

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



HODNOCENÍ JATERNÍ TOXICITY *IN VITRO*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Kateřina Kafuňková

„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.“

Datum:

Podpis:

Ráda bych poděkovala RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D. za cenné rady, ochotu, věcné připomínky a užitečné náměty při konzultacích a vypracování této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Kateřina Kafuňková

Vedoucí: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení jaterní toxicity *in vitro*

Předmětem diplomové práce bylo hodnocení toxicity nově syntetizovaných látek na buněčném modelu reprezentujícím jaterní buňky. Testované látky byly dodány z Katedry organické a anorganické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy jakožto potencionální antifungální léčiva a léčiva účinná na Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, DAB-5-K, PABA-Me-5, PABA-Et-5, MK-F-1, PABAN-3, PABAN-5, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃-2).

Pro stanovení toxicity byly využity dvě metody. První metoda je založena na měření metabolické aktivity buněk pomocí redukce tetrazolinu na barevný produkt. Druhá metoda detekuje množství uvolněného LDH jako markeru cytotoxicity. Jako buněčný model byla použita buněčná linie lidských buněk hepatomu HepG2. K posouzení míry viability a cytotoxicity byl použit parametr IC₅₀ a EC₅₀.

Výsledné hodnoty za využití první metody ukázaly, že všechny testované látky vykazovaly určitou míru toxicity vůči jaterní tkáni. Nejtoxičtější látkou je MK-CF₃-2. Použitý standard (amfotericin B) můžeme na základě naměřených hodnot označit za netoxickou látku vůči buňkám linie HepG2. Druhou metodu nebylo kvůli nízké senzitivitě testu možné vyhodnotit.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Kateřina Kafuňková

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Evaluation of liver toxicity *in vitro*

The subject of the diploma thesis is toxicity evaluation of newly synthesised substances on a cellular model representing a hepatocyte. The tested substances have been provided by the Department of Organic and Bioorganic Chemistry at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, as potential antifungal pharmaceuticals and medicine effective against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, DAB-5-K, PABA-Me-5, PABA-Et-5, MK-F-1, PABAN-3, PABAN-5, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃-2).

In order to determine the toxicity we have implemented two methods. The first method is based upon measuring metabolic activity of cells by means of reducing tetrazolium to a colored product. The second method detects the amount of LDH released as a marker of toxicity. The human hepatoma cell line HepG2 was used as a model. The IC₅₀ and EC₅₀ parameters were used to assess the degree of viability and cytotoxicity.

The final values obtained from the first method indicated all tested substances showed a certain level of toxicity to the hepatic tissue. MK-CF₃-2 is the most toxic substance. Based on the obtained values, the used standard (amfotericin B) can be considered as non-toxic substance to the HepG2 cells. The second method could not be evaluated due to the low level of sensitivity of the test.

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Úvod	10
3. Teoretická část	11
3.1. <i>Cytotoxicita</i>	12
3.2. <i>Metody stanovení cytotoxicity</i>	12
3.2.1. Test redukce tetrazolia	13
3.2.2. Test redukce resazurinu	14
3.2.3. Test stanovení ATP	15
3.2.4. Test uvolňování LDH	16
3.2.5. Test detekce apoptózy	18
3.3. <i>Buněčné kultury</i>	18
3.3.1. Primární buněčné kultury.....	19
3.3.2. Buněčné linie	19
3.3.3. Hep G2.....	19
3.4. <i>Testované látky</i>	21
3.5. <i>Použité standardy</i>	22
3.5.1. Amfotericin B	22
4. Cíl práce	24
5. Experimentální část	25
5.1. <i>Použitý materiál</i>	26
5.1.1. Přístroje	26
5.1.2. Další použitý materiál	26
5.1.3. Chemikálie.....	27
5.1.4. Testovaná buněčná linie HepG2	27
5.1.5. Testované látky	28
5.2. <i>Použité metody</i>	30
5.2.1. Příprava fosfátového pufru o pH = 7,4.....	30

5.2.2. Příprava testovaných látek	30
5.2.3. Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.....	31
5.2.4. Stanovení cytotoxicity metodou CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	32
6. Výsledky	34
6.1. <i>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.....</i>	<i>34</i>
6.2. <i>CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay.....</i>	<i>39</i>
7. Diskuse.....	43
8. Závěr.....	46
9. Literatura.....	47

1. Seznam zkratk

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintrifosfát
CHO	Buněčné klony vaječníku křečička čínského
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Střední efektivní koncentrace 50 %
HEK293	Linie embryonální ledvinné tkáně
HeLa	Buňky nádoru děložního hrdla Henrietty Lacks
HepG2	Standardní buněčná linie lidských jaterních buněk
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace potřebná k inhibici procesu na 50 %
INT	Jodonitrotetrazolium
LDH	Laktátdehydrogenáza
MABA	Kyselina 3-aminobenzoová
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
MTT	[(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
N.A.	Nelze určit
NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid – oxidovaná forma
NADH	Nikotinamidadeninukleotid – redukována forma
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát

NS0	Linie získaná z myšího myelomu
PABA	Kyselina para-aminobenzoová
PBS	Fosfátový pufr
PES	Fenazin ethosulfát

2. Úvod

Testy cytotoxicity jsou dnes důležitou součástí vývoje a testování nových léčiv pro zajištění bezpečnosti pro lidský organismus. Účinkem cytotoxických látek může docházet v buňkách k poškození membrány, narušení homeostázy a enzymatických procesů, které jsou důležité pro životaschopnost buněk. Proto kontakt s takovou látkou mnohdy způsobuje buněčnou smrt. Cytotoxiny ovšem mohou způsobit i reakci celého organismu. Testování cytotoxicity *in vitro* nových léčivých látek je proto součástí preklinických studií (Kubicová et al. 2016).

K testování cytotoxicity bylo vyvinuto mnoho metod. Proto je třeba při výběru vhodného testu zvážit například citlivost metody, možnosti detekce, vlastnosti testovaných sloučenin a výběr buněčné linie, abychom dospěli k přesným výsledkům (Riss et al. 2004).

Cílem mé práce bylo stanovit cytotoxicitu 11 nových potencionálně antifungálních a antiMRSA látek, a porovnat získané výsledky se zvoleným standardem. Cytotoxicitu jsme studovali na standardní buněčné linii HepG2. Na této linii jsme pomocí dvou vybraných testů zaměřených na buněčnou viabilitu a cytotoxicitu měřili míru toxicity stanovením parametru IC_{50} a EC_{50} .

3. Teoretická část

3.1. Cytotoxicita

Cytotoxicitou, nazýváme schopnost chemické látky způsobit poškození buňky. Kontakt s takovou látkou (cytotoxinem) může způsobit přímé narušení buněčných struktur nebo procesů nutných pro životaschopnost buňky a může vést k jejímu trvalému poškození nebo apoptóze či nekróze. Apoptózou rozumíme programovanou smrt buňky vyvolanou fyziologickými signály, naopak nekróza je patologický stav, který vzniká porušením membrány, a tedy změnou homeostázy a následné lýzy buňky. Dalším projevem může být zánětlivá reakce, kterou bohužel nemůžeme spolehlivě testovat *in vitro*, protože i když vzniká na buněčné úrovni, projevuje se systémově. Také se může stát, že buňka cytotoxickou látku metabolizuje a neprojeví se navenek žádný efekt. Míra poškození buňky je závislá na koncentraci látky, expozici, příjmu živin nebo teplotě (Kubicová et al. 2016, Freshney, 2011, Miret et al. 2006).

3.2. Metody stanovení cytotoxicity

Stanovení míry cytotoxicity je nezbytnou součástí vývoje nových léčivých látek pro zajištění bezpečnosti. Součástí testů bývá kultivace buněk, vystavení buněk zkoumané látce a následné zhodnocení jejich stavu. Testy dělíme do několika skupin podle zkoumaných parametrů (Peternel et al. 2009, Riss et al. 2004).

První ze zkoumaných parametrů je viabilita, tedy životaschopnost buněk. Výsledkem testů viability je počet živých buněk. Mezi takovéto testy patří například testy založené na redukci resazurinu či tetrazolinu, u kterých měříme metabolickou aktivitu jako marker životaschopnosti buněk. Další test viability je založen na stanovení ATP (Riss et al. 2004, Anonym 2006). Druhým typem testu je test cytotoxicity. V tomto testu je pro nás výsledkem počet mrtvých buněk. Měřeným parametrem může být množství uvolněného LDH z buňky nebo aktivita proteáz. Poslední typ testu detekuje buněčnou smrt (apoptózu). Zkoumaným parametrem je zde kaspázová aktivita (Anonym 2006).

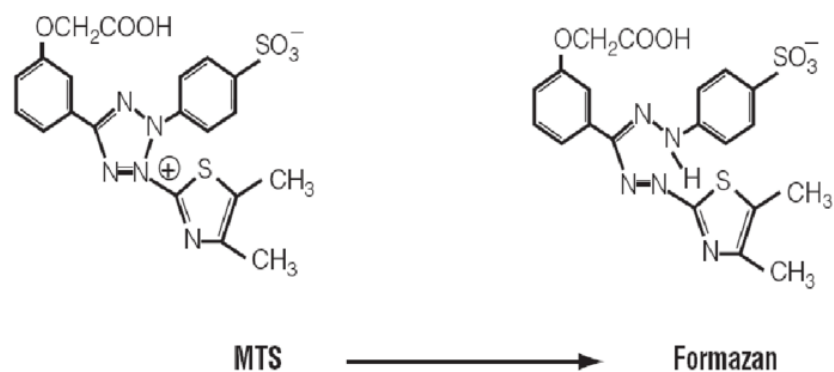
3.2.1. Test redukce tetrazolia

Soli tetrazolia patří mezi nejpoužívanější sloučeniny k měření metabolické aktivity buněk, a tedy i jejich viability. Nejpoužívanější sloučeninou tetrazolia je MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] - 2,5-diphenyltetrazolium bromid). Nažloutlý roztok MTT se rozštěpením tetrazolinového kruhu redukuje pomocí redukčních činidel přítomných v buňkách (NADH a NADPH) na fialový nerozpustný formazán, proto se musí použít organické rozpouštědlo DMSO (dimethylsulfoxid), aby mohl být test spektrofotometricky vyhodnocen, a to při vlnové délce 590 nm. Schopnost této barevné přeměny mají jenom živé buňky. Proto hodnota absorbance vypovídá o množství živých buněk. Další, hojně používanou sloučeninou tetrazolia je MTS. MTS se na rozdíl od MTT redukuje na rozpustný formazanový produkt, a proto nemusí být už nijak upravován rozpouštěním. Komerčním kitem, obsahujícím roztok MTS je například CellTiter 96® AQueous One Solution nebo MTS Reagent Powder (Anonym 2012, Riss et al. 2004, Berridge 2005).

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

CellTiter 96® AQueous One Solution je kolorimetrická metoda, díky které stanovujeme buněčnou životaschopnost v testech proliferace nebo cytotoxicity. Během tohoto testu je činidlo MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] jakožto inertní sůl tetrazolinu, redukováno na tmavý formazanový produkt (viz Obr. 1). Redukce probíhá především pomocí mitochondriálních enzymů živých buněk NADH nebo NADPH a dalších redukčních činidel přítomných v metabolicky aktivních buňkách (glutathion, kyselina askorbová) (Salgado et al. 2002, Anonym 2006).

Do této reakce je zapojen také PES (fenazin ethosulfát), který díky své zvýšené chemické stabilitě umožňuje vznik stabilního roztoku PES a MTS. MTS se v přítomnosti PES, mění na ve vodě rozpustný barevný formazanový produkt, u kterého můžeme zaznamenat absorbanci při 490 nm pomocí spektrofotometru. Intenzita zbarveného produktu je přímo úměrná počtu živých buněk a době inkubace, která běžně trvá 1-4 hodiny (Cory et al. 1991, Anonym 2012).



Obr.1 Chemický vzorec přeměny tetrazolinové soli na tmavě zbarvený zredukovaný formazanový produkt.

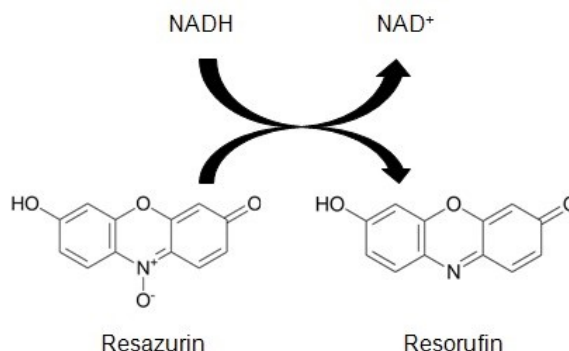
Převzato z: Anonym (2012)

3.2.2. Test redukce resazurinu

Testy redukce resazurinu, komerčně známé jako CellTiter-Blue nebo AlamarBlue jsou testy založené na redukcí modře zbarveného resazurinu na růžově zbarvený fluorescenční produkt resorufin. Tato reakce probíhá díky současné přeměně cytozolického redukčního činidla NADH na NAD⁺ (viz Obr. 2) (McGaw et al. 2014).

Poškozené buňky nejsou schopné tuto reakci provést. Výsledkem nám tedy je množství vzniklého barevného produktu, které je úměrné počtu živých, metabolicky aktivních buněk. Po uběhnutí inkubační doby (1-4 hodiny) můžeme zahájit měření výsledného množství resorufinu. Nejčastěji stanovujeme míru fluorescence pomocí fluorometru. Hodnotit můžeme také měřením absorbance pomocí spektrofotometru, tato hodnota ale není dostatečně citlivá. Vzhledem k tomu, že při provedení tohoto testu nedochází k destrukci buněk, využívá se často kombinování tohoto testu s jinými testy cytotoxicity. Tento proces nazýváme multiplexování. Kombinovat můžeme například s testy, při kterých stanovujeme kaspázovou aktivitu. Díky možnosti multiplexování máme možnost shromažďovat více dat z jednoho vzorku (O'Brien et al. 2000, Sittampalam 2004, Anonym 2006).

Dříve byla tato metoda využívána pro hodnocení kvality spermatu nebo kontaminace mléka. Nyní se s oblibou využívá na testy cytotoxicity a buněčné proliferace. Provedení tohoto testu je velmi spolehlivé, levné, poměrně rychlé a jednoduché. Výsledky jsou citlivější než u testů redukce tetrazolia.



Obr. 2 Chemický vzorec redukce resazurinu na růžově zbarvený fluorescenční resorufin.

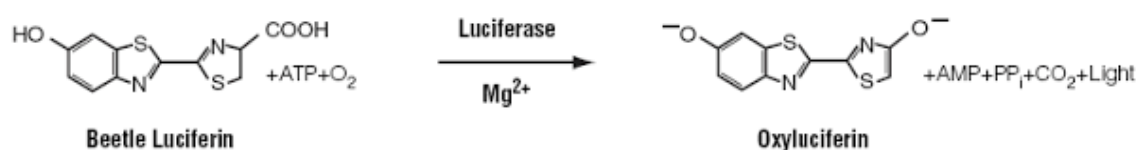
Převzato z: Riss et al. (2013)

3.2.3. Test stanovení ATP

ATP je nukleotid přítomný ve všech živých metabolicky aktivních eukaryotických buňkách. Jeho funkcí je zajišťování energie pro chod organismu a udržovat homeostázu buňky. Vzhledem k faktu, že poškozené umírající buňky nemají schopnost tvorby nových molekul ATP a přítomné ATPázy rychle odstraní zbývající molekuly z cytoplazmy, nabízí se nám možnost využít této skutečnosti pro měření počtu živých buněk v rámci testů cytotoxicity (McGaw et al. 2004).

Test zahájíme přidáním činidla, které obsahuje detergent, pro narušení integrity buněčné membrány a vyplavení ATP do media, a inhibitory ATPáz, které mají tendenci stále rozkládat ATP v živých buňkách. Další složkou činidla je enzym luciferáza, který za přítomnosti ATP a luciferinu dokáže generovat bioluminiscenční signál, který je závislý na množství ATP (viz Obr. 3). Tento signál můžeme měřit pomocí luminometru (Crouch et al. 1993, Sittampalam 2004, Anonym 2006).

Testování je velmi rychlé, jelikož luminiscenční signál je detekovatelný již po 10 minutách a vydrží až 5 hodin. Další výhodou je extrémně vysoká citlivost, a tedy i možnost detekovat i méně než 10 buněk na jamku. Nevýhodou je, že při tomto testu dochází k lýze buněk, a tedy i jejich usmrcení. Proto jsou buňky již nepoužitelné pro další testování. Komerčně dostupným testem je například CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Anonym 2006, Niels et al. (2008).



Obr. 3 Schéma reakce důležité pro vznik luminiscenčního signálu a detekce ATP.

Převzato z: Anonym (2009)

3.2.4. Test uvolňování LDH

Testy LDH (laktátdehydrogenáza) patří mezi testy cytotoxicity, během kterých se hodnotí neživotaschopnost buněk, na rozdíl od předchozích testů. Pokud dojde k poškození buněk, dochází k porušení membrány a uvolnění určitých látek do media, tyto látky nám můžou sloužit jako markery pro detekci toxicity. Jedním z takových markerů je například LDH, jehož uvolňování je detekováno například prostřednictvím komerčního testu CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (McGlaw 2014, Sittampalam 2004).

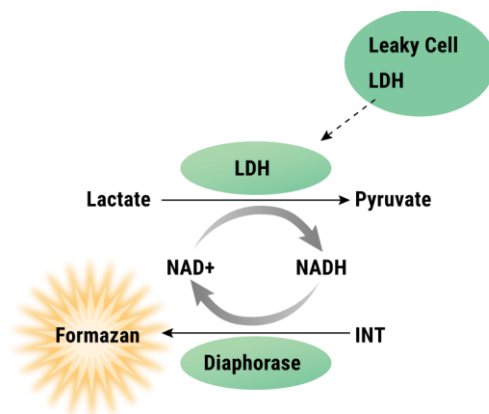
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

Tato kalorimetrická metoda je neradioaktivní alternativou testu cytotoxicity uvolňováním chromu (⁵¹Cr). Test uvolňování ⁵¹Cr je založen na měření radioaktivního chromu uvolněného z lyzovaných umírajících buněk. Tento test byl vyvinut již v roce 1968 a stále je jedním z nejpoužívanějších testů cytotoxicity. Jelikož je ⁵¹Cr radioaktivní, a tedy zdraví škodlivý a provedení testu je finančně náročné, kvůli potřebě gamma čtečky, přistupuje se v dnešní době raději

k neradioaktivním variantám, jako je právě test CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Karimi et al. 2014).

Test je založen na kvantitativním měření LDH uvolněného z poškozené buňky do media. LDH neboli laktátdehydrogenáza je stabilní glykolytický enzym nacházející se běžně v cytosolu buněk. Poškozením plazmatické membrány buněk se tento enzym uvolní do media, téměř stejným způsobem jako ^{51}Cr je uvolňován v radioaktivních testech (Anonym 2016a). Množství uvolněného LDH je úměrné počtu lyzovaných buněk a měří se 30minutovým enzymatickým testem (Boas et al. 2006, Anonym 2016a).

Po přidání reakční směsi, která obsahuje laktát, NAD^+ , NADPH oxidázu a INT (jodonitrotetrazolium) nejdříve LDH katalyzuje redukci NAD^+ na NADH a H^+ a současně dochází k oxidaci laktátu na pyruvát. Poté enzym diaforáza za využití NADH a H^+ katalyzuje redukci fialové tetrazolinové soli INT na červený formazanový produkt. (viz Obr. 4). Intenzita zbarvení formazanu je úměrná počtu lyzovaných buněk. Měříme tedy absorbanci, a to při hodnotě 490 nm, pomocí spektrofotometru. Reakce a měření většinou probíhá na testovacích destičkách s 96 jamkami (Anonym 2016a).



Obr. 4 Schéma uvolňování LDH z poškozených buněk.

Převzato z: Anonym (2016a)

3.2.5. Test detekce apoptózy

Během testů apoptózy zkoumáme aktivitu kaspáz (proteázy účastnící se apoptózy). Jedním ze způsobů vyhodnocování je test fluorescence. Během tohoto testu se po přidání substrátu a pufru ke vzorku ze substrátu odštěpí peptidová sekvence a následně dochází k silné fluorescenci. Fluorescence je úměrná počtu aktivovaných kaspáz. Dalším typem jsou velmi citlivé testy, při kterých kaspázovou aktivitu detekujeme pomocí luminiscence (Anonym 2009).

3.3. Buněčné kultury

Buněčné kultury jsou izolované buňky získané z živého organismu. Buňky jsou pěstovány mimo organismus v kultivačních nádobách obsahujících živné médium, které poskytuje buňkám živiny potřebné pro další růst. Kultivační médium obsahuje potřebné živiny: aminokyseliny, které jsou důležitým zdrojem dusíku, glukóza jakožto zdroj energie nebo růstové faktory pro urychlení růstu. Dalšími důležitými složkami média jsou vitamíny a minerály. Pro správný růst buněk jsou důležité další parametry: ideální pH = 7,4, teplota při 37 °C, složení atmosféry je vzduch s přídavkem 5 % CO₂; dále se udržuje relativní vlhkost, a to 90 %. Buňky se uchovávají zmrazené v tekutém dusíku či v mrazáku na -80 °C a rozmrazují se v době potřeby (Palsson et al, 2004).

Kultury můžeme rozdělit podle způsobu růstu buněk na adherentní a suspenzní. Buňky adherentních kultur jsou přichyceny pomocí elektrostatických sil nebo extracelulárních proteinů (nejčastěji pomocí kolagenu) v kultivačním mediu na dně nádoby. Adherentní kultury můžeme získat například z jaterní nebo ledvinné tkáně. Naopak pro suspenzní kultury je typické, že nepotřebují ukotvení a mohou být tedy volně rozprostřeny v mediu. Pro výměnu media je proto důležitým krokem oddělit buňky od média pomocí centrifugace. Takovéto kultury se získávají především z buněk krevního oběhu (Vejražka 2008, Anonym 2016b).

Význam buněčných kultur je především v oblasti vývoje a ověřování bezpečnosti nových léčiv. Dále se využívají například k výrobě enzymů, tkáňovém inženýrství, diagnostice virových onemocnění, výrobě vakcín a genetice (Bártová 2014).

3.3.1. Primární buněčné kultury

Primární kultury vznikají přímým oddělením z tkáně pomocí enzymatického působení trypsinu. Buňky v mediu prolifерují až do stavu pokrytí celé kultivační nádoby. V tuto chvíli je nutné kulturu naředit a přenést do nových kultivačních nádob s čerstvým mediem, kde může dojít k dalšímu růstu a vzniku takzvané sekundární kultury. Tomuto procesu říkáme pasážování. Kultury vzniklé pasážováním primárních kultur získaných přímo z živých orgánů jsou na rozdíl od původní kultury genotypově a fenotypově uniformní. Po několika pasážích dochází ke stárnutí buňky a zkracování telomer, což má za následek neschopnost buňky se nadále dělit (Bártová 2014, Vejražka 2008).

3.3.2. Buněčné linie

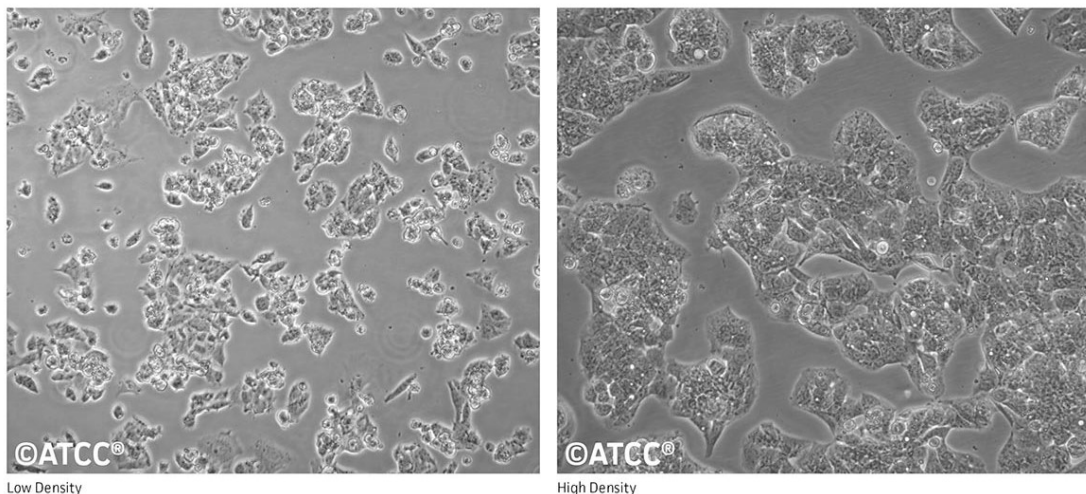
Buněčné linie jsou imortalizované buňky, které na rozdíl od primárních kultur mají neomezenou možnost proliferace. Získávají jsou především z nádorových buněk, a proto jsou vysoce diferenciované a lépe se množí. Další možnost vzniku buněčné linie je transformace z primárních kultur. Uniformitu linií můžeme získat například umělým klonováním buněk. Mezi nejznámější buněčné line patří například HeLa (buňky nádoru děložního hrdla Henrietty Lacks), HEK293 (linie embryonální ledvinné tkáně), CHO (buněčné klony vaječníku křečička čínského), NS0 (linie získaná z myšího myelomu) nebo námi testovaná linie HepG2 (Bártová 2014, Mašková 2019).

3.3.3. Hep G2

Buněčná linie HepG2 je imortalizovanou linií pocházející z buněk karcinomu jater kavkazského chlapce. Poprvé byla popsána roku 1979 Barbarou Knowlesovou a jejími kolegy (viz Obr. 5). Tato linie je díky svým vlastnostem s oblibou používána na *in vitro* testy metabolismu léčiv a cytotoxicity. Na rozdíl od primárních hepatocytů jsou buňky této linie plně diferenciované, mají vysokou životnost a poměrně stabilní fenotyp. Také se vyznačují vysokou mírou proliferace, snadnou manipulací a dostupností. Buňky HepG2 jsou adherentními buňkami, jejichž kultivace probíhá v plastových kultivačních lahvích. Buňky

rostou v malých agregátech jako monovrstvy a jsou senzitivní na stimulaci růstovými hormony. Mají schopnost vylučovat řadu důležitých plazmatických proteinů, jako je například fibrinogen, plazminogen, transferrin nebo albumin (López-Terrada 2009).

Jednou z hlavních nevýhod používání této linie je metabolická rozdílnost oproti hepatocytům. Buňky hepatomu neexprimují takové množství biotransformačních enzymů, účastnících se první fáze metabolismu. Aktivita těchto enzymů bývá o tři až čtyři řády nižší než v jaterních buňkách a bývá detekovatelná jen citlivými technikami, a proto dochází k zhoršení metabolismu xenobiotik. Konjugační fáze metabolismu zůstává plně zachována. Právě díky této skutečnosti se linie HepG2 nepoužívá pro testování toxicity metabolitů (Donato et al. 2014, Gomez-Lechon et al. 2008).



Obr. 5 Mikroskopický snímek buněk HepG2.

Převzato z: Anonym (2016c)

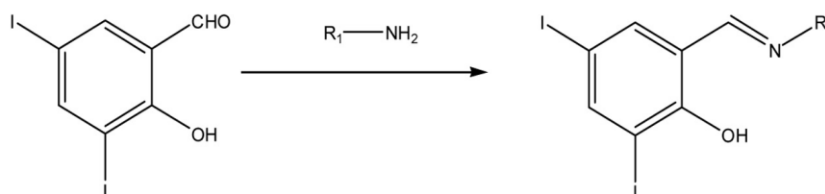
3.4. Testované látky

Testované látky byly dodány z Katedry organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, jakožto potencionální antifungální léčiva a léčiva účinná na Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

Testované látky s pracovním označením MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, DAB-5-K, PABA-Me-5, PABA-Et-5, MK-F-1, PABAN-3, PABAN-5, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃- 2 řadíme z chemického hlediska mezi analoga iminů kyseliny para-aminobenzoové a mezi analoga 3,5-dijodsalicylidenových Schiffových bází.

Pro úpravu kyseliny para-aminobenzoové byly využity různé modifikace struktury. Testované látky s označením DAB vznikají duplikací iminových vazeb derivátů kyseliny 3-aminobenzoové (MABA), která je polohovým izomerem kyseliny para-aminobenzoové. Vznikají tedy deriváty kyseliny 3,5-diaminobenzoové. Testované látky s označením PABA a PABAN jsou estery a amidy původních iminů kyseliny para-aminobenzoové. Tyto analoga vykazují oproti původním látkám vyšší lipofilitu a tedy i lepší prostup bakteriální buněčnou stěnou (Krátký et al. 2020).

Analoga typu 3,5-dijodsalicylidenových Schiffových bází byly syntetizovány z 3,5-dijodosalicylaldehydů a primárních aminů (viz Obr. 6). Tyto látky testujeme pod označením MK. Všechny testované deriváty této struktury mají na aromatický kruh zavedeny dva atomy jodu. Vložení halogenu do molekuly dochází k zvýšení propustnosti přes membrány a hematoencefalickou bariéru, a tedy i k zvýšení biologické aktivity (Xu et al. 2010).



Obr. 6 Syntéza Schiffových bází.

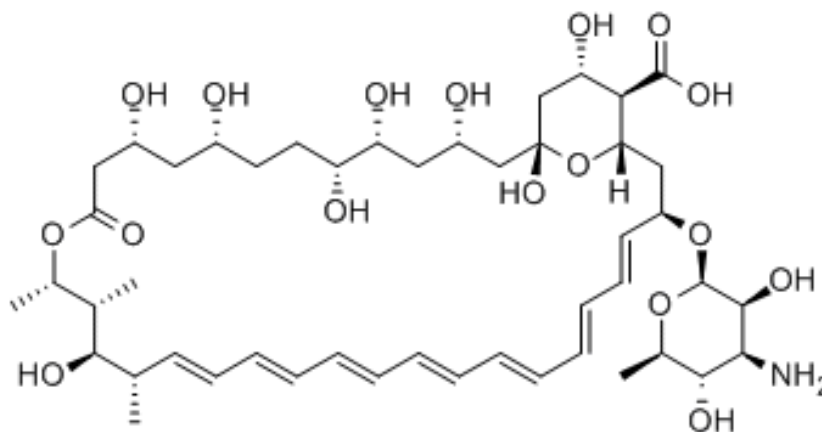
Převzato z: Xu et al. (2010)

3.5. Použité standardy

3.5.1. Amfotericin B

Amfotericin B (viz Obr. 7) je vysoce účinná antifungální látka patřící mezi polyenová antimykotika. Díky širokému spektru působení se využívá při léčbě život ohrožujících infekcí, jako je například systémová kandidóza, aspergilóza nebo kryptokoková meningitida. Dále se využívá k léčbě lokálních mykóz, infekcí centrálního nervového systému a některých protozoálních infekcí (Ulozas 2010).

Chemicky se jedná o makrocyclický laktonový kruh, jehož základ je složen z lipofilního polyenového řetězce a hydrofilního polyhydroxylového řetězce. Polyenovým fragmentem makrocycliku se amfotericin naváže na lipofilní část ergosterolu v plazmatické membráně houbového organismu. Hydrofilní fragment makrocycliku vytváří v membráně pór, který způsobí narušení permeability, únik iontů, a tedy i snížení funkce membrány (Hartl et al. 2012, Vardanyan 2006).



Obr. 7 Strukturní vzorec amfotericinu B.

Převzato z: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1397-89-3.gif>

Amfotericin B se kvůli špatné rozpustnosti ve vodě nevstřebává po perorální aplikaci, a proto musí být aplikován parenterální cestou. Parenterální podání je spojeno s vysokou toxicitou, která je způsobena podobností savčích a houbových buněčných membrán. Největším problémem při podávání amfotericinu B je jeho nefrotoxicita. Renální toxicita je způsobena navázáním makrocycly na tubulární buněčnou membránu. Nežádoucí účinky amfotericinu B se dají snížit použitím vhodné technologické úpravy (liposomální lékové formy, zpracování do komplexu s lipidy, koloidní disperze) (Kelly 2010, Hartl et al. 2012).

4. Cíl práce

- Cílem této práce je stanovit cytotoxické působení 11 nových vývojových látek *in vitro* na jaterní buněčné linii HepG2.
- Srovnání cytotoxického působení testovaných látek se zvolenými standardy.
- Vzájemné srovnání výsledků získaných pomocí dvou různých metod.

5. Experimentální část

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Přístroje

- Destičkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Švýcarsko)
- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS–1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Centrifuga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Německo)
- Laminární box: Micrological safety cabinet TOP– SAVE 1,8 (Bioair instruments, Itálie)
- Vodní lázeň, TW 12 (Julabo, Německo)
- Orbitální třepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Německo)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)

5.1.2. Další použitý materiál

- 96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)
- Kultivační láhve 25 cm², 75 cm² (TPP, Švýcarsko)
- Skleněné Pasteurovi jednorázové pipety (Sigma Aldrich, USA)
- Jednorázové plastové pipety 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus 5 – 50 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Automatická pipeta Discovery 50–300 µl (HTL, Polsko)
- Mikrozkuhavky Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1–20 µl, 20–200 µl (Eppendorf, Německo)
- Falkonky 15 ml, 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- Rukavice latexové, nesterilní (VWR, USA)

5.1.3. Chemikálie

- Testované látky (MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, DAB-5-K, PABA-Me-5, PABA-Et-5, MK-F-1, PABAN-3, PABAN-5, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃- 2)
- Amfotericin B (Sigma-Aldrich, USA)
- DMSO (dimethyl sulfoxid pro molekulární biologii > 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální hovězí sérum (Sigma-Aldrich, USA)
- Chemikálie na přípravu fosfátového pufru (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄,) (PENTA, Česká republika)
- DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované medium) (Sigma Aldrich, USA)
- Trypsin (0,25 %, Trypsin–EDTA Solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin 200 mM (Sigma-Aldrich, USA)
- MEM (Non-essential Amino Acid Solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- CytoTox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA)

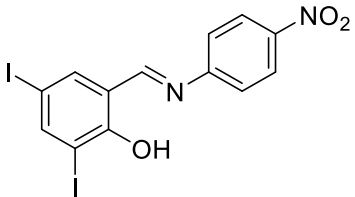
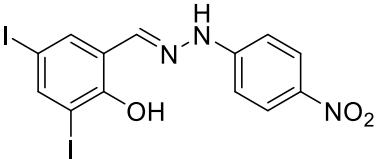
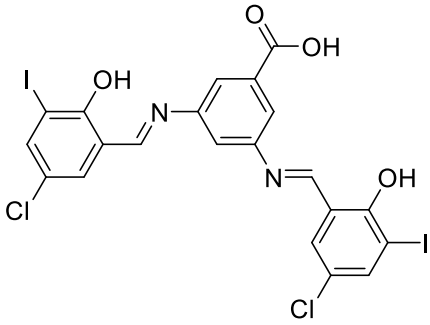
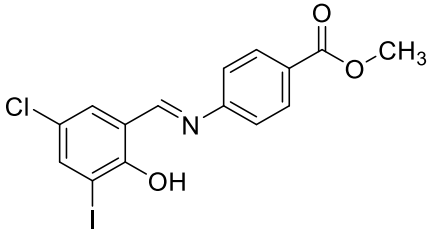
5.1.4. Testovaná buněčná linie HepG2

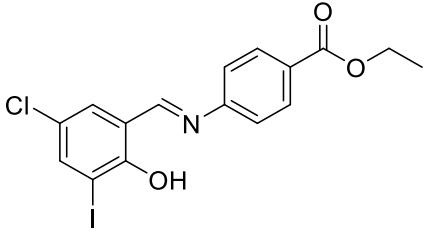
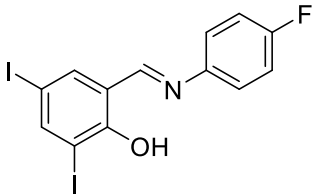
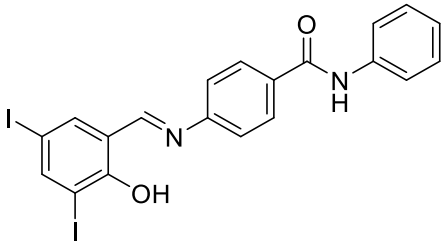
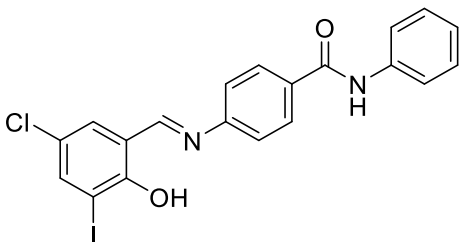
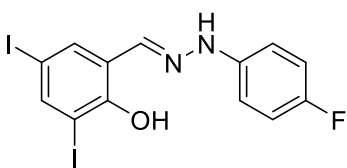
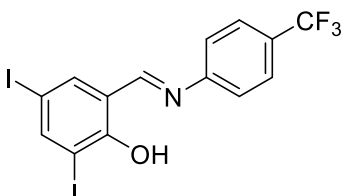
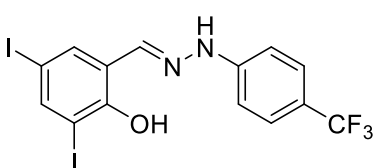
Lidské imortalizované jaterní buňky (Human hepatocellular liver carcinoma cell line, HepG2) získané z ATCC (American Type Culture Collection; USA). Buněčná linie (pasáž 15-16) byla kultivována v 75 cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované medium) (Sigma-Aldrich, USA) s L-glutaminem (2 mM) (Sigma-Aldrich, USA), 10 % fetálního hovězího séra (PAA, Rakousko) a 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, USA).

5.1.5. Testované látky

K testu bylo využito 11 vývojových látek s potencionální antifungální a antiMRSA aktivitou. Strukturní vzorce a chemické názvy testovaných látek jsou uvedeny v tabulce 1. Látky byly připraveny na Katedře Organické a Bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Tab. 1 Seznam testovaných látek

Testovaná látka	Strukturní vzorec	Chemický název
MK-NO ₂ -1		2,4-dijod-6-{{(4-nitrofenyl)imino}methyl} fenol
MK-NO ₂ -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
PABA-Me-5		methyl-4-{{(5-chlor-2-hydroxy-3-jodbenzyliden)amino}benzoát

PABA-Et-5		ethyl-4-[(5-chlor-2-hydroxy-3-iodobenzyliden)amino]benzoát
MK-F-1		2-[[4-fluorfenyl]imino]methyl}-4,6-dijodfenol
PABAN-3		4-[(5-chlor-2-hydroxy-3-iodobenzyliden)amino]-N-fenylbenzamid
PABAN-5		4-[(2-hydroxy-3,5-dijodbenzyliden)amino]-N-fenylbenzamid
MK-F-2		2-[[2-(4-fluorfenyl)hidrazinyliden]methyl]-4,6-dijodfenol
MK-CF ₃ -1		2,4-dijod-6-({[4-(trifluormethyl)fenyl]imino}metihyl)fenol
MK-CF ₃ -2		2,4-dijod-6-({2-[4-(trifluormethyl)fenyl]hidrazinyliden}methyl)fenol

5.2. Použité metody

5.2.1. Příprava fosfátového pufru o pH = 7,4

Fosfátový pufr se připravil navážením potřebného množství jednotlivých komponent a doplněním destilovanou vodou na požadovaný objem. Pro konečnou úpravu bylo třeba upravit pH pomocí hydroxidu sodného na 7,4. Použité komponenty na přípravu fosfátového pufru jsou znázorněny v tabulce 2.

Tab. 2 Složení fosfátového pufru (1000 ml)

Sloučenina	Molární hmotnost [g/mol]	Koncentrace [g/l]
NaCl	58,44	16,010
KCl	74,55	0,420
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	358,14	7,160
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177,99	3,120

5.2.2. Příprava testovaných látek

Vzhledem ke špatné rozpustnosti testovaných látek ve vodě bylo potřeba pro přípravu vzorku použít DMSO (dimethyl sulfoxid). DMSO je vysoce polární organické rozpouštědlo, které je již v nízkých koncentracích pro buňky toxické, proto jeho koncentrace v konečném vzorku nepřesáhla 1 %.

Před samotným testem a napipetováním buněk na destičku, je třeba provést pasážování. Celý tento proces probíhá v laminárním boxu, který nám umožňuje pracovat ve sterilním prostředí bez mikroorganismů. Pasážování jsme zahájili odstraněním starého média a opláchnutím 6 ml PBS. Po odsátí PBS jsme k buňkám přidali 3 ml trypsinu a nechali 2 minuty inkubovat. Po uplynutí inkubační doby se buňky zkontrolovali pod mikroskopem, zda se již odlepují a přidalo se 6 ml čerstvého média, které obsahuje sérum, pro zastavení účinku trypsinu. Po

resuspendaci buněk jsme přenesli 1 ml obsahu do nové kultivační lahve s čerstvým médiem a nechali inkubovat při 37 °C a 5 % atmosféře oxidu uhličitého.

Buněčnou linii HepG2 jsme nasadili na 96-jamkovou destičku v počtu 15 000 buněk/100 µl/jamku. Před přidáním testovaných látek byly buněčné linie 24 hodin inkubovány při 37 °C v atmosféře 5 % oxidu uhličitého.

K buňkám jsme napipetovali v triplikátech testované látky v osmi koncentracích (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µM). Zároveň jsme pro každou koncentraci připravili nebuněčné kontroly testovaných látek s médiem (100 µl příslušného média + 1 µl testované látky). Dále jsme provedli kontrolu pro stanovení 100 % životaschopnosti buněk (buňky ve 100 µl kultivačního média + 1 % DMSO), kontrolu pro stanovení 0% životaschopnosti buněk (buňky ve 100 µl kultivačního média + 10 % DMSO) a kontrolu samotného média (pouze 100 µl kultivačního média). Všechny kontroly byly také připraveny v triplikátech. Po nanesení testovaných látek na destičku byly vzorky opět 24 hodin inkubovány v 37 °C v 5 % atmosféře CO₂.

5.2.3. Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Po nanesení testovaných látek a ukončení inkubační doby (24 hodin) jsme ke vzorku přidali 20 µl činidla MTS a nechali dalších 90 minut inkubovat za stejných podmínek (při teplotě 37 °C v 5 % atmosféře CO₂). Následně jsme změřili absorbanci při vlnové délce 490 nm na destičkovém analyzátoru TECAN.

Výsledné hodnoty absorbance jsme zpracovali v programech Microsoft Excel 2016 a GraphPad Prism 8.02. Nejdříve jsme pomocí programu Microsoft Excel vytvořili průměr z hodnot absorbancí triplikátu v jednotlivých koncentracích. Z těchto hodnot jsme získali směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku. Stejný postup jsme aplikovali na nebuněčné kontrolní vzorky. Z těchto číselných údajů jsme získali procenta výsledné viability (životaschopnosti) pro všechny koncentrace testovaných látek. Výsledná hodnota viability se získává z následující rovnice:

$$\% \textit{ viability} = \frac{A_b - A_k}{A_{v100} - A_m} \times 100$$

A_b = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu buněk o stejné koncentraci testované látky

A_k = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu nebuněčné kontroly o stejné koncentraci testované látky

A_m = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu daného kultivačního média

A_{v100} = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu kontroly 100 % viability (Anonym 2012)

Dále jsme data vložili do programu GraphPad Prism 8.02, ve kterém jsme získali inhibiční křivky testovaných látek (grafy závislosti viability na koncentraci testované látky) a za pomoci modelu nelineární regrese jsme určili hodnotu IC_{50} . Toxikologický parametr IC_{50} udává koncentraci zkoušené látky mající za následek úhyn 50 % buněčné populace.

5.2.4. Stanovení cytotoxicity metodou CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

Po přidání testovaných látek na destičku a 24hodinové inkubaci při 37 °C v 5 % atmosféře CO_2 jsme přenesli 50 μ l vzorku ze všech jamek na novou destičku. Následně jsme přidali do každé jamky 50 μ l činidla CytoTox 96® ohřátého na pokojovou teplotu (činidla se skladují v – 20 °C, chráněna před světlem). Destičku jsme poté zakryli neprůhledným materiálem, aby byla chráněna před světlem a inkubovali jsme 30 minut při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace jsme do každé jamky přidali 50 μ l „Stop Solution“, odstranili jsme nežádoucí bubliny injekční jehlou a změřili jsme absorbanci při vlnové délce 490 nm. Měření muselo proběhnout do 1 hodiny po podání „Stop Solution“.

V programu Microsoft Excel 2016 jsme zprůměrovali výsledné hodnoty absorbance triplikátů téže koncentrace a z těchto dat jsme určili směrodatnou a relativní směrodatnou odchylku. Následně jsme pomocí následujícího vzorce získali procenta výsledné cytotoxicity pro jednotlivé koncentrace testovaných látek:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{A_{exp} - A_m}{A_{max}} \times 100$$

A_{exp} = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu buněk o stejné koncentraci testované látky

A_{max} = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu maximálního množství uvolněného LDH

A_m = zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu daného kultivačního média (Anonym 2012)

V programu GraphPad Prism 8.02 jsme na závěr získali toxikologický parametr EC_{50} , který je definován jako koncentrace látky, která způsobí u 50 % testovaných organismů maximálního dosažitelného efektu.

6. Výsledky

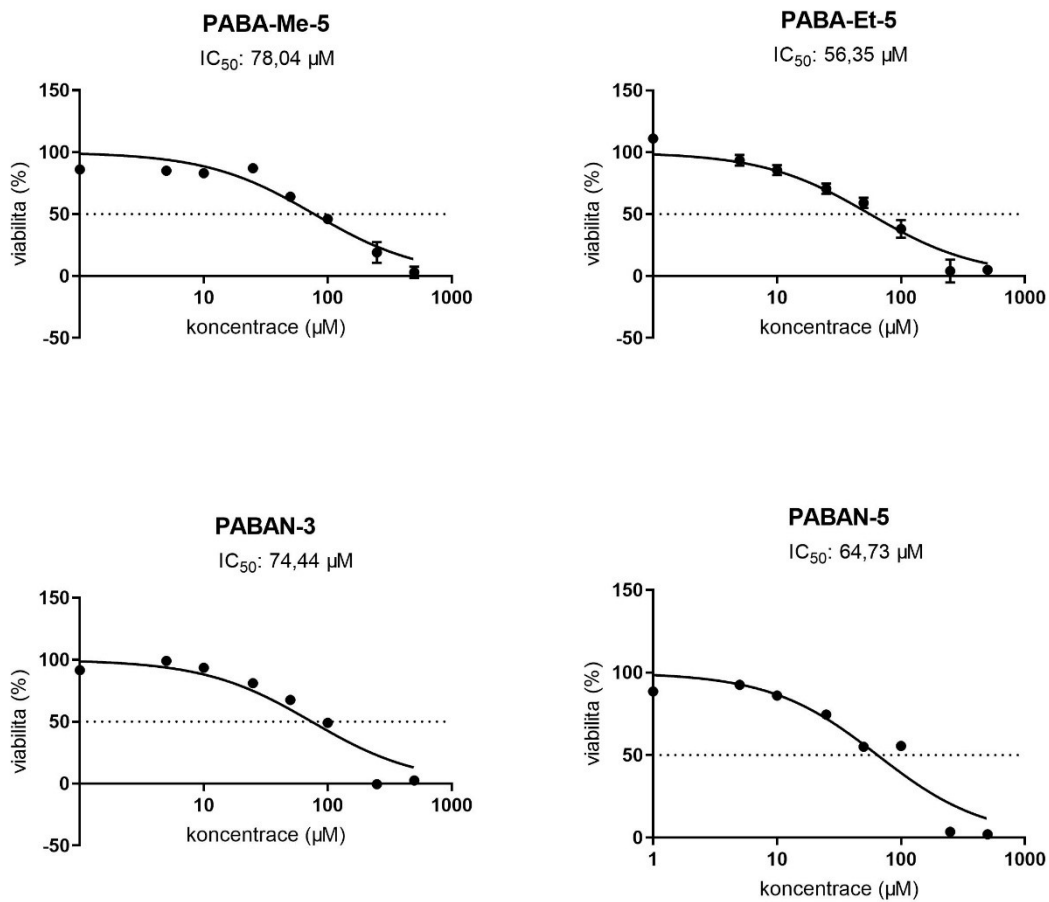
6.1. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Tabulka 3 přehledně shrnuje testované látky a standard společně s naměřenými hodnotami IC₅₀. Tento parametr vyjadřuje míru cytotoxicity měřených látek vůči buněčné linii HepG2. Buňky byly s látkami inkubovány 24 hodin v koncentračním rozmezí 0,1-500 μM.

Tab. 3 Hodnoty IC₅₀ testovaných látek za použití metody CellTiter96

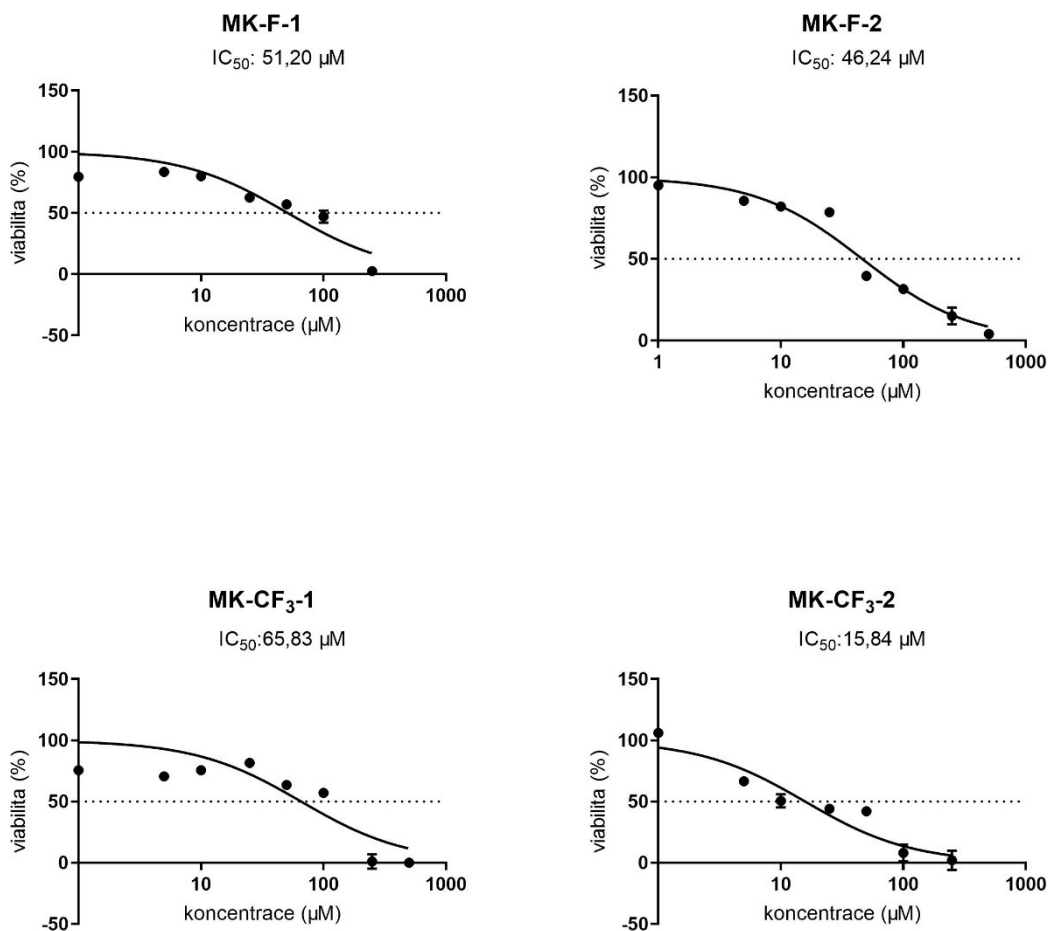
Testovaná látka	IC ₅₀ (μM)	Rozsah koncentrací (μM)	Pasáž
MK-NO ₂ -1	56,27	1-500	P15-16
MK-NO ₂ -2	66,59	1-500	P15-16
DAB-5-K	53,25	1-500	P15-16
PABA-Me-5	78,04	1-500	P15-16
PABA-Et-5	56,35	1-500	P15-16
MK-F-1	51,20	1-250	P15-16
PABAN-3	74,44	1-500	P15-16
PABAN-5	64,73	1-500	P15-16
MK-F-2	46,24	1-500	P15-16
MK-CF ₃ -1	65,83	1-500	P15-16
MK-CF ₃ - 2	15,84	1-250	P15-16
Amfotericin B	> 500	1-500	P15-16

Cytotoxicita testovaných potenciálně antimikrobních vývojových látek na linii jaterních buněk HepG2 je graficky vyjádřena na obrázcích 9-11. Grafy vyjadřují závislost viability buněk na koncentraci testované látky. Jako standardní látku jsme si vybrali amfotericin B.



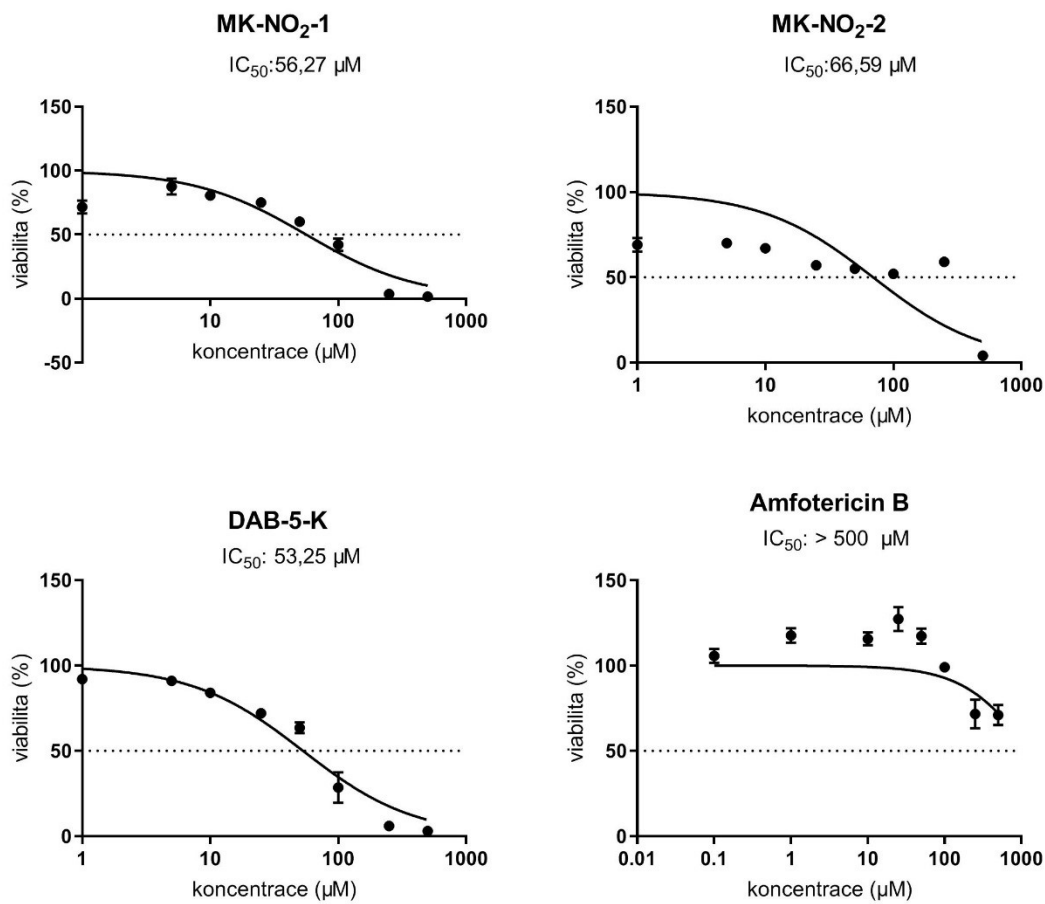
Obr.8 Cytotoxické působení látek PABA-Me-5, PABA-Et-5, PABAN-3 a PABAN-5 na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 8 je znázorněna závislost životaschopnosti buněčné linie HepG2 po 24hodinové inkubaci s testovanými látkami PABA-Me-5, PABA-Et-5, PABAN-3 a PABAN-5. Z těchto hodnot byl následně zjištěn parametr IC₅₀. Tyto látky byly testovány v triplicátech v koncentracích 1-500 µM. Všechny 4 znázorněné testované látky mají podobnou hodnotu IC₅₀, a to nižší než 100 µM. Nejvyšší cytotoxicitu z této skupiny má PABA-Et-5, jejíž IC₅₀ 56,35 µM. Seřazením těchto látek dle jejich rostoucí toxicity získáme řadu: PABA-Me-5 < PABAN-3 < PABAN-5 < PABAEt-5.



Obr.9 Cytotoxické působení látek MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1 a MK-CF₃-2 na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 9 jsou znázorněny grafy závislosti viability na koncentraci testovaných látek MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1 a MK-CF₃-2 u buněčné linie HepG2. Z těchto parametrů byl následně zjištěn toxikologický parametr IC₅₀. Látky byly inkubovány 24 h s různými koncentracemi (1-500 µM), a to v triplicátech. Všechny znázorněné látky mají IC₅₀ < 100 µM. Nejvyšší cytotoxicitu vykazuje látka MK-CF₃-2, která má hodnoty IC₅₀ pod 20 µM. MK-CF₃-2 je zároveň nejtoxičtější ze všech testovaných látek. Pokud bychom seřadili látky dle jejich rostoucí toxicity, získáme následující řadu: MK-CF₃-1 < MK-F-1 < MK-F-2 < MK-CF₃-2.



Obr. 10 Cytotoxické působení látek MK-NO₂-1, MK-NO₂-2 a DAB-5-K a standardu Amfotericin B na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 10 je znázorněna závislost životaschopnosti buněk linie HepG2 na koncentraci testovaných látek MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, DAB-5-K a amfotericinu B. Z těchto parametrů jsme získali toxikologický parametr IC₅₀. Látky byly 24 h inkubovány a testovány v triplicátech v koncentračním rozmezí 1-500 µM. Všechny znázorněné látky mají podobnou hodnotu IC₅₀, a to nižší než 100 µM. Nejvyšší cytotoxicitu vykazuje látka DAB-5-K (53,25 µM). Při seřazení látek podle vzrůstající toxicity získáme řadu: MK-NO₂-2 < MK-NO₂-1 < DAB-5-K. Amfotericin B je na základě naměřených hodnot > 500 µM možné označit za netoxický.

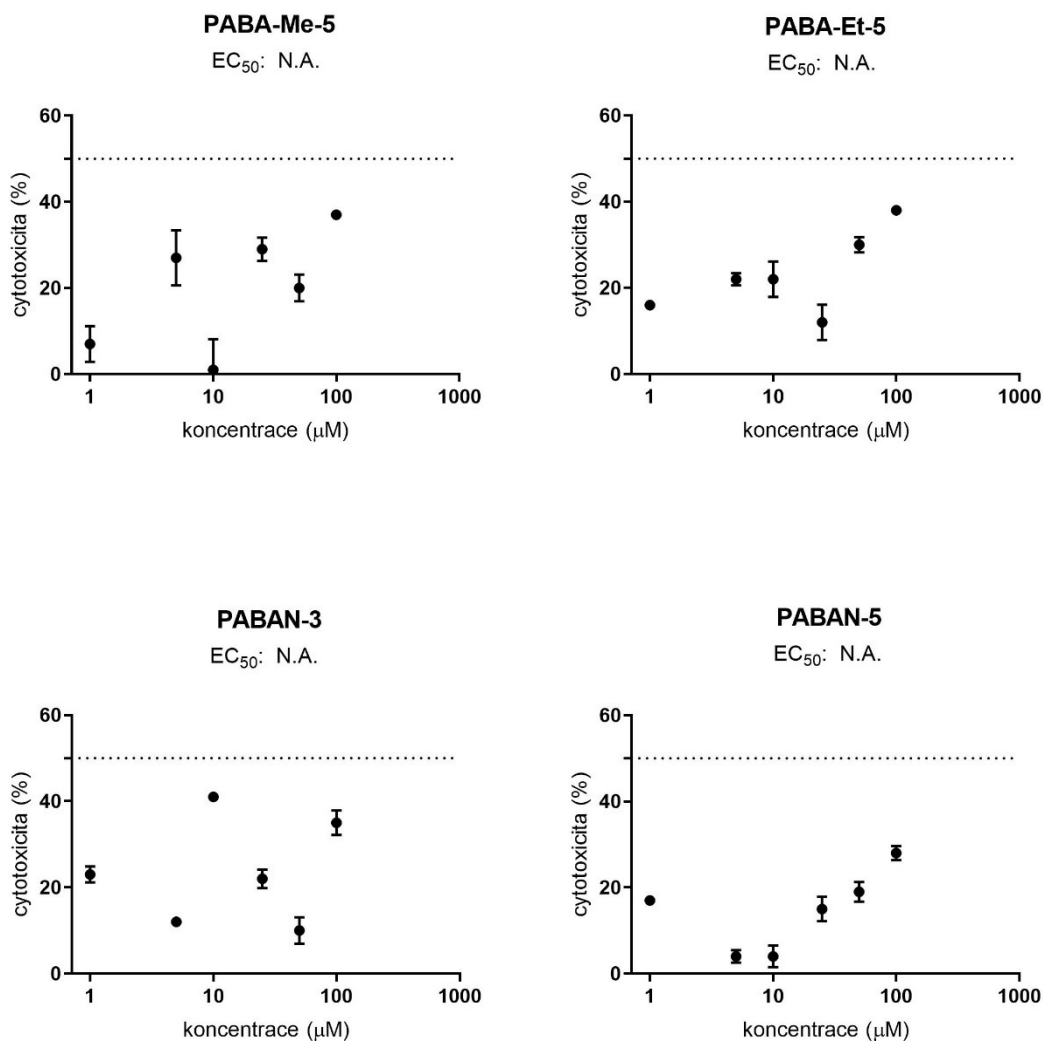
6.2. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

V tabulce 4 jsou shrnuty testované látky společně s naměřenými hodnotami EC₅₀. Tento parametr vyjadřuje koncentraci testované látky, při které uhynie 50 % buněk linie HepG2.

Tab. 4 Hodnoty EC₅₀ testovaných látek za použití metody CellTiter96

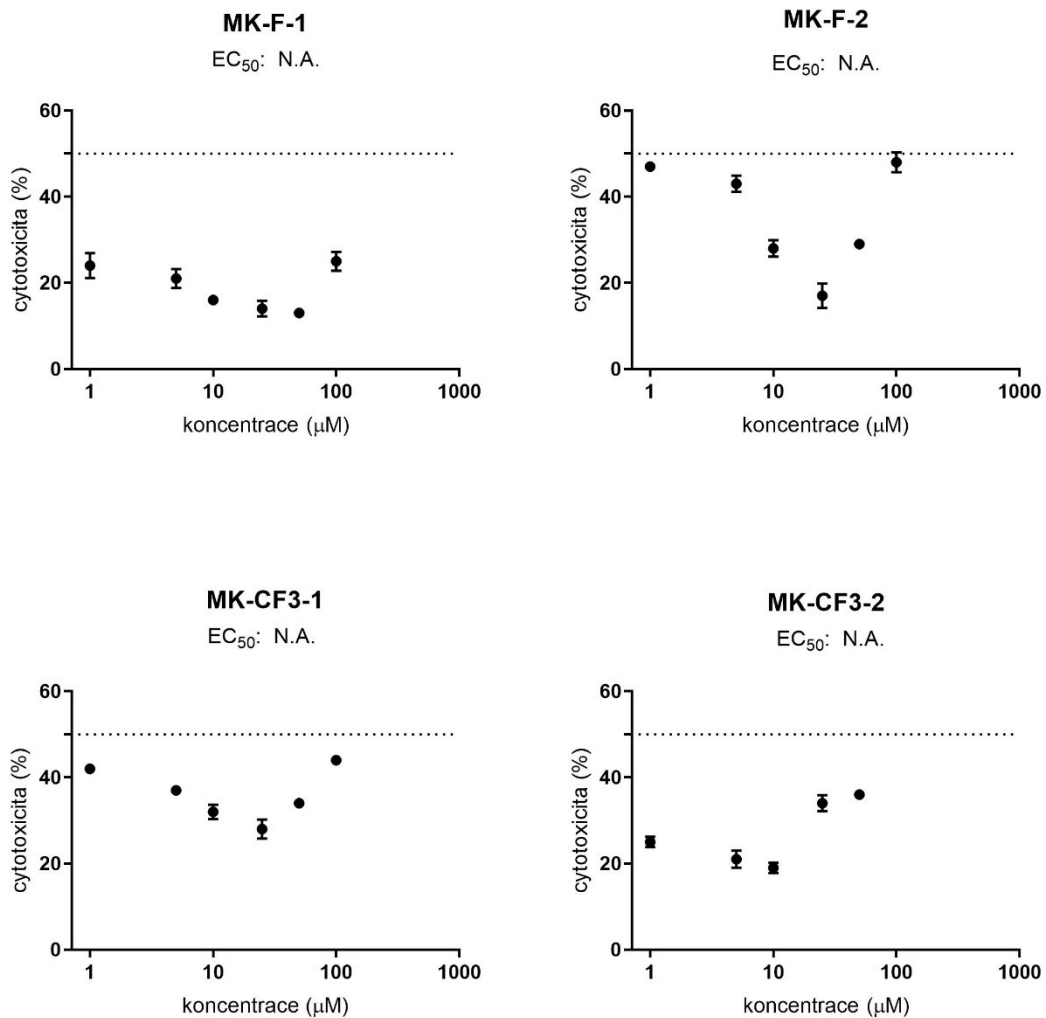
Testovaná látka	EC ₅₀ (μM)	Rozsah koncentrací (μM)	Pasáž
MK-NO ₂ -1	N.A.	1-500	P15-16
MK-NO ₂ -2	0,1059	1-500	P15-16
DAB-5-K	N.A.	1-500	P15-16
PABA-Me-5	N.A.	1-500	P15-16
PABA-Et-5	N.A.	1-500	P15-16
MK-F-1	N.A.	1-250	P15-16
PABAN-3	N.A.	1-500	P15-16
PABAN-5	N.A.	1-500	P15-16
MK-F-2	N.A.	1-500	P15-16
MK-CF ₃ -1	N.A.	1-500	P15-16
MK-CF ₃ - 2	N.A.	1-250	P15-16

Cytotoxicita testovaných potenciálně antimikrobních vývojových látek na linii buněk HepG2 je graficky vyjádřena na obrázcích 11-13. Grafy vyjadřují závislost cytotoxicity buněk na koncentraci testované látky.



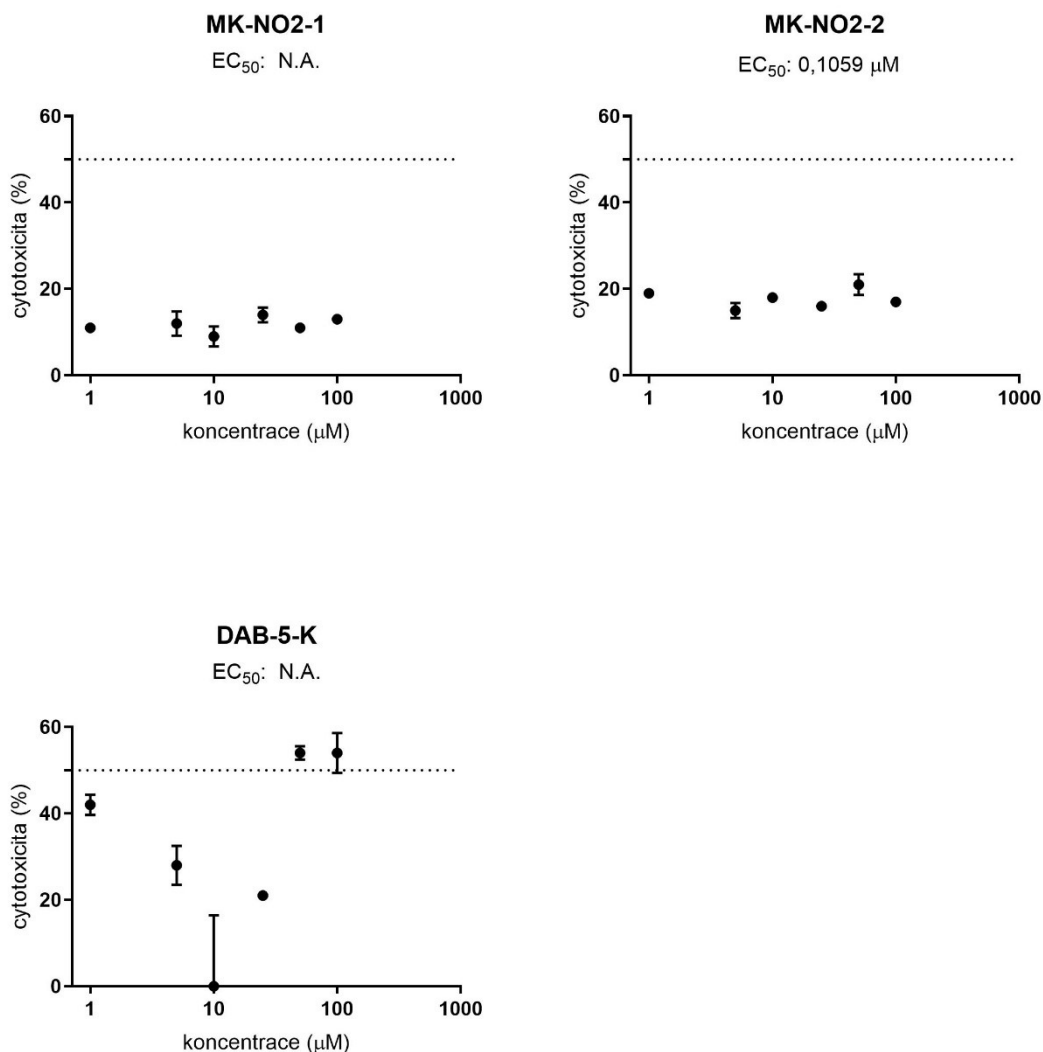
Obr. 11 Cytotoxické působení látek PABA-Me-5, PABA-Et-5, PABAN-3 a PABAN-5 na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 11 jsou znázorněny grafy závislosti cytotoxicity k buněčné linii HepG2 po 24hodinové inkubaci testovaných látek PABA-Me-5, PABA-Et-5, PABAN-3 a PABAN-5. Z těchto hodnot byl následně zjišťován parametr EC₅₀. Látky byly testovány v triplicátech v koncentracích 1-500 µM. Jak je znázorněno na grafu, EC₅₀ nelze určit, důvodem tohoto výsledku může být nízká senzitivita testu.



Obr.12 Cytotoxické působení látek MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1 a MK-CF₃-2 na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 12 je graficky znázorněna závislosti cytotoxicity na koncentraci testovaných látek MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1 a MK-CF₃-2 u buněčné linie HepG2. Z těchto hodnot byl následně zjišťován toxikologický parametr EC₅₀, který kvůli nízké citlivosti testu nelze, také v tomto případě určit. Látky byly inkubovány 24 h v rozmezí koncentrací 1-500 μM, a to v triplikátech.



Obr. 13 Cytotoxické působení látek MK-NO₂-1, MK-NO₂-2 a DAB-5-K na buněčnou linii HepG2 při inkubaci 24 h.

Na obrázku 13 je znázorněna závislost cytotoxicity buněk linie HepG2 na koncentraci testovaných látek MK-NO₂-1, MK-NO₂-2 a DAB-5-K. Z těchto parametrů jsme získali toxikologický parametr EC₅₀. Látky byly inkubovány 24 h a testovány v triplikátech v koncentračním rozmezí 1-500 μM. Kvůli nízké senzitivě testu, jsme hodnotu EC₅₀ získaly pouze u jedné látky MK-NO₂-2.

7. Diskuse

Předmětem diplomové práce bylo *in vitro* stanovení cytotoxicity 11 nových látek s potenciálními antiMRSA a antifungálními účinky na jaterní buněčné linii HepG2. K testování jsme využily dvě odlišné kalorimetrické metody (test buněčné viability a test cytotoxicity) a výsledky jsme porovnali s cytotoxickým působením standardu – amfotericinu B. Mezi testované sloučeniny syntetizované na Katedře Organické a Bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové patřila analoga iminů kyseliny para-aminobenzoové (DAB-5-K, PABA-Me-5, PABA-Et-5, PABAN-3, PABAN-5) a analoga 3,5-dijodsalicylidenových Schiffových bází (MK-NO₂-1, MK-NO₂-2, MK-F-1, MK-F-2, MK-CF₃-1, MK-CF₃-2).

Vzhledem k častému podávání širokospektrálních antibiotik v nemocničním prostředí a následnému vývoji bakterií, dochází v poslední době k vzrůstající rezistenci antibiotik na MRSA. Onemocnění rezistentním kmenem bakterie *Staphylococcus aureus* je spojeno s vysokou morbiditou a využíváním zdrojů zdravotní péče. Jelikož míra rezistence a počet multirezistentních kmenů neustále roste, léčba infekce způsobené tímto patogenem se stává mnohem složitější (Guo et al. 2020, Thampi et al. 2015). V poslední době byl zaznamenán také nárůst rezistence vůči některým antifungálním látkám, což může způsobit značný problém při léčbě vážných mykotických infekcí. Ovšem ve srovnání s antibiotiky není rezistence k antifungálním látkám tak častá (Arendrup et al. 2017). Vzhledem k těmto faktům vznikla potřeba vývoje nových léčiv proti rezistentním infekcím. Jednou z možností vývoje nových léčiv je modifikace původní účinné struktury tvorbou analogů nebo proléčiv.

Experiment byl prováděn na vhodném buněčném modelu – standardní linii lidských jaterních buněk (HepG2) získané z ATCC, s cílem posoudit možnou orgánovou toxicitu studovaných sloučenin. K hodnocení *in vitro* toxicity těchto látek byly využity dvě kalorimetrické metody sledující různé parametry.

První použitou metodou byl test redukce tetrazolia, u kterého byla měřena metabolická aktivita jako marker životaschopnosti buněk. Jako komerčně dostupný kit, obsahující sloučeninu tetrazolia MTS jsme využili CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Tato metoda je založena na

redukci MTS pomocí mitochondriálních enzymů živých buněk na barevný formazanový produkt, který vzniká pouze v metabolicky aktivních buňkách. Proto hodnota měřené absorbance vypovídá o množství živých, metabolicky aktivních buněk. Z naměřených hodnot absorbance jsme následně získali inhibiční křivky testovaných látek a pomocí modelu nelineární regrese jsme určili hodnotu IC_{50} , která udává koncentraci zkoušené látky mající za následek úhyn 50 % buněčné populace.

Jako druhou metodu jsme použili komerční test CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. V tomto testu je pro nás výsledkem počet mrtvých buněk a je založen na kvantitativním měření LDH uvolněného z cytosolu buněk do media. Porušením integrity cytoplazmatické membrány dochází k vyplavení LDH do extracelulárního prostoru, kde se vlivem oxidačně – redukční reakce tvoří barevný formazanový produkt, který lze stanovit spektrofotometricky. Intenzita zbarvení formazanu je úměrná počtu lyzovaných buněk. Z výsledné absorbance jsme získali procenta cytotoxicity testovaných látek a určili toxikologický parametr EC_{50} , který vyjadřuje koncentraci testované látky, při které uhynie 50 % buněk linie HepG2.

Látky byly testovány na 96-jamkové destičce v počtu 15 000 buněk/100 μ l/jamku. Testovány byly vždy v triplicátech v koncentračním rozmezí 1-500 μ M a po dobu 24 h inkubovány při 37 °C v atmosféře 5 % oxidu uhličitého. Použité koncentrace musely být u 2 látek (MK-F-1 a MK-CF₃- 2) omezeny kvůli nižší rozpustnosti. Tyto dvě látky byly testovány v koncentraci jen do 250 μ M. Hlavním důvodem snížení koncentrace u těchto látek bylo vysrážení látek při vyšší koncentraci a vypadnutí do media.

Pro každou koncentraci jsme v triplicátech připravili nebuněčné kontroly testovaných látek s médiem, kontrolu 100 % životaschopnosti buněk, kontrolu pro stanovení 0% životaschopnosti buněk a kontrolu samotného média.

Vzhledem k nízké rozpustnosti testovaných látek ve vodě bylo nutné pro přípravu vzoru využít polární rozpouštědlo DMSO. Toto rozpouštědlo je ovšem toxické pro veškeré buňky již v nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu bylo nutné zajistit, aby koncentrace v konečném vzorku nepřesáhla 1 %, abychom zabránili toxickému působení DMSO na buňky HepG2.

Z výsledných hodnot IC_{50} testu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je patrné, že všechny testované látky působí toxicky na jaterní buňky. Pokud bychom seřadili látky dle jejich rostoucí toxicity, získáme následující řadu: PABA-Me-5 < PABAN-3 < MK-NO₂-2 < MK-CF₃-1 < PABAN-5 < PABA-Et-5 < MK-NO₂-1 < DAB-5-K < MK-F-1 < MK-F-2 < MK-CF₃-2. Vysokou cytotoxicitu vykazuje sloučenina MK-CF₃-2, která má hodnotu IC_{50} 15,84 μ M, ostatní sloučeniny mají podobné hodnoty IC_{50} a řadíme je mezi středně toxické látky. Hodnota IC_{50} amfotericinu B je vyšší než testované koncentrační rozmezí tohoto experimentu (1-500 μ M). Z naměřených dat vyplívá, že amfotericin B má nízkou jaterní toxicitu vůči buňkám linie HepG2.

Vyhodnocení metody CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay se nedalo uskutečnit kvůli nízké senzitivě testu. Hodnotu EC_{50} získaly pouze u jedné látky – MK-NO₂-2.

8. Závěr

- V této práci se nám podařilo stanovit cytotoxicitu 11 nových vývojových látek s potenciálním antifungálním a antiMRSA účinkem na standardní buněčné linii lidských jaterních buněk HepG2.
- Výsledky práce ukázaly, že všechny testované látky mohou mít určitý cytotoxický účinek na jaterní tkáň. Jako standard byl využit lék – amfotericin B. Z naměřených dat vyplívá, že amfotericin B má nízkou jaterní toxicitu vůči buňkám linie HepG2
- Látky byly testovány pomocí dvou metod sledujících různé parametry. Výsledná hodnota IC_{50} získaná za využití metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ukázala, že jsou všechny sloučeniny poměrně výrazně toxické s hodnotou parametru IC_{50} pohybující se v rozmezí od 10 μ M do 100 μ M. Látka MK-CF₃-2 je nejtoxičtější ze všech testovaných látek. Z výsledků testu CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay toxikologický parametr EC_{50} nelze určit, důvodem tohoto výsledku mohla být nízká senzitivita testu.

9. Literatura

Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_3), S445–S451. doi:10.1093/infdis/jix131

Anonym: Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, Technical Bulletin, Promega. In: Promega. 2009, 18.

Anonym: Cell Culture Basics Handbook: Gibco® Cell Culture Basics Certification. Thermo Fisher Scientific, 2016 (b)

Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Assay, Technical Bulletin, Promega. In: Promega. 2012, 12.

Anonym: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Technical Bulletin, 2009 c, 1-12.

Anonym: CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay: Instructions for Use of Product [online]. Promega Corporation, 2016 (a).

Anonym: Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™). ATCC [online]. Teddington, 2016 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB-8065.aspx?geo_country=cz#characteristics (c).

Anonym: Protocols & Applications Guide, Promega, 2006, 1-24.

Bártová E. Buněčné a tkáňové kultury. In: Biologie a genetika pro bakaláře. 2014.
Dostupné z URL:
https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teoriebunecne_a_tkanove_kultury. Datum
přístupu: 13. 4. 2020.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 2005;11:127-152.

Boas, U., Christensen, J.B. and Heegaard, P.M.H. *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*. Royal Society of Chemistry, 2006, 179 s.

Cory, A.H. et al.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 1991; 3: 207–21.

Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88. doi:10.1016/0022-1759(93)90011-u

Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2014). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 77–93. doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_5

Freshney, I. (2001). *Cell Biology and Toxicology*, 17(4), 213–230. doi:10.1023/a:1012572930721

Gomez-Lechon, M., Donato, M., Lahoz, A., & Castell, J. (2008). Cell Lines: A Tool for In Vitro Drug Metabolism Studies. *Current Drug Metabolism*, 9(1), 1–11. doi:10.2174/138920008783331086

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00107

Hartl, J. *Farmaceutická chemie IV. 2., nezměn. vyd.* Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2129-6.

Karimi MA, Lee E, Bachmann MH, et al. Measuring cytotoxicity by 49ioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay. *PloS One*. 2014;9(2):e89357. Published 2014 Feb 19. doi:10.1371/journal.pone.0089357

Kelly, K. J. (2010). Acute Kidney Injury. *Comprehensive Toxicology*, 169–196. doi:10.1016/b978-0-08-046884-6.00808-3 .

Krátký, M., Konečná, K., Brokešová, K., Maixnerová, J., Trejtnar, F., Vinšová, J. Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents. 2020. (článek v revizi)

Kubicová, P., Novák, J., Sovadinová, I. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. 2016, 110, s. 110-118.

López-Terrada, D., Cheung, S. W., Finegold, M. J., & Knowles, B. B. (2009). Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*, 40(10), 1512–1515. doi:10.1016/j.humpath.2009.07.003

Mašková, Jana a Peter Dartsch. Využití buněčných kultur v lékařském výzkumu [online]. Fulda, 2019 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.bicom-optima.cz/texts/prof-peter-dartsch-biorezonance-bunecne-kultury.pdf?fbclid=IwAR2Ax4rWBWNVsQRq7ZmXmOgw38FhNwYCeNkW8vF8vFI7WNOIDs8U8W5FICcAnonym>.

McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, 181–233. doi:10.1016/b978-0-12-800018-2.00008-x

Miret, S., De Groene, E. M., & Klaffke, W. (2006). Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(2), 184–193. doi:10.1177/1087057105283787

Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(6), 655–669. doi:10.1517/17460441.3.6.655

O'Brien PJ, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:5421-5426.

Palsson, Bernhard. a Sangeeta BHATIA. *Tissue engineering*. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, c2004. ISBN 01-304-1696-7.

Peternel, L., Kotnik, M., Prezelj, A., & Urleb, U. (2009). Comparison of 3 Cytotoxicity Screening Assays and Their Application to the Selection of Novel Antibacterial Hits. *Journal of Biomolecular Screening*, 14(2), 142–150. doi:10.1177/1087057108329452.

Riss et al. Cell Viability Assays. In: National Center for Biotechnology Information. 2016. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Datum přístupu: 5. 4. 2020.

Salgado, A. J., Gomez, M. E., Chou, A., Coutinho, O. P., Reis, R. L., Hutmacher, D. W. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds *Materials. Science and Engineering*. 2002, 20, s. 27 – 33.

Sittamplan, Sitta a Abigail Grossman. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, 2004.

Thampi, N., Showler, A., Burry, L., Bai, A. D., Steinberg, M., Ricciuto, D. R., ... Morris, A. M. (2015). Multicenter study of health care cost of patients admitted to hospital with *Staphylococcus aureus* bacteremia: Impact of length of stay and intensity of care. *American Journal of Infection Control*, 43(7), 739–744.

Ulozas, E. (2010). Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity. *Comprehensive Toxicology*, 347–357. doi:10.1016/b978-0-08-046884-6.00818-6.

Vardanyan, R. S., & Hruby, V. J. (2006). Antifungal Drugs. *Synthesis of Essential Drugs*, 535–547. doi:10.1016/b978-044452166-8/50035-2.

Vejražka, M. Buněčné kultury. Bioprojekty. Praha: 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. 2008: 1-16.

Xu, S.-P., Lv, P.-C., Shi, L., & Zhu, H.-L. (2010). Design, Synthesis, and Pharmacological Investigation of Iodinated Salicylimines, New Prototypes of Antimicrobial Drug Candidates. *Archiv Der Pharmazie*.