

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

STUDIUM CYTOTOXICITY VÝVOJOVÝCH BRONCHODILATANCÍ *IN VITRO*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Hradec Králové 2020

Michaela Havelková

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

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Lucii Hyřové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, věnovaný čas, ochotu a laskavou pomoc nejen při práci v laboratoři, ale také při sepsání této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Michaela Havelková

Školitelka: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium cytotoxicity vývojových bronchodilancí *in vitro*

Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení vlivu vývojových bronchodilatačně aktivních látek na viabilitu modelových nádorových buněčných linií lidských jaterních buněk HepG2 a lidských plicních buněk HCC827. Tato potencionální léčiva jsou teoreticky vhodná k léčbě astma bronchiale a CHOPN. Předmětem zkoumání byly látky (VN014a, VN015a, VN045b, VN122c) odvozené od struktury chinazolinových alkaloidů vasicinu a vasicinonu, což jsou obsahové látky rostliny *Justicia adhatoda*. Rostlina, pocházející z Indie, je hojně využívána v tradiční ayurvédské medicíně mimo jiné k léčbě dýchacích obtíží. Kombinace obou alkaloidů vykazuje výraznou bronchodilatační aktivitu. Cytotoxické působení látek bylo testováno kolorimetrickou metodou měřící buněčnou metabolickou aktivitu založenou na redukci tetrazolinové sloučeniny. K posouzení vlivu na viabilitu byl stanovován parametr IC_{50} pro studované látky na obou testovaných buněčných liniích.

Celkově testovaná vývojová bronchodilatancia vykazovala cytotoxické působení na jaterní buněčnou linii HepG2 v řádově 100 μ M koncentracích, stejně tomu tak bylo i v případě plicní linie HCC827. Výsledné pořadí testovaných látek dle zjištěné IC_{50} pro jednotlivé typy buněk bylo různé. Jako nejvíce toxická pro HepG2 buňky se jevila látka VN015a a nejméně toxickou byla látka VN014a. Pro buňky linie HCC827 byla nejvíce toxická testovaná látka VN122c a nejméně toxická látka VN045b.

Vzhledem k tomu, že maximální plazmatická koncentrace většiny klinicky používaných léčiv se v lidském organismu pohybuje maximálně řádově v jednotkách až desítkách μ M, lze konstatovat, že testované látky se jeví perspektivně z hlediska dalšího testování.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Michaela Havelková

Supervisor: PharmDr. Lucie Hyršová, PhD.

Title of diploma thesis: Study of cytotoxicity of newly prepared bronchodilators *in vitro*

This diploma thesis is focused on the determination the influence of developmental bronchodilatory active substances on viability of model tumor cell lines of human liver cells HepG2 and human lung cells HCC827. These potential drugs are theoretically suitable for the treatment of asthma bronchiale and COPD. The tested compounds (VN014a, VN015a, VN045b, VN122c) were derived from structure of the quinazoline alkaloids vasicine and vasicinone, which are substances contained in the *Justicia adhatoda* plant. The plant originated in India is widely used in traditional Ayurvedic medicine besides others to treat respiratory problems. The combination of both alkaloids showed significant bronchodilation activity. Cytotoxic activity of compounds was tested using colorimetric method by measuring cell metabolic activity based on reduction of tetrazolium compound. The IC₅₀ value was determined for each studied compound on both used cell lines to assess the influence on cell viability.

Overall, the tested developmental bronchodilators proved cytotoxic effect on the hepatic cell line HepG2 and on the lung cell line HCC827 in the order of magnitude of hundreds μM concentrations. The final ranking of the tested substances according to the IC₅₀ was different for each cell type. VN015a was the most cytotoxic substance for HepG2 cells, VN014a was the least cytotoxic compound. VN122c was the most cytotoxic substance for HCC827 cells, VN045b showed the lowest cytotoxic effect.

Considering maximum plasma concentration of most clinically used drugs in human organism, which ranges maximum in order of magnitude of singles to tens μM , we can conclude that test substances are perspective for further testing.

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod	10
3	Teoretická část	11
3.1	Hodnocení léčiv	11
3.1.1	Preklinické studie	11
3.1.2	Klinické studie	13
3.2	Vybrané metody stanovení cytotoxicity (testy cytotoxicity)	14
3.2.1	Charakterizace metodologického přístupu k testování	14
3.2.2	Faktory ovlivňující výběr testu	15
3.3	<i>In vitro</i> modely	15
3.3.1	2D a 3D buněčné modely	17
3.4	Bronchodilatační terapie	19
3.4.1	Astma bronchiale	19
3.4.2	CHOPN	21
3.4.3	Bronchodilatancia	24
3.4.4	Charakteristika stanovovaných látek	30
4	Cíle práce	36
5	Experimentální část	37
5.1	Materiál	37
5.1.1	Buněčné linie	37
5.1.2	Pomůcky, přístroje	38
5.1.3	Chemikálie	39
5.1.4	Testované látky	40
5.2	Princip použité metody	40

5.3	Pracovní postup	41
5.3.1	Pasážování a příprava buněk pro testování	41
5.3.2	Příprava roztoků testovaných látek	42
5.3.3	Vlastní postup testu cytotoxicity a zpracování výsledných dat.....	43
6	Výsledky	45
6.1	Výsledky pro buněčnou linii HepG2	45
6.2	Výsledky pro buněčnou linii HCC827	47
6.3	Porovnání hodnot IC_{50}	50
7	Diskuse.....	51
8	Závěr	53
9	Literatura.....	54

1 Seznam zkratek

ACO	fenotyp překryvu astma a CHOPN (z agl. astma-COPD overlap)
BCOS	fenotyp překryvu bronchiektáze a CHOPN (z agl. bronchiectasis and COPD overlap syndrome)
BMI	index tělesné hmotnosti (z agl. body mass index)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
COPD	chronická obstrukční plicní nemoc (z agl. chronic obstructive pulmonary disease)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované sérum (z agl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
ED ₅₀	střední efektivní dávka (z agl. median effective dose)
FBS	fetální bovinní sérum
FEV ₁	usilovně vydechnutý objem za první sekundu
FVC	usilovná vitální kapacita
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (z agl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid)
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
LABA	dlouze působící β_2 adrenergní agonista (z agl. long acting β_2 adrenergic agonist)

LAMA	dlouze působící antagonist muskarinových receptorů (z agl. long acting muscarinic antagonist)
LD ₅₀	střední smrtná dávka (z lat. <i>dosis lethalis media</i>)
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolinum]
PBS	fosfátový pufr (z agl. phosphate buffered saline)
PDE	fosfodiesteráza (z agl. phosphodiesterase)
PES	fenazin ethosulfát (z agl. phenazine ethosulfate)
SABA	krátce působící β_2 adrenergní agonista (z agl. short acting β_2 adrenergic agonist)
SAMA	krátce působící antagonist muskarinových receptorů (z agl. short acting muscarinic antagonist)
ULABA	ultra dlouze působící β_2 adrenergní agonista (z agl. ultra long acting β_2 adrenergic agonist)
ULAMA	ultra dlouze působící antagonist muskarinových receptorů (z agl. ultra long acting muscarinic antagonist)

2 Úvod

Stanovení cytotoxicity testovaných látek na buněčných modelech *in vitro* patří mezi testy používané v preklinických studiích při procesu hodnocení nových léčiv. Pro uvedení léčivé látky na trh je povinné vykonat tyto preklinické testy zjišťující výsledky toxicity, kdy musí žadatel o registraci doložit na základě svých výsledků testů, že jsou splněna kritéria neškodnosti potencionálních léčiv (Lüllmann et al. 2012).

Snaha vyvíjet nová bronchodilancia je především z důvodu neoptimální účinnosti nyní používaných léčivých látek. Například co se týče teofylinu, je jeho hlavním problémem úzké terapeutické okno nebo v případě β_2 agonistů výskyt nežádoucích účinků z důvodu jejich neúplné selektivity (Špulák et al. 2014).

Tato práce se zabývá látkami, které vznikly modifikací struktury přírodních obsahových látek – alkaloidů získaných z rostliny *Justicia Adhatoda*. Tyto dva chinazolinové alkaloidy vasicin a vasicinon mají mimo jiné bronchodilatační aktivitu. Rostlina je využívána především v tradiční ayurvédské medicíně pro celou řadu indikací (Kumar et al. 2010).

Testované látky s bronchodilatační aktivitou by se v budoucnu daly využít v terapii obstrukčních plicních nemocí jako je astma bronchiale a/nebo chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), jelikož obě onemocnění jsou poměrně závažná a doposud neexistuje ideální bronchodilatans.

CHOPN je třetí nejčastější příčina úmrtí na světě a v roce 2017 toto onemocnění způsobilo přibližně 3,2 milionu úmrtí celosvětově (Halpin et al. 2019). Z metaanalýzy hodnotící 194 studií vyplývá, že celosvětová celková prevalence CHOPN je 9,23 % u mužů a 6,16 % u žen (Ntritsos et al. 2018). V České republice úmrtnost v roce 2015-2016 dosáhla hranice 3 500 osob a počet hospitalizovaných bylo 16 000 (Koblížek et al. 2018).

Bronchiálním astmatem na světě trpí více než 300 miliónů lidí a asi 250 000 na následky tohoto onemocnění zemře, ale prevalence dle lokální statistiky se podle epidemiologických studií významně liší. V rámci České republiky jím pak trpí každé desáté dítě a téměř každý dvanáctý dospělý, ale také se zde vyskytuje spousta nediodagnostikovaných astmatiků. Úmrtnost se v ČR pohybuje kolem 100 osob ročně (Salajka a Sedlák 2019, Novosad a Krčmová 2018).

3 Teoretická část

3.1 Hodnocení léčiv

Celý proces od zahájení výzkumu po uvedení léčiva na trh trvá 12 – 15 let. Jedná se o složitý, časově náročný a nákladný proces vývoje o co nejúčinnější a nejbezpečnější lék. Z přibližně 10 000 látek se budoucím léčivem stane pouze 1 látka. Na začátku vývoje stojí objev nových struktur nebo výzkum již známých molekul. Mezi základní postupy získání nových léčiv patří modifikace struktury již známé látky, syntéza analogů přirozených látek, testování látek přírodního původu a jejich farmakologických vlastností, nové použití známé látky a systematický screening vybraných molekul (Lüllmann et al. 2012, Součková et al. 2015).

Proces hodnocení nových léčiv zahrnuje preklinické studie a klinické studie. Hodnocení obvykle probíhá v po sobě následujících fázích na čtyřech testovacích systémech *in silico*, *in vitro*, *in vivo* a *in homo* (Andrade et al. 2016).

3.1.1 Preklinické studie

Preklinické studie nás informují především o účincích a toxicitě nových látek. V preklinických studiích se využívají následující testovací systémy *in vitro* a *in vivo*. Na *in vitro* modelech (jako jsou například izolované buňky, tkáně, orgány) se testuje především toxicita a farmakologické vlastnosti. Přes veškerou snahu snížení počtu pokusných zvířat pomocí zlepšování metod u testovacích systémů *in vitro* nelze živé modely nahradit zejména z důvodu nutnosti ověření účinnosti a bezpečnosti látky na orgánové systémy se všemi vazbami, které jsou přítomny pouze v komplexním živém organismu. Nejčastěji se testy provádí na zdravých zvířatech, ale občas i na zvířatech, u kterých se uměle navozuje dané experimentální onemocnění (Lüllmann et al. 2012, Součková et al. 2015).

Během preklinického vývoje musí potenciální kandidát na nové léčivo projít několika kroky zahrnující testy farmakodynamiky, farmakokinetiky a toxicity. Mezi testy toxicity řadíme tři základní skupiny testů a to akutní, při nichž je testována toxicita po jednorázovém podání, dále chronické, kdy je zjišťována toxicita po opakovaném podání

a testy speciální toxicity zahrnující testy mutagenity, kancerogenity a reprodukční studie (Andrade et al. 2016, Součková et al. 2015).

Testy farmakokinetiky a farmakodynamiky

Cílem testů farmakokinetiky je odhalení chování potencionálního léčiva v organismu na úrovni absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace. Farmakodynamické testy popisují vztah mezi danou koncentrací a rozsahem specifické odpovědi a ukazují nám, co daná látka dělá s tělem (Edwards et al. 2007, Van den Anker et al. 2018).

Toxicita po jednorázovém podání – akutní toxicita

Testy akutní toxicity jsou důležitým prvním krokem při stanovení bezpečnostního profilu. Dříve se zjišťovala tzv. střední smrtná dávka (LD_{50} – *dosis letalis media*), což znamená, že po podání látky byla způsobena 50% úmrtnost u pokusných zvířat. Dnes již není nutné ji zjišťovat, je preferováno stanovit maximální tolerovanou dávku. Z tohoto testu se poté může určit dávka pro opakované podání (Edwards et al. 2007).

Toxicita po opakovaném podání

Při zjišťování toxicity po opakovaném podání by v ideálním případě měla být cesta podání látky pokusnému zvířeti stejná jako u člověka. Dávky podávané zvířatům by měly být o něco vyšší a doba trvání studie by měla být o něco delší, než je plánovaná délka podání u člověka. Pro studie opakovaných dávek protokoly vyžadují použití tří úrovní dávek plus kontrolní skupiny a použití obou pohlaví jak hlodavce, tak i nehlodavce. Před zahájením studie a v jejím průběhu jsou sledovány změny tělesné hmotnosti, parametry krve, příjem potravy, hematologické vyšetření a další vhodné parametry. Jako závěrečné vyšetření je vyžadováno makroskopické vyšetření při pitvě, stanovení hmotnosti orgánů a kompletní histopatologické vyšetření tkání zvířat (Edwards et al. 2007).

Testy speciální toxicity

Studie mutagenity slouží k odhalení látek s mutagenním potenciálem. Poskytují údaje o schopnosti potencionálního léčiva poškodit genetický materiál. Studie kancerogenity probíhají

u hlodavců dlouhou dobu, téměř po celý život zvířete (18 měsíců až 2 roky), aby se určilo, zda daná látka má schopnost iniciovat nebo podporovat vývoj nádorů. Thalidomidová aféra způsobila potřebu hodnotit potencionální léčiva v reprodukčních studiích. V rámci reprodukčních studií jsou hodnoceny tři podtypy studií. První podtyp hodnotí účinek potencionálního léčiva na fertilitu. V této studii jsou chována zvířata pouze jednoho druhu (nejčastěji potkani nebo králíci). Oběma pohlavím je látka podávána dva nebo více týdnů před pářením a samicím se látka podává ještě určitou dobu gravidity. Druhým podtypem je studie embryotoxicity. Mateřská zvířata jsou vystavena testovací medikaci v období embryogeneze (organogeneze) a těhotná zvířata jsou obvykle usmrcena krátce před termínem porodu pro podrobnou studii plodu. Třetí podtyp hodnotí toxické účinky během pozdního těhotenství, porodu a laktace (Edwards et al. 2007, Lüllmann et al. 2012).

Testy je většinou nutné provádět na zvířatech obou pohlaví a na minimálně dvou zvířecích druzích, přičemž jeden druh musí být hlodavec a druhý nehlodavec. Z hlodavců se především používá myš laboratorní, potkan laboratorní, morče domácí nebo křeček syrský. Z nehlodavců se nejčastěji používá králík domácí, pes domácí nebo kočka domácí. Veškeré testy, procesy a zkoušky musí být prováděny v souladu se správnou laboratorní praxí. Nedílnou součástí správné laboratorní praxe je dodržování etických principů zacházení s pokusnými zvířaty na akreditovaných pracovištích. Cílem preklinických studií je zjistit především bezpečnost potencionálního léčiva a najít důkazy o účinnosti látky (Andrade et al. 2016, Edwards et al. 2007, Součková et al. 2015).

3.1.2 Klinické studie

Klinické zkoušení se dělí do čtyř fází. Je zahájeno fází I, která obnáší první podání potencionálního léčiva člověku. U zdravých dobrovolníků se přezkouší, zda účinky látky, které byly přítomny u pokusných zvířat, jsou přítomné i u člověka. Zjišťuje se farmakokinetika, ovlivnění tělesných funkcí a určuje se dávka.

Ve fázi II se na vybraných pacientech testuje, zda potenciální léčivo působí proti dané chorobě. Dále se testuje bezpečnost, účinnost, farmakokinetika a dochází k úpravě dávky.

Následně ve fázi III se u většího množství pacientů porovnává terapeutická úspěšnost látky se standardní terapií nebo placebem. Následuje proces registračního řízení na základě

podání žádosti výrobcem. Žadatel musí doložit, že kritéria účinnosti a neškodnosti jsou splněna.

Po schválení a registraci se nové léčivo uvádí na trh jako lék. V průběhu používání probíhá IV. fáze klinického testování, kdy jsou sledovány především nežádoucí účinky (Lüllmann et al. 2012).

3.2 Vybrané metody stanovení cytotoxicity (testy cytotoxicity)

Jedna z prvních věcí, kterou musíme rozhodnout před výběrem správného testu je to, co chceme na konci stanovit. Jsou dostupné různé testy, které detekují usmrčené buňky (test cytotoxicity), respektive životaschopné buňky (test viability) a rovněž je možné rozlišit mechanismus buněčné smrti – tedy zda bude docházet k apoptóze nebo nekróze buněk (Anonym 2009). Při testování toxického působení mohou být sledovány různé parametry. Cytotoxicita může být hodnocena kvantifikací uvolněné složky jako je laktát dehydrogenáza, adenylát kináza a následně měřena aktivita uvolňovaného enzymu v kultivačním supernatantu. Alternativou může být měření intracelulární enzymové aktivity, která je ztracena při úniku do extracelulární tekutiny. Dalším způsobem hodnocení je měření buněčné metabolické aktivity, kterou lze stanovit redukcí tetrazolinových solí na barevný formazan nebo redukcí resazurinu na fluorescenční resorufin. Nakonec lze cytotoxicitu stanovit pomocí bioluminiscenční detekce adenosintrifosfátu (ATP), který hraje hlavní roli v procesech výměny energie v biologických systémech, a proto je spolehlivým znakem životaschopnosti buňky (Peternel et al. 2009).

Každá *in vitro* buněčná kultura představuje heterogenní populaci, která v případě vystavení buněk působení toxinu neodpovídá jednotně. V důsledku této heterogenity buněčné populace představují data průměrný signál (Anonym 2009).

3.2.1 Charakterizace metodologického přístupu k testování

Testy používané při stanovení cytotoxického působení se výrazně liší. Existují dva základní přístupy: buď jsou buňky nasazeny na kultivační destičky a nechají se určitou dobu před přidáním testované látky usadit nebo mohou být buňky nasazeny na destičky, které již obsahují testované látky (Anonym 2009).

Doba expozice toxinu se může lišit od méně než hodiny po několik dní. Pokud látky způsobují okamžité nekrotické poškození buněk, lze použít krátkou dobu expozice, jestliže toxiny inhibují buněčnou proliferaci, musíme použít delší dobu expozice. Vhodnější jsou rychlé testy např. i z důvodu snížené pravděpodobnosti možných interakcí testované sloučeniny s ostatními chemikáliemi (jako je např. použité rozpouštědlo nebo příměsi použité v kultivačním médiu). Typicky se hodnotí cytotoxické působení látek po 24 resp. 48 hodinách od přidání zkoumané látky (Anonym 2009).

3.2.2 Faktory ovlivňující výběr testu

Jedním z prvních faktorů, které je třeba vzít v úvahu, je snadné použití, citlivost detekce a doba potřebná k provedení a vyhodnocení experimentu. Rovněž stabilita detekovaného signálu a stabilita použitého činidla je důležitým hlediskem pro snadné a spolehlivé zaznamenávání dat. Činidlo by mělo být stabilní při pokojové teplotě po určitou dobu, aby bylo možné činidlo nadávkovat do mikrotitračních destiček (Anonym 2009).

3.3 *In vitro* modely

In vitro modely se používají již několik desetiletí, rutinně se zavedly v průběhu šedesátých let minulého století. Začaly se používat především ke snížení počtu experimentálních zvířat, tedy z etických i ekonomických důvodů (Gad 2000). Testovací systémy založené na použití buněčných linií mají tedy výhodu především v tom, že postrádají přítomnost experimentálních zvířat, hlavní nevýhodou je relativní jednoduchost těchto modelů (Piersma 2006). Zmiňovaná jednoduchost modelů, však může být i výhodou. Většina experimentální práce se totiž provádí na nádorových buněčných liniích, které jsou na rozdíl od primárních buněk dediferencované, tedy postrádají určité specifické rysy, které jsou typické pro primární buňky. Primární kultury jsou získané přímo z určitého typu tkáně, jakmile však dojde k pasáži buněk, kultura již není primární, stává se buněčnou linií. Dále je pro nádorové linie charakteristické neustálé dělení buněk, což poskytuje prakticky nekonečné zásoby buněk a zajišťuje i dobrou reprodukovatelnost výsledků na rozdíl od primárních buněk získaných od různých dárců, kde je třeba počítat s velkou interindividuální variabilitou. Základní rozdíly mezi nádorovými buněčnými liniemi a primárními buňkami jsou shrnuté v Tab. 1 (Anonym 2016).

Tab. 1 Rozdíly mezi primárními buňkami a nádorovými buněčnými liniemi.

	Primární buňky	Nádorové buněčné linie
Aplikovatelnost na celý organismus (<i>in vivo</i>)	poměrně dobrá	orientační
Dostupnost	špatná	velmi dobrá
Cena	vysoká	poměrně levné
Reprodukovatelnost výsledků	špatná	dobrá
Diferenciace buněk	diferenciované	dediferencované
Životnost	krátká	velmi dlouhá

Modifikováno dle: Anonym (2016)

Pro růst buněk v kultuře existují dva základní systémy. Prvním je suspenzní kultura, což znamená, že buňky jsou rozptýleny volně v kultivačním médiu. Pouze několik typů buněk roste v tomto systému (např. hematopoetické), ale některé další buněčné linie se dají upravit, aby mohly být v tomto systému kultivovány. Pro stimulaci růstu může být kultura zředěna, jelikož růst je omezen koncentrací buněk. Druhým typem je adherentní kultura, ve které roste většina typů buněk včetně primárních. V adherentní kultuře jsou buňky přilnuty k povrchu, jelikož jsou závislé na ukotvení. Tato kultura vyžaduje pravidelné pasážování, jelikož je omezen růst povrchovou plochou, ale na druhou stranu je možné snadno kontrolovat růst pomocí inverzního mikroskopu (Anonym 2015).

Původ a typy buněk používané v hodnocení cytotoxicity jsou často vybírány na základě konkrétních cílů projektu nebo sledovaného cílového orgánu testovaného potenciálního léčiva (Anonym 2015). Dostupná je pestrá škála buněčných linií zahrnující jaterní, ledvinné, plicní, srdeční, kožní, nervové buňky a mnoho dalších (Gad 2000). Bez ohledu na zvolený model je důležité stanovit stálý a reprodukovatelný postup, což se týká reprodukovatelnosti výsledků nejen v rámci jedné laboratoře, ale výsledky by měly být srovnatelné v různých laboratořích (Piersma 2006).

Výsledky může dále ovlivnit i počet buněk nasazených na jamku a doba kultivace před provedením experimentu včetně denní doby (Du Pré 2014). Údržba a manipulace s buněčnými kulturami by měla být v každém kroku standardizována a validována. Citlivost testu může být ovlivněna mnoha jemnými faktory včetně poměru povrchu k objemu kultivačního média, kdy při použití nadměrného objemu média bude probíhat horší výměna

plynů, naopak při použití nedostatečného objemu kultivačního média může dojít ke zkreslení výsledků v důsledku odpařování kapalně části média a tím i zakoncentrování roztoku (Anonym 2009).

3.3.1 2D a 3D buněčné modely

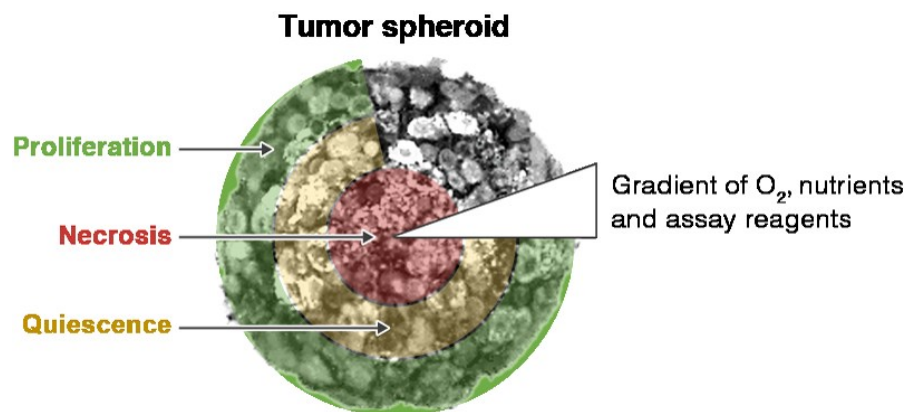
Buněčné kultury *in vitro* se používají pro pochopení mechanismů, které jsou základem chování buněk *in vivo*. Stále je ve většině případů používán tradiční model dvojrozměrné (2D) buněčné kultivace, který je v případě adherentních buněčných linií, založen na přilnutí buněk na dno jamky mikrotitrační destičky. Ačkoli jsou tyto přístupy dobře přijímány a významně pokročily v našem chápání buněčného chování, stále narůstající důkazy ukazují, že za určitých okolností mohou 2D systémy vést k buněčné biologické aktivitě, která se výrazně liší od odpovědi *in vivo*. V prostředí *in vivo* jsou buňky obklopeny jinými buňkami a extracelulární matrix, tzn. rostou v 3D prostředí, tudíž 2D struktura adekvátně nezahrnuje toto přirozené 3D prostředí. Výsledkem je, že 2D kultivační testy někdy poskytují zavádějící údaje. Z tohoto důvodu je vhodnější použít 3D buněčné kultury, které lépe napodobují podmínky v živém organismu (Duval et al. 2017, Edmondson et al. 2014).

2D modely

Ve 2D jsou buňky adherentní buněčné linie přilnuté k povrchu kultivačního plastiku, čímž je poskytnuta jejich mechanická podpora. V této buněčné kultuře je buňkám umožněn přístup k podobnému množství živin a růstových faktorů, což vede k homogennímu růstu. Vrstva buněk je složena především z proliferujících buněk, jelikož nekrotické buňky se z povrchu oddělují a při výměně média se odstraní. Buňky jsou zde nepřirozeně nataženy na povrchu, což může ovlivnit mnoho buněčných procesů, především proliferaci, diferenciaci, apoptózu a genovou expresi. Proto tento model nedostatečně nenapodobuje prostředí *in vivo* a buňky se nechovají tak jako v organismu. Jejich výhodou je především jednoduchost provádění experimentů, ale většina těchto metod nezajišťuje kontrolu nad tvarem buněk, který může být kritický pro jejich biologickou aktivitu (Duval et al. 2017, Edmondson et al. 2014).

3D modely

Ve 3D kultuře tvoří buňky agregáty nebo sféroidy. Jsou zde přítomny vzájemné interakce mezi buňkami a mezi buňkami a extracelulární matrix, které více napodobují prostředí *in vivo* a morfologie buněk je více podobná tvaru buněk v organismu. Sféroidy nádorových buněk jsou heterogenní, obsahují buňky v různých stádiích. Proliferující buňky se vyskytují ve vnější oblasti, klidové buňky ve střední oblasti a nekrotické ve vnitřní oblasti jak je znázorněno na Obr. 1. Jejich hlavní výhodou je, že lépe napodobují tkáňové struktury a prostředí *in vivo*, tudíž lépe predikují *in vivo* odpovědi na testované látky (Duval et al. 2017, Edmondson et al. 2014).



Obr. 1 Sféroid z nádorových buněk – červená barva znázorňuje buňky nekrotické, žlutá barva buňky v klidovém stádiu a zelenou barvou jsou zobrazeny proliferující buňky.

Převzato z: Promega (2020)

Rozdíly mezi 2D a 3D strukturami

1. Rozdíl ve fyzikálních a fyziologických vlastnostech. Zatímco ve 2D jsou buňky nataženy v nepřirozeném stavu na plochem dně kultivační destičky, buňky ve 3D si zachovávají normální tvar.
2. Rozdíl v expresi a prostorové organizaci povrchových receptorů a kancerogenních genů. Bylo zjištěno, že extracelulární matrix diktuje organizaci buněk a jejich jader prostřednictvím nepřetržité sítě spojení a tak řídí expresi genů (Lelièvre et al. 2017). Uspořádání buněčného jádra, především chromatinu řídí reakci buněk na vnější podněty, a jelikož buňky rostoucí v 2D vrstvě jsou ve stresu, může se také měnit míra exprese řady genů v důsledku tohoto nepřirozeného stavu.
3. Rozdíl v buněčných stádiích. Buňky ve 2D struktuře jsou většinou proliferující buňky, zatímco ve 3D struktuře jsou obvykle v různých stádiích.

4. Rozdíl v dostupnosti látek do buněk a místního pH. Zatímco ve 2D kultuře látky včetně léčiv difundují do buněk rovnoměrně, difúze do buněk ve sféroidu může být různá v závislosti na umístění buňky ve sféroidu (Edmondson et al. 2014).

V některých případech jsou 2D studie proveditelnější a jsou považovány za jakýsi zlatý standard, kdežto v jiných případech 3D studie přinesou přesnější výsledky, které jsou lépe aplikovatelné na celý organismus. (Duval et al. 2017).

3.4 Bronchodilatační terapie

Bronchodilatancia jsou léčiva určené především pro léčbu obstrukčních respiračních onemocnění jako je chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a astma bronchiale. Obě onemocnění se vyznačují omezením průtoku vzduchu. Bronchodilatační terapie může snížit příznaky obstrukce dýchacích cest uvolněním hladkého svalstva, dochází tedy k bronchodilataci (Williams a Rubin 2018).

3.4.1 Astma bronchiale

Definice

Astma bronchiale je chronické zánětlivé respirační onemocnění. Je charakterizované bronchiální obstrukcí, která je reverzibilní. Na celém světě je odhadován počet astmatiků na více než 300 milionů a počet stále roste. Jeho vznik je nejčastěji v dětském věku. Stává se nečastější chronickou nemocí u dětí. Astma není plně vyléčitelné, avšak je možné ho mít plně pod kontrolou (Kottová et al. 2008, Salajka a Sedlák 2019).

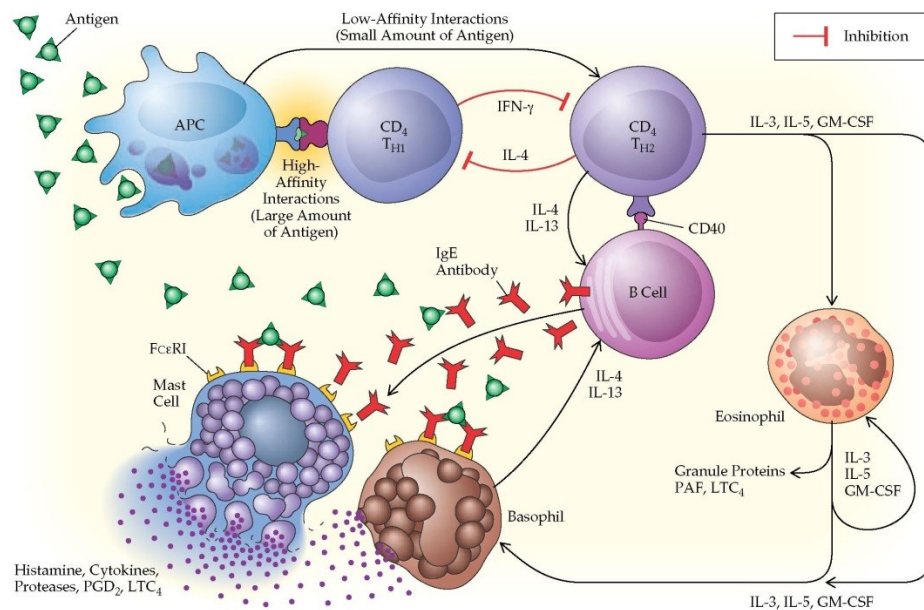
Etiopatogeneze

Aby byl zánětlivý proces aktivován, je nutná přítomnost alergenu (antigenu), která vede k uvolnění IgE protilátek prostřednictvím buněk prezentujících antigen. Tuto odpověď organismu na přítomnost alergenu lze rozdělit na časnou a pozdní fázi.

V časně fázi dochází k navázání antigenu na IgE protilátky, což vede k uvolnění zánětlivých mediátorů (jako jsou histamin, leukotrieny, prostaglandiny a další). Tyto

mediátory okamžitě způsobí bronchokonstrikci – kontrakci hladkých svalů cest dýchacích (Jayasinghe et al. 2015).

V pozdní fázi je také přítomna bronchokonstrikce, která se ale nevyskytuje ihned po expozici antigenu, ale o několik hodin později. Nejvíce se na ní podílejí eozinofily, které způsobují alergický zánět. Důsledkem těchto dějů dochází k remodelaci průdušek. (Jayasinghe et al. 2015). Celý mechanismus vzniku astmatu je zobrazen na Obr. 2.



Obr. 2 Mechanismus vzniku astmatu.

Převzato z: Allergic response (2020)

Ovšem astma může vznikat i bez přítomnosti alergenu tzv. nealergické kdy příčinou může být chlad, stres, fyzická námaha, viry. Tyto faktory pravděpodobně stimulují dráždivé receptory sensorických nervů a uvolnění neuromediátorů, které aktivují mastocyty a další prozánětlivé buňky (Jayasinghe et al. 2015, Kottová et al. 2008).

Rizikové faktory

Příčinou mohou být jak genetické, tak i vnější faktory. Podmínkou vzniku astmatu je především opakovaný kontakt s alergenem. Zvýšené riziko mají pacienti, kteří trpí atopickým ekzémem nebo jím trpěli v dětském věku a také pacienti s alergickou rýmou. Toto riziko se zvyšuje spolu s rodinnou predispozicí (Kottová et al. 2008, Salajka a Sedlák 2019).

Klinické příznaky

Nejčastějšími projevy jsou opakující se epizody dušnosti, pískotů, dráždivého kašle a pocit tíhy na hrudi častěji v noci nebo ráno. Astma může vzniknout v jakémkoli věku. Onemocnění je charakteristické velkou variabilitou příznaků a celkového stavu. Astma je možné klasifikovat do tří skupin dle úrovně kontroly: astma pod kontrolou, pod částečnou kontrolou a pod nedostatečnou kontrolou (Salajka a Sedlák 2019).

3.4.2 CHOPN

Definice

CHOPN je závažné chronické onemocnění dolních dýchacích cest charakterizované omezením průtoku vzduchu v průduškách způsobené bronchiální obstrukcí, která není plně reverzibilní. Bronchiální obstrukce obvykle časem progreduje a je způsobena abnormálními změnami dýchacích cest, které vznikají v důsledku zánětlivé reakce na dlouhodobou expozici škodlivým částicím (Koblížek et al. 2019, Kotolová a Hammer 2018).

Rizikové faktory

Hlavním rizikovým faktorem nemoci je dlouhodobé kouření, tudíž základním přístupem účinné léčby je odstranění expozice tabákového kouře (Zatloukal 2007). Také pasivní kouření je nebezpečné. Rizikovým faktorem může být i dlouhodobé vystavení znečištěnému vzduchu např. smogu, nebo škodlivinám vyskytujícím se v pracovním prostředí (Koblížek et al. 2019). Svou roli v rozvoji onemocnění může hrát také genetická predispozice a věk nad 40 let (Kotolová a Hammer 2018).

Klinické příznaky a klasifikace

Hlavním projevem nemoci jsou exacerbace neboli akutní epizody dušnosti. Exacerbace je nejčastěji vyvolána bakteriemi, viry nebo znečištěným ovzduším v exteriéru i interiéru a při změně počasí. Při akutních epizodách dušnosti se celkově zhoršuje zánět, kdy ve sputu můžeme najít větší množství zánětlivých buněk. Tuto nemoc můžeme klasifikovat do čtyř stádií (I – lehké stádium, II – středně těžké stádium, III – těžké stádium, IV – velmi těžké stádium) podle závažnosti příznaků a dle spirometricky naměřené hodnoty FEV₁ (FEV₁ – usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu) a dle poměru FEV₁/FVC (FVC – usilovná vitální

kapacita), jehož snížení pod 0,70 dokazuje ireverzibilní obstrukci. Jednotlivá stádia s popisem příznaků a spirometrickou charakteristikou jsou uvedena v Tab. 2. Typickým příznakem je produktivní kašel a chronická dušnost způsobená bronchiální obstrukcí. Kvůli přítomné dušnosti se snižuje tolerance fyzické námahy. V pozdějších stádiích může docházet k respirační insuficienci a k rozvoji *cor pulmonale*. Podle stádia onemocnění se také odvíjí léčba (Kolek et al. 2011, Zatloukal 2007).

Tab. 2 Klasifikace CHOPN podle tíže.

Stádium	<i>Spirometrická charakteristika</i>	<i>Klinická charakteristika</i>
I - lehké	FEV ₁ /FVC < 70 % FEV ₁ > 80 % NH	Pacient s chronickými nebo bez chronických příznaků (kašel, expektorace); pacient si ještě nemusí uvědomovat, že jeho funkce plic je již abnormální
II – středně těžké	FEV ₁ /FVC < 70 % 50 % < FEV ₁ < 80 % NH	Pacient s chronickými nebo bez chronických příznaků (kašel, expektorace); příznaky obvykle progredují a objevuje se námahová dušnost; v tomto stádiu většinou pacient vyhledává lékařskou pomoc pro dušnost nebo exacerbaci
III - těžké	FEV ₁ /FVC < 70 % 30 % < FEV ₁ < 50 % NH	Pacient s chronickými nebo bez chronických příznaků (kašel, expektorace); typické je zhoršení dušnosti, která pacienta limituje v jeho denních aktivitách; exacerbace se opakují a prakticky ovlivňují kvalitu života
IV – velmi těžké	FEV ₁ /FVC < 70 % FEV ₁ < 30 % NH nebo FEV ₁ < 50 % NH při současné respirační insuficienci nebo <i>cor pulmonale</i>	Kvalita života je zjevně velmi zhoršena, exacerbace mohou být život ohrožující

FVC – usilovně vitální kapacita, FEV₁ – usilovně vydechnutý objem za 1. sekundu, NH – náležitá hodnota

Převzato z: Kolek et al. (2011)

Komorbidity

Ačkoli CHOPN postihuje primárně plíce, nyní je označováno jako komplexní vícesložkové onemocnění charakterizované chronickým systémovým zánětem, který se často vyskytuje s jinými stavy nazývanými komorbidity. Mezi nejčastější komorbidity, které doprovázejí CHOPN, patří kardiovaskulární onemocnění, metabolické poruchy, osteoporóza, dysfunkce kosterních svalů, úzkost případně deprese, kognitivní poškození, gastrointestinální onemocnění a respirační stavy jako je astma, bronchiektáza, plicní fibróza a rakovina plic. Komorbidity mohou také ovlivnit léčbu CHOPN. Z hlediska délky hospitalizace pro akutní exacerbaci, bylo prokázáno, že pacienti s komorbiditami jako je ischemická choroba srdeční, srdeční selhání, srdeční arytmie, diabetes mellitus a cévní mozková příhoda byli hospitalizováni delší dobu. Předpokládá se, že systémový zánět je nejpravděpodobnější vazbou vzhledem k jeho roli v patogenezi CHOPN a jeho hlavních komorbidit (Negewo et al. 2015).

Fenotypy

U onemocnění CHOPN se můžeme setkat s různými klinickými formami neboli fenotypy. Pokud je u pacienta základem chronická bronchitida a tím pádem vyšší produkce hlenu a mikrobiální kolonizace dolních cest dýchacích, jedná se o bronchitický typ. Pokud pacient trpí více progresivní destrukcí plicních sklípků, projevující se dušností při námaze, sníženou tolerancí fyzické námahy, soudkovitým hrudníkem a absencí chronické expektorace jde o typ emfyzematický. Forma onemocnění, u kterého se vyskytly dvě a více exacerbace v průběhu posledních dvanácti měsíců, je nazývána exacerbačním fenotypem. Někteří trpí retencí hlenohnisu a tím zvýšeným rizikem infekcí tzv. bronchiektázií. Občas se může vyskytnout i krev v hlenu, někdy však může expektorace chybět. Tento fenotyp je překryvem mezi CHOPN a bronchiektázami označován anglickou zkratkou BCOS (bronchiectasis and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) overlap syndrome). U některých pacientů se může vyskytovat kombinace klinických projevů CHOPN a astmatu, jde o fenotyp překryvu CHOPN a astmatu značeným anglickou zkratkou ACO (astma-COPD overlap). Posledním fenotypem je fenotyp plicní kachexie, do kterého jsou řazeni pacienti trpící CHOPN a zároveň i podváhou, kdy je jejich body mass index (BMI) menší než 21 (Koblížek et al. 2019, Pauk 2019).

3.4.3 Bronchodilatancia

Pro bronchodilatační terapii jsou hlavním cílem adrenergní a cholinergní receptory. Aktivace β_2 receptorů vede přímo k relaxaci hladkého svalstva. Antagonisté muskarinových receptorů (anticholinergní terapie) jsou kompetitivní antagonisté acetylcholinu na postgangliových nervových receptorech, což vede k relaxaci hladkého svalstva a bronchodilataci (Williams a Rubin 2018).

Dlouze působící bronchodilatancia a novější ultra-dlouhodobě působící bronchodilatancia se využívají jako preventivní léčiva. Způsobují dlouhodobou bronchodilataci, díky které snižují potřebu záchranné medikace v podobě krátkodobých bronchodilancií při akutních stavech dušnosti u CHOPN i u astmatu. Podáváme je denně a dlouhodobě. Řadíme sem β_2 mimetika, anticholinergika a methylxantiny (Kottová et al. 2008, Martínková 2007, Zatloukal 2007).

Rychle působící bronchodilatancia, označována také jako úlevová či záchranná léčiva slouží k úlevě při náhle vzniklé dušnosti. Do této skupiny můžeme také zařadit kromě SABA (short acting β_2 adrenergic agonist) a anticholinergik SAMA (short acting muscarinic antagonist), methylxantiny s krátkodobým účinkem (Kottová et al. 2008, Zatloukal 2007).

Při léčbě preferujeme především inhalační formy, které mají nižší riziko nežádoucích účinků. Výběr správného terapeutického přístupu závisí na mnoha faktorech např. na závažnosti onemocnění, fenotypu, nežádoucí reakci pacienta na dané léčivo atd. Je také vhodné využívat fixní kombinace, díky kterým můžeme zvyšovat jejich účinek a snižovat riziko nežádoucích účinků. Bronchodilatancia jsou hlavními léky v léčbě CHOPN (Vondra 2004).

β_2 agonisté

Mechanismus účinku

Důležitým cílem β_2 agonistů je β_2 adenoreceptor v hladkém svalstvu. Vazba na receptor způsobí intracelulární biochemickou kaskádu způsobující bronchodilataci. Vazba β_2 agonisty na β_2 adenoreceptor, který je spřažený s G proteinem (konkrétně se jedná o typ G_s), vede ke stimulačnímu působení na adenylátcyklázu, což následně vede ke zvýšení intracelulárního cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), který vede k aktivaci proteinkinázy A. Aktivovaná proteinkináza A inhibuje fosforylaci klíčových svalových proteinů a cAMP také vede

k inhibici uvolňování vápenatých iontů z intracelulárních zásob. Tyto události společně vedou k relaxačnímu účinku hladkých dýchacích svalů. Na relaxaci se také mohou podílet cAMP nezávislé mechanismy zahrnující přímou interakci G_s proteinu s draslíkovými kanály, které jsou přítomny v buňkách hladkého svalstva (Lötvall 2001).

Ačkoli jsou adrenergní receptory přítomné v celém lidském těle, nejvíce klinicky relevantní účinky se vyskytují v srdečním svalu, bronchiálním a děložním hladkém svalu a kosterním svalu (Williams a Rubin 2018).

Farmakokinetika β_2 agonistů

Po perorálním podání mají nízkou biologickou dostupnost a malý terapeutický benefit. Jsou absorbovány v gastrointestinálním traktu, ale podstupují výrazný first-pass efekt, který snižuje jejich skutečnou biologickou dostupnost. K překonání tohoto problému jsou pro perorální terapii vyžadovány vyšší dávky, což může mít za následek nebezpečné nežádoucí účinky. Z těchto důvodů jsou podávány především inhalačně (Williams a Rubin 2018).

Farmakologické rozdíly mezi β_2 agonisty

Krátkodobě působící β_2 agonisté – SABA mají nástup účinku během několika minut, což je základem jejich hlavní role jako záchranné medikace při akutním bronchospasmu. Doba trvání efektu SABA je 3 – 6 hodin, což omezuje jejich použití v chronické terapii. První dlouhodobě působící β_2 agonisté – LABA (long acting β_2 adrenergic agonist) vykazovali dlouhodobou bronchodilataci, která umožňovala dávkování každých 12 hodin. Nyní, nově vyvinuté ultra dlouhodobě působící látky – ULABA (ultra long acting adrenergic agonist) lze dávkovat jednou za 24 hodin. Zástupci jednotlivých skupin jsou uvedeny v Tab. 3. LABA obecně mají vyšší specifitu pro β_2 receptor oproti SABA. Je to dáno různými faktory, včetně přítomnosti vedlejšího řetězce na molekulární struktuře. Tyto postranní řetězce zvyšují lipofilitu molekuly, která umožní jejich retenci v lipidové dvojvrstvě buňky (Williams a Rubin 2018).

Tab. 3 Dělení β_2 agonistů se zástupci jednotlivých skupin

	Příklady léčiv	Nástup účinku	Doba trvání účinku
SABA	Salbutamol	<5min	3-6 h
	Terbutalin		
	Fenoterol		
LABA	Salmeterol	5-15 min	12 h
	Formoterol		
	Olodaterol		
	Vilanterol		
ULABA	Indakaterol	5 min	24 h

Modifikováno dle: Billington et al. (2016)

Formoterol a salmeterol patří mezi dlouhodobě působící β_2 agonisty, ale farmakologicky se liší. Formoterol má rychlý nástup účinku (během několika minut), zatímco salmeterol začíná účinkovat pomaleji. Salbutamol a terbutalin jsou β_2 agonisty s rychlým nástupem účinku, ale jejich trvání je krátkodobé. Rozdíly jsou dány rychlostí absorpce, distribuce do tkání a odlišnou interakcí s β_2 receptorem. Formoterol je plný agonista β_2 receptorů, zatímco salmeterol je pouze částečným agonistou (Lötvall 2001).

Odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv mohou vysvětlovat rozdíly v délce působení. Formoterol má mírnou lipofilitu, čímž je zajištěna rychlá difúze k receptoru. Salmeterol má pomalejší nástup účinku díky své vysoké lipofilitě. Salbutamol a terbutalin mají rychlý nástup účinku a krátké trvání díky vyšší rozpustnosti ve vodě. Snadněji difundují skrz tkáň, ale jsou rychle odplaveny. Oproti tomu formoterol a salmeterol díky své dostatečné lipofilitě zůstávají v tkáních dýchacích cest déle, což vysvětluje jejich dlouhodobé trvání účinku. Odlišná je také jejich vazba na receptor, která je daná jejich chemickou strukturou (Lötvall 2001).

Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky jsou nejčastěji důsledkem stimulace β_2 receptorů i v jiných částech organismu než jen v dýchacích cestách, nebo důsledkem neúplné selektivity k β_2 receptorům, kdy při vyšších dávkách jsou stimulovány i β_1 receptory. Se stimulací β_1 receptoru v srdci se pojí nejzávažnější nežádoucí účinky a to riziko kardiovaskulárních příhod, anginózních stavů

riziko tachykardie, palpitace a arytmií především u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. V důsledku působení na β_2 receptory je rizikem neklid a tremor kosterního svalstva, nespavost a bolest hlavy. Dále pak relaxace dělohy a v rámci biologických procesů β_2 agonisté způsobují zvýšení glykémie, lipolýzu a navozují hypokalémii. Také mají nežádoucí účinek na gastrointestinální trakt, kdy mohou vyvolat nevolnost a zvracení (Billington et al. 2016, Williams a Rubin 2018).

Specifickým nežádoucím účinkem indakaterolu je suchý kašel objevující se po inhalaci léku (Kolek et al. 2011).

Inhalační anticholinergika

Anticholinergika účinkují prostřednictvím vazby na muskarinové receptory v cílových buňkách dýchacích cest. V dýchacích cestách jsou přítomny tři typy muskarinových receptorů M_1 , M_2 a M_3 (Matera a Cazzola 2016).

V současné době se v ČR používá pět antagonistů muskarinových receptorů dělených do tří skupin podle délky účinku podobně jako β_2 agonisté. Prvním zástupcem anticholinergik je ipratropium – krátkodobě působící antagonist muskarinových receptorů SAMA, dále dlouhodobě působící anticholinergika LAMA (long acting muscarinic antagonist) aklidinium, tiotropium a nejnovější umeklidium a glykopyrronium s ultra dlouze působícím účinkem ULAMA (ultra long acting muscarinic antagonist) (Pauk 2019).

Mechanismus účinku

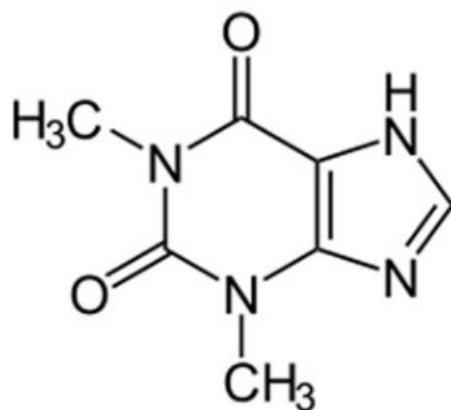
Neurotransmitterem parasympatiku je acetylcholin, který je syntetizován enzymem cholinacetyltransferáza. Acetylcholin je excitační neurotransmitter, který je skladován ve vezikulech a po aktivaci dochází k jeho uvolnění do synaptické štěrbině. Poté acetylcholin stimuluje nikotinové nebo muskarinové receptory. Existuje 5 typů muskarinových receptorů ($M_1 - M_5$), které regulují sekundární posly a iontové kanály. Všechny M receptory jsou spojené s G-proteinem. Anticholinergika působí tak, že inhibují parasympatické nervové impulzy tím, že antagonizují účinek neurotransmiteru acetylcholinu v centrálním a periferním nervovém systému, zejména inhibicí muskarinových receptorů prostřednictvím kompetitivní vazby a snížením cholinergní neurotransmise (Nishtala et al. 2016).

Nežádoucí účinky

Vzhledem k tomu, že muskarinové receptory jsou přítomny v různých částech organismu, mohou anticholinergika vyvolat celou řadu vedlejších účinků. Fyzikálně-chemické vlastnosti a rozpustnost v tucích zásadně ovlivňují schopnost léčiva způsobovat nežádoucí účinky. Dobrá rozpustnost v tucích je předpokladem průniku léčiva hematoencefalickou bariérou a následně centrálních účinků jako je stimulace až excitace centrálního nervového systému, halucinace, bludy, dezorientace, delirium a kognitivní dysfunkce především u pacientů v seniorském věku. Jako bronchodilatancia se používají kvarterní amoniové soli, které jsou hůře vstřebatelné z gastrointestinálního traktu a jsou nerozpustné v tucích, tudíž neprostupují hematoencefalickou bariérou. Současně má také vliv na závažnost nežádoucích účinků cesta podání, kdy se po inhalaci velmi špatně vstřebávají. Nejčastějším nežádoucím účinkem inhalačních anticholinergik je sucho v ústech. Dále mohou zhoršovat glaukom s úzkým úhlem, inhibovat pocení a způsobovat retenci moči zejména u pacientů s benigní hyperplazií prostaty. Obecně antimuskarinika mají i negativní vliv na kardiovaskulární mortalitu a morbiditu, ale který je u inhalačně podávaných antimuskarinik nižší (Lapela et al. 2015, Matera a Cazzola 2016).

Methylxantiny

Jedná se o preventivní bronchodilatační léky podávané perorálně. Používaným methylxantinem v rámci léčby CHOPN a astmatu je teofylin (dimethylxantin) struktura je zobrazena na Obr. 3, méně pak aminofylin, což je komplex teofylinu a ethylendiaminu 2:1. Tato sloučenina je rozpustná ve vodě, díky čemuž je možné intravenózní podání. Vlastní účinek je následně způsoben teofylinem, proto se v rámci methylxantinů používaných pro léčbu astma a CHOPN bavíme především o teofylinu. Strukturou jsou podobné běžným stravovacím xantinům jako je kofein a teobromin. Teofylin se přirozeně vyskytuje v čaji a stopově v kakaových bobech. Původně byl používán jako diuretikum. Poté byl hojně využíván i pro léčbu dýchacích cest, ale následně se jako výhodnější léčiva začali používat β_2 agonisté a inhalační kortikosteroidy mající větší protizánětlivý účinek. V dnešní době se pro své nežádoucí účinky používá spíše jako doplňková terapie u pacientů, kteří nejsou v rámci léčby plně kontrolováni (Barnes 2013, Marek et al. 2010).



Obr. 3 Chemická struktura teofylinu (1,3-dimethyl-7H-purin-2,6-dion)

Modifikováno dle: Johnson et al. (2012)

Mechanismus účinku

Mechanismus účinku teofylinu není stále plně objasněn. Bylo navrženo několik mechanismů účinku, ovšem některé jsou v terapeutických dávkách slabé. Jako prvním mechanismem je uváděna neselektivní inhibice fosfodiesterázy (PDE) 1-4. Dalším mechanismem účinku byl navržen antagonismus všech typů adenosinových receptorů. Dále má imunomodulační a protizánětlivé účinky způsobené inhibicí uvolňování zánětlivých mediátorů. Tento účinek je již pozorován v nižších dávkách, než jsou potřeba pro bronchodilataci. Dále mezi nověji pozorované mechanismy patří zvýšení sekrece interleukinu, zvýšení aktivity histon deacetylázy a několik dalších. Zmíněné zvýšení aktivity histon deacetylázy je výhodné u pacientů, kteří jsou v expozici tabákového kouře a tím pádem u nich dochází ke snížení účinnosti enzymu histon deacetylázy, který je důležitý pro zastavení acetylace histonů a k následnému zastavení exprese prozánětlivých genů (Barnes 2013, Kolek et al. 2017).

Farmakokinetika

Teofylin má úzký terapeutický index, tedy při nízké dávce jsou bronchodilatační účinky malé a při vysoké dávce hrozí riziko nežádoucích účinků. Z důvodu úzkého terapeutického okna je vhodné hladiny teofylinu monitorovat. Při určování dávek k dosažení terapeutického účinku se vyskytují velké interindividuální rozdíly, především kvůli rozdílům v clearance každého pacienta (Barnes 2013).

Nežádoucí účinky

Výskyt nežádoucích účinků u teofylinu je relativně častý, proto se v dnešní době nedoporučuje jako lék první volby. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou bolest hlavy, gastrointestinální potíže jako je nauzea a zvracení, zvýšená sekrece kyseliny a gastroezofageální reflux, z důvodu relaxace dolního jícnového svěrače, což je způsobené inhibicí PDE. Dále pak diuréza, která může mít spojitost s antagonismem adenosinového receptoru a při vysokých dávkách se mohou objevit křeče a srdeční arytmie z důvodu blokády adenosin A_{1A}-receptoru (Barnes 2013, Marek et al. 2010).

3.4.4 Charakteristika stanovovaných látek

Stanovované látky byly získány strukturální modifikací hlavních obsahových látek rostliny *Justicia adhatoda* L. Konkrétně se jedná o deriváty alkaloidů vasicinu a vasicinonu (Špulák et al. 2014).

Justicia adhatoda

Justicia adhatoda (*Adhatoda vasica*) nazývaná také vasaka nebo strom ořechů malabar je dobře známá v celé Indii pro její blahodárné účinky, především pro léčbu různých onemocnění dýchacího ústrojí. Jedná se o rostlinu z čeledi *Acanthaceae*. Vasaka je původem z Indie, ale lze ji najít ve všech tropických oblastech jihovýchodní Asie. Jedná se o stálezelený keř vysoký asi 2,2 – 3,5 metrů, který má velké dlouhé tmavě zelené listy. Květy mohou být zbarvené buď bíle, nebo fialově. Na Obr. 4 je zobrazen vzhled listů a květů rostliny. V tradiční medicíně se používají květy, kořeny, kůra a listy. Rostlina má štiplavou a svíravou chuť (Kumar et al. 2010, Žampachová 2012).



Obr. 4 *Justicia adhatoda* L. (list s květem)

Převzato z: The indian med (2019)

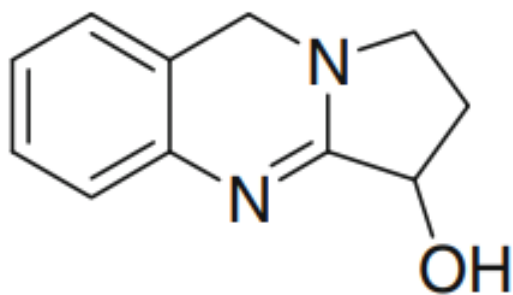
V tradiční ayurvédské medicíně se používá pro celou řadu indikací především k léčbě poruch dýchacích cest jako je bronchitida, astma, tuberkulóza, kašel a jiné symptomy nachlazení skrze podporu bronchiálních funkcí pomocí broncho-dilatačních, expektorančních a mukolytických vlastností. Dále se užívá k léčbě malomocenství, u krvácivých poruch jako je potlačení krvácení u peptických vředů, hemoroidů a krvácejících dásní. Dále lze použít u srdečních potíží, horečky, zvracení, poruch paměti, žloutence, nádorů, bolestí očí, kapavky a má i antibakteriální a protizánětlivé účinky. Obklad z listů lze aplikovat na klouby pro zmírnění revmatických potíží. Terapeutické efekty byly uznány i moderními lékaři. Hlavním alkaloidem je vasicin, dále pak v rostlině můžeme nalézt další alkaloidy jako je například L-vasicinon, což je autooxidační produkt vasicinu, deoxyvasicin, maionton, vasicinolon a vasicinol (Kumar et al. 2010, Nepali et al. 2012).

Alkaloidy vasicin a vasicinon

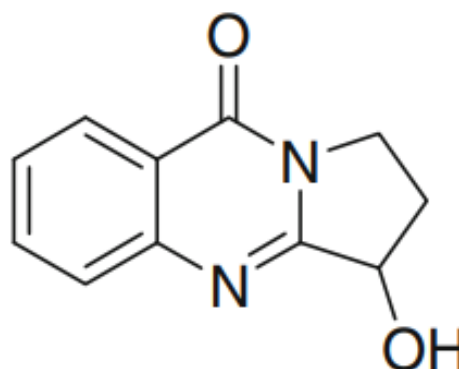
Jedná se o chinazolinové alkaloidy, jež jsou dva hlavní obsahové alkaloidy v listech vasaky. Oba alkaloidy jsou opticky aktivní, ale během extrakce racemizují. Vasicin (1,2,3,9-tetrahydropyrrolo [2,1-b] chinazolin-3-ol) viz Obr. 5, jako čistý alkaloid byl poprvé izolován Hooperem (1888) z listů adhatody, poté byl znovu izolován Senem a Ghoseem (1924), kdy proběhlo podrobné chemické zkoumání tohoto alkaloidu. Molekulová hmotnost vasicinu je 188,23 g/mol (PubChem, vasicine 2020). Vasicin má pravděpodobně, kromě bronchodilatačního účinku, mírný antioxidační a protizánětlivý efekt a byl označen také jako

abortivní činidlo a uterotonikum. Vasicin má také jistou spojitost s mukolytickým činidlem bromhexinem, jelikož se jedná o semisyntetický derivát vasicinu (Kumar et al. 2010, Nepali et al. 2012).

Vasicin vykazuje bronchodilatační aktivitu srovnatelnou s teofylinem *in vivo* a *in vitro*. Dle nedávno uveřejněné práce má vasicin vyšší bronchodilatační aktivitu než teofylin a aktivita vasicinonu je nižší než aktivita použitého standardu teofylinu (Žampachová, 2012). Kombinace chinazolinových alkaloidů vasicinu a vasicinonu ((3S)-3-hydroxy-2,3-dihydro-1H-pyrrolo [2,1-b] chinazolin-9-on) vykazuje výraznou bronchodilatační aktivitu. Chemická struktura vasicinonu je uvedena na Obr. 6 a jeho molekulová hmotnost je 202,91 g/mol (PubChem, vasicinone 2020). Vasicin také vykazuje silnou respirační stimulační aktivitu (Kumar et al. 2010)



Obr. 5 Chemická struktura vasicinu
(1,2,3,9-tetrahydropyrrolo [2,1-b]
chinazolin-3-ol)
Modifikováno dle: Nepali et al. (2012)



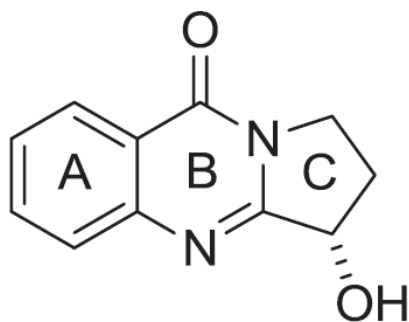
Obr. 6 Chemická struktura vasicinonu
((3S) -3-Hydroxy-2,3-dihydro-1H-pyrrolo
[2,1-b] chinazolin-9-on)
Modifikováno dle: Nepali et al. (2012)

Charakteristika testovaných látek

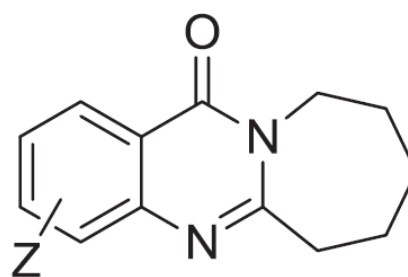
Snaha vyvíjet nová bronchodilatační činidla je z důvodu neoptimální účinnosti nyní používaných bronchodilancií, především kvůli jejich přítomným nežádoucím účinkům. Tím je například myšlena neúplná selektivita β_2 agonistů nebo úzké terapeutické okno teofylinu. Námi testované látky vznikly modifikací původní struktury alkaloidů vasicinu a vasicinonu

v několika krocích. Obměnou struktury bylo získáno více sloučenin, nicméně pro naše experimenty byly vybrány pouze 4, označené kódy VN014a, VN015a, VN045b, VN122c.

Z dosud publikovaných dat bylo zjištěno, že sloučeniny mající sedmičlenný kruh C a alkoxy substituenty v kruhu A, vykazují vyšší aktivitu ve srovnání se standardem teofylinem. Pro lepší orientaci je na Obr. 7 přítomné abecední označení jednotlivých kruhů a na Obr. 8 je vyobrazen již zmiňovaný sedmičlenný kruh C a také je zde naznačen alkoxy substituent. Ovšem přítomnost kruhu A byla pro aktivitu klíčová. Následně bylo zjištěno, že analogy bez kruhu C vykazují lepší aktivitu a zároveň nízkou toxicitu, tudíž byla modifikována nová řada analogů, kde byl C kruh nahrazen jednoduchým alkylovým řetězcem a byla zde také začleněna kyselá nebo bazická část z důvodu zjištění, že by potenciální léčiva měla být ve vodě rozpustná. Tím vznikla nová řada 3-alkyl-3,4-dihydrochinazolin-4-onů. Přítomnost terciárního aminu způsobila ještě další mírné zlepšení aktivity, tím pádem byla další snaha zaměřena na přípravu sloučenin s důrazem na změnu délky postranního řetězce, který nese terciární aminoskupinu. Další zlepšení bylo zjištěno po zavedení nasyceného heterocyklu obsahujícího dusík. Následně byla získána řada C4-O, C4-N, C4-S a modifikací řady C4-S byly získány 4-alkylsulfanylové sloučeniny, které vykazovaly nejvýraznější efekt a byly účinnější než jejich alkoxy a alkylamino analogy (Špulák et al. 2014).

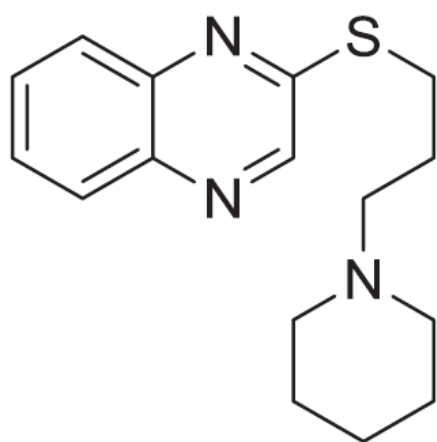


Obr. 7 Struktura vasicinonu se zobrazenými kruhy A, B a C.
Modifikováno dle: Špulák et al. (2014)

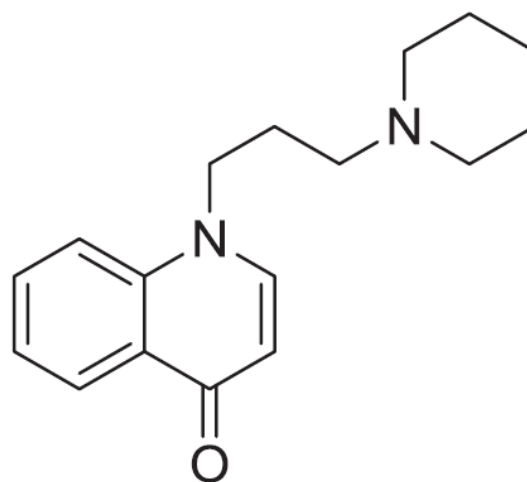


Obr. 8 Struktura se sedmičlenným C kruhem, písmeno Z značící alkoxy substituenty v kruhu A.
Modifikováno dle: Špulák et al. (2014)

Postupně přes další modifikace byly získány látky používané v našem experimentu. Látka VN014a se systematickým názvem 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]quinoxalin s chemickou strukturou zobrazenou na Obr. 9 a látka VN015a se systematickým názvem 1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,4-dihydroquinolin-4-on uvedena na Obr. 10. Při provedení předběžných testů zaměřených na zjištění mechanismu účinku bylo zjištěno, že několik látek, včetně naší testované látky VN014a, vykazuje více než jeden mechanismus. Byl odhalen cholinergní antagonismus, kdy hladký sval průdušnice potkana byl kontrahován karbacholem, což je M-agonista. Pokud byla zároveň přítomna testovaná látka, bylo nutné pro kontrakci použít mnohem vyšší koncentraci karbacholu, z čehož vyplývá antagonismus M-receptoru testovanou látkou. Byl zjištěn také β_2 -agonismus podobným experimentem, kdy u morčat byla průdušnice kontrahována karbacholem a β_2 receptory blokovány propranololem. U sloučenin byla zjištěna podstatně vyšší účinnost na izolované průdušnici potkanů než účinnost teofylinu a vasicinonu. Studie toxicity *in vivo* poskytly dobré výsledky. Po provedení testu akutní cytotoxicity u látky VN014a vyšlo LD_{50} 104,0 mg/kg.



Obr. 9 Chemická struktura látky VN014a
2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]quinoxalin
Modifikováno dle: Špulák et al. (2014)



Obr. 10 Chemická struktura látky VN015a
1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,4-dihydroquinolin-4-on
Modifikováno dle: Špulák et al. (2014)

Dilatační aktivita nových sloučenin byla testována na izolované průdušnici potkana. Potkani byli usmrceni vykrvácením, byla odstraněna trachea a rozřezána na 4 prstence. Každý prsteneček byl rozříznut a upevněn do vícekanálového tkáňového systému do roztoku tak, aby byla možná volná relaxace a kontrakce. Průdušnice byla předem kontrahována karbacholem a následně byly zkoumány relaxační účinky testovaných látek. Změna v pohybu byla registrována snímačem síly a zaznamenána pomocí softwaru SPEL Advanced Kymograph Software. Relaxační účinky nových látek byly porovnávány s teofylinem a následně byly výsledky vyjádřeny jako procentuální změna v poměru k maximální relaxaci vyvolané teofylinem. U látky VN014a byla zjištěna 72 % změna současně s naměřenou střední efektivní dávkou (ED_{50}) 0,00326 mmol/l. Látka VN015a vykazovala bronchodilatační aktivitu 89 % a ED_{50} 0,946 mmol/l. Pro porovnání ED_{50} teofylinu byla zjištěna 2,090 mmol/l a ED_{50} vasicinonu 2,684 mmol/l (Špulák et al. 2014).

O látkách VN045b a VN122c nebylo doposud nic uveřejněno, tím pádem nelze poskytnout bližší informace.

4 Cíle práce

- Stanovení vlivu vývojových bronchodilatačně aktivních látek na viabilitu modelových nádorových buněčných linií HepG2 a HCC827.
- Stanovení parametru IC_{50} (poloviční inhibiční koncentrace) pro studované látky na obou testovaných buněčných liniích.

5 Experimentální část

5.1 Materiál

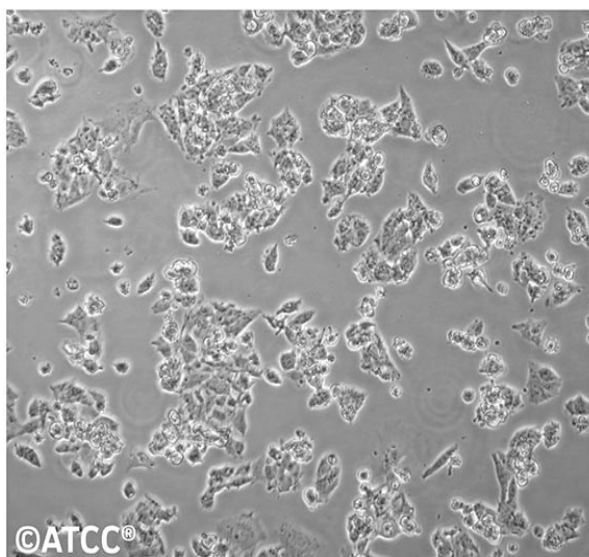
5.1.1 Buněčné linie

HepG2 (ATCC®HB-8065™)

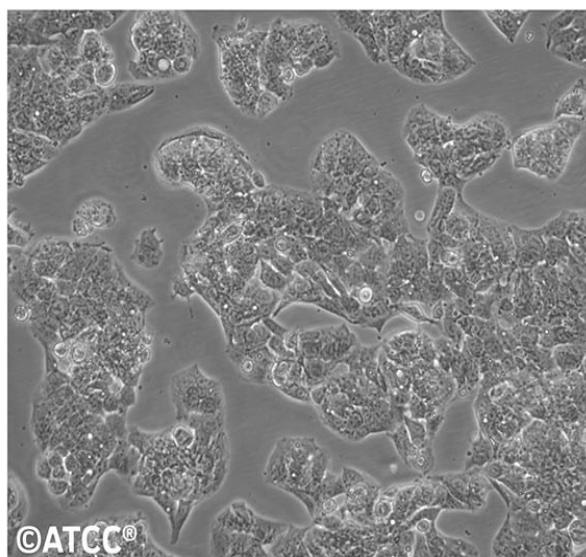
Modelová adherentní buněčná linie izolovaná z jater 15letého bělošského adolescenta s hepatocelulárním karcinomem (ATCC HepG2 2016). Kultivace byla prováděna v médiu Dulbecco a Eaglovo modifikované médium (DMEM) s 10 % fetálním bovinním sérem (FBS), 1 % neesenciálními aminokyselinami a 2 mM L-glutaminu. Inkubace probíhala při 37 °C, ve vlhčené atmosféře a 5 % koncentraci CO₂. HepG2 buněčná linie je součástí sbírky buněčných linií používaných na pracovišti. Buněčná linie HepG2 je viditelná na Obr. 11.

ATCC Number: **HB-8065**

Designation: **Hep G2**



Low Density



High Density

Obr. 11 Mikroskopický pohled na HepG2 buňky při nízké a vysoké hustotě

Převzato z: ATCC HepG2 (2016)

- Destičkový spektrofotometr Infinite M200 Tecan (Německo)
- Zkumavky s víčkem o objemu 0,5, 1,5 a 2 ml (Eppendorf, USA)
- Inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Jednorázové špičky (Eppendorf, USA)
- Kahan
- Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box (TopSafe 1.8 Bioair Instruments, Itálie)
- Jednorázové pipety (TPP, Švýcarsko)
- Pasteurovy pipety (Sigma-Aldrich, USA)
- Světelný mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)
- Vodní lázeň (TW12 Julabo, Německo)
- Vakuová odsávačka

5.1.3 Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter96[®] AQueous One Solution Proliferation Assay (Promega, USA)
- DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
- neesenciální kyseliny (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- HEPES (Sigma-Aldrich, USA)
- pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)

- glukóza (Sigma-Aldrich, USA)
- 0,25 % Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich, USA)
- fosfátový pufr PBS (phosphate buffered saline) o pH 7,4 (připravený na pracovišti)

5.1.4 Testované látky

Jednalo se o látky typu bronchodilatancií, které byly získány z Katedry anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

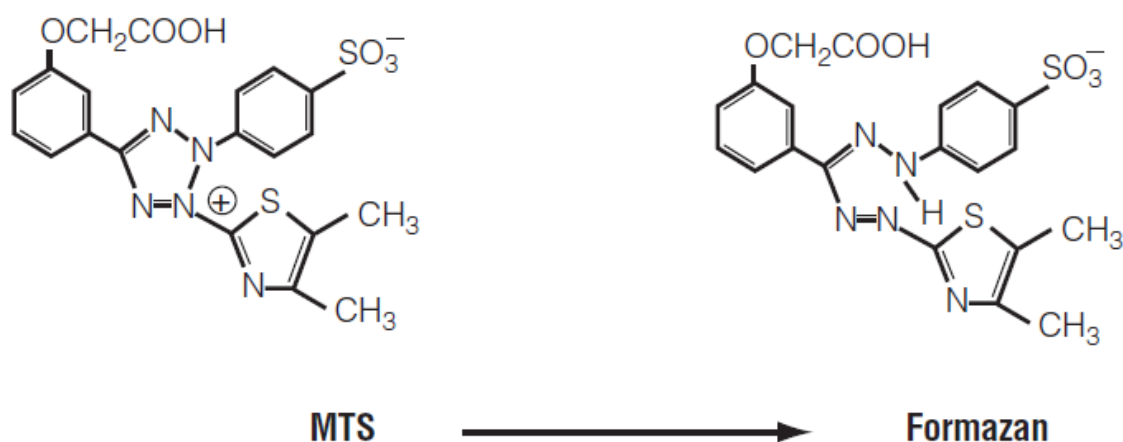
Testované látky nesly označení:

- VN014a
- VN015a
- VN045b
- VN122c

5.2 Princip použité metody

Pro měření cytotoxicity byla použita metoda The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Jedná se o kolorimetrickou metodu pro stanovení počtu životaschopných buněk. Činidlo obsahuje tetrazolinovou sloučeninu [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolinum], inertní sůl (MTS) a fenazin ethosulfát (PES). PES má zvýšenou chemickou stabilitu, díky které při kombinaci s MTS vzniká stabilní roztok.

Principem metody je redukce MTS tetrazolinové sloučeniny (Owenovo činidlo) na barevný produkt formazan, jak je zobrazeno na Obr. 13, který je rozpustný v médiu pro tkáňové kultury. Tato konverze probíhá prostřednictvím NADPH nebo NADH produkovanými enzymy dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách.



Obr. 13 Princip metody The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, redukce MTS na formazan.

Modifikováno dle: Anonym (2012)

Po uplynutí inkubační doby se množství metabolického produktu formazanu stanoví změřením absorbance při 490 nm, detekovaná hodnota absorbance je přímo úměrná množství životaschopných buněk v jamce.

Mezi výhody tohoto testu patří snadné použití, kdy stačí k buňkám přidat reakční činidlo, inkubovat a změřit absorbanci. Dále je pohodlný (dodává se jako jediný roztok), rychlý, flexibilní a bezpečný. Jako nevýhodu můžeme považovat citlivost na světlo. Pokud je roztok vystaven světlu po dobu několika hodin, může dojít ke změně zbarvení a tím i ke změnám hodnot absorbance (Anonym 2012).

5.3 Pracovní postup

5.3.1 Pasážování a příprava buněk pro testování

Když buňky měly ještě dostatek prostoru pro růst, ale málo živin, stačilo buňkám jen vyměnit médium. Pokud ovšem konfluence dosahovala kolem 80 %, bylo nutné kulturu pasážovat. Z kultivační láhve jsme odsáli kultivační médium. Poté jsme buňky krátce opláchli pomocí roztoku PBS (phosphate buffered saline) a opět jsme roztok odsáli. Následně jsme přidali roztok 0,25 % trypsinu-EDTA na delší dobu než při oplachu pro uvolnění adherentních buněk od kultivačního povrchu a také od sebe navzájem. Pro lepší účinek jsme kultivační láhev dali do inkubátoru a působení trypsinu jsme průběžně pozorovali pod mikroskopem.

Pro rozvolnění jsme přidali připravené nahřáté kompletní růstové médium a buňky jemně resuspendovali pomocí pipety pro lepší rozvolnění shluků buněk a zhomogenizování suspenze. Po promíchání jsme mohli buněčnou suspenzi přemístit do nových kultivačních lahví a kultivovat při 37 °C. Stejným postupem jsme buňky připravili na testování s výjimkou toho, že jsme buňky nepřemístili do nových kultivačních nádob, ale po vhodném naředění do 96-jamkových mikrotitračních destiček.

5.3.2 Příprava roztoků testovaných látek

Nejprve jsme připravili zásobní roztoky testovaných látek. Navázili jsme testované látky a rozpustili je v DMSO. Pro lepší rozpuštění jsme použili třepačku. Molekulová hmotnost, přesné navážené množství testovaných látek, objem DMSO a koncentrace zásobních roztoků je uvedena v Tab. 4. Koncentrace zásobních roztoků není u všech látek stejná, musela být upravena podle rozpustnosti testovaných látek.

Tab. 4 Příprava zásobních roztoků testovaných látek

Testovaná látka	Molekulová hmotnost (g/mol)	Přesná navážka (g)	Objem DMSO (μl)	Koncentrace roztoku (mM)
VN014a	307,82	0,01739	226	250
VN015a	323,88	0,01671	515	100
VN045b	386,72	0,02130	550	100
VN122c	402,78	0,02128	5285	10

Poté jsme připravili z každého zásobního roztoku testované látky 3 koncentrace (100 mM, 10 mM a 1 mM), kromě látky VN122c, jejíž zásobní roztok jsme kvůli nízké rozpustnosti museli připravit o koncentraci 10 mM. A následně jsme připravili více koncentrací pomocí ředění, jak je uvedeno v Tab. 5. DMSO bylo použito jako rozpouštědlo a jeho objem v médiu byl normalizován na 1 %. Nejprve jsme však do všech mikrozkupek přidali 1 ml média. Dále jsme připravili 2 kontroly a to 1 % DMSO (netoxická kontrola), kdy jsme napipetovali 1,5 ml média a 15 μl DMSO a 10 % DMSO (toxická kontrola), ve kterém bylo 1,5 ml média a 150 μl DMSO.

Tab. 5 Příprava 1 ml testovaných roztoků.

Výsledná koncentrace	100 mM [μl]	10 mM [μl]	1 mM [μl]	DMSO [μl]
500 μM	5			5
250 μM	2,5			7,5
100 μM	1	10*		9/0*
50 μM		5		5
25 μM		2,5		7,5
10 μM		1		9
5 μM			5	5
2,5 μM			2,5	7,5
1 μM			1	9

* Pouze pro látku s označením VN122c, jejíž zásobní roztok jsme kvůli nízké rozpustnosti museli připravit o koncentraci 10 mM.

5.3.3 Vlastní postup testu cytotoxicity a zpracování výsledných dat

96-jamkové titrační destičky s buněčnými liniemi HepG2 i HCC827 jsme vyndali z inkubátoru a přesunuli do laminárního boxu. Následně jsme odsáli médium od buněk a přidali jsme média s testovanými látkami. Celý pokus jsme prováděli v triplicátech, to znamená, že každá koncentrace byla otestována souběžně ve třech jamkách. Buňky jsme nechali inkubovat 48 hodin při 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂. Následně po uplynutí doby kultivace jsme do jamek přidali činidlo pro stanovení pomocí kitu The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay a opět nechali buňky inkubovat, tentokrát pouze 2 hodiny. Poté jsme měřili absorbanci jednotlivých jamek při 490 nm pomocí destičkového spektrofotometru Tecan. Experimenty jsme opakovali celkem třikrát.

Z naměřených hodnot absorbancí triplicátů jsme udělali průměr. Od hodnot absorbancí pro testované látky jsme odečetli kontroly. Jako kontroly jsme použili stejné roztoky testovaných látek s přidaným činidlem ovšem bez buněk, které byly inkubovány po stejnou dobu jako buněčné experimenty. Pro vyhodnocení výsledků jsme využili programu Microsoft Excel, v němž jsme vytvořili tabulky, z nichž jsme následně odvodili grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci testovaných látek.

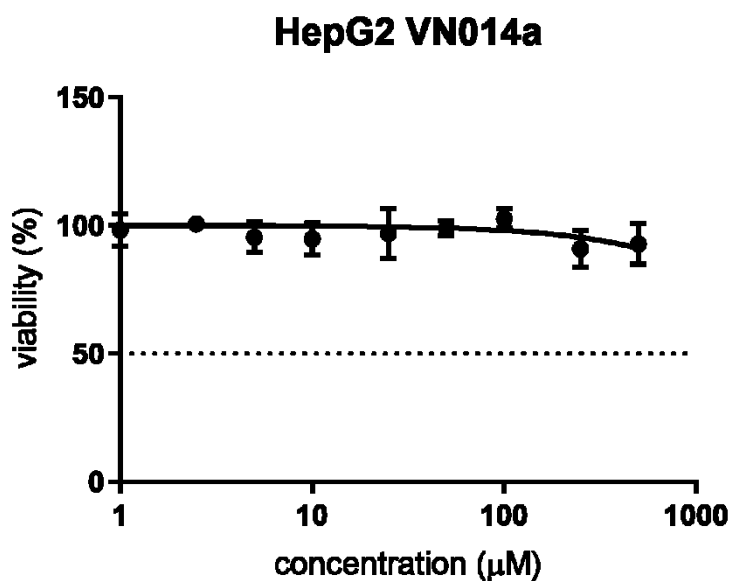
Hodnoty IC_{50} jsme následně určili s využitím softwaru pro analýzu dat GraphPad Prism verze 8. Hodnota IC_{50} představuje koncentraci, při které testovaná látka sníží viabilitu buněčné populace o 50 %. Výsledné grafické zpracování dat bylo provedeno rovněž pomocí programu GraphPad Prism.

6 Výsledky

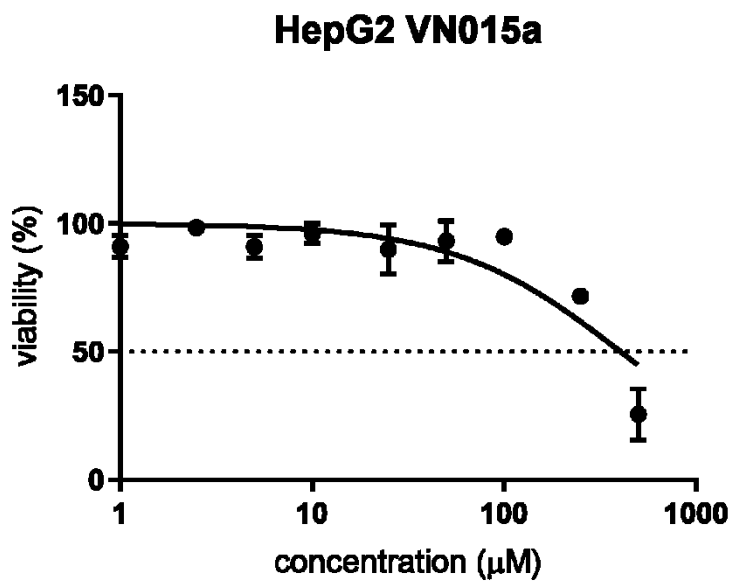
6.1 Výsledky pro buněčnou linii HepG2

Grafy na Obr. 14 – 17 znázorňují závislost viability buněk HepG2 (v %) na koncentraci testovaných látek VN014a, VN015a, VN045b, VN122c (v μM).

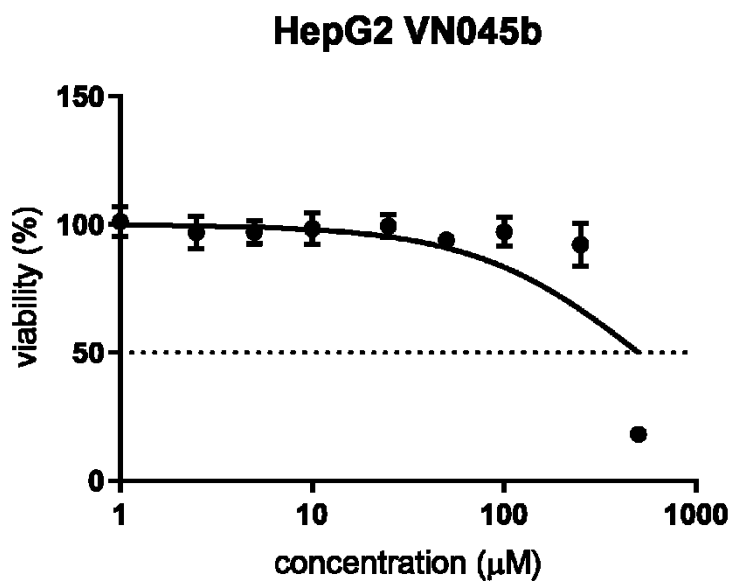
Z grafů uvedených na Obr. 14 – 17 vyplývá, že pro jaterní buněčnou linii HepG2 je nejméně cytotoxická je látka VN014a s nejvyššími hodnotami IC_{50} a nejvíce cytotoxická je testovaná látka VN015a. Toxicita pro HepG2 buňky roste v pořadí VN014a, VN122c, VN045b, VN015a.



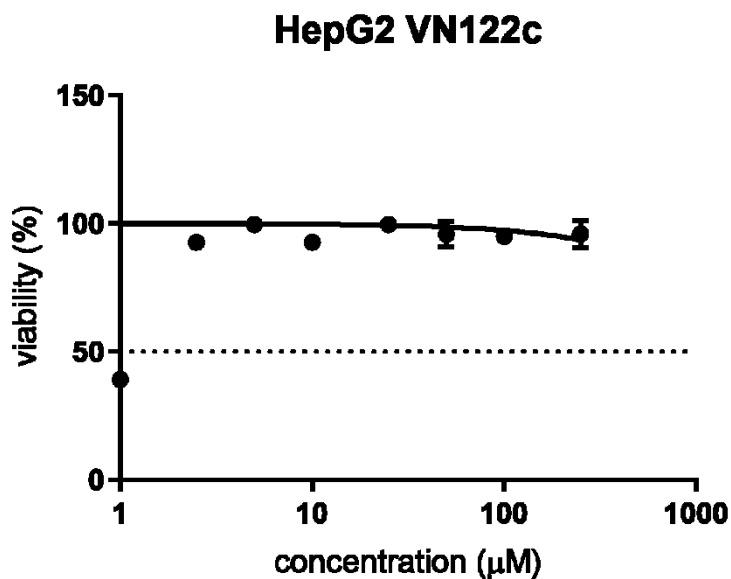
Obr. 14 Graf závislosti viability buněk HepG2 na koncentraci látky VN014a po 48 hodinách.



Obr. 15 Graf závislosti viability buněk HepG2 na koncentraci látky VN015a po 48 hodinách.



Obr. 16 Graf závislosti viability buněk HepG2 na koncentraci látky VN045b po 48 hodinách.

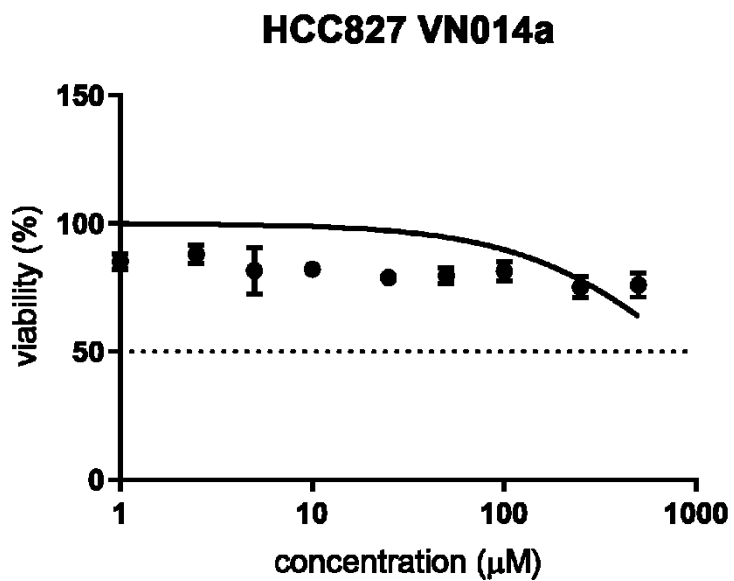


Obr. 17 Graf závislosti viability buněk HepG2 na koncentraci látky VN122c po 48 hodinách.

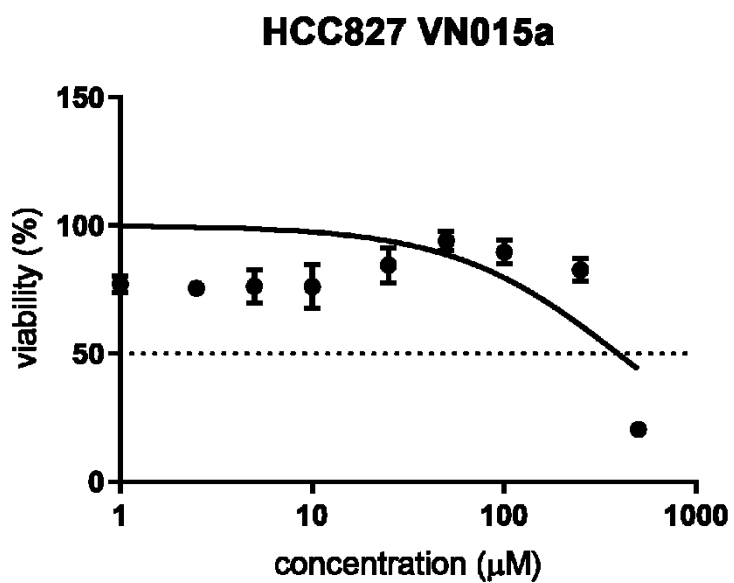
6.2 Výsledky pro buněčnou linii HCC827

Grafy uvedené na Obr. 18 – 21 vyobrazují závislost viability buněk HCCC827 (v %) na koncentraci testovaných látek VN014a, VN015a, VN045b, VN122c (v μM).

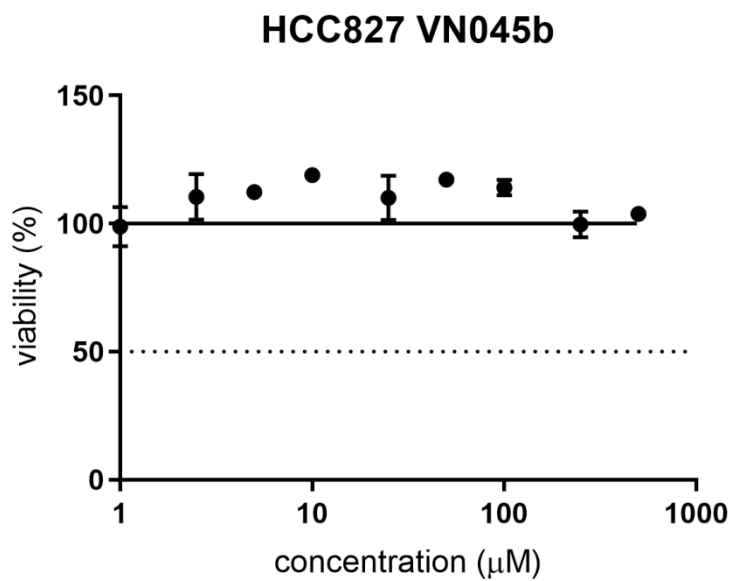
Z grafů na Obr. 18 – 21 je zřejmé, že nejmenší cytotoxicitu vykazovala látka VN045b, u níž nebylo možné ani hodnotu stanovit, jelikož byla v testovaném koncentračním rozsahu zcela netoxická. Naopak nejvyšší cytotoxicitu vykazovala látka VN122c s nejnižšími hodnotami IC_{50} . Pro buňky HCC827 toxicita roste v pořadí VN045b, VN014a, VN015a, VN122c.



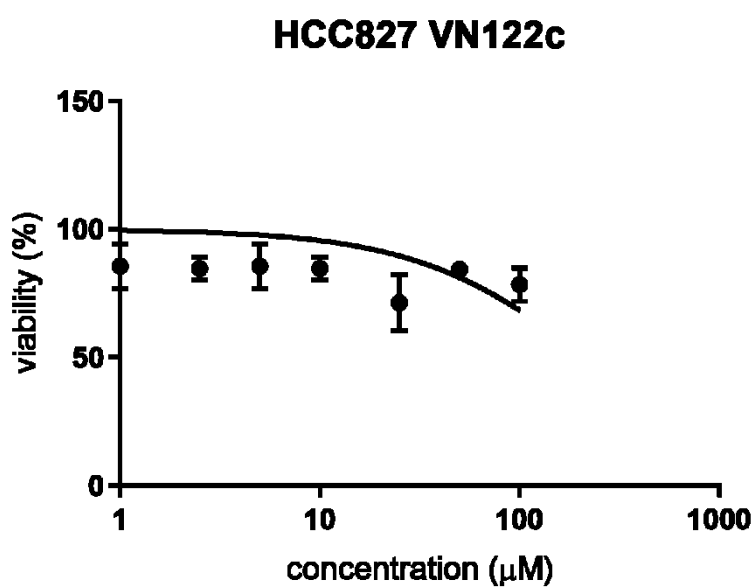
Obr. 18 Graf závislosti viability buněk HCC827 na koncentraci látky VN014a po 48 hodinách.



Obr. 19 Graf závislosti viability buněk HCC827 na koncentraci látky VN015a po 48 hodinách.



Obr. 20 Graf závislosti viability buněk HCC827 na koncentraci látky VN045b po 48 hodinách.



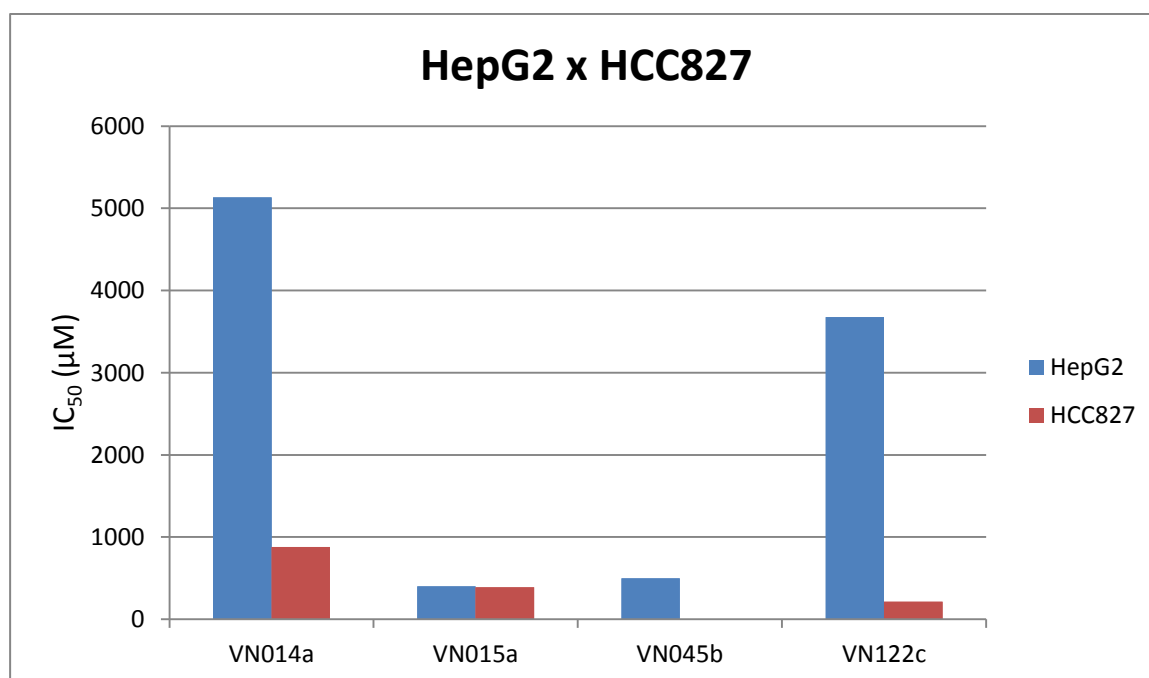
Obr. 21 Graf závislosti viability buněk HCC827 na koncentraci látky VN122c po 48 hodinách.

6.3 Porovnání hodnot IC_{50}

V Tab. 6 a na Obr. 22 jsou porovnané hodnoty IC_{50} jednotlivých testovaných látek pro buňky HepG2 a HCC827.

Tab. 6 Porovnání hodnot IC_{50} jednotlivých látek pro buňky HepG2 a HCC827

Testovaná látka	IC_{50} (μM)	
	HepG2	HCC827
VN014a	5134,0	881,5
VN015a	403,5	391,6
VN045b	501,3	Nelze stanovit, netoxické
VN122c	3676,0	216,0



Obr. 22 Grafické znázornění porovnání hodnot IC_{50} jednotlivých látek pro buňky HepG2 a HCC827

7 Diskuse

V rámci této diplomové práce jsme se zabývali testováním cytotoxicity látek strukturně odvozených od alkaloidů vasicinu a vasicinonu. Tyto alkaloidy byly získané z rostliny *Justicia adhatoda*, která se v tradiční indické medicíně používá k léčbě respiračních poruch tisíce let. Rostlina je užívána také k léčbě různých jiných poruch, které se netýkají jen respiračního ústrojí, ale vzhledem k tématu této práce, nás zajímají především účinky na dýchací systém (Kumar et al. 2010).

Z důvodu neoptimálního účinku nyní používaných bronchodilatancií k léčbě CHOPN a astmatu je stále snaha vyvinout nová, lépe účinná a bezpečnější bronchodilatancia. Za hlavní problém jsou považovány nedokonalé vlastnosti léčiv. Příkladem může být neúplná selektivita β_2 agonistů, která vede k závažným nežádoucím účinkům v důsledku stimulace β_1 receptorů nacházejících se především v srdci. Nebo také působení na β_2 receptory v jiné části organismu než jen v plicích. Problémem je také velmi úzké terapeutické okno další bronchodilatační látky teofylinu. Pro dospělé se toto okno pohybuje v rozmezí 5 – 20 mg/l a pro děti 5 -15 mg/l (Martínková 2007, Špulák et al. 2014).

Testované látky mají potvrzenou bronchodilatační aktivitu a tudíž by se tak mohly stát novými léčivy. Je však třeba ještě provést celou řadu preklinických testů, než budou námi zkoumané látky ke klinickému testování nemluvě o registraci, uvedení látek na trh a běžné podávání pacientům v rámci standardní bronchodilatační léčby. Celá tato skupina látek přichází s novým mechanismem účinku kombinujícím antagonismus na muskarinových receptorech s agonistickou aktivitou na β_2 -receptorech.

Pro testování jsme použili jaterní buněčnou linii HepG2, která je v případě toxicitních studií považována za zlatý standard, navíc existuje i možnost, že se studované látky budou biotransformovat v játrech, a je tedy zapotřebí otestovat i vliv na jaterní buňky. Další zvolenou buněčnou linií byla linie HCC827 pocházející z plicního adenokarcinomu. Důvodem pro volbu této plicní buněčné linie je způsob podání těchto potencionálních bronchodilatancií a to lokálně inhalačně k léčbě CHOPN nebo bronchiálního astmatu.

Pro srovnání cytotoxického působení vývojových bronchodilatančně aktivních látek jsme použili parametr IC_{50} . Hodnota IC_{50} představuje koncentraci, při které testovaná látka sníží viabilitu buněčné populace o 50 %.

Omezením byla nízká rozpustnost u látky VN122c, kvůli které jsme připravili zásobní roztok pouze 10 mM. Tudíž jako testovaný roztok nemohl být použit ve vyšší koncentraci než 100 μ M, abychom nepřesáhli maximální množství rozpouštědla v médiu (1 %). Pokud by byla koncentrace DMSO v kultivačním médiu vyšší než 1 %, došlo by k toxickému působení rozpouštědla na buňky a tím pádem ke zkreslení výsledků.

Velké rozdíly mezi liniemi mohou být dány mimo jiné i špatnou rozpustností látek, kdy jsme nemohli otestovat vyšší koncentrace studovaných látek. Na základě takto omezených dat vyhodnotil software hodnoty IC_{50} , které mohou být do značné míry zkreslené, protože představují vyšší hodnoty než jsme testovali. S jistotou můžeme prohlásit, že hodnoty IC_{50} látek VN014a, VN045b a VN122c jsou vyšší než námi testovaná koncentrace. Výjimku tvoří látka VN015a, jejíž hodnota IC_{50} byla stanovena přibližně stejná pro obě buněčné linie (Tab. 6). Existuje tedy možnost, že skutečné hodnoty IC_{50} látek VN014a, VN045b a VN122c pro buněčné linie HepG2 a HCC827 se budou vzájemně méně odlišovat, což však nebylo v našem případě možné stanovit.

Při zkoumání látky VN045b na buněčné linii HCC827 se látka v testovaném koncentračním rozmezí jevila jako zcela netoxická, pomocí softwaru pro analýzu dat GraphPad Prism se nedala stanovit hodnota IC_{50} .

Pro srovnání, podle studie provedené kolektivem autorů Ponsoda et al. hodnota IC_{50} teofylinu pro lidské hepatocyty byla zjištěna 16,895 μ M, jedná se tedy o poměrně nízkou hodnotu (Ponsoda et al. 1995). Pokud bychom tedy porovnávali čistě jenom hodnotu IC_{50} teofylinu a hodnoty našich testovaných látek je jasné, že tyto látky jsou výrazně méně toxické než teofylin. Nicméně je ještě třeba vzít v potaz terapeutickou koncentraci jednotlivých látek v plazmě, která, vzhledem k tomu že se jedná o vývojové látky, ještě nebyla stanovena, doposud nebylo zahájeno klinické testování látek. Posoudit bezpečnost látek z tohoto hlediska tedy není možné, můžeme pouze provést srovnání hodnot IC_{50} s již používanými látkami, které se v bronchodilatační terapii používají. V tomto ohledu se tedy jedná ve všech případech o látky méně cytotoxické, než je teofylin.

8 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování cytotoxicity látek s bronchodilatačním účinkem. Nejprve jsme stanovili vliv vývojových bronchodilatačně aktivních látek na viabilitu modelových nádorových buněčných linií, a to jaterní linie HepG2 a plicní HCC827. Testování bylo prováděno s využitím kolorimetrické metody CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. A následně jsme stanovili parametr IC₅₀ pro studované látky na obou testovaných buněčných liniích.

Nejméně toxickou látkou pro jaterní nádorové buňky byla látka VN014a (IC₅₀ = 5134 μM) a nejvíce látka VN015a (IC₅₀ = 403,5 μM). Pro plicní buněčnou linii se jako nejméně toxická jevila látka VN045b, u které ani nebylo možné stanovit hodnotu IC₅₀ jelikož byla ve studovaném koncentračním rozmezí zcela netoxická. Nejvíce toxickou byla látka VN122c s hodnotou IC₅₀ 216 μM. Jediná látka VN015a měla podobné hodnoty IC₅₀ pro jaterní a plicní buněčnou linii.

Závěrem je možné konstatovat, že jsou vzhledem k relativně vysokým hodnotám IC₅₀ (řádově stovkách μM) všechny testované látky vhodné pro další preklinické hodnocení jakožto potenciálních nových léčiv s bronchodilatační aktivitou.

9 Literatura

ANDRADE, EL. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2016, 49(12). DOI: 10.1590/1414-431x20165646.

ANONYM. Protocols & Applications Guide. Promega, 2009, rev. 12/09

ANONYM. CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Assay. Promega. Technical Bulletin, 2012, rev. 12/12, 1-12

ANONYM. Cell Culture Basics Handbook, Gibco® Cell Culture Basics Certification, ThermoFisher Scientific, 2015, 19

ANONYM. Fundamental Techniques In Cell Culture, Laboratory Handbook 3rd Edition, Sigma Aldrich, 2016

BARNES, PJ. Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 188(8), 901-906. DOI: 10.1164/rccm.201302-0388PP.

BILLINGTON, CK., PENN RB., HALL IP. B2 Agonists. PAGE, Clive P. a Peter J. BARNES, ed. *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2016-11-23, s. 23-40. Handbook of Experimental Pharmacology. DOI: 10.1007/164_2016_64. ISBN 978-3-319-52173-2.

DU PRÉ, BC., VAN VEEN TAB., YOUNG ME., VOS MA., DOEVENDANS PA., VAN LAAKE LW. Circadian Rhythms in Cell Maturation. *Physiology*, 2014, 29(1), 72-83. DOI: 10.1152/physiol.00036.2013.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 2017, 32(4), 266-277. DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.

EDMONDSON, R., BROGLIE JJ., ADCOCK AF., YANG L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2014, 12(4), 207-218. DOI: 10.1089/adt.2014.573.

EDWARDS, LD. *Principles and practice of pharmaceutical medicine*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-09313-9.

GAD, SC. *In vitro toxicology*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2000. ISBN 9781560327691.

HALPIN, DMG. et al. It is time for the world to take COPD seriously: a statement from the GOLD board of directors. *European Respiratory Journal*, 2019, 54(1). DOI: 10.1183/13993003.00914-2019.

JAYASINGHE, H., KOPSAFTIS Z., CARSON K. Asthma Bronchiale and Exercise-Induced Bronchoconstriction. *Respiration*, 2015, 89(6), 505-512. DOI: 10.1159/000433559.

JOHNSON, IM., PRAKASH H., PRATHIBA J., RAGHUNATHAN R., MALATHI R., TAJMIR-RIahi H. Spectral Analysis of Naturally Occurring Methylxanthines (Theophylline, Theobromine and Caffeine) Binding with DNA. *PLoS ONE*, 2012, 7(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0050019.

KOBLÍŽEK, V., ZATLOUKAL J., CHLUMSKÝ J., HEJDUK K. Péče o chronickou obstrukční plicní nemoc pohledem nových doporučení České pneumologické a ftizeologické společnosti. *Interní Medicína pro Praxi*, 2018, 20(5), 238-244.

KOBLÍŽEK, V., ZATLOUKAL J., KONŠTACKÝ S. Chronická Obstrukční Plicní Nemoc. *Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře*, 2019

KOLEK, V., KAŠÁK V., VAŠÁKOVÁ M. *Pneumologie*. 3. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2017. Jessenius. ISBN 978-80-7345-538-5.

KOTOLOVÁ, H., HAMMER T. Chronická obstrukční plicní nemoc. *Praktické Lékařství*. 2018, 14(4), 156-160.

KOTTOVÁ, M., VOPRŠALOVÁ M., POUROVÁ J. Farmakoterapie asthma bronchiale. *Praktické Lékařství*, 2008, 4(3), 116-121.

KUMAR, KPS., BHOWMIK D., CHIRANJI B., TIWARI P., KHAREL R. Indian traditional herbs Adhatoda vasica and its medicinal application. *J Chem Pharm Res*, 2010, 2(1): 240-245.

LAMPELA, P., PAAJANEN T., HARTIKAINEN S., HUUPPONEN R. Central Anticholinergic Adverse Effects and Their Measurement. *Drugs & Aging*, 2015, 32(12), 963-974. DOI: 10.1007/s40266-015-0321-6.

LELIÈVRE, SA., KWOK T., CHITTIBOYINA S. Architecture in 3D cell culture: An essential feature for in vitro toxicology. *Toxicology in Vitro*, 2017, 45, 287-295. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.03.012.

LÖTVALL, J. Pharmacological similarities and differences between β 2-agonists. *Respiratory Medicine*, 2001, 95, S7-S11. DOI: 10.1053/rmed.2001.1139.

LÜLLMANN, H., MOHR K., HEIN L. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Ilustroval Jürgen WIRTH, přeložil Maxmilián WENKE. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024739083.

MAREK, J. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 9788024726397

MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. ISBN 9788024713564.

MATERA, MG., CAZZOLA M. Muscarinic Receptor Antagonists. PAGE, Clive P. a Peter J. BARNES, ed. *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2016-10-28, s. 41-62. Handbook of Experimental Pharmacology. DOI: 10.1007/164_2016_68. ISBN 978-3-319-52173-2

NEGEWO, NA., GIBSON PG., MCDONALD VM. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology*, 2015, 20(8), 1160-1171. DOI: 10.1111/resp.12642.

NEPALI, K., SHARMA S., OJHA R., DHAR KL. Vasicine and structurally related quinazolines. *Medicinal Chemistry Research*, 2013, 22(1), 1-15. DOI: 10.1007/s00044-012-0002-5.

NISHTALA, PS., SALAHUDEEN MS., HILMER SN. Anticholinergics: theoretical and clinical overview. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2016, 15(6), 753-768. DOI: 10.1517/14740338.2016.1165664.

NOVOSAD, J., KRČMOVÁ I. Novinky v diagnostice a léčbě bronchiálního astmatu. *Interní Medicína pro Praxi*, 2018, 20(1), 14-18.

NTRITSOS, G. et al. Gender-specific estimates of COPD prevalence: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2018, 13, 1507-1514. DOI: 10.2147/COPD.S146390.

PAUK, N. Léčba CHOPN. *Interní Medicína pro Praxi*, 2019, 21(3), 149-153.

PETERNEL, L., KOTNIK M., PREZELJ A., URLEB U. Comparison of 3 Cytotoxicity Screening Assays and Their Application to the Selection of Novel Antibacterial Hits. *Journal of Biomolecular Screening*, 2009, 14(2), 142-150. DOI: 10.1177/1087057108329452.

PIERSMA, AH. Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006, 98(5), 427-431. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_373.x.

PONSODA, X., JOVER R., NÚÑEZ C., ROYO M., CASTELL J.V., GÓMEZ-LECHÓN M.J. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentration. *Toxicology in Vitro*, 1995, 9(6), 959-966. DOI: 10.1016/0887-2333(95)00053-4.

SALAJKA, F., SEDLÁK V. Astma bronchiale. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. *Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře*, 2019

SOUČKOVÁ, L., KOSTKOVÁ H., DEMLOVÁ R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické Lékárenství*, 2015, 11(4), 144-147.

ŠPULÁK, M. et al. Novel bronchodilatory quinazolines and quinoxalines: Synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 74, 65-72. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.12.024.

VAN DEN ANKER, J., REED MD., ALLEGAERT K., KEARNS GL. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 58, S10-S25. DOI: 10.1002/jcph.1284.

VONDRA, V. Současná inhalační terapie stabilizované chronické obstrukční plicní nemoci. *Interní Medicína pro Praxi*, 2005, 6(4), 184-188.

WILLIAMS, DM., RUBIN BK. Clinical Pharmacology of Bronchodilator Medications. *Respiratory Care*, 2018, 63(6), 641-654. DOI: 10.4187/respcare.06051.

ZATLOUKAL, J. Novinky v terapii CHOPN. *Medicína pro Praxi*, 2007, 4(7), 301-304.

ŽAMPACHOVÁ PAVLA. Sledování účinků chinazolinových alkaloidů z *Justica adhatoda*
Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2012

Internetové stránky

Allergic response, 2020

Dostupné na URL: <http://what-when-how.com/acp-medicine/allergic-response-part-1/>

Přístup 28. 2. 2020 Citace v textu: Allergic response (2020)

ATCC, LGC Standards, products HCC827 (ATCC[®] CRL-2868[™]) 2016

Dostupné na URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2868.aspx?geo_country=cz#generalinformation

Přístup 27. 2. 2020 Citace v textu: ATCC HCC827 (2016)

ATCC, LGC Standards, products HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]) 2016

Dostupné na URL: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx#generalinformation>

Přístup 27. 2. 2020 Citace v textu: ATCC HepG2 (2016)

Promega, applications 3D cell culture, 2020

Dostupné na URL: <https://worldwide.promega.com/applications/3d-cell-culture-guide/>

Přístup 27. 2. 2020 Citace v textu: Promega (2020)

PubChem, Vasicine, 2020

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=72610

Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vasicine>

Přístup 20. 3. 2020 Citace v textu (PubChem, vasicine 2020)

PubChem, Vasicinone, 2020

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. l-Vasicinone, CID=442935

Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-Vasicinone>

Přístup 20. 3. 2020 Citace v textu (PubChem, vasicinone 2020)

The indian med, Adhatoda Vasica (Vasaka), Uses and Benefits, 2019

Dostupné na URL: <https://theindianmed.com/adhatoda-vasica-vasaka-uses-and-benefits/>

Přístup 27. 2. 2020 Citace v textu: The indian med (2019)