannenfelsler 2006).

Pri detekcii *in vitro* sa zistilo, že 40 % a 60 % propylénglykol, resp. 40 % propylénglykol + 10 % etanol vo vode spôsobujú hemolýzu. Napriek tomu v niektorých komerčne dostupných produktoch sa nachádza 40 % propylénglykol (napr. fenobarbital, fenytoin, digoxin). Tento rozpor je akceptovateľný, pretože hemolýza je komplexná udalosť ovplyvnená množstvom faktorov. Napríklad hemolytický účinok vehikula sa môže eliminovať použitím pomalšej rýchlosti vstrekovania, čím sa zníži koncentrácia pomocnej látky v mieste vpichu injekcie (Amin and Dannenfelsler 2006).

Hemolytické anémie

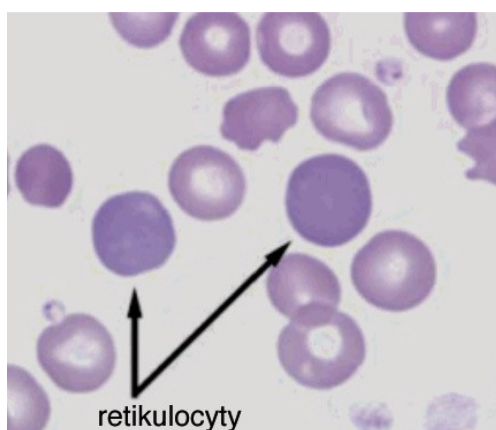
Príčinou hemolytických anémií je nerovnovážny stav medzi nadmerným rozpadom erytrocytov (hemolýzou) a kompenzačnou funkciou kostnej drene. Príčina skráteného prežívania erytrocytov môže byť priamo v samotnej krvinke – ide o korpuskulárne hemolytické stavy, alebo o extrakorpuskulárne hemolytické stavy, kedy je život erytrocytu skrátený kvôli vplyvom vychádzajúcim z prostredia, v ktorom sa krvinka pohybuje, teda mimo krvinku samotnú (Kafková 2005).

Imunitný systém

Imunitná hemolytická anémia vyvolaná liečivom (DIIHA) je zriedkavá; môže byť mierna alebo spojená s akútnou hemolytickou anémiou (HA) a smrťou. Za príčinu sa považuje asi 125 liekov. HA môže byť spôsobená protilátkami nezávislými od liečiva, ktoré sú nerozlíšiteľné *in vitro* a *in vivo* od autoprotílátok spôsobujúcich idiopatickú autoimunitnú hemolytickú anémiu s tepelnými protilátkami (AIHA). Bežnejšie sú protilátky závislé od liečiva (t.j. budú reagovať *in vitro* iba v prítomnosti liečiva). Najbežnejšie lieky spôsobujúce DIIHA sú antimikrobiálne látky (napr. cefotetan, ceftriaxon a piperacilín), ktoré sú spojené s protilátkami závislými od liečiv.

Najbežnejším liekom spôsobujúcim AIHA je cytostatikum fludarabín. Zistenie, ktorý liek spôsobuje problém a zastavenie tohto lieku, je prvým prístupom k liečbe (Garratty 2010).

Autoimunitné hemolytické anémie (AIHA) najviac zapríčiňujú tepelné protilátky (70 % prípadov) a môžu byť primárne alebo sekundárne pri autoimunitných ochoreniach (systémový lupus erytematosus), lymfoproliferatívnych ochoreniach (malígne lymfómy vrátane chronickej lymfocytovej leukémie), monoklonových gamapatiách a pri užívaní niektorých liekov (antihypertenzívum metyldopa). Podtyp AIHA s chladovými protilátkami môže takisto byť idiopatický alebo sekundárny pri infekčných ochoreniach (infekčná mononukleóza, tuberkulóza, syfilis), malígnych lymfómoch a paroxyzmálnej chladovej hemoglobinúrii. Na hemolýzu treba myslieť, keď dôjde k náhlemu poklesu hemoglobínu bez prejavov krvácania, a to najmä vtedy, keď sa zvýši počet retikulocytov, nezrelých ČK (nad 1,5 %) (viz Obr. 5). Vzostup nekonjugovaného bilirubínu je včasným ukazovateľom hemolýzy, konjugovaný bilirubín ostáva v norme. Vyšetrenie moču na bilirubín je negatívne. Haptoglobín sa významne znižuje, resp. chýba. Pri masívnej hemolýze stúpa plazmatická LDH (laktátdehydrogénáza). Základným vyšetrením je priamy a nepriamy antiglobulínový (Coombsov) test. Podstatou testov je dôkaz antierytrocytových protilátok triedy IgG s aktivovanou zložkou komplementu C3. Pri priamom Coombsovom teste sa dokazujú imúnne antierytrocytové protilátky, ktoré sa naviazali na erytrocyty *in vivo*. Pri nepriamom Coombsovom teste sa po inkubácii vyšetřovaného séra so známymi typovými erytrocytmi dokazujú cirkulujúce protilátky v sére pomocou heteroimúnneho séra proti ľudským imunoglobulínom (Stančiaková, Flochová et al. 2015).



Obr. 5 Retikulocyty viditeľné v krvi. Prevzaté z: Lisowska (2011)

Imunitné hemolytické anémie vyvolané liekmi

V tejto skupine sa rozlišujú dva základné typy hemolytickej anémie: po podaní antihypertenzného lieku alfa-metyldopa a klasické liekmi vyvolané imunohepatolytické anémie.

V prvom prípade sa nachádzajú v sére pacienta protilátky typu IgG namierené proti určitým antigénom, ktoré reagujú s normálnymi erytrocytmi aj za neprítomnosti lieku. V laboratórnych podmienkach sa chovajú ako tepelné protilátky proti Rh systému. Prvýkrát sa dokázali u pacientov po podávaní alfa-metyldopy, ale môžu sa objaviť aj po nesteroidných antireumatikách. Predpokladá sa, že tieto lieky účinkujú priamo na imunitný systém, pričom potláčajú supresorové klony lymfocytov, čím umožňujú vznik autoprotílátok proti vlastným antigénom. Protilátky pretrvávajú dlho aj po vysadení lieku.

V druhom prípade klasický typ liekmi vyvolanej hemolytickej anémie je charakteristický vznikom protílátok proti užívanému lieku, ktoré sa v pacientovom sére dajú dokázať *in vitro* len po jeho pridaní do skúmavky.

Existujú dva základné typy týchto reakcií:

Penicilínový typ hemolytickej anémie sa objavuje po veľkých dávkach tohto antibiotika. Penicilíny sa chovajú ako haptény (neúplné antigény), ktoré sa viažu pevne s proteínmi na erytrocytovej membráne. Tým vzniká kompletný antigén, ktorý vyvoláva tvorbu protílátok typu IgG. Hemolytická anémia sa rozvíja pomaly, keďže väčšina erytrocytov s naviazaným imunokomplexom sa odbúrava v slezine. Po vysadení lieku hemolýza ustane. Podobná reakcia vzniká aj po dnes často podávanom antibiotiku cefalosporíne.

Stibophennový (imunokomplexový) typ hemolytickej anémie vzniká po veľkom počte rôznych liekov- napr. chinidíne, kyseliny paraminosalicylovej, po sulfonamidoch, rifampicíne, diklofenaku a ďalších. Liek sa naviaže na plazmatické proteíny, čím vzniká kompletný antigén, voči ktorému organizmus tvorí protilátky väčšinou typu IgM. Tieto komplexy sa nešpecificky a voľne naviažu na membránu erytrocytu. Ak sa na komplex naviaže komplement, môže dôjsť k ťažkej hemolýze so všetkými jej prejavmi a následkami pre organizmus. Zvlášť nebezpečná je situácia, keď pacient už v minulosti prišiel do kontaktu s uvedeným liekom. Po vysadení lieku hemolýza vymizne. Podobne pri tomto type reakcie môžu byť postihnuté aj trombocyty.

Imunokomplexová hemolytická anémia je zriedkavá v porovnaní s tým, že vyššie uvedené lieky sa bežne užívajú. Pravdepodobne sa protilátky tvoria častejšie, avšak na to, aby došlo k manifestácii hemolytickej reakcie, musia byť na erythrocytovej a trombocytovej membráne tiež určité antigénne predpoklady.

Pri oboch typoch hemolýzy po vysadení lieku je možné podať transfúzie, podané erythrocyty, prípadne trombocyty, prežívajú normálne (Fábryová et al. 2012).

Favizmus

U ľudí postihnutých dedične podmieneným favizmom sa dajú zistiť biochemické abnormality metabolizmu erythrocytov (Lüllman, Mohr et al. 2004). Enzým glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PD) je rozhodujúci pre ochranu erythrocytov pred oxidačným stresom a nedostatok môže viesť k hemolýze v prítomnosti určitých environmentálnych faktorov, ako sú infekcie a niektoré lieky, potraviny (Harcke, Rizzolo et al. 2019). Po podaní oxidujúcich liečiv alebo určitých strukovín (napr. bôb záhradný) sa zvyšuje tvorba H_2O_2 , možnosť redukcie je znížená, vznikajúce kyslíkové radikály zvýšia rigiditu cytoskeletu. Pri nedostatku G6PD je okrem toho porušená redukcia methemoglobínu (Fe^{3+}) na hemoglobín (Fe^{2+}) (Lüllman, Mohr et al. 2004). Príkladom liekov, ktoré môžu viesť k hemolýze sú: sulfasalazín (črevné protizápalové liečivo), nitrofurantoin (antimikrobiálna látka), nitroglycerín (vazodilačne aktívna látka), primachín (antimalarikum) atď (Anonym 2019). Novorodenecká žltacka, favizmus a hemolýza sú spojené s expozíciou zvýšeným oxidačným stresorom u pacientov s geneticky zdedeným deficitom G6PD (Harcke, Rizzolo et al. 2019). Hemolýza pri požití primachínu nastáva u 5 – 10 % mužov čiernej rasy, u Aziatov a taktiež u niektorých ľudí zo Stredomoria (Fendrich 2005). Rozpoznaním potenciálu nedostatku G6PD môžu lekári vyšetriť poruchu a naučiť postihnutých pacientov, ako sa vyhnúť spúšťačom, ktoré vedú k škodlivým klinickým prejavom (Harcke, Rizzolo et al. 2019).

3.8 Stanovenie cytotoxicity

Test cytotoxicity, jeden z *in vitro* biologických hodnotiacich a skriningových testov, využíva tkanivové bunky na pozorovanie bunkového rastu, reprodukcie a morfológických účinkov testovaných látok. Cytotoxicita je jednou zo základných a zároveň najdôležitejších metód biologického hodnotenia. Cytotoxicita je

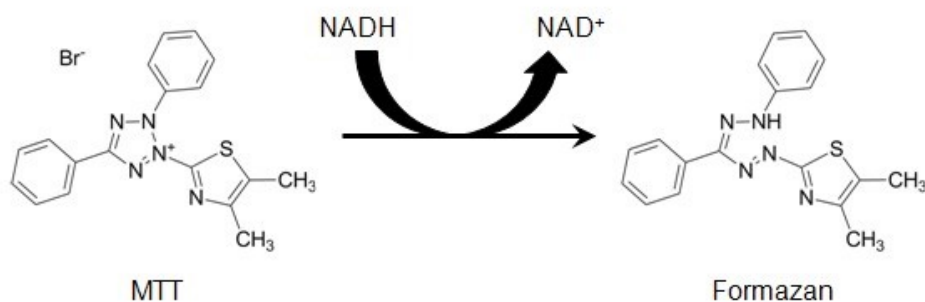
uprednostňovaná ako pilotný projektový test a dôležitý ukazovateľ na hodnotenie toxicity, pretože je jednoduchá, rýchla, má vysokú citlivosť a znižuje množstvo použitých laboratórnych zvierat. Zvieratá chráni pred toxickým pôsobením novo syntetizovaných látok tým, že je značne znížené množstvo látok, ktoré sa zvieratám podáva, pretože tie, ktoré vykážu výrazný cytotoxický účinok, sú z ďalších štúdií vyradené (Li, Zhou et al. 2015).

Existuje viacero spôsobov ako merať cytotoxicitu testovanej látky. Môže sa napríklad jednať o sledovanie životaschopných buniek (test viability), mŕtvych buniek alebo mechanizmu apoptózy (Riss and Moravec 2004).

Obecne sú testy vyhodnocované na základe luminiscencie, fluorescencie alebo sa hodnotí absorbancia pri danej vlnovej dĺžke. Môže sa využiť i kombinácia týchto testov a tak dosiahnuť získanie čo najväčšieho množstva informácie zo vzorku (Anonym 2020). V minulosti boli rozšírené i rádioaktívne testy. Príkladom môže byť test s použitím rádioaktívneho chrómu, ktorého nevýhodou však je žiarenie, ktoré musí byť tienené a meranie je potrebné uskutočniť v špecifickom časovom bode (Karimi, Lee et al. 2014).

Testovanie viability

Viabilita buniek predstavuje počet živých buniek a je zvyčajne vyjadrená percentuálne ku kontrole (životaschopné bunky s netoxickou látkou). Postupným zvyšovaním koncentrácie testovanej látky sa sleduje jej vplyv na životnosť. Pri testoch viability sa využívajú napríklad kolorizačné metódy, ktoré rozlíšia mŕtve bunky od živých (Fang and Trewyn 2012). Viabilita môže byť sledovaná na základe viacerých bunkových procesov. Jednou z možností je zmeranie množstva ATP v živých bunkách, ktoré sa dá nepriamo zistiť reakcie s luminiscenčným činidlom luciferinom. Ďalšou možnosťou je kolorimetrická reakcia založená na intracelulárnej premene živými bunkami tetrazólievej soli MTS na rozpustný formazan alebo resazurinu na resofurin (viz Obr. 6). Sleduje sa hodnota IC_{50} , koncentrácia látky, pri ktorej stráca životnosť polovica kultivovaných buniek (Anonym 2020)



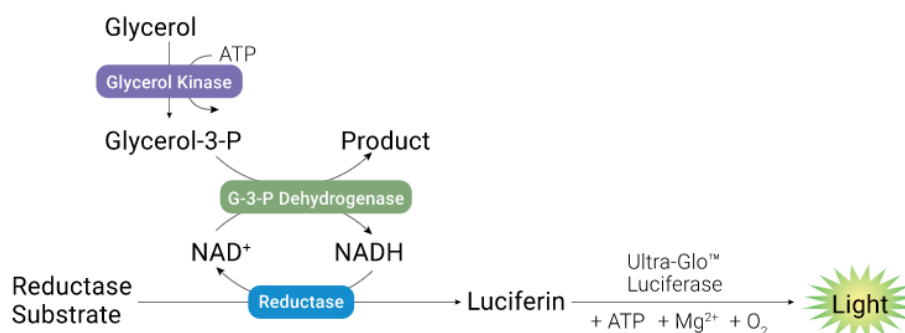
Obr. 6 Reakcia získania formazanu testovaním viability kolorimetrickou reakciou. Prevzané z: Riss, Moravec et al. (2004)

Testovanie cytotoxicity

Jedným z prístupov testovania cytotoxicity je sledovanie zmien v integrite membrány, ktoré nastávajú v dôsledku úmrtia bunky. Esej je predurčená na stanovenie cytotoxického pôsobenia v bunkovej kultúre po experimentálnej manipulácii. Je využívané asymetrické kyanínové farbenie ktoré je vylúčené z životaschopných buniek, ale preferenčne značí DNA v mŕtvych bunkách. Keď sa farbivo naviaže na DNA v dotýčajných bunkách, fluorescenčné vlastnosti sú významne zvýšené. Životaschopné bunky produkujú nevýznamné zvýšenie fluorescencie. Tým pádom fluorescenčný signál produkovaný vďaka naviazaniu na DNA mŕtvych buniek je úmerný k cytotoxicite. Farbivo môže byť riedené v médiu a podané priamo bunkám v čase nasadenia buniek alebo počas pridávania skúmaných látok, umožňujúce kontinuálnu kinetiku merania cytotoxicity. Farbivo taktiež môže byť riedené v pufrí a podané bunkám na konci merania. Jedná sa o stabilný systém, pretože nie je založený na bielkovinových biomarkeroch, ktoré môžu degradovať počas pridávania látok a viesť k strate signálu. DNA je viac stabilné a preto dáva stabilnejšie, dlhšie trvajúce signály než iné súčasné cytotoxické chemikálie. Pri hodnotení cytotoxicity sa stanovuje hodnota EC₅₀, efektívna koncentrácia skúšanej látky, ktorá spôsobí úhyn 50 % skúšaných erytrocytov (Anonym 2013).

Sledovanie metabolickej aktivity buniek

Ďalším z možných postupov je testovanie metabolickej aktivity. Rakovinové ochorenie je typické nekontrolovateľným rastom buniek, ktorých metabolické cesty sa zmenili za cieľom prežitia a proliferácie. Mechanizmus týchto procesov je stále nedostatočne objasnený. Nikotínamidnukleotidy (NADH, NADPH) sú základnými kofaktormi energetického metabolizmu buniek, nevyhnutnými k biosyntéze, udržiavaniu redoxného potenciálu bunky a bunkovej signalizácii. NADPH je napríklad spotrebované pri biosyntetických reakciách. NADH sa vytvára pri energetických reakciách. Testy by následne mohli podrobnejšie sledovať úlohu dinukleotidov v metabolickej aktivite buniek. Príkladom môže bioluminescentná esej, ktorá sleduje koncentráciu redukovanej formy NADH a NADPH, priamo úmernej luminiscenčnému efektu luciferinu za prítomnosti jeho detekčného činidla (viz Obr. 7). Sleduje sa parameter IC_{50} (Anonym 2020).



Obr. 7 Testovanie metabolickej aktivity pomocou luciferinu. Prevzané z: Anonym (2020)

4 Ciele práce

Cieľom diplomovej práce je určenie hemolýzy spôsobenej skúmanými látkami, potenciálnymi antibiotikami a antimykotikami, a stanovenie vplyvu spomenutých látok na viabilitu modelovej bunkovej línie.

Zároveň sa sledovala korelácia medzi výsledkami získanými z testov viability a hemolytickým efektom.

5 Experimentálna časť

5.1 Materiál

5.1.1 Prístroje a zariadenia

Centrifúga Z 326K (HERMLE Labortechnik GmbH, Nemecko)

Centrifúga Universal 32R (Hettich)

Platničkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Švajčiarsko)

Orbitálna trepačka IKA® Lab Dancer (IKA-Werke GmbH & Co., Nemecko)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Box s laminárnym prúdením TopSafe 1.8 (Bioair Instruments, Taliansko)

Optický mikroskop (Optica Microscopes, Taliansko)

Vodný kúpeľ TW12 (Julabo, Nemecko)

Analytické váhy (Boeco, Nemecko)

5.1.2 Ďalší použitý materiál

Automatické pipety Eppendorf Research® plus 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l
(Eppendorf, Nemecko)

96-jamkové mikrotitračné platničky, číre (TPP, Švajčiarsko)

Rukavice latexové, nesterilné (VWR, USA)

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

Mikroskúmavky Eppendorf 2 ml

Falkonky/centrifugačné skúmavky 50 ml TPP

Jednorázové sérologické pipety TPP

Sklenené Pasteurove pipety (Sigma Aldrich, USA)

Kultivačné fľašky TPP

5.1.3 Ďalšie použité chemikálie

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, USA)

DMSO (dimethyl sulfoxid pre molekulárnu biológiu >99,9%) (Sigma-Aldrich, USA)

triton X-100 (Koch-Light Laboratories)

Destilovaná voda

DMEM médium (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované medium) (Sigma Aldrich, USA)

FBS (fetálne hovädzie sérum) (Sigma Aldrich, USA)

Neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich, USA)

L-glutamín 200 mM (Sigma Aldrich, USA)

Fosfátový pufer s fyziologickým pH

Trypsín (Sigma Aldrich, USA)

5.1.4 Použitá bunková línia

Pri určovaní cytotoxického efektu bola využitá bunková línia HepG2. Jedná sa o bunky ľudského hepatocelulárneho karcinómu produkujúce hlavné plazmové proteíny (napr. albumín) bez povrchových antigénov hepatitídy B. Bunková línia bola poskytnutá z Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, UK).

Bunky hepatocelulárneho karcinómu sú považované za štandardnú líniu pri uskutočňovaní základného toxikologického screeningu.

5.2 Testované látky

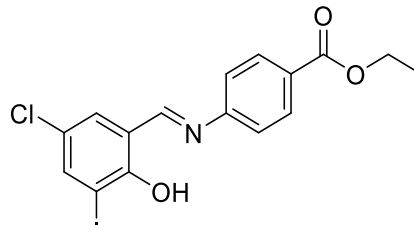
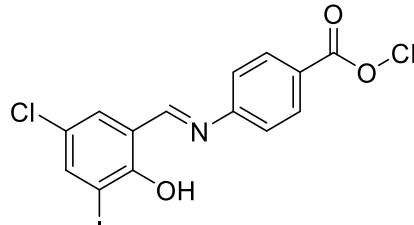
Hemolytický a cytotoxický efekt bol sledovaný na jedenástich novo syntetizovaných látkach získaných z laboratória doc. PharmDr. Mgr. M. Krátkého, Ph.D. z Katedry organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty UK. Konkrétne hodnoty použité pri príprave 50 mM roztokov skúmaných látok sa nachádzajú v tabuľke 1. Objem DMSO u všetkých roztokov bol 500 µl.

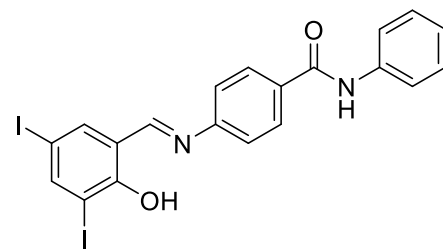
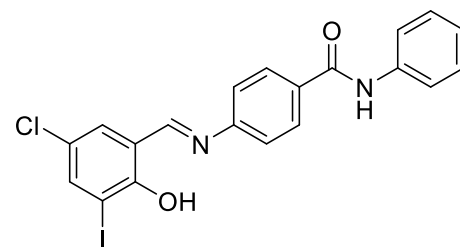
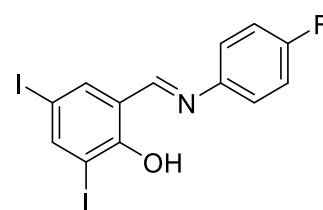
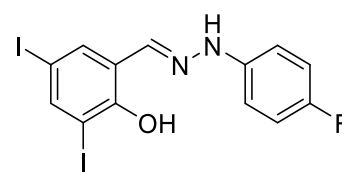
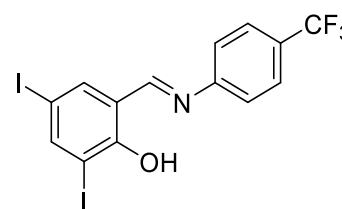
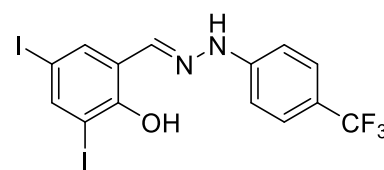
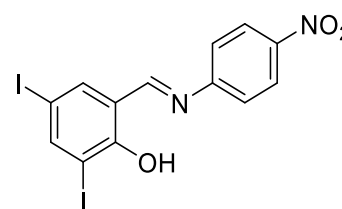
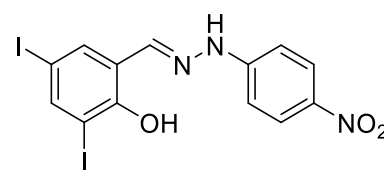
Tab. 1 Relatívna molekulová hmotnosť a navážka použité pri príprave 50 mM roztokov

Č.	Kód	Mr	Navážka (g)
1	DAB-5-K	681,05	0,01703
2	PABA-Me-5	415,61	0,01039
3	PABA-Et-5	429,64	0,01074
4	PABAN-3	568,15	0,01420
5	PABAN-5	476,70	0,01192
6	MK-F-1	467,02	0,01168
7	MK-F-2	482,04	0,01205
8	MK-CF ₃ -1	517,03	0,01293
9	MK-CF ₃ -2	532,04	0,01330
10	MK-NO ₂ -1	494,03	0,01235
11	MK-NO ₂ -2	509,04	0,01273

Jedná sa o deriváty aminobenzoovej kyseliny líšiace sa či už substituentom na amínovej funkčnej skupine alebo substituentami na aromatickom kruhu. Chemické názvy a štruktúrne vzorce sú uvedené v tabuľke 2. Testované látky boli skúmané na základe ich potenciálneho antibakteriálneho, antifungálneho a antimykobakteriálneho pôsobenia.

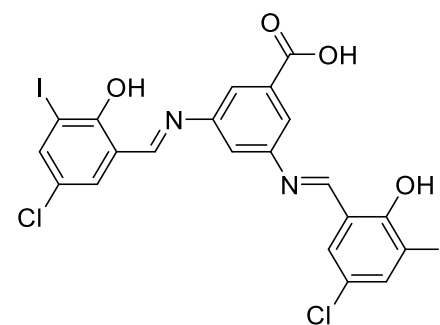
Tab. 2 Chemické názvy a štruktúrne vzorce skúmaných látok

Testovaná látka	Chemický názov	Štruktúrny vzorec
PABA-Et-5	ethyl-4-[(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino]benzoát	
PABA-Me-5	methyl-4-[(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino]benzoát	

PABAN-34-[(5-chlor-2-hydroxy-3-
jodbenzyliden)amino]-*N*-fenylbenzamid**PABAN-5**4-[(2-hydroxy-3,5-
dijodbenzyliden)amino]-*N*-
fenylbenzamid**MK-F-1**2-{[(4-fluorfenyl)imino]methyl}-4,6-
dijodfenol**MK-F-2**2-{[2-(4-
fluorfenyl)hydrazinyliden]methyl}-4,6-
dijodfenol**MK-CF₃-1**2,4-dijod-6-({[4-
(trifluormethyl)fenyl]imino}methyl)fenol**MK-CF₃-2**2,4-dijod-6-({2-[4-
(trifluormethyl)fenyl]hydrazinyliden}met
hyl)fenol**MK-NO₂-1**2,4-dijod-6-({[4-
nitrofenyl]imino]methyl} fenol**MK-NO₂-2**2,4-dijod-6-({2-(4-
nitrofenyl)hydrazinyliden]methyl} fenol

DAB-5-K

3,5-bis[(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino]benzoová kyselina



5.3 Metódy

5.3.1 Príprava roztoku HEPES

Roztok HEPES (N-2-hydroxyetylpiiperazin-N'-2-etansulfonová kyselina) je pufer široko využívaný laboratórnych procesoch z dôvodu dobrého udržiavania fyziologického pH, účinné činidlo na udržanie štruktúry a funkcie enzýmov aj pri nižších teplotách.

Pufer HEPES bol pri vypracovávaní experimentálnej časti využitý pri čistení potkanej krvi, príprave 2 % suspenzie erytrocytov a taktiež ako negatívna kontrola pri meraní absorbancie - systém bez prítomnosti hemolýzy.

Príprava pufru prebiehala navážením zložiek podľa tabuľky 3 a doplnením destilovanou vodou do objemu 800 ml. Miešaním sa docielilo rozpustenie zložiek a pomocou pH metru bola odmeraná hodnota pH, ktorá bola následne upravená na cieľovú hodnotu 7,4. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

Tab. 3 Príprava 10 mM HEPES pufru (1000 ml)

Zlúčenina	Molárna hmotnosť [g/mol]	Navážka [g]	Koncentrácia [mM]
HEPES	238,30	2,383	10
NaCl	58,44	8,766	150

5.3.2 Príprava 2 % suspenzie erytrocytov

Pri vypracovávaní experimentálnej časti diplomovej práce bola využívaná čerstvá potkania krv. Krv bola výlučne dospelých samčích potkanov. Po obdržaní krvi

nasledovalo jej spracovanie. Ako prvé bola prevedená centrifugácia, pri ktorej sa docielilo rozdelenie erytrocytov od zvyšných krvných elementov a plazmy odstredivou silou. Centrifugácia prebiehala za nasledujúcich podmienok: pri 5000 ot/min (čo odpovedá 2790 g), teplote 5 °C, po dobu 5 minút. Nasledovalo odsatie plazmy a pridanie dvojnásobného objemu HEPES pufru, ktorým sme erytrocyty premývali. Celý tento proces bol opakovaný 2-3x pokiaľ nebol supernatant číry. Pri práci sme využívali 2 % hematokrit, ktorý sme vytvorili nariadením suspenzie erytrocytov HEPES pufrom.

5.3.3 Proces prípravy vzoriek a meranie absorbancie

Prvým krokom pri príprave vzoriek prebiehalo riedenie testovaných látok v škále koncentrácie od 50 mM do 0,01 mM. Riedenie bolo prevádzané látkou DMSO (dimetylsulfoxid). Vzorky boli pipetované do vopred priradených jamiek na platničkách s 200 µl 2% suspenzie erytrocytov postupne, podľa klesajúcej koncentrácie. Každá koncentrácia v objeme 2 µl bola testovaná v troch jamkách za cieľom vyvarovania sa chýb a získania čo najpresnejšieho výsledku. Zároveň prebiehalo i sledovanie pozitívnych a negatívnych kontrol. Na platničkách sa nachádzalo šesť jamiek s HEPES pufrom, kde sme mohli sledovať absorbanciu sústavy bez hemolýzy (negatívna kontrola) a šesť jamiek s látkou triton X (s výslednou koncentráciou roztoku 1 %), ktorá potvrdene lyzuje erytrocyty (pozitívna kontrola). Platničky boli inkubované pri izbovej teplote a bez prístupu svetla po dobu 60 minút.

Po ukončení inkubácie nasledovala centrifugácia pri 4500 ot/min, 2720 g, teplote 4 °C, počas 10 minút. V prípade, že látky majú hemolytický účinok, po inkubácii a stočení buniek bude supernatant zafarbený, ak hemolýza neprebehla, supernatant bude číry. Supernatant bol odsatý a premiestnený do novej 96 jamkovej čirej platničky. Pomocou platničkového readera TECAN bola nameraná absorbancia vzorkov pri vlnovej dĺžke 540 nm. Vďaka získaným výsledkom absorbancie bola stanovovaná schopnosť spôsobovať hemolýzu.

Za rovnakých podmienok boli pripravené platničky bez erytrocytov, iba za prítomnosti pufru HEPES. Vzorky boli pripravené v rovnakej koncentračnej škále, v triplikátoch, Pozitívna i negatívna kontrola boli taktiež zahrnuté. Nasledovala inkubácia, centrifugácia a meranie absorbancie v rovnakých podmienkach ako platničky s roztokom erytrocytov. Získaný výsledok bol využitý k vyrušeniu ovplyvnenia výsledku

absorpciou pozadia, ktorá by mohla mať napríklad za následok kladnú chybu merania, zvyšovanie absorbancie.

Výsledky boli spracované a vyhodnotené pomocou Microsoft Excel 2016 a GraphPad Prism 8.3.1, taktiež hodnoty EC_{50} boli stanovené s využitím tohto softwaru.

5.3.4 Kultivácia buniek

Prvým krokom pri práci s bunkovou líniou je kontrola buniek pod mikroskopom z dôvodu uistenia sa o neporušenosti línie, zistenia konfluencie (tj. pokrytie kultivačnej fľaše), morfológického zhodnotenia, vylúčenia prítomnosti baktérií a plesní. V laminárnom boxe nasleduje odsatie všetkého média nachádzajúceho sa vo fľaši. Opatrne sa pridá PBS, ktorým sa bunky opláchnu od zvyškov starého média DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované medium). Médium obsahuje 10 % FBS (fetálne hovädzie sérum) obsahujúce bielkoviny, ktoré by zapríčinili nefunkčnosť trypsínu v ďalšom kroku. PBS sa odsaje Pasteurovou pipetou. Pridá sa trypsín-EDTA (proteáza), ktorá uvoľní bunky od dna kultivačnej fľašky. Fľaška sa vloží do inkubátora na približne 1-2 minúty, potom sa poklepaním na bok fľašky odlepia bunky od dna. Účinky trypsínu sa zneutralizujú pridaním rovnakého množstva kultivačného média. Vzniknutá bunková suspenzia sa premiešava opakovaním nasávaním a vypúšťaním pipetou. Časť sa prenesie do novej fľašky, zo zvyšnej sa pripraví suspenzia. Bunky sa počítajú pomocou Bürkerovej komôrky a pripraví sa suspenzia s vyžadovaným počtom buniek, čiže 150 000 buniek/ml. Pri hodnotení viability používame 96-jamkové platničky, pričom do každej jamky je daných 15 000 buniek, čiže pipetovaný objem je 100 μ l. Na platničke sa kultivujú bunky 24 hodín, potom nastáva pridanie testovaných látok. Inkubácia buniek prebieha v inkubátore pri teplote 37 ° C a 5 % atmosfére CO_2 .

5.3.5 Stanovenie vplyvu vývojových látok na viabilitu HepG2 buniek

Po 24 hodinách od nasadenia buniek na platničku sa k bunkám pridá médium s testovanými látkami v požadovanom koncentračnom rozmedzí. Celkový objem rozpúšťadla (DMSO) v médiu musí byť maximálne 1 %, inak už na bunky pôsobí toxicky. Pri stanovení máme dve kontroly: netoxickú, ktorá je tvorená 1 % DMSO (100 % viabilita) a toxickú, tvorenou 10 % DMSO (100 % úmrtnosť). Bunky sú s testovanými

látkami kultivované ďalších 24 hodín za štandardných kultivačných podmienok. Nasleduje prídanie činidla CellTiter a bunky sa znovu inkubujú v inkubátore počas doby 1,5 – 2 hodiny. Po uplynutom čase sa zmeria absorbancia pri 490 nm.

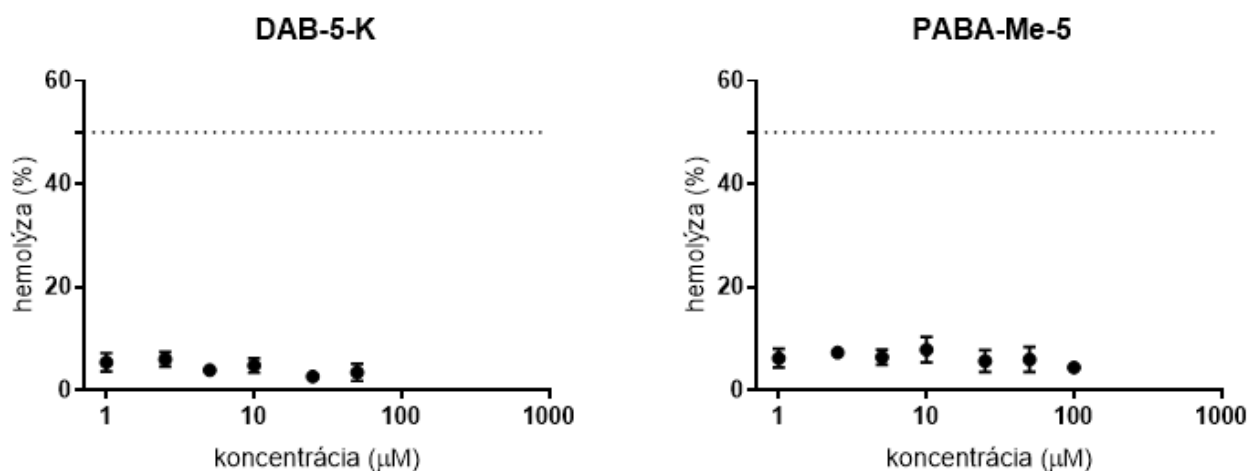
Súčasne sa prevádza i meranie pozadia, to znamená opakovanie rovnakého postupu, ale bez prítomnosti buniek. Na 96-jamkovú platničku sa napipetuje médium s látkami, pridá sa CellTiter a po 1,5-2 hodinách sa zmeria absorbancia. Od získaných bunkových hodnôt sa odpočíta pozadie.

Použitý komerčne dostupný kit CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay sa radí medzi kolorimetrické metódy merania metabolickej aktivity buniek na určenie životaschopnosti buniek. Metóda prebieha pomocou tetrazoliovej soli MTS a elektrón spájacieho činidla fenazín etosulfátu, PES. PES je intracelulárne redukovaný napríklad NADH alebo NADPH (koenzýmy oxidačno-redukčných reakcií v bunke) a extracelulárne vedie k redukcii MTS na intenzívne sfarbený formazan. Iba bunky, ktoré sú metabolicky aktívne, teda aj životaschopné, sú schopné premeniť MTS na fialovo sfarbený formazan. Sleduje sa absorbancia média pri 490 nm, čo je absorpčné maximum formazanu, produktu MTS. Týmto spôsobom sme potom schopní zhodnotiť kvantitu formazanu, ktorá je úmerná množstvu životaschopných buniek.

Výsledky boli spracované a vyhodnotené pomocou Microsoft Excel 2016 a GraphPad Prism 8.3.1, rovnako hodnoty IC₅₀ boli stanovené s využitím tohto softwaru.

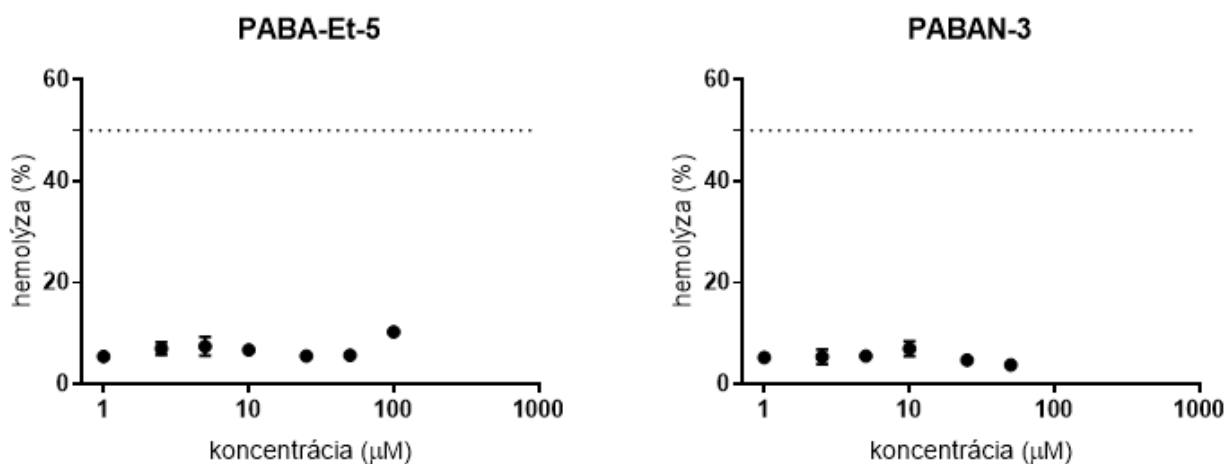
6 Výsledky

6.1 Hodnotenie hemolytickej aktivity testovaných potencionálnych liečiv



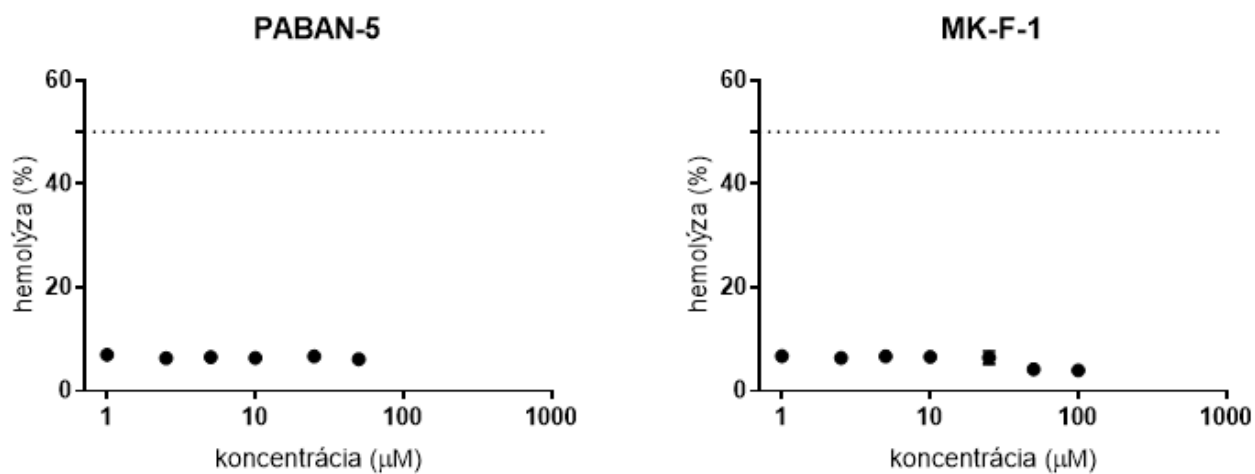
Obr. 8 Hemolytická aktivita látok DAB-5-K a PABA-ME-5 pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 8 sa nachádzajú namerané hodnoty pri určovaní hemolytickej aktivity látok DAB-5-K a PABA-Me-5. Počas vyhodnocovania bola sledovaná hodnota EC_{50} - efektívna koncentrácia skúšanej látky, ktorá spôsobí hemolytický účinok na 50 % skúšaných erythrocytov. Z nameraných dát je zrejmé, že obe látky nevykazujú v testovanom rozmedzí žiadnu hemolytickú aktivitu, výsledky sa pohybujú v rovnakej výške ako štandard (HEPES pufor). U látky DAB-5-K však hodnota EC_{50} bola vyššia ako maximálna testovaná koncentrácia. Takisto u látky PABA-Me-5 nebolo možné určiť hodnotu EC_{50} .



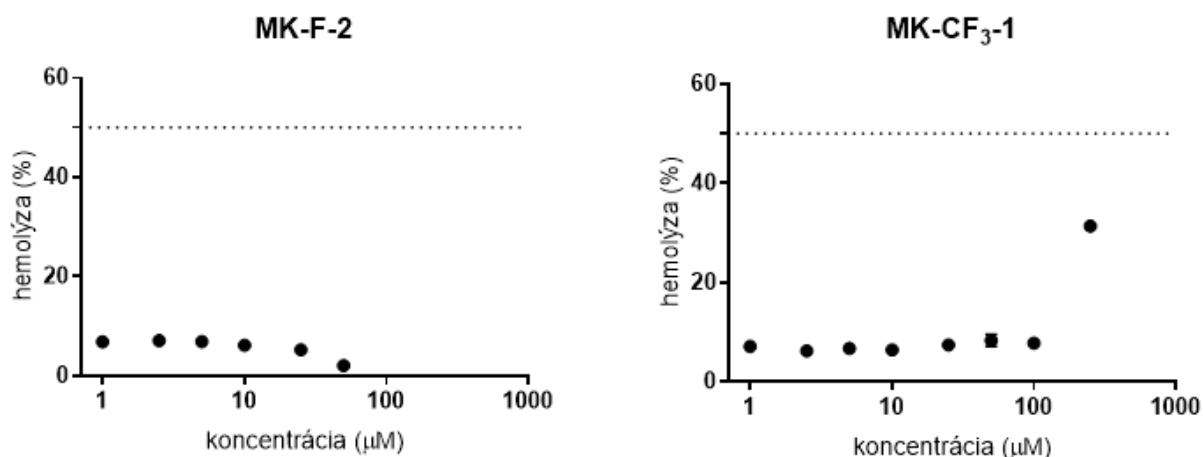
Obr. 9 Hemolytická aktivita látok PABA-Et-5 a PABAN-3 pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 9 sú zobrazené hemolytické efekty látok PABA-Et-5 a PABAN-3. U oboch látok bola potvrdená hemolytická aktivita, ale hodnota EC_{50} bola vyššia ako nami najvyššia nameraná koncentrácia. V prípade látky PABA-Et-5 bol pozorovaný hemolytický účinok až v najvyšších testovaných koncentráciách (100 μ M). Látka PABAN-3 vykazovala hemolytické účinky zrovnateľné so štandardom.



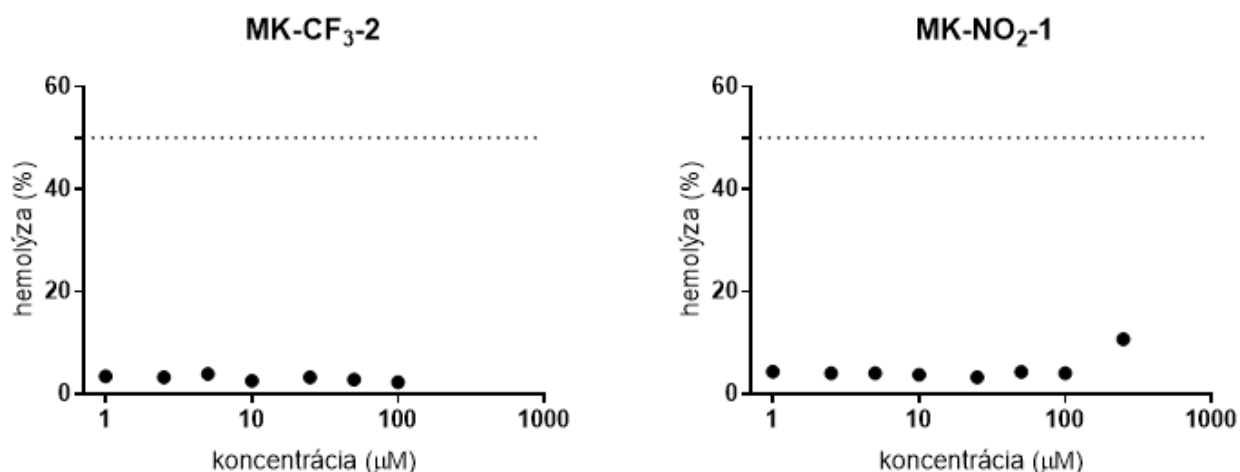
Obr. 10 Hemolytická aktivita látok PABAN-5 a MK-F-1 pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 10 môžeme vidieť hemolytické pôsobenie látok PABAN-5 a MK-F-1. Obe látky vykazujú hemolytický efekt porovnateľný so štandardom, hodnoty EC_{50} určené pomocou počítačového programu GraphPad Prism však boli mnohonásobne vyššie ako najvyššie koncentrácie použité pri skúmaní aktivity. V prípade týchto dvoch látok teda nebol potvrdený hemolytický účinok v testovanom koncentračnom rozmedzí.



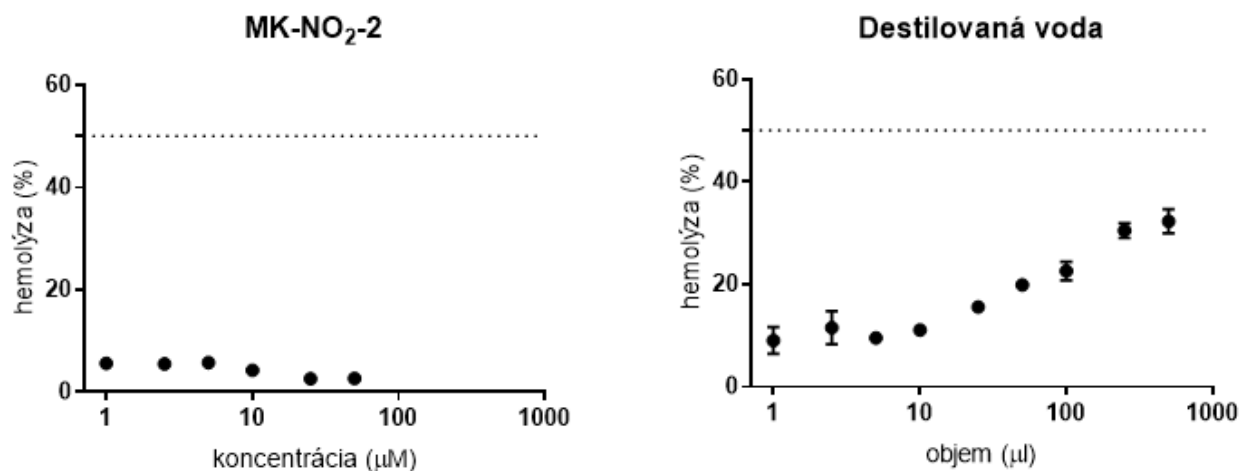
Obr. 11 Hemolytická aktivita látok MK-F-2 a MK-CF₃-1 pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 11 sledujeme výsledné hodnoty percentuálnej hemolýzy látok MK-F-2 a MK-CF₃-1. V prípade látky MK-F-2 sme pozorovali hemolytický účinok na úrovni štandardu, avšak softwarovo bola stanovená hodnota EC₅₀, ktorá o niekoľko rádov prevyšovala našu najvyššie použitú koncentráciu, takže nebolo možné ju presne určiť. Látka MK-CF₃-1 síce potvrdila hemolytickú aktivitu prevyšujúcu 30 % úrovne 100% hemolytickej kontroly, opäť to bolo v prípade najvyššie použitej koncentracii, hodnota EC₅₀ nebola možná stanoviť.



Obr. 12 Hemolytická aktivita látok MK-CF₃-2 a MK-NO₂-1 pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 12 môžeme vidieť hemolytické pôsobenie látok MK-CF₃-2 a MK-NO₂-1. Látka MK-CF₃-2 vykazovala hemolytický účinok porovnateľný s HEPES pufrom, hodnota EC₅₀ bola vyššia ako najvyššie použitá koncentrácia. Pri zisťovaní hemolytickej aktivity látky MK-NO₂-1 došlo k hemolytickému účinku na úrovni približne 10 % použitej hemolytickej kontroly (1 % triton X), hodnotu EC₅₀ však nebolo na základe získaných dát softwarovo možné stanoviť.



Obr. 13 Hemolytická aktivita látky MK-NO₂-2 a destilovanej vody pozorovaná na potkaních erythrocytoch

Na Obr. 13 sa nachádzajú graficky znázornené výsledky hemolýzy látky MK-NO₂-2 a destilovanej vody, ktorá bola použitá ako štandardná látka na overenie hemolytického účinku vzhľadom k tomu, že prídavkom destilovanej vody vzniká hypotonické prostredie. Posledná nami testovaná látka MK-NO₂-2 vykazuje hemolytický účinok na úrovni nehemolytického štandardu, spočítaná hodnota EC₅₀ bola o niekoľko rádov vyššia ako nami testovaná najvyššia koncentrácia. V prípade destilovanej vody sa potvrdil očakávaný hemolytický efekt. Na grafe je vidieť ako s rastúcim podielom destilovanej vody stúpa hemolytický efekt. Už od najnižšie použitých hodnôt objemu destilovanej vody bol pozorovaný hemolytický efekt, takže hodnoty relatívnej hemolýzy sú na úrovni aspoň 10 % pozitívnej hemolytickej kontroly (1 % roztok tritonu X). Avšak ani použitím najvyššieho možného objemu destilovanej vody sme nedosiahli hranicu 50 % hemolýzy vzhľadom k roztoku tritonu X.

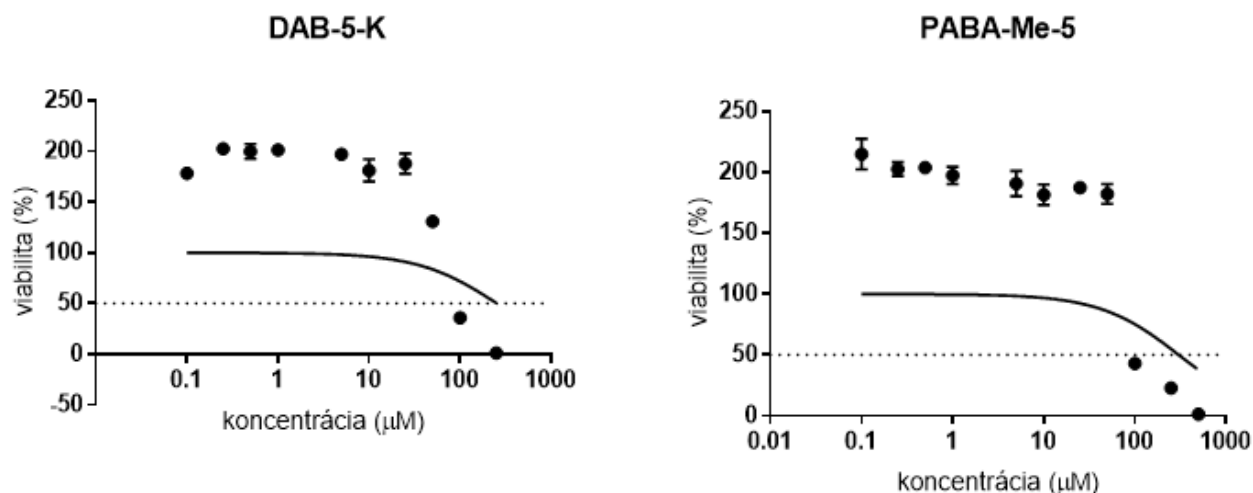
V tab. 4 sú zhrnuté dáta získané z hemolytických štúdií, konkrétne hodnotené koncentračné rozmedzie, ktoré nie je u všetkých látok rovnaké vplyvom zníženej rozpustnosti látok v HEPES pufri. Ďalej sú v tabuľke vypísané najvyššie koncentrácie, ktoré nevyvolávali hemolytický účinok (NHÚ), teda kde nedošlo k prekročeniu medze 10 % hemolytickej aktivity pozitívnej kontroly (1 % triton X). Hemolytický účinok bol pozorovaný u celkom troch látok, konkrétne PABA-Et-5, MK-CF₃-1 a MK-NO₂-1.

Tab. 4 Zhrnutie hemolytického pôsobenia testovaných látok

Látka	Koncentračné rozmedzie (μM)	NHÚ (μM)
DAB-5-K	0,1 – 50	50
PABA-Me-5	0,1 – 100	100
PABA-Et-5	0,1 – 100	50
PABAN-3	0,1 – 50	50
PABAN-5	0,1 – 50	50
MK-F-1	0,1 – 100	100
MK-F-2	0,1 – 50	50
MK-CF₃-1	0,1 – 250	100
MK-CF₃-2	0,1 – 100	100
MK-NO₂-1	0,1 – 250	100
MK-NO₂-2	0,1 – 50	50

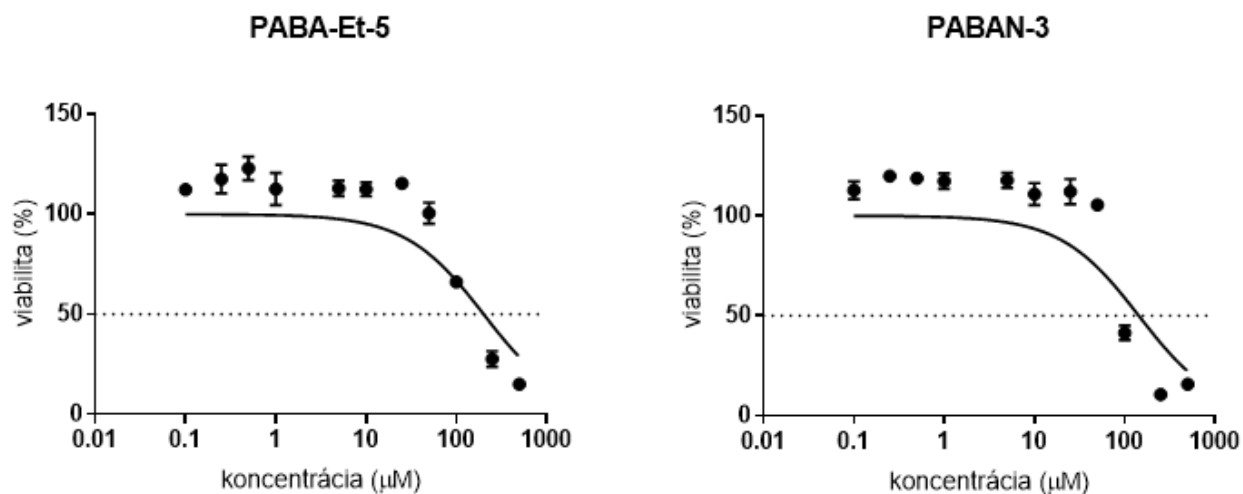
6.2 Hodnotenie vplyvu testovaných potencionálnych liečiv na bunkovú viabilitu

Počas zisťovania vlastností potencionálnych liečiv bol sledovaný taktiež vplyv na viabilitu buniek. Popisuje životaschopnosť po interakcii HepG2 buniek so zvyšujúcou sa koncentráciou skúmaných látok. Viabilita testovaných potencionálnych liečiv bola následne graficky spracovaná, a to zaznamenaním závislosti viability % na koncentrácii. Taktiež bola sledovaná hodnota IC_{50} , koncentrácia látky, pri ktorej stráca životnosť polovica kultivovaných buniek. Hodnoty viability sú znázornené percentuálne oproti kontrolným bunkám, kde bolo aplikované iba 1 % rozpúšťadla (1 % DMSO v štandardnom kultivačnom médiu).



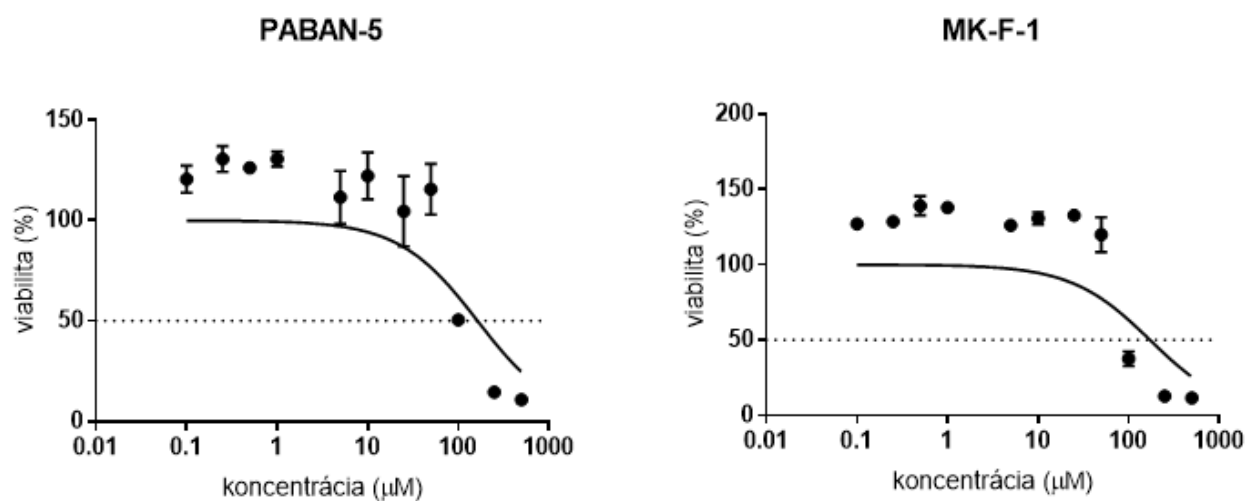
Obr. 14 Vplyv látok DAB-5-K a PABA-Me-5 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 14 sa nachádza grafické spracovanie viability buniek po 24 hodinovej aplikácii látky DAB-5-K a PABA-Me-5. V prípade oboch látok došlo k výraznému zníženiu viability HepG2 buniek po aplikácii 100 µM roztoku testovaných látok, kedy viabilita poklesla v oboch prípadoch pod 50 % hranici.



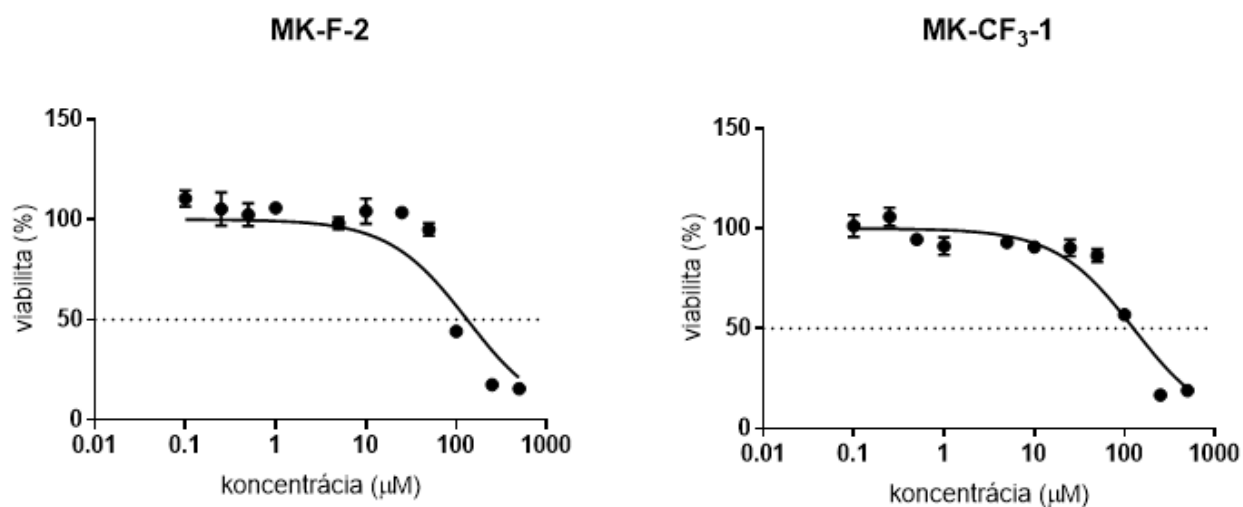
Obr. 15 Vplyv látok PABA-Et-5 a PABAN-3 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 15 môžeme vidieť viabilitu buniek po 24 hodinové aplikácii látok PABA-Et-5 a PABAN-3. Testovaná zlúčenina PABA-Et-5 významne znižovala bunkovú viabilitu už v koncentrácii 100 µM, k poklesu viability pod 50 % hranicu došlo až pri použitej koncentrácii 250 µM. V porovnaní s touto látkou sa v poradí 4. testovaná zlúčenina PABAN-3 javila viac toxicky, pretože k významnému zníženiu viability a to pod 50 % došlo po aplikácii 100 µM roztoku.



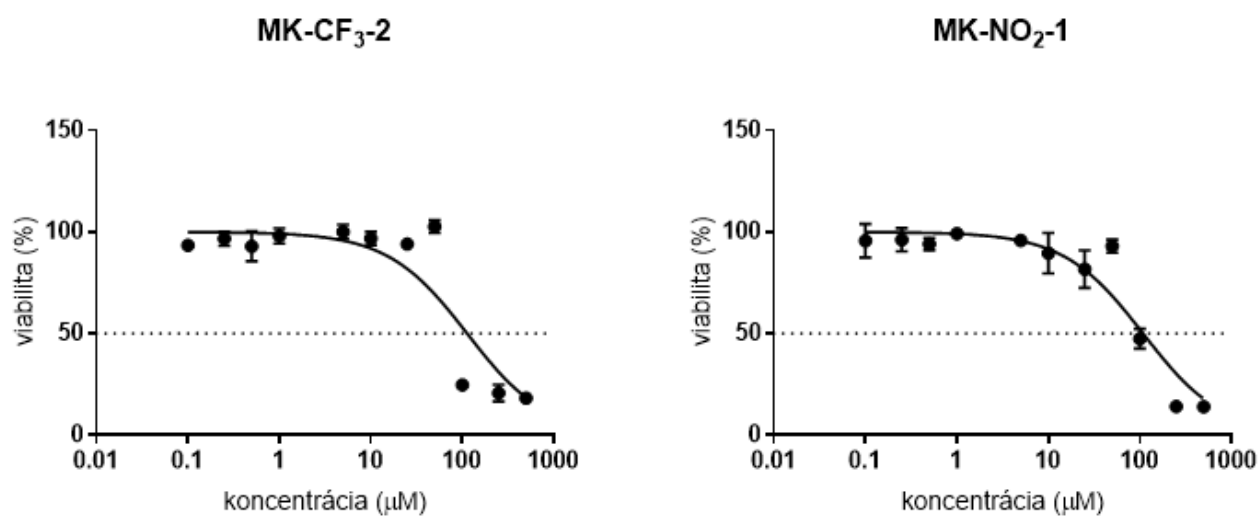
Obr. 16 Vplyv látok PABAN-5 a MK-F-1 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 16 sledujeme viabilitu po 24 hodinovej aplikácii látok PABAN-5 a MK-F-1. Obe látky mali približne rovnaký cytotoxický efekt, kedy k výraznému poklesu bunkovej viability došlo po aplikácii 100 μM. V prípade zlúčeniny PABAN-5 viabilita poklesla na približne 50 %, v prípade MK-F-1 bol pokles výraznejší, na necelých 40 % viability kontrolných buniek.



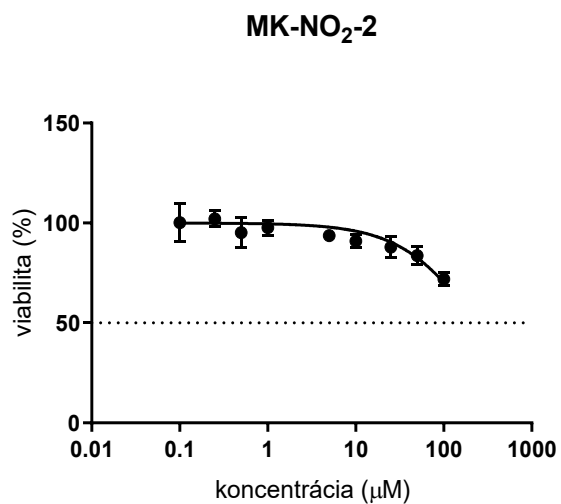
Obr. 17 Vplyv látok MK-F-2 a MK-CF₃-1 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 17 sa nachádza grafické znázornenie viability po 24 hodinové aplikácii látok MK-F-2 a MK-CF₃-1. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade obe študované látky vykázali približne rovnaký cytotoxický efekt. K významnému zníženiu viability došlo po podaní 100 µM roztoku testovaných antimikrobiálne aktívnych látok a to na 44 % po aplikácii látky MK-F-2 resp. na 57 % po aplikácii 100 µM roztoku látky MK-CF₃-1.



Obr. 18 Vplyv látok MK-CF₃-2 a MK-NO₂-1 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 18 môžeme vidieť viabilitu po 24 hodinovej aplikácii látok MK-CF₃-2 a MK-NO₂-1. U oboch látok sa prejavil významný cytotoxický efekt, po aplikácii prvej z dvoch spomínaných látok v koncentrácii 100 µM došlo k zníženiu viability HepG2 buniek na zhruba 25 % kontrolných buniek (1 % DMSO). V prípade 100 µM roztoku látky MK-NO₂-1 bunková viabilita poklesla na približne 48 %.



Obr. 19 Vplyv látky MK-NO₂-2 na viabilitu HepG2 bunkovej línie

Na Obr. 19 vidíme vplyv 24 hodinového pôsobenia látky MK-NO₂-2 na viabilitu HepG2 buniek. Z grafického znázornenia je zrejmé, že táto látka vykazuje cytotoxický efekt, no hodnota IC₅₀ bola vyššia ako nami najvyššia použitá koncentrácia 100 µM. Vyššie koncentrácie boli z testovania vyradené kvôli ich vyzrážaniu v kultivačnom médiu.

V tab. 5 sú zhrnuté dáta získané z toxicitných štúdií, konkrétne je uvedené hodnotené koncentračné rozmedzie, ktoré sa pohybuje v rozmedzí od 0,1 do 500 μM , s výnimkou prvej testovanej látky DAB-5-K, ktorá bola rozpustná iba do koncentrácie 250 μM a poslednej testovanej látky MK-NO₂-2, pri ktorej bola z rovnakého dôvodu najvyššia sledovaná koncentrácia 100 μM . Látka MK-NO₂-1 mala najvyššiu toxicitu zo všetkých skúmaných látok. Naopak najnižší vplyv na bunkovú viabilitu vykázala látka PABA-Me-5, kde hodnota IC₅₀ 304,2 μM bola najvyššia spomedzi testovaných látok.

Tab. 5 Zhrnutie vplyvu testovaných látok na viabilitu HepG2 bunkovej línie po 24 hodinovom pôsobení testovaných látok

Látka	Koncentračné rozmedzie (μM)	IC₅₀ (μM)
DAB-5-K	0,1 – 250	255,1
PABA-Me-5	0,1 – 500	304,2
PABA-Et-5	0,1 – 500	201,4
PABAN-3	0,1 – 500	143,6
PABAN-5	0,1 – 500	163,8
MK-F-1	0,1 – 500	172,5
MK-F-2	0,1 – 500	132,7
MK-CF ₃ -1	0,1 – 500	126,3
MK-CF ₃ -2	0,1 – 500	113,1
MK-NO ₂ -1	0,1 – 500	108,7
MK-NO ₂ -2	0,1 – 100	>100

7 Diskusia

Hľadanie a vývoj nových liečiv zohráva dôležitú rolu v zdravotníctve. Už tisícky rokov pred našim letopočtom sa ľudstvo snažilo liečiť rôzne ochorenia liekmi prírodného pôvodu. Postupom času sa začali rozvíjať chemicky pripravené liečivá až po najmodernejšie prístupy prípravy liekov. Nový liek by mal priniesť nové možnosti prístupu k liečbe ochorenia, vylepšenie doposiaľ používaných liekov a riešenie pre zatiaľ nepoznanú liečbu neliečiteľných chorôb. Prospech a bezpečnosť pacienta sú vždy na prvom mieste a z toho dôvodu je nutné vykonať veľké množstvo rôznych testov, vrátane základného testovania cytotoxicity, ale i špecializované prístupy ako je hodnotenie hemolytickej aktivity (Švihlovec et al. 2018). Diplomová práca bola zameraná na *in vivo* testovanie cytotoxicity a hematotoxicity vyvíjaných liečiv. V minulých štúdiách už bol dokázaný ich antibiotický, antimykotický a antifungálny účinok. Štruktúrou sa jednalo o deriváty aminobezoovej kyseliny. Vo všetkých prípadoch bola aminoskupina substituovaná objemnejším substituentom, rôzne substituovaným benzylidénom. V troch prípadoch (MK-F-2, MK-CF₃-2, MK-NO₂-1) aminoskupina bola nahradená hydrazinylidenovým spojovacím článkom a vo väčšine bola substituovaná alebo nahradená karboxylová skupina.

Podobnou chemickou štruktúrou sa vyznačuje známa skupina antibakteriálnych chemoterapeutík, sulfonamidy. Medzi sulfonamidmi a skúmanými látkami sú výrazné rozdiely, ako napríklad prítomnosť sulfonamidovej skupiny. V štruktúre sa však nachádzajú aj spoločné prvky, ktoré sú dôležité pre antibakteriálny účinok. Významnou časťou je aminobenzén, ktorý majú spoločný a je zároveň nevyhnutný pre farmakologický efekt z dôvodu analógie kyseliny *p*-aminobezoovej. U sulfonamidov je voľná aromatická aminoskupina pre účinok nevyhnutná, ale môže byť nahradená za tvorby proliečiv. Taktiež v našich potencionálnych liečivách je aminoskupina substituovaná objemnejším substituentom. Je dôležité, aby bola látka v neionizovanej forme, pretože musí prejsť cez bunkovú membránu dovnútra baktérie. Mechanizmus účinku sulfonamidov je založený na štruktúrnej analógii a kompetitívnom antagonizme kyseliny *p*-aminobezoovej a zabraňujú tak syntéze kyseliny listovej. Sulfonamidy sú baktériostatické, ale širokospektré, ich účinok pôsobí na G⁺ aj G⁻ baktérie. Jedným z nežiadúcich účinkov sulfonamidov je i akútna hemolytická anémia,

čo je dôvod, prečo bolo potrebné hodnotiť hemolytickú aktivitu. Časté podávanie sulfonamidov však viedlo k vzniku rezistencie (Hartl et al. 2012).

Antibiotiková rezistencia je jedným z dôležitých problémov v zdravotníctve. Je to vlastne schopnosť mikroorganizmu odolávať účinkom antimikrobiálneho prostriedku vplyvom výsledku génovej mutácie alebo expresiou exogénneho genetického materiálu. Vznik rezistencie podmieňuje veľa faktorov zo strany makroorganizmu, mikroorganizmu a lieku. Medzi ne patria lokálna antibiotiková politika, génové mutácie vplyvom vonkajšieho prostredia, dostupnosť zdravotníckej starostlivosti, vysoká spotreba antibiotík v humánnej a veterinárnej praxi a iné. Dôležité je, aby sa viedlo k racionálnej antiinfekčnej liečbe, ktorá by mala za následok optimalizáciu spotreby antibiotík a zníženie rezistencie (Jarčuška and Liptáková 2004). Svetová zdravotnícka organizácia WHO v roku 2017 vydala zoznam baktérií, pre ktoré je nutné získanie nových antibiotík. Baktérie boli zoradené do troch skupín podľa priority. Medzi týmito baktériami sa nachádzali aj baktérie *Staphylococcus aureus*, methicilin-rezistentný (WHO 2017). Práve na týchto baktériách a rade patogénnych húb boli skúšané nosyntetizované látky, s výnimkou látok MK-F-2 a MK-NO₂-2 vykázali látky signifikantní antimikrobiálny i antifungálny efekt.

In vivo testovanie cytotoxicity a hematotoxicity patria medzi počiatočné biologické hodnotenia potencionálnych liečiv.

Väčšina skúšaných látok vykazovala hemolytický účinok porovnateľný s HEPES pufrom, nehemolytickým štandardom. Hodnoty EC₅₀ určené pomocou počítačového programu GraphPad Prism však boli násobne vyššie ako najvyššie koncentrácie použité pri skúmaní aktivity. V prípade látok PABAN-Et-5, MK-CF₃-1 a MK-NO₂-1 sme potvrdili hemolytický efekt, čiže došlo k prekročeniu medze 10 % hemolytickej aktivity pozitívnej kontroly (1 % triton X). Pozorovateľný hemolytický efekt nastal až pri použití nevyššie testovanej koncentrácie daných látok, kedy pozorovaná hemolýza dosahovala maximálne 30 % úrovne pozitívnej kontroly, čo nám neumožnilo presné spočítanie hodnoty EC₅₀. Vyššie koncentrácie látok nebolo možné otestovať z dôvodu nízkej rozpustnosti látok, pričom ich rozpustnosť v suspenzii erytrocytov a bunkovom kultivačnom médiu bola vyššia v porovnaní s HEPES pufrom, ktorý bolo nevyhnutné použiť pre odčítanie absorbance pozadia, kedy zafarbenie roztoku mohlo vniest' falošne pozitívne výsledky.

V prípade hemolytickej aktivity destilovanej vody, ktorá bola použitá na overenie hemolytického účinku, vznikla lýza erytrocytov vyvolaná v dôsledku hypotonického

prostredia a prejavila sa už po pridaní najnižšieho množstva destilovanej vody. So vzrastajúcim množstvom sa hemolytický účinok postupne zvyšoval, avšak v prípade posledného testovaného množstva bol nárast hemolýzy iba necelé 2 % oproti predchádzajúcemu množstvu. Tento fenomén mohol vzniknúť napr. v dôsledku prítomnosti dvojnásobného množstva vody, ktorý suspenziu erytrocytov viacej nariedil a tým pádom nebol pozorovaný výraznejší efekt.

V priebehu sledovania hemolytickej aktivity skúmaných látok bola použitá potkana krv. Medzi potkaňou a ľudskou krvou sa síce nachádzajú rozdiely, ale je viacero faktorov, ktoré ovplyvnili výber potkanej krvi. Príkladom môže byť vyššia dostupnosť, ale rolu zohráva je hygienické hľadisko, možná prítomnosť ochorenia darcu a následné ovplyvnenie výsledkov, nutnosť prístrojového a personálneho zabezpečenia. Taktiež využívanie potkanej krvi je veľmi rozšírené, čo viedlo k intenzívnej štúdiu parametrov potkanej krvi a získaniu podrobných poznatkov vlastností potkanej krvi (da Silveira Cavalcante, Acker et al. 2015, Starobová, Landa et al. 2006).

Pri toxicitných štúdiách sme si zvolili sledovanie vplyvu látok na viabilitu HepG2 bunkovej línie. Jedná sa o bunky odvodené z hepatocelulárneho karcinomu, ktoré sú považované za zlatý štandard pri základných toxikologických skrínigoch, aj keď je ich biotransformačná aktivita značne obmedzená v porovnaní s primárnymi ľudskými hepatocytmi. Avšak dostupnosť primárnych hepatocytov je do značnej miery obmedzená z dôvodu obmedzeného počtu darcov, navyše sa medzi jednotlivými darcami môže vyskytnúť výrazná interindividuálna variabilita, čo môže skresliť výsledné dáta. Vzhľadom k tomu, že HepG2 bunky sú nádorovou bunkovou líniou, tak nám v podstate poskytujú takmer neobmedzené množstvo buniek, ktoré sú uniformné a poskytnú nám dobre opakovateľné výsledky s oveľa nižšou finančnou záťažou (Donato, Tolosa et al. 2015).

Všetky študované látky vykázali negatívne ovplyvnenie viability HepG2 bunkovej línie, avšak hodnoty IC_{50} sa pohybovali v rozmedzí hodnôt 108,7 - 304,2 μM , použité koncentračné rozmedzie bolo od 0,1 μM do 500 μM (s výnimkou prvej testovanej látky DAB-5-K, u ktorej bola kvôli obmedzenej rozpustnosti použitá maximálna koncentrácia 250 μM a poslednej testovanej látky MK-NO₂-2, pri ktorej bola z rovnakého dôvodu najvyššia sledovaná koncentrácia 100 μM).

Vzhľadom k tomu, že zatiaľ nepoznáme plazmatickú účinnú koncentráciu, výsledky nemôžeme škálovo deliť za málo alebo veľmi toxické. Až po zistení účinnej

koncentracii a jej porovnaní so získanými nameranými hodnotami môžeme posudzovať bezpečnosť podávanej látky. Vo väčšine klinicky používaných liečiv sa však účinná koncentrácia pohybuje v rozmedzí jednotiek až desiatok μM , takže z tohto hľadiska je možné látky označiť ako vhodné pre ďalšie testovanie, avšak v prípade látok PABAN-3, PABAN-5, MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃-2, MK-NO₂-1, kedy sa hodnoty IC₅₀ pohybujú pod 200 μM , je treba s ďalším predklinickým testovaním postupovať obozretné i z dôvodu podávania násobne vyšších dávok pokusným zvieratám.

Počas merania absorbancie pri stanovovaní hemolytické aktivity potenciálnych nových liečiv, sme u niektorých hodnôt absorbancie zaznamenali záporné hodnoty, prípadne sme pozorovali nezvyčajný pokles absorbancie. Tieto hodnoty boli z použitých výsledkov eliminované. Kvôli tomu sa škála použitých koncentrácií látok vo výsledkoch líši. Dôvodom je, že pravdepodobne došlo k vyzrážaniu látok, ktoré spôsobila rozdielna rozpustnosť (napríklad v krvi a pufri, ako už bolo spomenuté vyššie). Niekedy je rozdielna rozpustnosť i medzi rôznymi druhmi kultivačných médií (každá bunková línia vyžaduje iné podmienky a teda i iné médium). Práve v dôsledku vyzrážania látky potom môže byť zvýšená absorbancia a preto vychádzajú záporné hodnoty po odčítaní pozadia.

Pri stanovovaní vplyvu testovaných potencionálnych liečiv na bunkovú viabilitu bola použitá neinvazívna metóda hodnotenia. Ďalším krokom v skúmaní účinku potencionálnych liečiv môže byť pozorovanie použitých buniek. Nepoškodenosť bunky môže viesť k nepretržitému sledovaniu tkaninovej kultúry, čo môže prispieť k pochopeniu mechanizmov bunkovej smrti. Znížená viabilita použitých buniek môže byť spôsobená cytostatickým, apoptickým alebo nekrotickým účinkom. Účinok môže byť definovaný pomocou ďalších esejí, ktoré sa zameriavajú na rozdiely, ako je napríklad prítomnosť zápalu, stav membrány a uvoľnenie obsahu bunky (Riss and Moravec 2004).

V prípade pozitívnej korelácie výsledkov hodnôt účinnej koncentrácie a výsledkov testov cytotoxicity a hematotoxicity je možné pokračovať ďalej v predklinickom hodnotení liečiva. Nasledujú ďalšie testy toxicity, testy špeciálnej toxicity, ako sú napríklad testy mutagenity, kancerogenity, reprodukčné štúdie a iné. Ak by aj tieto testy vyšli negatívne, pokračuje sa klinickým hodnotením liečiv, kedy sú testované látky, potenciálne nové liečivá, podávané ľudským dobrovoľníkom. Výskum liečiva je veľmi zložitý a nákladný proces získania čo najúčinnšieho a najbezpečnejšieho lieku (Starobová, Landa et al. 2006).

8 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo určenie *in vitro* hemolytického pôsobenia skúmaných látok s potenciálnym antibiotickým a antimykotickým účinkom. Ďalším účelom bolo stanovenie vplyvu spomenutých látok na viabilitu modelovej bunkovej línie HepG2 v *in vitro* podmienkach. Zároveň sa sledoval vzájomný vzťah medzi výsledkami získanými z testov viability a hemolytickým pôsobením.

Väčšina skúšaných látok vykazovala hemolytický účinok porovnateľný s HEPES pufrom, nehemolytickým štandardom. V prípade najvyššie testovanej koncentrácie látok PABA-Et-5 (100 μM), MK-CF₃-1 (250 μM) a MK-NO₂-1 (250 μM) sme potvrdili hemolytický efekt, čiže bola prekročená hranica 10 % hemolytickej aktivity pozitívnej kontroly (1 % triton X). Vyššie koncentrácie látok nebolo možné otestovať z dôvodu nižšej rozpustnosti látok v HEPES pufri, potrebného na odčítanie absorbancie pozadia.

Všetky študované látky vykázali negatívne ovplyvnenie viability HepG2 bunkovej línie, avšak hodnoty IC₅₀ sa pohybovali v rozmedzí hodnôt 108,7 - 304,2 μM , čo nás vedie k tomu, že s látkami, ktorých hodnota IC₅₀ je pod 200 μM , je treba v ďalšom predklinickom testovaní postupovať obozretne. U látok MK-CF₃-1 a MK-NO₂-1, pri ktorých bol potvrdený hemolytický efekt, sa zistila hodnota IC₅₀ nižšia ako 200 μM . Látka MK-CF₃-1 vykazovala hodnotu IC₅₀ 126,3 μM a látka MK-NO₂-1 mala koncentráciu IC₅₀ 108,7 μM . Tretia hemolytická látka PABA-Et-5 je menej cytotoxická, hodnota IC₅₀ predstavuje 201,4 μM . V prípade, že účinná koncentrácia nebude omnoho nižšia než toxické koncentrácie alebo nebude výrazne aktívna, je vhodnejšie látky MK-CF₃-1 a MK-NO₂-1 z budúceho testovania vyradiť, kvôli získaným hraničným alebo potvrdeným výsledkom dvoch parametrov toxicity. Hemolýza oboch spomínaných látok nastáva pri koncentrácii 250 μM , pri nižšej koncentrácii, je možné sledovať skôr cytotoxické pôsobenie. Naopak, látka PABA-Et-5 spôsobila hemolýzu už pri koncentrácii 100 μM a hodnota IC₅₀ bola pozorovaná až pri koncentrácii 201,4 μM .

Až po zistení účinnej koncentrácie a jej porovnaní so získanými nameranými hodnotami môžeme určovať bezpečnosť podávanej látky. Vo veľkom množstve klinicky používaných liečiv sa však účinná koncentrácia pohybuje v jednotkách až desiatkach μM , takže z tohto hľadiska je možné látky posudzovať ako vhodné pre ďalšie testovanie.

LITERATÚRA

1. Amin, K. and R. M. Dannenfelser (2006). "In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist." J Pharm Sci **95**(6): 1173-1176.
2. Baskurt, O. K., et al. (1997). "Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study." Am J Physiol **273**(6): H2604-2612.
3. Baskurt, O. K. and H. J. Meiselman (2013). "Comparative hemorheology." Clin Hemorheol Microcirc **53**(1-2): 61-70.
4. Carter, M. and J. Shieh (2015). Chapter 14 - Cell Culture Techniques. Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition). M. Carter and J. Shieh. San Diego, Academic Press: 295-310.
5. da Silveira Cavalcante, L., et al. (2015). "Differences in Rat and Human Erythrocytes Following Blood Component Manufacturing: The Effect of Additive Solutions." Transfus Med Hemother **42**(3): 150-157.
6. Demitrovičová, A. (2017). "Nové antibiotiká a antimykotiká." Praktické lekárníctvo: 131-134.
7. Dobrovolskaia, M. A., et al. (2008). "Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro." Nano Lett **8**(8): 2180-2187.
8. Donato, M. T., et al. (2015). "Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells." Methods Mol Biol **1250**: 77-93.
9. Eastmond, D. A., et al. (2009). "Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme." Mutagenesis **24**(4): 341-349.
10. Fábryová, E., et al. (2012). Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax, Praha: Grada. ISBN: 9788024743912

11. Fang, I. J. and B. G. Trewyn (2012). "Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins." Methods Enzymol **508**: 41-59.
12. Fendrich, Z. (2005). "Malárie a její léčba." Klinická farmakologie a farmacie: 89-94.
13. Ford, K. A. (2016). "Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods." ILAR J **57**(2): 226-233.
14. Garratty, G. (2010). "Immune hemolytic anemia associated with drug therapy." Blood Rev **24**(4-5): 143-150.
15. Harcke, S. J., et al. (2019). "G6PD deficiency: An update." Jaapa **32**(11): 21-26.
16. Hartl, J. et al. (2012). Farmaceutická chémie IV. Praha, Nakladatelství Karolinum.: 93-96.
17. Jarčuška, P. and A. Liptáková (2004). "Rezistencia antibiotík a ich spotreba." Via practica **4**: 211-214.
18. Kafková, A. (2005). "Anémie - diagnostika a liečba." Via practica **2**(3): 141-144.
19. Karimi, M. A., et al. (2014). "Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay." PLoS One **9**(2): e89357.
20. Kiss, F., et al. (2016). "The effect of centrifugation at various g force levels on rheological properties of rat, dog, pig and human red blood cells." Clin Hemorheol Microcirc **62**(3): 215-227.
21. Li, W., et al. (2015). "Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices." Biomed Rep **3**(5): 617-620.

22. Lisowska, M. (2011). "Niedokrwistość autoimmunohemolityczna psów – przypadek kliniczny." Magazyn Weterynaryjny.
23. Loomis, T. A. and A. W. Hayes (1996). CHAPTER 13 - Toxicologic Testing Methods. Loomis's Essentials of Toxicology (Fourth Edition). T. A. Loomis and A. W. Hayes. San Diego, Academic Press: 205-248.
24. Lüllman, H., et al. (2004). Farmakologie a toxikologie. Praha: Grada. ISBN: 80-247-0836-1
25. Manaargadoo-Catin, M., et al. (2016). "Hemolysis by surfactants--A review." Adv Colloid Interface Sci **228**: 1-16.
26. Mustafa, I. A.-O., et al. (2016). "Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM." (2314-6141 (Electronic)).
27. Neun, B. W., et al. (2015). "Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles." Nanotechnology Characterization Laboratory.
28. Panchaxari, D. M., et al. (2013). "Design and characterization of diclofenac diethylamine transdermal patch using silicone and acrylic adhesives combination." Daru **21**(1): 6.
29. Parasuraman, S. (2011). "Toxicological screening." Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics **2**(2): 74-79.
30. Riss, T. L. and R. A. Moravec (2004). "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 **2**(1): 51-62.
31. Riss, T. L., et al. (2004). Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe et al. Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

32. Sharma, P. and J. D. Sharma (2001). "In vitro hemolysis of human erythrocytes - - by plant extracts with antiplasmodial activity." J Ethnopharmacol **74**(3): 239-243.
33. Součková, L., et al. (2015). "Jak se vyvíjí nový lék." Practical pharmacy **11**(4): 144-147.
34. Stančíaková, L., et al. (2015). "Anémie - diagnostika a diferenciálna diagnostika." Via practica **12**(4): 156-159.
35. Starobová, O., et al. (2006). "Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity." 3-17.
36. Suchý, D., et al. (2009). "Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv." Czech urology **13**(2): 141-148.
37. Švihlovec, J., et al. (2018). Farmakologie, Grada. 97-99. ISBN: 9788024755588
38. Trojan, S., et al. (2003). Lékařská fyziologie. Praha, Grada. 111-156. ISBN: 80-247-0512-5
39. van der Helm, M. W., et al. (2016). "Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research." Tissue Barriers **4**(1): e1142493.

ELEKTRONICKÉ ZDROJE

1. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; USA. In: Promega. 2020. Dostupné na URL: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-mts_/?catNum=G3582 Prístup 29. 4. 2020

2. Anonym. Gain More Informative Data by Multiplexing a Fluorescent Real-Time Cytotoxicity Assay with Luminescent, Fluorescent or Colorimetric Viability Assays; USA. In: Promega. 2013. Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/multiplexing-a-fluorescent-real-time-cytotoxicity-assay-with-luminescent-fluorescent-or-colorimetric/> Prístup 21. 1. 2020
3. Anonym. Glycerol-Glo™ Assay; USA. In: Promega. 2020. Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/products/energy-metabolism/lipid-metabolism-assay/glycerol-glo-assay/?catNum=J3150> Prístup 2. 5. 2020
4. Anonym. Italian G6PD Deficiency Association. Drugs that should be avoided: official list. In: G6PD Deficiency favism association. 2019. Dostupné na URL: https://www.g6pd.org/en/G6PDDeficiency/SafeUnsafe/DaEvitare_ISS-it. Prístup 3. 12. 2019
5. Mauriac, H., Pannetier Ch. and Casquillas G. V. Organs on chip. In: Elveflow. 2017. Dostupné na URL: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/organs-chip-review/> Prístup 1. 5. 2020
6. OECD. Guidelines for the Testing od Chemicals, Section 4. Test No. 406: Skins Sensitisation. In: OECDiLibrary. 1992. Dostupné na: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264070660-en> Prístup 14. 1. 2020
7. Vejražka, M. Bunečné kultury. In: Bioprojekty 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Dostupné na URL: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf> Prístup 24. 1. 2020
8. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In: World Health Organization. 2017. Dostupné na URL: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> Prístup 27. 4. 2020

9. Wilkin, D. Brainard, J. Mutation. In: CK-12 Foundation. 2012. Dostupné na URL: <https://www.ck12.org/biology/mutation/lesson/Mutation-Types-BIO/> Prístup 1. 5. 2020