

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



STUDIUM CYTOTOXICITY LÁTEK *IN VITRO*

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Lucie Vašková

„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“.

.....

Lucie Vašková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit poděkování RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D., za cenné rady, připomínky, vedení a čas, které mi věnovala při vypracování této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Vašková

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium cytotoxicity látek *in vitro*

Předmětem této diplomové práce bylo posoudit vliv vývojových antimykobakteriálně účinných látek na viabilitu buněk lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). Testovanými látkami byly estery (HE-nMe, HE-4PHOPH, HE-KARVA, HE-2NAFT, HE-METRO, HE-CH2PY, HE-8CHIN) a thioestery (HES-4H, HES-nETH) antituberkulotika izoniazidu. U všech těchto látek bylo experimentálně prokázáno, že stejně jako izoniazid působí u mykobakterií inhibicí enzymu InhA, díky čemuž interferují s biosyntézou buněčné stěny. Isoniazid je léčivo standardně používané v první linii léčby TBC. Společně s dalšími antituberkulotiky první linie byl u tohoto léčiva popsán určitý hepatotoxický potenciál. Pro zhodnocení možného cytotoxického účinku testovaných derivátů izoniazidu byla jako buněčný model zvolena standardní buněčná linie lidských hepatocytů HepG2. Viabilita buněk byla hodnocena kolorimetrickou metodou, která posuzuje metabolickou aktivitu buněk na základě redukce tetrazoliové sloučeniny MTS. Získané hodnoty byly kvantitativně porovnávány pomocí toxikologického parametru IC_{50} .

Z naměřených hodnot vyplývá, že všechny testované vývojové látky vykazují velmi nízkou toxicitu na zvolenou buněčnou linii. Hodnoty IC_{50} se pro všechny látky pohybují v koncentracích $>100 \mu\text{M}$. Nejvíce hepatotoxickou se ukázala látka testovaná pod označením HES-4H. Látky HE-CH2PY, HE-METRO, HE-nETH, HE-nMe nevykazovaly žádné toxické působení. Z hlediska jaterní toxicity se tedy pro další vývoj jeví jako velmi perspektivní sloučeniny.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Lucie Vašková

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study on cytotoxicity of compounds *in vitro*

The subject of this diploma thesis was to assess the effect of newly synthesized antimycobacterial substances on the viability of human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. The tested substances were esters (HE-nMe, HE-4PHOPH, HE-KARVA, HE-2NAFT, HE-METRO, HE-CH2PY, HE-8CHIN) and thioesters (HES-4H, HES-nETH) of antituberculosic isoniazid. Experiments performed with these substances have shown, that like isoniazid, the substances inhibit InhA enzyme in mycobacteria and therefore interfere with cell wall biosynthesis. Isoniazid is a drug standardly used in the first line of TB treatment. Together with other first-line antituberculosics, some hepatotoxic potential has been reported during treatment. To assess the possible cytotoxic effect of the tested isoniazid derivatives, the standard human hepatocyte cell line HepG2 was chosen as the cell model. Cell viability was assessed by a colorimetric method that measures the metabolic activity of cells based on the reduction of tetrazolium compound MTS. Obtained values were quantitatively compared using the toxicological parameter IC_{50} .

The measured values show that all newly synthesized substances show very low toxicity to the selected cell line. IC_{50} values for all substances are $> 100 \mu\text{M}$. The substance tested under the name HES-4H has turned out to be the most hepatotoxic. The substances HE-CH2PY, HE-METRO, HE-nETH, HE-nMe did not show any toxic effects. In terms of liver toxicity, they therefore appear to be very promising compounds for further development.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	1
2	ÚVOD.....	3
3	TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1	Vývoj nových léčiv	4
3.1.1	Preklinické hodnocení léčiv	5
3.1.2	Klinické hodnocení léčiv	7
3.2	Antimykobakteriální látky	10
3.2.1	Tuberkulóza	10
3.2.2	Léčba tuberkulózy.....	11
3.2.3	Isoniazid (INH).....	11
3.3	Použité standardy	14
3.3.1	Cisplatina	14
3.3.2	Tamoxifen	14
3.4	Buněčné kultury	16
3.4.1	Získ buněčných linií.....	16
3.4.2	Kultivační podmínky.....	17
3.4.3	Buněčná linie HepG2	18
3.5	Testování cytotoxicity	19
3.5.1	CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	19
4	CÍL PRÁCE.....	21
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
5.1	Použitý materiál	22
5.1.1	Přístroje a pomůcky	22
5.1.2	Chemikálie	22
5.1.3	Buněčná linie HepG2	23
5.1.4	Testované látky	23

5.2	Experimentální procedury	26
5.2.1	Příprava fosfátového pufru (PBS).....	26
5.2.2	Příprava roztoků testovaných látek	26
5.2.3	Příprava buněčné linie pro pokus.....	27
5.2.4	Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	27
5.2.5	Vyhodnocení experimentálních dat	28
6	VÝSLEDKY.....	29
6.1	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	29
7	DISKUSE	34
8	ZÁVĚR.....	36
9	LITERATURA	37

1 SEZNAM ZKRATEK

ADME	Adsorpce, distribuce, metabolismus a eliminace léčiva v organismu
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Vakcína proti tuberkulóze (Bacillus Calmette-Guérin)
CADD	Computer-aided Drug Design
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
Hep-G2	Standardní buněčná linie lidských jaterních buněk
HTS	High-throughput screening
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace 50
INH	Isoniazid (hydrazid kyseliny nikotinové)
KatG	Kataláza-peroxidáza
KHL	Klinické hodnocení léčiv
LBDD	Návrh léků na bázi ligandů (Ligand based drug design)
LTBI	Latentní tuberkulózní infekce
LD ₅₀	Střední letální dávka
MTD	Maximální tolerovaná dávka
MTS	[3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], Owenovo činidlo

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PES	Fenazin ehtosulfát (Phenazin ethosulfát)
SAR	Vztahy mezi strukturou a aktivitou (Structure-activity relationship)
SBDD	Návrh léků na bázi struktury (Structure based drug design)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TBC	Tuberkulóza (Tuberculosis)
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

2 ÚVOD

In vitro testy cytotoxicity na buněčných liniích jsou nedílnou součástí preklinického testování nově syntetizovaných molekul. Jedná se o rychlou, bezpečnou a ekonomicky nenáročnou cestu, jak posoudit základní biologické vlastnosti zejména biologický účinek a toxicitu. (Bácskay et al. 2017) S využitím buněčných linií různého orgánového původu je možné získat základní informace o specifické orgánové toxicitě molekuly ještě před podáním lidem či zvířatům v rámci testování *in vivo*. Je možné takto posoudit například toxické působení na buňky ledvin, plic, nervového systému, reprodukčního systému a dalších. Vzhledem k tomu, že většina léčiv se metabolizuje v játrech, je jedním z nejčastějších důvodů ukončení klinického hodnocení hepatotoxicita nově syntetizované molekuly. Testování potencionální hepatotoxicity je tak důležitou součástí preklinického výzkumu. (Patel et al. 2020)

Tato diplomová práce se zabývá testováním cytotoxického působení devíti nově syntetizovaných molekul ze skupiny derivátů izoniazidu s prokázanou antimykobakteriální aktivitou. Pokusy byly prováděny na lidských jaterních buňkách linie HepG2. K posouzení cytotoxicity těchto látek byl sledován parametr IC_{50} , tedy střední inhibiční koncentrace vyjadřující 50% snížení životaschopnosti buněk. Výsledné hodnoty byly porovnávány s hodnotami IC_{50} lékových standardů tamoxifenu a cisplatiny s již známým cytotoxickým potenciálem.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vývoj nových léčiv

Vývoj nového léčiva je velice náročný a nákladný proces trvající zpravidla déle než deset let. Odhaduje se, že celkové náklady na výzkum a vývoj nového léčiva přesahují 800 miliónů USD. Výši těchto nákladů ovlivňují zejména výzkum a práce vynaložená na vyhledávání použitelných molekul, preklinické a klinické studie a rozsáhlé legislativní procesy při zavádění nového léčiva na trh. Proces vývoje nového léčiva zahrnuje několik základních nezastupitelných fází. (Švihovec et al. 2018) Nejprve je třeba zvolit nemoc a cílovou strukturu léčiva v organismu. Tou může být určitý buněčný typ, enzym, gen, metabolická dráha či jiný buněčný proces. Udává se, že ve farmaceutickém průmyslu je v současné době vyšetřováno více než 500 potencionálních lékových cílů. Jakmile je vybrána cílová struktura, je třeba nalézt látku, která na ni má určitý regulační účinek. Tedy látku s potencionálním terapeutickým účinkem, nazývanou také vůdčí struktura či lékový kandidát (tzv. lead structure, drug candidate). (Taylor 2016)

Proces objevování nových léčiv prošel v posledních desetiletích značným rozvojem. V současné době jsou pro vývoj potencionálních léčiv využívány experimentální a zejména počítačové přístupy (racionální lékový design). Mezi experimentální přístupy se řadí metody kombinatoriální chemie a high-throughput screening (HTS). (Veselovsky et al. 2003) Kombinatoriální chemie neboli syntéza chemických knihoven je metodika používaná od počátku 90. let. Principem je mnohonásobné provedení reakce s různými substráty na polymerní matici, což umožňuje syntetizovat několik tisíc látek současně. Nasyntetizované sloučeniny se uchovávají v chemických knihovnách. Jejich biologický účinek se následně hodnotí skrze HTS. Tato metoda umožňuje rychlý farmakologický screening rozsáhlých sérií látek z chemických knihoven s využitím extrémně malých množství látky. (Kuchař 2008)

V dnešní době využívanější počítačové metody syntézy, vychází z předpokladu, že farmakologicky aktivní sloučeniny působí díky jejich interakcím s makromolekulárními cíli v organismu, zejména proteiny a nukleovými kyselinami. Hlavní faktory ovlivňující tyto interakce jsou sterická komplementarita interagujících povrchů molekul, elektrostatické síly, hydrofobní interakce a vznik vodíkových můstků. (Taylor 2016)

Racionální design léčiv s použitím výpočetní techniky lze souhrnně označit jako Computer-aided Drug Design (CADD). Využití nachází jak ve vývoji, tak v optimalizaci nových léčiv. (Cozza 2017) Dva hlavní přístupy CADD jsou návrh léků na bázi struktury (structure based drug design; SBDD) a návrh léků na bázi ligandů (ligand based drug design LBDD). Pro použití SBDD metod je třeba znát 3D strukturu cílové molekuly. Díky tomu je možné navrhnout léčivo, které bude přímo interagovat s cílovou strukturou. LBDD metody se využívají v případech, kdy tato struktura není známa, ale je již znám jiný ligand, který cílovou molekulu ovlivňuje. Pro vývoj nového léčiva se využije znalostí o jeho fyzikálně-chemických vlastnostech a jejich vlivu na účinek (tzv. structure-activity relationship; SAR). (Yu et al. 2017, Hung et al. 2014)

Po získání vůdčí molekuly následuje její optimalizace. Ta má za cíl zvýšit účinnost potencionálního léčiva, jeho afinitu k cílové struktuře a zlepšit bezpečnost léčiva. (Sliwoski et al. 2014) Pozornost je v této fázi věnována také podrobnějšímu profilování fyzikálně-chemických vlastností a ovlivnění ADME (adsorpce, distribuce, metabolismus a exkrece léčiva). Je snaha zlepšit permeabilitu přes buněčné membrány a rovněž vyřešit otázku chemické stability. (Hughes et al. 2011)

Vybraná molekula poté vstupuje do preklinického a klinického hodnocení, po jejichž úspěšném podstoupení může být zaregistrována a uvedena na trh. (Švihovec et al. 2018, Veselovsky et al. 2003)

3.1.1 Preklinické hodnocení léčiv

Předtím než je možné nové léčivo podat lidem v rámci klinických studií, je třeba otestovat celé spektrum jeho účinků včetně potencionálních vedlejších účinků. Výsledkem preklinických zkoušek je zjištění údajů o farmakokinetice a farmakodynamice léčiva, akutní, subakutní a chronické toxicitě, účincích na funkci reprodukčního systému, karcinogenních účincích a mutagenitě. Provádí se i speciální toxikologické testy, jako například testy na místní dráždivost. (Švihovec et al. 2018) Důležitým výstupem preklinických zkoušek je i definování maximální tolerované dávky (MTD), která následně slouží k odvození dávky podávané v rámci 1. fáze klinického hodnocení. (Součková et al. 2015) I přes provedení rozsáhlého preklinického testování není možné zaručit úplnou bezpečnost testované látky. (Starobová et al. 2006)

Preklinické studie lze dle použitých modelů rozdělit na dvě skupiny. První tvoří *in vitro* experimenty, mezi něž řadíme studie na izolovaných buňkách, tkáních nebo orgánech. Na těchto modelech jsou zjišťovány toxické a farmakologické vlastnosti nové látky. Druhou skupinou jsou *in vivo* experimenty, tedy experimenty na živých zvířecích modelech. I přesto, že v posledních letech je snaha omezit testování na zvířatech na minimum, v rámci preklinického výzkumu mají stále nezastupitelnou roli a nelze je plně nahradit. Umožňují totiž ověřit účinnost a bezpečnost potencionálního léku na orgánové systémy se zachovalými vazbami, které nalezneme pouze v komplexním živém organismu. (Součková et al. 2015) Stále více jsou využívány i počítačové modely, jejich použití pro predikci účinku léčiva u člověka je však z výše uvedených důvodů omezené. (Švihovec et al. 2018)

U vybraného zvířecího modelu je důležité, aby co nejvíce napodoboval fyziologické prostředí lidského těla. Preklinické testování pak probíhá jak na zdravých zvířatech, tak na zvířatech s navozeným modelovým onemocněním (např. hypertenze, peptický vřed apod.). Na patologicky změněném zvířecím organismu lze sledovat účinek takových léčiv, které by u zdravého zvířete nevyvolaly žádný efekt. Jedná se například o látky s potenciálně antihypertenzivním, antipyretickým nebo analgetickým účinkem. (Starobová et al. 2006) Vždy je potřeba provést výše zmíněné testy minimálně na dvou zvířecích druzích, kdy jeden z nich musí být hlodavec a druhý nehlodavec. Často se využívá myš domácí a potkan obecný, z nehlodavců se pak volí nejčastěji mezi králíkem domácím, kočkou domácí, psem domácím nebo prasetem domácím. Všechny preklinické studie jsou prováděny v akreditovaných zařízeních a za dodržení etických standardů zacházení s laboratorními zvířaty a v souladu se správnou laboratorní praxí. (Součková et al. 2015)

Základem preklinického hodnocení léčiv jsou testy akutní toxicity. Ty se zpravidla provádí na dvou druzích savců, hlodavci a nehlodavci, a jejich výsledkem je určení maximální tolerované dávky (MTD) a střední letální dávky (LD₅₀), tedy dávky, která je smrtelná pro 50 % testovaných zvířat. Léčivo bývá podáváno jak parenterálně, tak i způsobem, kterým bude podáváno v klinické praxi. (Švihovec et al. 2018) Během akutních testů se efekt léčiva sleduje 14 dní. Dalšími testy jsou testy subakutní, subchronické a chronické toxicity. Ty poskytují toxikologický profil léčiva při opakovaném podávání. Subakutní testy se provádí po dobu minimálně 28 dní, subchronické 90 dní. (Parasuraman 2011) U chronických testů by délka podávání měla

odpovídat předpokládané době klinického podávání. Tyto testy poskytují informace o vlivu léčiva na základní orgánové systémy a fyziologické funkce a umožňují prokázání histopatologických změn v organismu. Dále se provádí testy reprodukční toxicity. Ty sledují vliv léčiva na organismus po celou dobu trvání reprodukčního cyklu použitého modelového zvířete. Tím umožní zjistit vliv na fertilitu, případnou teratogenitu a vliv na narozená mláďata. Případné genetické změny sledují testy genotoxicity. Mezi poslední testy prováděné v rámci preklinického testování patří testy farmakodynamiky a farmakokinetiky. Ty podávají základní informace o chování léčiva v organismu. Mají spíše prediktivní váhu, jelikož jejich výsledky výrazně ovlivňuje výběr modelového zvířete. (Švihovec et al. 2018)

3.1.2 Klinické hodnocení léčiv

Před schválením pro klinické použití v populaci prochází léčivo dále rozsáhlým klinickým hodnocením léčiv (KHL). (Umscheid et al. 2011) KHL je systematické testování potencionálního léčiva prováděné na určitých skupinách populace (tzv. subjektech hodnocení) za účelem zjistit či ověřit klinické a farmakologické účinky, stanovit možné nežádoucí účinky a ověřit bezpečnost nebo účinnost testovaného léčiva. (Strašík et al. 2014) Subjektem hodnocení se může stát jak zdravý dobrovolník, tak nemocný jedinec. (Anonym 2010) Kvůli zapojení lidských subjektů do testování je klinické hodnocení léčiv velmi přísně regulováno. V České republice upravuje proces KHL Zákon o léčivech, detailněji pak také Vyhláška o správné klinické praxi. Hlavní regulační autoritou v této oblasti je Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Nezastupitelnou roli mají i tzv. etické komise. (Součková et al. 2015). Před schválením klinické studie posuzuje SÚKL zejména poměr risk-benefit (tj. poměr rizika nové léčby pro pacienty ku přínosu studie), kvalitu používaných léků a design studie (tj. výběr pacientů, zvolené kontroly a vyšetření, dávkování a délka léčby, stanovené cíle a parametry zvolené k jejich prokázání). To vše je důležité pro získání objektivních informací o léčivu. (Anonym 2010)

Vlastní klinické hodnocení probíhá zpravidla ve 4 fázích, které na sebe navazují nebo se částečně překrývají. (Součková et al. 2015)

I. fáze klinického hodnocení poskytuje počáteční údaje o bezpečnosti testovaného léčiva. Subjektem jsou v této fázi zdraví dobrovolníci. Výjimku tvoří případy, kdy se

testují vysoce toxické látky, například ty zamýšlené k léčbě onkologických pacientů. V tomto případě je využíváno nemocných dobrovolníků, u nichž nezabírá standardní léčba. Začíná se velmi nízkými dávkami, které se postupně navyšují, aby bylo možné určit maximální tolerovanou dávku (MTD) a navrhnout dávku a dávkovací schéma pro použití v II. fázi KHL. Shromažďují se farmakokinetické údaje, které slouží k posouzení rychlosti absorpce a eliminace testovaného léčiva. Pokud se během I. fáze prokáží u léčiva závažné toxické účinky, KHL je ukončeno. (Umscheid et al. 2011, Le Tourneau et al. 2009)

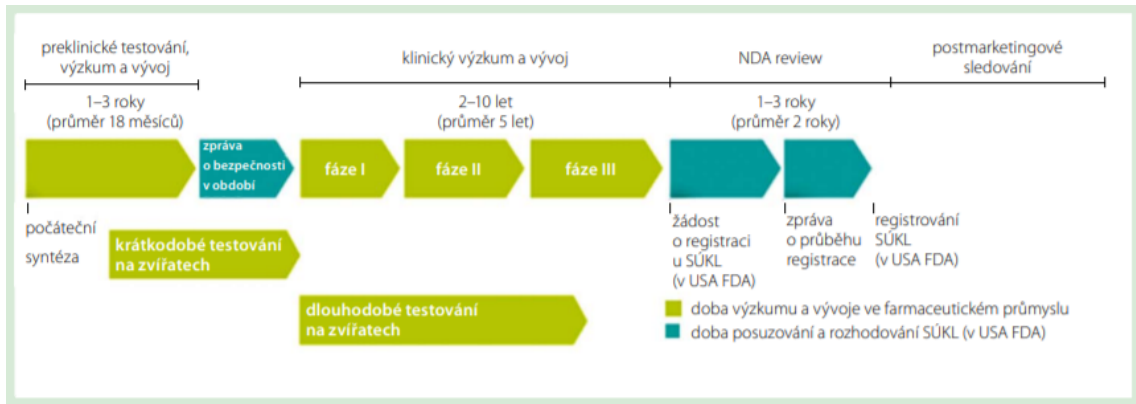
Ve II. fázi KHL se léčivo podává v dávce či dávkách, které byly zhodnoceny jako bezpečné v I. fázi. Tyto studie jsou obvykle větší než studie I. fáze a lék je dle přísných kritérií poprvé podán malému počtu přesně vytipovaných nemocných pacientů. Testují se zde léčebné účinky, bezpečnost, farmakokinetika, farmakodynamika a upřesňují se informace o optimální dávce, frekvenci dávkování a vhodné cestě podání pro III. fázi KHL. (Umscheid et al. 2011) Počet subjektů hodnocení účastnících se této fáze bývá obvykle sto až několik set. (Starobová et al. 2006)

III. fáze KHL se provádí u větší a často rozmanitější cílové populace, počet dobrovolníků se navyšuje na 300 až 3000. Tyto studie se často nazývají potvrzovací studie a je snaha zde prokázat, že testovaná látka je buď účinnější anebo má méně nežádoucích účinků než léčba současná. Vzhledem k tomu, že toto testování probíhá po delší časové období a na větším počtu dobrovolníků než fáze předešlé, umožňuje odhalit i relativně vzácné toxické účinky. (Umscheid et al. 2011)

Poté, co lék prošel I. až III. fází klinického hodnocení, je možné podat žádost o jeho registraci příslušné registrační autoritě. Tou je v případě České republiky Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL), na evropské úrovni pak Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency; EMA), v USA pak Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration; FDA). Ve chvíli, kdy má lék platnou registraci, je možné ho začít používat v rámci poskytování zdravotní péče a KHL přechází do IV. fáze. (Anonym 2010)

IV. fázi KHL jsou postmarketingové studie tedy studie hodnotící účinnost a možná rizika léku po jeho uvedení na trh. Sleduje se hlavně výskyt vzácných, závažných účinků, které nebylo možné posoudit na menších počtech dobrovolníků v prvních třech fázích KHL. (Umscheid et al. 2011). Případně se provádí další KHL, také označované

jako klinické hodnocení fáze „III. b“. V této fázi se zkouší nové indikace, nová léčebná schémata či užívání léku specifickými skupinami pacientů jako jsou děti nebo staří lidé. (Anonym 2010) Jednotlivé fáze vývoje léčivého přípravku znázorňuje obrázek č.1.



Obr. 1 Jednotlivé fáze vývoje nového léčivého přípravku. Převzato z: Součková et al. 2015

3.2 Antimykobakteriální látky

Antimykobakteriální látky jsou látky využívané v léčbě infekcí způsobených zástupci rodu *Mykobakterium*, zejména tuberkulózy a lepry. Působí i proti netuberkulózním mykobakteriím, které jsou stále častěji identifikovány jako lidské patogeny. V současné době dostupná antimykobakteriální chemoterapeutika jsou účinná v léčbě citlivých forem TBC, celosvětovou zdravotní prioritou je však vývoj nových antimykobakteriálních léčiv pro léčbu rezistentních typů tuberkulózy. (Gillespie et al. 2011)

Všechny látky testované v této diplomové práci jsou analoga antituberkulotika izoniazidu vykazující antimykobakteriální účinky. Bylo u nich experimentálně prokázáno, že stejně jako izoniazid působí inhibici enzymu InhA mykobakterií, díky čemuž interferují s biosyntézou buněčné stěny. Látky byly dodány Katedrou organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy.

3.2.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené infekční onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Mycobacterium*. (Homolka 2016) Odhaduje se, že přibližně čtvrtina světové populace je infikována bakteriemi způsobujícími TBC. Dle poslední Světové zprávy o tuberkulóze, vydávané každoročně Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization; WHO), se v roce 2019 tuberkulózou nakazilo 10 milionů lidí a zemřelo celkem 1,4 milionů lidí. To řadí tuberkulózu mezi jednu z 10 nejčastějších příčin úmrtí. Ze stejné zprávy dále vyplývá, že nejpostiženějším regionem světa je region jihovýchodní Asie (44 % nových případů), následovaný regionem africkým (25 % nových případů). (Anonym 2020a) V České republice bylo dle dat dostupných na stránkách Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) v roce 2019 hlášeno celkem 464 onemocnění tuberkulózou (tj 4,3 případů na 100 000 obyvatel). Oproti roku 2018 se jednalo o nárůst 20 případů. Z dlouhodobého hlediska, ale vykazuje počet onemocnění TBC v ČR klesající tendenci. (Anonym 2020b)

Nejčastější patogen způsobující TBC je *Mykobakterium tuberculosis* (Mtb). Jedná se o vysoce nakažlivou, pomalu rostoucí, aerobní bakterii tyčinkovitého tvaru. Člověk patří mezi její primární hostitele. Buněčná stěna Mtb má vysoký obsah lipidů, což poskytuje bakteriím odolnou bariéru proti mnoha běžně užívaným lékům a umožňuje jim

přežívat v makrofázích. K přenosu mykobakterií dochází téměř výlučně prostřednictvím kapénkové infekce. Z tohoto důvodu jsou nejčastěji postiženým orgánem plíce (85-90 %). (du Toit et al. 2006, Homolka 2016)

Odhaduje se, že po primární infekci se tuberkulóza klinicky projeví zhruba u 5-10 % lidí. Infekce je charakterizována přetrvávajícím kašlem doprovázeným tvorbou sputa, úbytkem hmotnosti, slabostí a nočním pocením. Ke klinickému rozvoji onemocnění či jeho zhoršenému průběhu přispívá řada komorbidit, zejména těch, které ovlivňují funkci imunitního systému nakaženého jedince. (Sia et al. 2019)

3.2.2 Léčba tuberkulózy

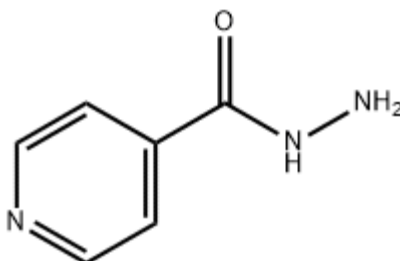
V léčbě tuberkulózy se využívají látky souhrnně nazývány jako antituberkulotika. Uplatňují se v léčbě plicní i extrapulmonární formy TBC. V praxi se dělí do dvou skupin, a to na antituberkulotika základní a na antituberkulotika náhradní. Základní neboli léčiva 1. linie jsou ta, na nichž jsou postaveny standardní léčebné režimy TBC. Jedná se o INH, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol a streptomycin. Mezi antituberkulotika náhradní patří aminoglykosidy, makrolidy, fluorchinolony, ethionamid a cykloserin. Ty jsou využívány při rezistenci na léky první volby, při výskytu alergií nebo závažných nežádoucích účinků u nakaženého. (Amin 2006, Martínková 2018) Minimální doba léčby je šest měsíců. Monoterapie se nevyužívá z důvodu velkého rizika rozvoje rezistence. (Martínková 2018)

Od roku 1927 je proti TBC dostupná živá atenuovaná BCG vakcína (bacille Calmette-Guérin). BCG vakcína snižuje riziko zejména diseminované tuberkulózy u malých dětí. Její vliv na plicní formy TBC u dospělých se ale velmi liší a je považován za nedostatečný. (Ernst 2018) Z tohoto důvodu se v posledních letech intenzivně pracuje na vývoji nové vakcíny. V posledních 2 desetiletích prošlo klinickými studiemi více než 20 kandidátů na vakcíny a 14 je v klinických studiích aktivně hodnoceno. (Sable et al. 2019)

3.2.3 Isoniazid (INH)

Isoniazid (viz Obr. 2) je léčivo indikované v první linii léčby aktivní infekce *Mykobakterium tuberculosis*. Jedná se o proléčivo, které se po podání aktivuje mykobakteriálním enzymem kataláza-peroxidázou (KatG) na aktivní metabolit.

(Švihovec 2018, O'Connor 2020) Výsledné aktivní metabolity reagují s NAD^+ za vzniku aduktu INH-NAD, který inhibuje mykobakteriální enzym InhA, což vede k zastavení biosyntézy mykolových kyselin důležitých pro formaci buněčné stěny mykobakterií. (Vilchèze et al. 2014) Tato aktivita dává INH silný baktericidní účinek. Isoniazid působí zejména na extracelulárně a intracelulárně rostoucí Mtb, méně účinný je proti jiným mykobakteriím. (Martínková 2018)



Obr. 2 Strukturální vzorec isoniazidu. Převzato z:

<https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/54-85-3.gif>

Isoniazid se po p.o. podání rychle a téměř úplně vstřebává, c_{max} je dosaženo za 1-2 hodiny. Lze podávat i i.v. INH se snadno distribuuje do všech tělesných tkání a tekutin. Biodegradace probíhá v játrech, kde je acetylován N-acetyltransferázou 2 (NAT 2) za účasti acetylkoenzymu A. Rychlost acetylace je podmíněna geneticky. Pomalá acetylace může vést k vyšším plazmatickým hladinám a zvyšovat tak riziko výskytu nežádoucích účinků. INH i jeho metabolity jsou vylučovány močí, malá část přechází do střeva. (Švihovec 2018, Martínková 2018, O'Connor 2020)

Při užívání isoniazidu byla hlášena řada nežádoucích účinků. Častým je periferní neuropatie, pravděpodobně vyvolaná interferencí metabolitů INH s metabolismem vitamínu B6 (pyridoxin), což vede ke snížení množství biologicky aktivního B6 v těle. (O'Connor 2020, SPC přípravku Nidrazid)

Až u 20 % pacientů léčených isoniazidem se objevuje mírné poškození jater. To se projevuje zvýšenými hladinami transamináz v séru, hyperbilirubinemií, rozvojem ikteru, vzácně až závažnou hepatitidou. Klinické projevy hepatotoxicity zahrnují horečku, únavu, slabost, nevolnost a zvracení. Většina pacientů je však asymptomatická a je u nich detekována pouze zvýšená hladina alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Jejich hodnoty mohou vzrůst až na pětinasobek normálních hladin. Asi u 1 % pacientů může dojít k vážnému poškození jater a léčba

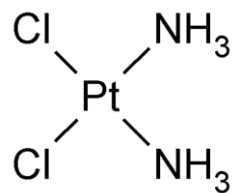
izoniazidem by měla být okamžitě ukončena. Vážné poškození jater vyvolané izoniazidem je spojeno s vyšším věkem pacienta a souběžnou léčbou rifampicinem. Výskyt je také vyšší u pomalých acetylátorů, což souvisí s vyššími sérovými hladinami izoniazidu. (O'Connor 2020, SPC přípravku Nidrazid)

Vzrůstajícím problémem v léčbě izoniazidem je zvyšující se výskyt případů izoniazid-rezistentní tuberkulózy. Rezistence je spojena s horšími výsledky léčby, relapsem onemocnění až smrtí pacientů. Rezistence je i hlavním důvodem nemožnosti využívat izoniazid v preventivní léčbě TBC. (Stagg et al. 2017) Hlavním mechanismem vyvolávajícím INH rezistenci je mutace enzymu KatG, který je důležitý pro tvorbu aktivního metabolitu INH. Druhým častým mechanismem je mutace v promotorové oblasti enzymu InhA. (Vilchèze et al. 2014)

3.3 Použité standardy

3.3.1 Cisplatina

Cisplatina je komplexní sloučenina obsahující platinu. Její struktura je znázorněna na Obr. 3. Je klinicky prokázáno, že cisplatina působí proti různým typům rakoviny, včetně sarkomů, rakoviny měkkých tkání, kostí, svalů a krevních cév. V praxi se používá ve formě infuzního roztoku k paliativní a adjuvantní léčbě bronchogenního karcinomu, testikulárního karcinomu, ovariálního karcinomu, karcinomu cervixu, endometria, prostaty a dalších. (Dasari et al. 2014, SPC přípravku Cisplatina Ebewe)



Obr. 3 Strukturální vzorec cisplatiny.

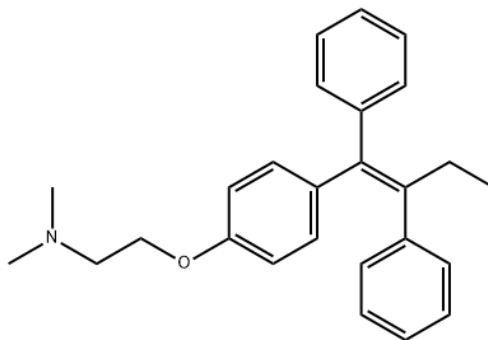
Převzato z: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m17910.html

Základním mechanismem účinku cisplatiny je alkylace řetězců DNA. (Švihovec et al. 2018) Cisplatina je vylučována ledvinami a může se hromadit v proximálních tubulech ledvin, což vede k nefrotoxicitě. V klinické praxi se celková prevalence nefrotoxicity vyvolané cisplatinou blíží jedné třetině léčených pacientů a obvykle se projevuje přibližně 10 dní po léčbě. U pacientů léčených cisplatinou je jako základní prevence nefrotoxicity zapotřebí dostatečná hydratace, která urychluje vylučování cisplatiny z ledvin a zkracuje tak dobu průchodu proximálním tubulem. (Crona et al. 2017) V této diplomové práci byla cisplatina použita jako negativní kontrola.

3.3.2 Tamoxifen

Tamoxifen je léčivo spadající do skupiny selektivních modulátorů estrogenních receptorů (SERM), látek, které se vyznačují agonistickým i antagonistickým účinkem na různé podtypy estrogenních receptorů. Agonisticky působí na estrogenní receptory v játrech, kostech a kardiovaskulárním systému. Antagonisticky působí v děloze a mléčné žláze. Klinicky se tamoxifen využívá v adjuvantní léčbě metastazujícího karcinomu prsu,

často v kombinaci s dalšími cytostatiky a ozařováním. (Švihovec et al. 2018, SPC přípravku Tamoxifen Ebewe) Struktura tamoxifenu je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4 Strukturní vzorec tamoxifenu.

Převzato z: <https://img.chemicalbook.com/CAS/GIF/10540-29-1.gif>

Mechanismus účinku tamoxifenu spočívá ve vazbě na estrogenní receptory v prsní tkáni. Tím se zablokuje schopnost estrogenu se na tyto receptory vázat a zastaví se tak estrogenem zvýšená buněčná proliferace. (Nazarali et al. 2014) Samotný tamoxifen má relativně malou afinitu k estrogenním receptorům a většina jeho terapeutického účinku při léčbě rakoviny prsu pochází z jeho metabolitu endoxifenu. Důležitým enzymem pro tuto přeměnu je CYP2D6. Léky, které inhibují tento receptor tak výrazně snižují účinnost tamoxifenu. (Hansten 2018) V dnešní době se jako hlavní léčba u karcinomu prsu pozitivního na estrogenový receptor používají u postmenopauzálních žen spíše inhibitory aromatázy třetí generace. (Khosrow-Khavar et al. 2017)

Dlouhodobá terapie tamoxifenem je spojená s rozvojem tukových jater, jaterní steatózou, cirhózou a vzácněji i s rozvojem akutního poškození jater. (Roy et al. 2019) Bylo prokázáno, že tamoxifen může inhibovat proliferaci a vyvolat apoptózu v buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). (Sanaei et al. 2017) V této diplomové práci byl tedy použit jako pozitivní kontrola.

3.4 Buněčné kultury

Buněčná kultura je označení pro rostlinné, živočišné nebo lidské buňky pěstované *in vitro* v kontrolovaných laboratorních podmínkách. (Vejražka 2008) Konkrétní podmínky pro růst a proliferaci buněk závisí vždy na typu pěstované buněčné kultury. (Bácskay et al. 2017)

Ve vědeckém výzkumu nachází buněčné linie uplatnění jako modely pro testování cytotoxicity léčiv a jejich metabolitů, uplatňují se při výrobě vakcín a monoklonálních protilátek, studiu genových funkcí a syntéze biologických sloučenin jako jsou terapeutické proteiny. Mezi jejich velké výhody patří nákladová efektivnost, snadné použití, neomezený přísun materiálu a vyhnutí se etickým problémům spojených s využitím zvířecích a lidských tkání. Poskytují konzistentní vzorek a tím i reprodukovatelné výsledky. (Kaur et al. 2012)

3.4.1 Získ buněčných linií

Buňky čerstvě izolované z žijícího organismu nazýváme primární kultury (též primokultury). Jedná se o fázi kultivace do doby, než izolované buňky spotřebují veškerý substrát v médiu a dosáhnou 100 % konfluence. Primární kultura existuje zpravidla jen několik dní, pak je nutné buňky převést do nového média. (Kočárek et al. 2010, Anonym 2016). Primární kulturu je možné založit několika způsoby. První možností je nechat buňky růst z celistvé odebrané tkáně, v tomto případě se zároveň jedná o kulturu tkáňovou. Takto je možné izolovat pouze rychle se množící buňky (př. fibroblasty), které díky svému rychlému dělení opouštějí tkáň přednostně. Častějším způsobem zakládání primárních kultur je přímé odebrání buněk z tkáně a jejich uvolnění jemnou enzymatickou nebo mechanickou dezintegrací. Metody enzymatické dezintegrace jsou v dnešní době preferovanější, jelikož umožňují získat z tkáně větší počet životaschopných buněk. K tomuto účelu jsou používány zejména proteolytické enzymy jako je trypsin, kolagenáza a elastáza. Další možností je pak odebrání buněk z již zavedené buněčné linie či buněčného kmene. (Šebek 2018, Anonym 2016)

Po první pasáži se z primární kultury buněk stává buněčná linie. Buněčné linie odvozené z primárních kultur mají omezenou délku života a během jednotlivých pasáží převládají buňky s nejvyšší růstovou kapacitou. To má za následek určitý stupeň genotypové a fenotypové uniformity buněk v populaci. Pokud je subpopulace buněčné

linie pozitivně selektována z kultury např. klonováním, stává se z buněčné linie buněčný kmen. V buněčném kmeni často dochází k dalším genetickým změnám oproti parenterální linii. (Anonym 2016)

3.4.2 Kultivační podmínky

Pro optimální růst a proliferaci je nutné buňkám zajistit vhodné podmínky. Důležitými jsou zejména povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a z něj vyplývajícího pH a osmotického tlaku, teplota a složení atmosféry v inkubátoru. (Vejražka 2008)

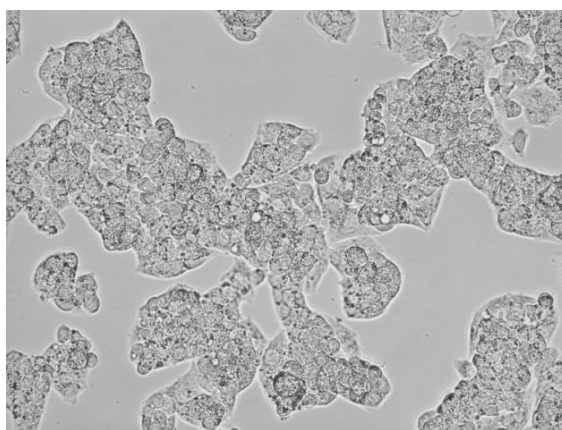
Při volbě vhodné kultivační nádoby a vhodného povrchu pro kultivaci je nutné brát v úvahu, zda se jedná o buněčnou linii suspenzní, kde buňky volně plovou v buněčném médiu či o linii adherentních buněk (př. HepG2), kde buňky rostou v monovrstvách na dně kultivační nádoby. V případě adherentních linií je třeba používat nádoby se speciálně upraveným hydrofilním povrchem. (Šebek 2018, Anonym 2016)

Výběr vhodného média závisí na typu buněk, které mají být kultivovány, na účelu kultivace a zdrojích dostupných v laboratoři. Různé typy buněk mají vysoce specifické požadavky na růst, proto musí být nejvhodnější médium pro každý typ buněk experimentálně stanoveno. Média pro buněčnou kultivaci obecně obsahují vhodný zdroj energie a sloučeniny, které regulují buněčný cyklus. Typické kultivační médium se skládá z doplňků aminokyselin, vitamínů, anorganických solí, glukózy, séra jako zdroje růstových faktorů, hormonů a faktorů pro adhezenci buněk k povrchu kultivačních nádob. Kromě živin pomáhá médium také udržovat vhodnou osmolalitu a pH. (Meenakshi 2013).

Linie odvozené od lidských buněk se kultivují při teplotě 37 °C, v médiu o pH 7,4. Relativní vlhkost atmosféry v inkubátoru se udržuje kolem 90 %. To zabraňuje odpařování vody z kultivačního média a změnám koncentrace jednotlivých jeho složek. Atmosféra se většinou dále obohacuje o oxid uhličitý, obvykle v koncentraci 5 % CO₂. Při použití médií pufrovaných hydrogenuhličitanovým pufrem se exogenní CO₂ podílí i na udržení pH média. (Vejražka 2008, Anonym 2016)

3.4.3 Buněčná linie HepG2

HepG2 je buněčná linie získaná z lidského hepatocelulárního karcinomu. Její buňky jsou vysoce diferencované a mají mnoho genotypových vlastností normálních jaterních buněk. Společně s primárními lidskými hepatocyty patří mezi nejčastěji používané *in vitro* modely ve farmakologických a toxikologických studiích. V oblasti farmacie nachází HepG2 buňky (viz. Obr. 5) uplatnění během screeningu cytotoxického potenciálu nových chemických entit při vývoji nových léčiv. (Gerets et al. 2012)



Obr. 5 Mikroskopický snímek buněk linie HepG2. (Autorka linie 2020)

Oproti primárním hepatocytům je výhodou neomezená dostupnost linie, snadná manipulace a vysoká proliferační kapacita. Nevýhodou pak genetická nestabilita vyplývající z rakovinového původu linie. (Schulz et al. 2019). Hlavní omezení linie souvisí s nízkými metabolickými kapacitami ve srovnání s primárními hepatocyty. HepG2 buňky vykazují nízkou expresi a aktivitu téměř všech enzymů 1. fáze metabolismu, zejména pak enzymů CYP3A4, CYP2A6, CYP2C9 a CYP2C19. Hladiny enzymů 2. fáze, s výjimkou UDP-glukuronosyltransferázy, vykazují normální. Mají tedy omezenou hodnotu pro predikci jaterní biotransformace. Vzhledem k tomu jsou vhodné spíše pro testování toxicity původní molekuly a méně vhodné pro testování toxicity jejích metabolitů. (Gerrets et al. 2012, Schulz et al. 2019, Wilkening et al. 2003)

3.5 Testování cytotoxicity

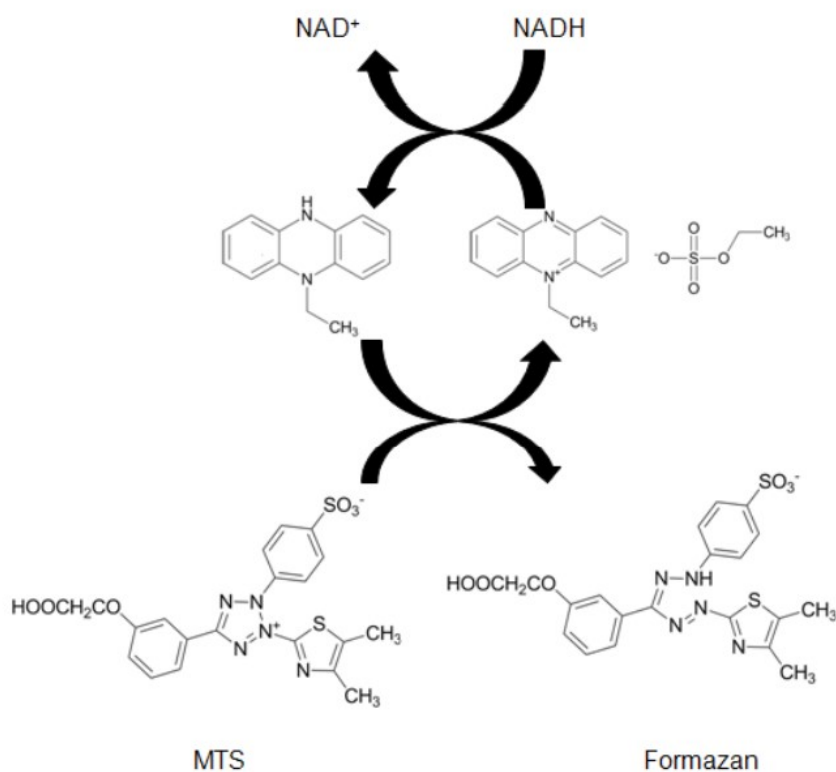
In vitro testy cytotoxicity představují vhodný způsob, jak stanovit cytotoxický účinek potencionálního léčiva v rámci preklinického testování. (Bácskay et al. 2017) Mimo to se hojně využívají i v onkologickém výzkumu, kde se kromě sledování toxikologických účinků používají i pro stanovení inhibičního potenciálu nových léčiv na nádorové buňky. Různé látky mohou vyvolávat cytotoxické účinky různými mechanismy. Mohou destruovat buněčné membrány, inhibovat syntézu proteinů, nevratně se vázat na buněčné receptory či negativně ovlivňovat metabolické procesy v buňce. Existuje proto i velké množství rozdílných metod zaměřených na stanovení cytotoxicity a viability buněk. (Aslantürk 2017)

Široce využívanými metodami pro studium viability buněk jsou studie založené na redukci tetrazoliových solí pomocí buněčných dehydrogenáz. Jedná se o metodu, která vychází z předpokladu, že cytotoxicky působící látka ovlivňuje metabolickou aktivitu buňky. Mezi nejdéle využívanou látku ze skupiny tetrazoliových solí patří 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidu (MTT). Ten je činností mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk redukovaný na barevný produkt. Nevýhodou je fakt, že tento produkt není rozpustný v buněčném médiu. (Huang et al. 2004) Je třeba ho tedy rozpustit v organickém rozpouštědle, což do stanovení přidává další krok a nedostatečné rozpuštění může vést ke vzniku odchylek. Z tohoto důvodu byly vyvinuty nové tetrazoliové soli jako XTT, WST-1, WST-2 a v tomto experimentu použitý MTS. Tyto soli se redukují na rozpustné deriváty formazanu. Redukci je možné urychlit přidáním elektronového vazebného činidla, jako je fenazin methosulfát (PMS) nebo fenazin ethosulfát (PES). (Ginouves et al. 2014) Tento přístup šetří čas a eliminuje potenciální chyby, jako je například ztráta buněk, ke které může dojít při odstraňování kultivačního média a následné solubilizaci buněk při použití MTT. (Huang et al. 2004)

3.5.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je kolorimetrická metoda používaná pro stanovení viability buněk. Ve farmaceutickém výzkumu nachází uplatnění při stanovování cytotoxického působení nově syntetizovaných molekul a potencionálních léčiv. Principem metody je redukce tetrazoliové sloučeniny MTS životaschopnými buňkami na fialově zbarvený formazan, jehož množství je následně

možné spektrofotometricky kvantifikovat. (Aslantürk 2017) Tato redukce je znázorněna na obrázku 6.



Obr. 6 Schéma redukce MTS na formazan. Převzato z: www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.html (Anonym)

Činidlo obsahuje tetrazoliovou sloučeninu [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS] a elektronový akceptor fenazin ethosulfát (PES). MTS je záporně nabitá molekula, která velice špatně proniká přes buněčné membrány. Z tohoto důvodu se v činidle nachází společně s fenazin ethosulfátem (PES), který zde zvyšuje chemickou stabilitu roztoku obou látek a zároveň snadno proniká přes membrány živých buněk. Uvnitř buněk je PES redukován pomocí koenzymů NAD(P)H, produkovaných dehydrogenázami metabolicky aktivních buněk. Následně v redukované formě přechází přes buněčnou membránu zpět do média, kde redukuje MTS na fialový formazan rozpustný v buněčném médiu. Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk. Stanovení se provádí kolorimetrickým měřením absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 490 nm. (Riss et al. 2020, Anonym 2012)

4 CÍL PRÁCE

- Posoudit cytotoxické působení vývojových látek HES-4H, HE-8CHIN, HE-4PHOPH, HE-KARVA, HE-2NAFT, HE-CH2PY, HE-METRO, HES-nETH a HE-nME na lidské jaterní buňky linie HepG2.
- Porovnat zjištěné cytotoxické působení těchto látek s cytotoxicitou lékových standardů (cisplatina, tamoxifen).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Přístroje a pomůcky

- Laminární box Micrological safety cabinet TOP-SAVE 1,8 (Bioair instruments, Itálie)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS-1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Vodní lázeň TW 12 (Julabo, Německo)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)
- Mikrozkmavky Eppendorf 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Automatické jednonálové pipety Eppendorf Research ® plus 5 – 50 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Automatická multikanálová pipeta Discovery Comfort 50 – 300 µl (HTL, Polsko)
- Jednorázové plastové pipety 5 ml; 10 ml; 25 ml (Techno Plastic Products – TPP, Švýcarsko)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1 – 20 µl, 20 – 200 µl (Eppendorf, Německo)
- Kultivační lahve 25cm², 75cm² (TPP, Švýcarsko)
- Falkonky 15 ml; 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- Destičkový analyzátor TECAN (Infinite M200, Švýcarsko)

5.1.2 Chemikálie

- Fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline; PBS, pH = 7,4) – chemikálie: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ (PENTA, Česká republika)
- DMEM (Dulbeccovo a Eagolovo modifikované médium (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální hovězí sérum (Fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin 0,25% (Trypsin-EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (Sigma-Aldrich, USA)

- Neesenciální aminokyseliny (MEM Non-essential Amino Acid Solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- DMSO (dimethylsulfoxid pro molekulární biologii; > 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Cisplatina (Sigma-Aldrich, USA)
- Tamoxifen (sigma-Aldrich, USA)
- Testované látky (HES-4H, Hes-nETH, HE-nMe, HE-4PHOPH, HE-KARVA, HE-2NAFT, HE-METRO, HE-CH2PY, HE-8CHIN) (Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)

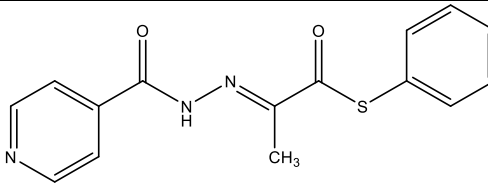
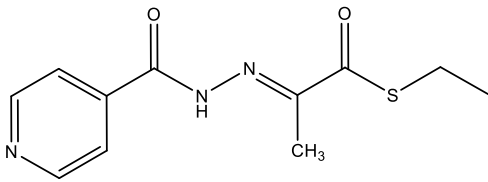
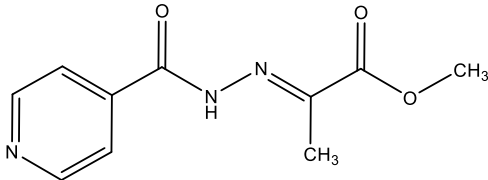
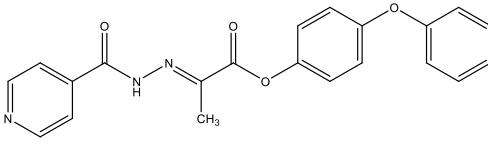
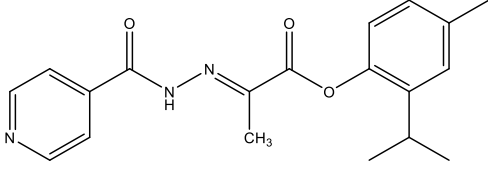
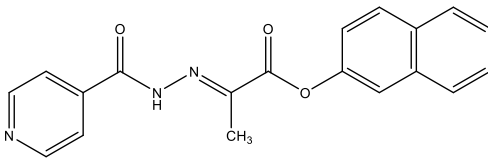
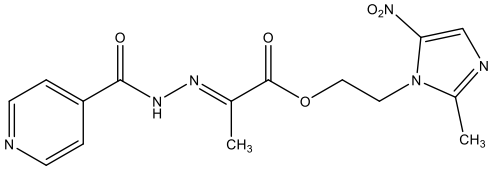
5.1.3 Buněčná linie HepG2

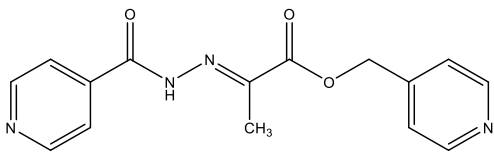
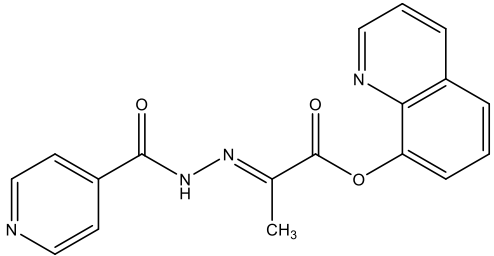
Pro pokus byly použity lidské jaterní buňky (Human hepatocellular liver carcinoma cell line, HepG2) od společnosti ATCC (American Type Culture Collection; USA). Buněčná linie (pasáž 8 – 12) byla kultivována v 75cm² kultivačních nádobách v DMEM buněčném médiu (Sigma-Aldrich, USA). Médium bylo obohaceno o 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, USA) a 10 % fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, USA).

5.1.4 Testované látky

K experimentu bylo použito devět nově syntetizovaných látek. Jejich chemické názvy a strukturní vzorce shrnuje Tab. 1. Látky byly připraveny Katedrou organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

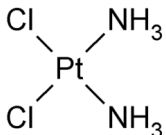
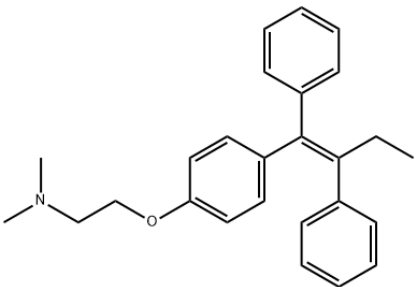
Tab. 1 Zkratka, chemický název a strukturní vzorec testovaných látek

Zkratka	Chemický název	Strukturní vzorec
HES-4H	<i>S</i> -fenyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanthioát	
HES-nETH	<i>S</i> -ethyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanthioát	
HE-nME	methyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	
HE-4PHOPH	4-fenoxyfenyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	
HE-KARVA	2-isopropyl-4-methylfenyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	
HE-2NAFT	naftalen-2-yl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	
HE-METRO	2-(2-methyl-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)ethyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	

HE-CH2PY	pyridin-4-ylmethyl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	
HE-8CHIN	chinolin-8-yl-(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	

Cytotoxicita vývojových látek byla porovnávána se dvěma lékovými standardy. Jejich přehled je uvedený v Tab. 2.

Tab. 2 Název a strukturní vzorec použitých standardů

Název látky	Chemický název	Strukturní vzorec
Cisplatina	diamindichlorplatina	
Tamoxifen	2-{4-[(1 <i>Z</i>)-1,2-difenylobut-1-en-1-yl]fenoxy}- <i>N,N</i> -dimethylethan-1-amin	

5.2 Experimentální procedury

5.2.1 Příprava fosfátového pufru (PBS)

Jednotlivé složky (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) jsme v potřebných množstvích navážili na analytických vahách a kvantitativně převedli do kádinky. V kádince jsme je za použití elektromagnetické míchačky rozpustili, doplnili destilovanou vodou na požadovaný objem a znovu zamíchali. Pro úpravu konečného pH pufru (pH = 7,4) jsme po malých částech přidávali hydroxid sodný (NaOH), pH bylo sledováno pomocí pH metru. Následně jsme roztok PBS vysterilizovali. Jednotlivé složky pufru jsou znázorněny v tabulce 3.

Tab. 3 Příprava 1 litru fosfátového pufru

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	7,16
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	177,99	3,12

5.2.2 Příprava roztoků testovaných látek

V experimentu jsme použili látky uvedené v tabulce 1. Jako standardy jsme použili cisplatinu a tamoxifen. Nejprve jsme připravili zásobní roztoky testovaných látek. Na analytických vahách jsme navážili potřebné množství testované látky a rozpustili. S ohledem na špatnou rozpustnost testovaných látek ve vodě byl pro usnadnění rozpouštění přidáván dimethylsulfoxid (DMSO). Ten je pro buňky ve vyšších koncentracích toxický, proto byl přidáván v maximální koncentraci 1 %. Ze zásobních roztoků jsme následně připravili devět roztoků různých koncentrací v koncentračním rozmezí 1–1000 μM. Roztoky standardů jsme připravili obdobným způsobem.

Jako negativní kontrolu jsme připravili buňky s 10 % roztokem DMSO v médiu, jako pozitivní kontrolu jsme použili samotné médium s buňkami.

5.2.3 Příprava buněčné linie pro pokus

Po rozmražení byla buněčná linie inkubována v kultivačních lahvích s velikostí kultivační plochy 75 cm² při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Veškerá následná manipulace s buňkami probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu.

Buňky byly každý týden pasážovány. Z kultivační lahve jsme sterilní pipetou odebrali staré kultivační médium a buňky jsme opláchli fosfátovým pufrům o fyziologickém pH 7,4. Následně jsme pufr odsáli a na dno kultivační lahve jsme nanесли roztok trypsinu tak, aby bylo pokryto celé dno kultivační lahve. Buňky jsme vrátili do inkubátoru, kde byly přibližně 2 minuty inkubovány při teplotě 37 °C v prostředí 5 % CO₂. Po uvolnění buněk ze dna kultivační lahve jsme působení trypsinu zastavili přidáním přibližně dvojnásobného množství buněčného média. Po 3-4 dnech od pasáže bylo buňkám médium vyměněno.

Pro pokus jsme buněčnou linii nasadili na 96jamkovou destičku v počtu 15 000 buněk/100 µl v jedné jamce destičky. Následně jsme buňky nechali inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí 5 % CO₂.

Počet buněk v buněčné suspenzi jsme stanovili počítáním za pomoci Bürkerovy komůrky a mikroskopu dle vzorce, kde:

$$x = \frac{N \cdot 10^4}{A}$$

x = počet buněk v 1 ml buněčné suspenze

N = počet buněk v 1 čtverci Bürkerovy komůrky

A = počet počítaných čtverců v Bürkerově komůrce

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

Pro každou z testovaných látek jsme cytotoxicitu stanovovali v devíti různých koncentracích. Z jamky jsme odsáli buněčné médium a napipetovali jsme 100 µl roztoku testované látky. Všechny koncentrace jsme na destičku nanášeli v triplicátu. Na všech destičkách byla zároveň v triplicátu měřena pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrolu tvořilo 100 µl samotného buněčného média, jako negativní kontrola bylo pipetováno 100 µl 10 % roztoku DMSO v médiu. Dále byla pro každou koncentraci

stanovena nebuněčná kontrola (destička bez nasazených buněk + 100 µl roztoku testované látky). Všechny destičky jsme následně inkubovali po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

Po 24 hodinách jsme přidali 20 µl činidla CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent. Destičky s činidlem jsme inkubovali po dobu 90 minut při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Absorbance jsme zjišťovali při vlnové délce $\lambda = 490$ pomocí destičkového analyzátoru TECAN.

5.2.5 Vyhodnocení experimentálních dat

Výsledné hodnoty absorbancí jednotlivých vzorků jsme zpracovávali v programech Microsoft Excel 2016 a GraphPad Prism 8.02.

V programu Microsoft Excel 2016 jsme naměřené hodnoty absorbance testovaných látek shodné koncentrace zprůměrovali a vypočetli jsme směrodatnou a relativní odchylku. Od průměru jsme odečetli nebuněčnou kontrolu (médium + buňky) a ze získaných hodnot jsme určili procenta viability buněk pro jednotlivé koncentrace testovaných látek. Viabilita byla vypočítána podle následujícího vzorce.

$$\% \text{ viability} = \frac{(Ab - Ak) * 100}{Av100 - Am}, \text{ kde:}$$

Ab = průměr hodnot absorbance triplikátů buněk stejné koncentrace testované látky,

Ak = průměr hodnot absorbance triplikátů buněk nebuněčných kontrol stejné koncentrace testované látky

Am = průměr hodnot absorbance triplikátů daného kultivačního média,

Av100 = průměr hodnot absorbance triplikátů kontroly 100 % viability. (Anonym 2012)

V programu GraphPad Prism 8.02 jsme ze získaných dat sestrojili inhibiční křivky a modelem nelineární regrese jsme určili pro každou testovanou látku hodnotu IC₅₀.

6 VÝSLEDKY

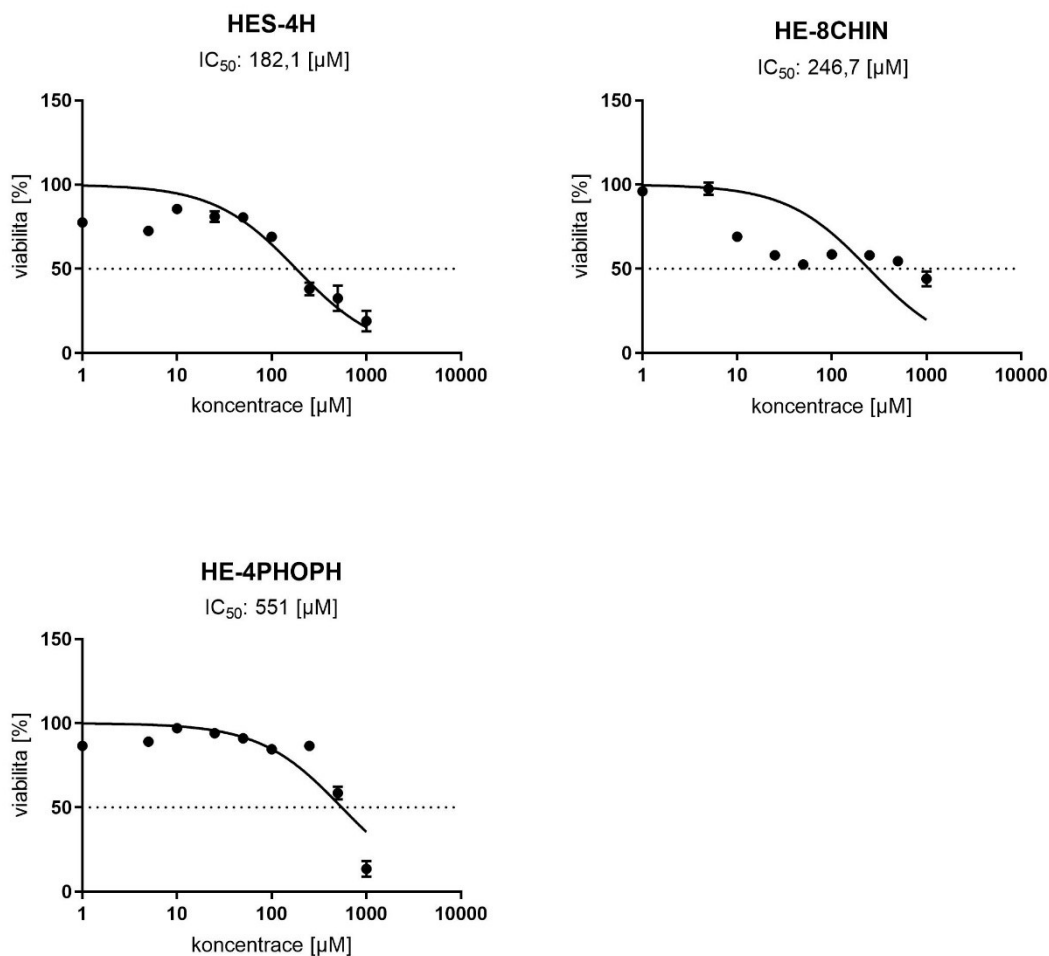
6.1 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

V tabulce č. 4 jsou uvedeny všechny testované vývojové látky společně se zjištěnými hodnotami IC_{50} . Parametr IC_{50} udává střední inhibiční koncentraci tedy koncentraci testované látky, při které dochází k inhibici růstu přesně poloviny buněčné populace. Dále jsou v tabulce uvedeny použité standardy včetně zjištěných hodnot IC_{50} .

Tab. 4 Hodnoty IC_{50} testovaných látek a standardů

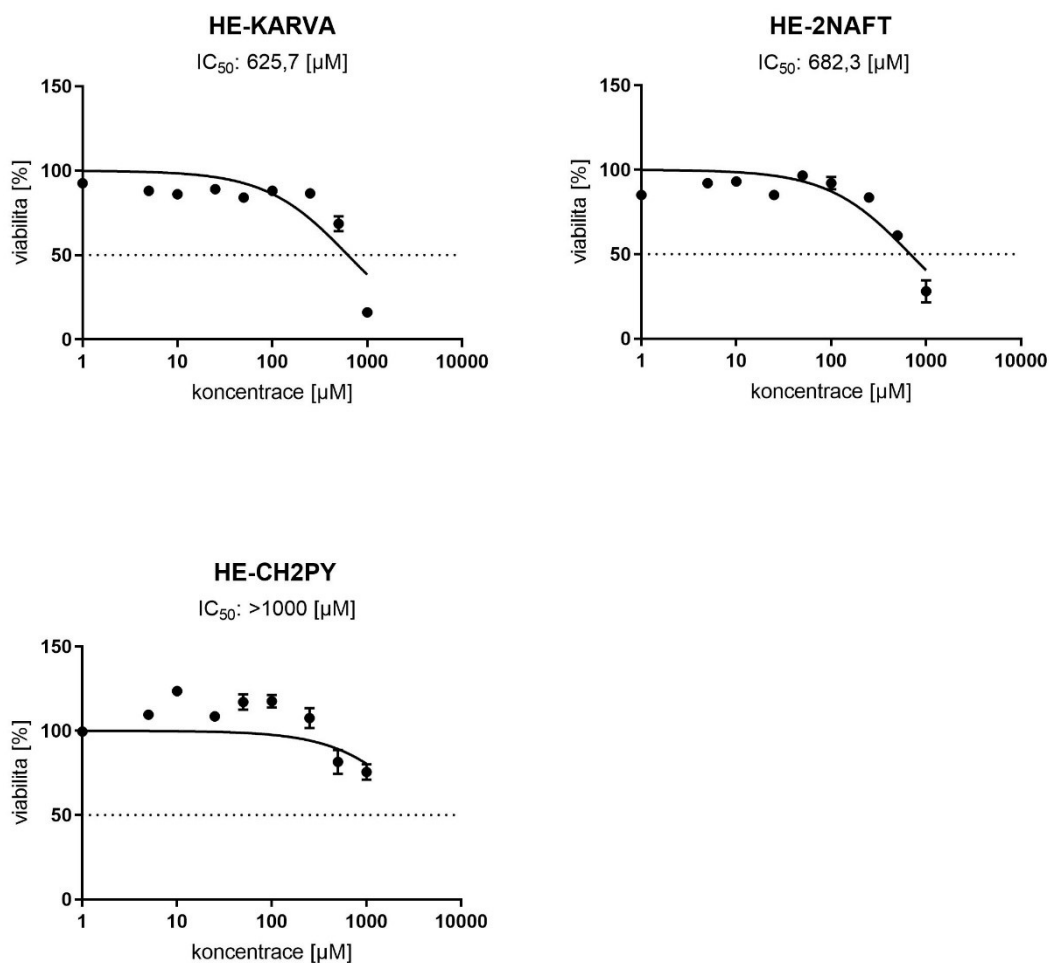
Název látky	Hodnota IC_{50} [μ M]
HES-4H	182,1 μ M
HE-8CHIN	246,7 μ M
HE-4PHOPH	551 μ M
HE-KARVA	625,7 μ M
HE-2NAFT	682,3 μ M
HE-CH2PY	>1000 μ M
HE-METRO	>1000 μ M
HES-nETH	>1000 μ M
HE-nMe	>1000 μ M
Cisplatina	283,5 μ M
Tamoxifen	19,56 μ M

Cytotoxický účinek námi testovaných látek je znázorněn na obrázcích 7-9. Obrázek 10 znázorňuje cytotoxický účinek standardů. Obecně se jedná o látky velmi málo toxické. Všechny vývojové testované látky mají $IC_{50} >100 \mu$ M. Při porovnání se standardy vykazují téměř výlučně nižší toxicitu.



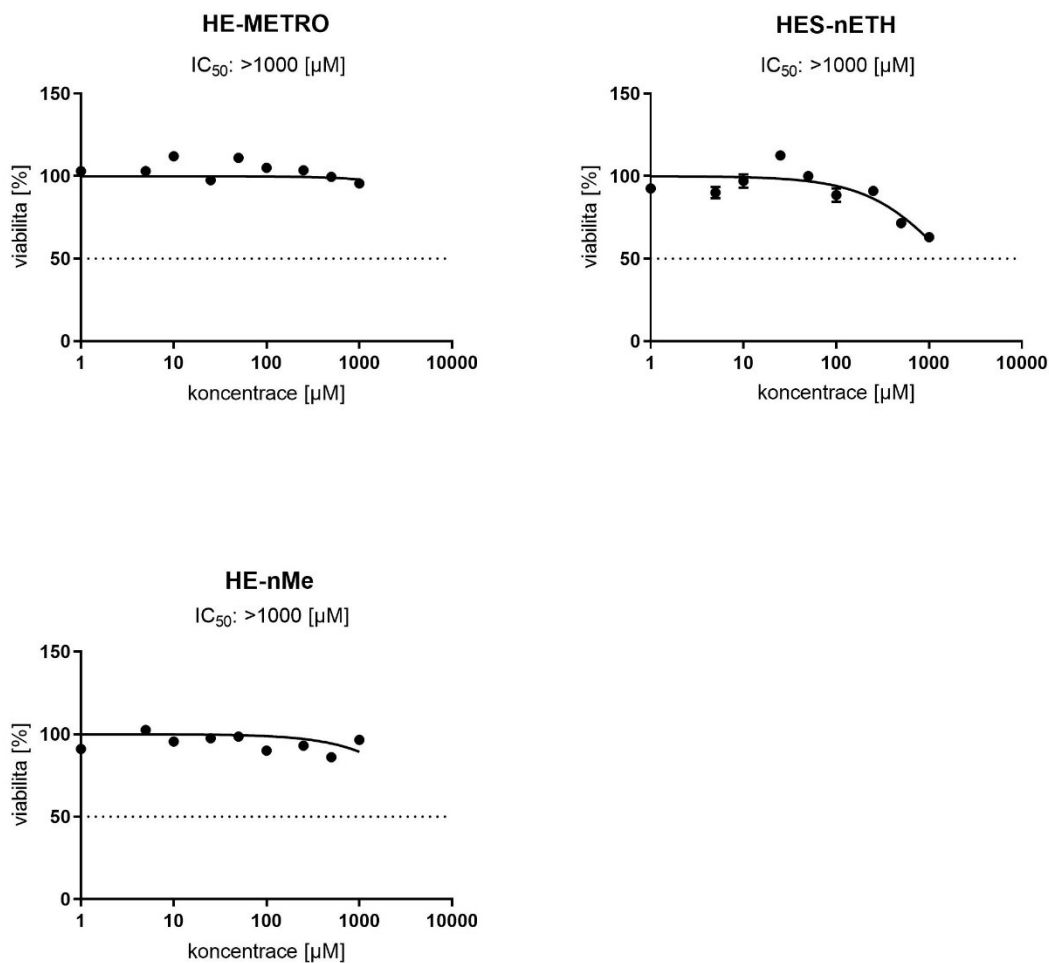
Obr. 7 Cytotoxické působení testovaných látek HES-4H, HE-8CHIN a HE-4PHOPH na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku č. 7 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci testovaných látek HES-4H, HE-8CHIN a HE-4PHOPH (1-1000 μM). Buňky byly s těmito látkami inkubovány po dobu 24 hodin. Z obrázku vyplývá, že toxicita látek vůči buňkám HepG2 klesá v pořadí HES-4H > HE-8CHIN > HE-4PHOPH. Dle výsledných hodnot IC₅₀ > 180 μM, lze tyto tři látky označit za málo toxické.



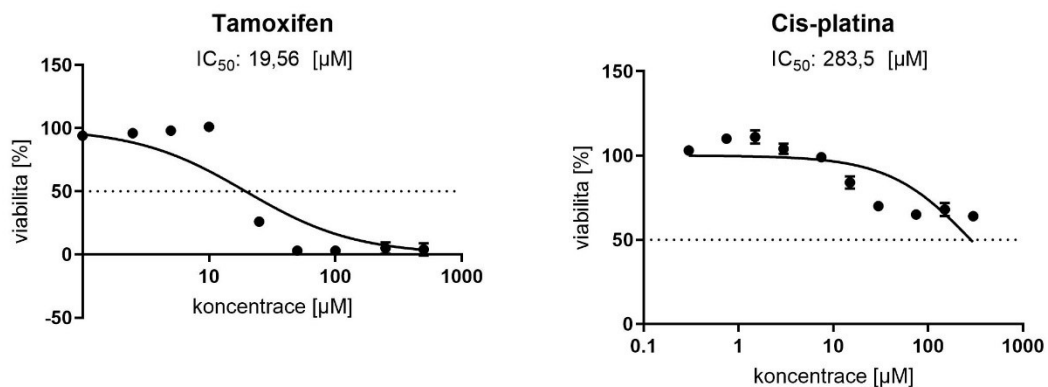
Obr. 8 Cytotoxické působení testovaných látek HE-KARVA, HE-2NAFT a HE-CH2PY na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku č. 8 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci testovaných látek HE-KARVA, HE-2NAFT a HE-CH2PY (1-1000 μM). Buňky byly s těmito látkami inkubovány 24 hodin. Z obrázku vyplývá, že toxicita látek vůči buňkám HepG2 klesá v pořadí HE-KARVA > HE-2NAFT > HE-CH2PY. Látky HE-KARVA (IC₅₀ 625,7 μM) a HE-2NAFT (IC₅₀ 682,3 μM) jsou velmi málo toxické. Hodnota IC₅₀ pro látku HE-CH2PY je vyšší než testované rozmezí koncentrací 1-1000 μM.



Obr. 9 Cytotoxické působení testovaných látek HES-METRO, HE-nETH a HE-nMe na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku č. 9 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci testovaných látek HES-METRO, HE-nETH a HE-nMe (1-1000 μM). Buňky byly s těmito látkami inkubovány 24 hodin. Hodnoty IC₅₀ pro všechny tyto látky jsou > 1000 μM. Společně s látkou HE-CH2PY se jedná o látky, které jsou v testovaných koncentracích pro buňky HepG2 netoxické.



Obr. 10 Cytotoxické působení standardů tamoxifenu a cisplatinu na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku č. 10 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci lékových standardů tamoxifenu a cisplatinu po 24 h inkubaci. Tamoxifen s hodnotou IC₅₀ 19,56 µM vykazuje vůči HepG2 buňkám relativně vysokou toxicitu. Cisplatina (IC₅₀ 283,5 µM) vykazuje nižší cytotoxický potenciál.

7 DISKUSE

Předmětem této diplomové práce bylo posoudit cytotoxické působení nově syntetizovaných derivátů izoniazidu na standardní buněčnou linii lidských hepatocytů. K porovnání cytotoxicity byl použit toxikologický parametr IC_{50} . Viabilita buněk byla hodnocena pomocí komerčně dostupné kolorimetrické metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Zjištěné hodnoty byly porovnávány se známými lékovými toxiny, cisplatinou a tamoxifenem.

In vitro testy patří mezi důležitou součást preklinického testování. Pomocí těchto testů je možné získat základní informace o biologickém účinku a potencionální toxicitě nově syntetizovaných molekul ještě před zahájením *in vivo* testování na zvířecích modelech či lidských dobrovolnících. (Eske 2020) V této diplomové práci byla testována *in vitro* cytotoxicita devíti nově syntetizovaných molekul. Jedná se o thioestery (HES-4H, Hes-nETH) a estery (HE-nMe, HE-4PHOPH, HE-KARVA, HE-2NAFT, HE-METRO, HE-CH2PY, HE-8CHIN) antituberkulotika izoniazidu. Stejně jako u INH i u těchto vývojových látek byla prokázána antimykobakteriální aktivita. Působí inhibiči enzymu InhA a interferují s biosyntézou buněčné stěny mykobakterií.

Nejdůležitějším orgánem metabolismu léčiv a jiných xenobiotik jsou játra. Většina léčiv používaných standardně v první linii léčby TBC, zejména izoniazid, rifampicin a pyrazinamid, vykazuje určité hepatotoxické působení. Přesný mechanismus toxického účinku INH na jaterní buňky není znám. Předpokládá se, že pro tkáň jsou toxické volné radikály generované monoacetylhydrazinem (MAH), který vzniká během metabolismu izoniazidu. (Saukonnen et al. 2006) Všechny vývojové látky testované v této práci jsou deriváty INH. Je tedy možné předpokládat, že i testované deriváty INH budou mít jistý hepatotoxický potenciál.

Jako buněčný model pro sledování cytotoxického působení byla vybrána standardní buněčná linie lidských hepatocytů (HepG2). K sledování viability (tj. životnosti) buněk byla použita kolorimetrická metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Metoda je založena na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat tetrazoliovou sůl MTS na barevný formazanový produkt. Platí, že více metabolicky aktivní buňky poskytují intenzivněji zbarvené formazanové produkty. Látky byly testovány v širokém terapeutickém rozmezí (1–1000 μ M), každá

byla stanovena v triplicátu. S ohledem na omezenou rozpustnost testovaných látek ve vodě byl během přípravy testovaných roztoků přidáván DMSO. DMSO zlepšil rozpustnost testovaných látek, zároveň se však jedná o látku, která je pro buňky ve větších koncentracích toxická. (Amin et al. 2009) Během pokusu byl tedy přidáván v maximální koncentraci 1 %.

K posouzení a porovnání cytotoxického působení testovaných vývojových látek a lékových standardů byl použit toxikologický parametr IC_{50} . Hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} určuje koncentraci, při které dochází k přesně 50% snížení životnosti buněk v buněčné populaci. Pro terapeuticky využívaná antituberkulotika se hodnoty IC_{50} pro buňky HepG2 pohybují 3,75 μ M pro pyrazinamid, 6,26 μ M pro izoniazid a 19,57 μ M pro ethionamid. (Šimková 2012)

Ze zjištěných hodnot IC_{50} testovaných vývojových látek vyplývá, že cytotoxické působení na jaterní buňky klesá v pořadí HES-4H > HE-8CHIN > HE-4PHOPH > HE-KARVA > HE-2NAFT > HE-CH2PY \approx HE-METRO \approx HE-nETH \approx HE-nMe. Nejméně toxickými látkami se ukázaly látky HE-CH2PY, HE-METRO, HE-nETH, HE-nMe. U těchto látek se v námi použitém koncentračním rozmezí (1–1000 μ M) neprojevil na použité jaterní linii žádný hepatotoxický účinek. Pro případné zjištění hodnot IC_{50} by bylo třeba testovat tyto látky v koncentracích >1000 μ M. Nejvíce toxickou sloučeninou je látka HES-4H s hodnotou IC_{50} 182,1 μ M.

Všechny námi testované látky vykazují vyšší hodnoty IC_{50} , a tedy nižší toxicitu pro zvolenou buněčnou linii než INH. Tamoxifen, který byl použit jako negativní kontrola a u kterého bylo prokázáno, že inhibuje proliferaci a působí apoptózu buněk HepG2, má hodnotu IC_{50} 19,56 μ M. Vykazuje tedy výrazně vyšší toxicitu než vývojové látky testované v této práci. Cisplatina s IC_{50} 283,5 μ M, která byla použita pro své zejména nefrotoxické působení jako negativní standard, vykazuje při působení na buněčnou linii HepG2 vyšší toxicitu než námi testované sloučeniny, s výjimkou látek HES-4H (IC_{50} 182,1 μ M) a HE-8CHIN (IC_{50} 246,7 μ M).

Z výsledků měření vyplývá, že všechny testované látky vykazují poměrně nízké cytotoxické působení na zvolenou buněčnou linii. Sloučeniny HE-CH2PY, HE-METRO, HE-nETH, HE-nMe se z hlediska jaterní toxicity jeví jako perspektivní sloučeniny pro další vývoj, jelikož v tomto experimentu nevykazovali žádné toxické působení.

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit cytotoxické působení devíti nově syntetizovaných látek s antimykobakteriálními účinky odvozených od antituberkulotika izoniazidu. Testování bylo prováděno *in vitro* na HepG2 buněčné linii reprezentující lidskou jaterní tkáň. Pro stanovení buněčné viability byla využita kolorimetrická metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Cytotoxicita vývojových látek byla na základě toxikologického parametru IC_{50} porovnávána s cytotoxickým působením cisplatinu a tamoxifenu.

Cytotoxicita testovaných látek klesá v pořadí HES-4H > HE-8CHIN > HE-4PHOPH > HE-KARVA > HE-2NAFT > HE-CH2PY \approx HE-METRO \approx HE-nETH \approx HE-nMe. Všechny testované látky vykazovaly menší cytotoxické působení na buňky linie HepG2 než izoniazid. Mimo látek HES-4H a HE-8CHIN, které jsou toxičtější než cisplatinu, vykazují nižší cytotoxické působení než použité standardy, cisplatinu a tamoxifen. Nejvíce toxickou se ukázala látka HES-4H s hodnotou IC_{50} 182,1 μ M. Sloučeniny HE-CH2PY, HE-METRO, HE-nETH, HE-nMe nebyly v testovaných koncentracích pro buňky toxické.

9 LITERATURA

1. Amin et al. Rapid screening of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth using tetrazolium salts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J.) 2009; 465:187-201. doi: 10.1007/978-1-59745-207-6_12
2. Amin Z. Clinical tuberculosis problems and management. *Acta Med Indonesia*, 2006; 38(2): 109-16.
3. Cozza G. The Development of CK2 Inhibitors: From Traditional Pharmacology to in Silico Rational Drug Design. *Pharmaceuticals* (Basel). 2017; 10(1): 26. doi: 10.3390/ph10010026.
4. Crona et al. A systematic Review of strategies to prevent Cisplatin_Induced Nephrotoxicity. *The Oncologist*. 2017; 22(5): 609-619. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0319
5. Dasari et al. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 740: 364-378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
6. du Toit et al. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respiratory Research*, 2006; 7(1): 118. doi: 10.1186/1465-9921-7-118.
7. Ernst JD. Mechanisms of *M. tuberculosis* Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host & Microbe*. 2018; 24(1): 34-42. doi: 10.1016/j.chom.2018.06.004
8. Gerets HH et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 2012; 28(2): 69-87. doi: 10.1007/s10565-011-9208-4.

9. Ginouves et al. Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. 52(6): 2131-8. doi: 10.1128/JCM.00201-14
10. Hansten PD. The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2018; 43(5): 495-508. doi: 10.1007/s13318-018-0475-9
11. Homolka, J. Tuberkulóza. 5., upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3476-0. 77 stran.
12. Huang et al. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *Biotechniques*. 2004. 37(3) :406, 408, 410-2. doi: 10.2144/04373ST05
13. Hughes et al. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 162(6): 1239-1249. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
14. Hung et al. Computational Approaches for Drug Discovery. *Drug Dev. Res*. 2014; 75: 412-418. doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.21222>
15. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1-5. doi:10.4161/spmg.19885
16. Khosrow-Khavar et al. Cardiotoxicity of aromatase inhibitors and tamoxifen in postmenopausal women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017; 28(3): 487-496. doi: 10.1093/annonc/mdw673
17. Kočárek et al. *Klinická cytogenetika I: Úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. upravené vydání. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7. 134 stran

18. Kuchař M. Výzkum a vývoj léčiv: studijní program: syntéza a výroba léčiv. Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7. 168 stran.
19. Le Tourneau et al. Dose escalation methods in phase I cancer clinical trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009; 101(10): 708-720. doi: 10.1093/jnci/djp079
20. Martínková, J. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4.
21. Nazarali et al. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2014; 6: 29-36. doi: 10.2147/BCTT.S43763
22. Parasuraman S. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011; 2(2): 74-79. doi: 10.4103/0976-500X.81895
23. Patel et al. A multiparametric organ toxicity predictor for drug discovery. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2020; 30(3): 159-166. doi: 10.1080/15376516.2019.1681044
24. Roy et al. Tamoxifen and fulvestrant induced steatohepatitis with cirrhosis: A rare case report. *South Asian Journal of Cancer*. 2019; 8(4): 225. doi: 10.4103/sajc.sajc_132_19
25. Sable SB et al. Tuberculosis Vaccine Development: Progress in Clinical Evaluation. *Clinical microbiology reviews*. 2019; 33(1): e00100-19. doi: 10.1128/CMR.00100-19
26. Sanaei et al. Effects of Genistein and Synergistic Action in Combination with Tamoxifen on the HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2017; 18(9): 2381-2385. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.9.2381

27. Saukkonen et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 174(8): 935-52. doi: 10.1164/rccm.200510-1666ST.
28. Schulz C et al. NADPH-cytochrome P450 reductase expression and enzymatic activity in primary-like human hepatocytes and HepG2 cells for *in vitro* biotransformation studies. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2019; 73(1): 249-260. doi: 10.3233/CH-199226.
29. Sia et al. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *Microbiology Spectrum*, 2019; 7(4). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018
30. Sliwoski et al. Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*. 2014; 66(1): 334-395. doi: 10.1124/pr.112.007336
31. Součková et al. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*, 2015; 11(4): 144–147
32. Stagg, H R et al. “Isoniazid-resistant tuberculosis: a cause for concern?.” *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2017; 21(2): 129-139. doi: 10.5588/ijtld.16.0716
33. Starobová et al. Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Brno, Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, 2006. 44 stran. ISSN 1801-6103.
34. Strašík et al. Klinické hodnocení léčiv z pohledu farmaceuta. *Praktické lékařství*. 2014; 10(5): 193–197
35. Šebek, J. Buněčné kultury v medicíně. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-380-7. 144 stran
36. Šimková, K. Studium toxicity xenobiotik *in vitro*. Diplomová práce. 2012. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova.

37. Švihovec et al. Farmakologie. Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8. 956 stran.
38. Taylor D. The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development, Pharmaceuticals in the Environment, 2016. 1-33. doi: 10.1039/9781782622345-00001.
39. Umscheid et al. Key concepts of clinical trials: a narrative review. Postgraduate Medicine. 2011; 123(5): 194-204. doi: 10.3810/pgm.2011.09.2475
40. Vejražka, M. Buněčné kultury. Bioprojekty. Praha: 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy. 2008: 1-16.
41. Veselovsky et al. Strategy of computer-aided drug design. Current Drug Targets Infectious Disorders, 2003; 3(1): 33-40. doi: 10.2174/1568005033342145.
42. Vilchèze et al. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. Microbiology Spectrum. 2014; 2(4): MGM2-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013
43. Wilkening S et al. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2003; 31(8): 1035-42. doi: 10.1124/dmd.31.8.1035.
44. Yu et al. Computer-Aided Drug Design Methods. Methods in Molecular Biology. 2017; 1520: 85-106. doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_5

Elektronické zdroje

1. Anonym. Cell Culture Basics Handbook. In: Thermo Fisher Scientific 2016. Dostupné na URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>. Datum přístupu: 15. 12. 2020
2. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. In: Promega. 2012. Dostupné na URL: https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582#protocols. Datum přístupu: 20. 12. 2020
3. Anonym. Cisplatina. In: Pharmacopeia.cn. Dostupné na URL: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m17910.html Datum přístupu: 19. 12. 2020
4. Anonym. Comparison of Different Methods to Measure Cell Viability. In: Creative Bioarray. Dostupné na URL: <https://www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm>. Datum přístupu: 7. 5. 2021
5. Anonym. Isoniazid. In: ChemicalBook.com. Dostupné na URL: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/54-85-3.gif> Datum přístupu: 19. 12. 2020
6. Anonym. Klinické hodnocení léků. In: SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2010. Dostupné na URL: <http://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>. Datum přístupu: 19. 12. 2020
7. Anonym. Tamoxifen. In: ChemicalBook.com. Dostupné na URL: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/10540-29-1.gif> Datum přístupu: 19. 12. 2020

8. Anonym. Tuberculosis. In: WHO: World Health Organization. 2020a. Dostupné na URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>. Datum přístupu: 15. 12. 2020
9. Anonym. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2019. In: ÚZIS: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2020b Dostupné na URL: <https://www.uzis.cz/res/f/008314/tbc2019-cz.pdf>. Datum přístupu: 15. 12. 2020
10. Aslantürk Özlem Sultan. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: intechopen.com. 2017. Dostupné na URL: <https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>. Datum přístupu: 19. 3. 2021
11. Bácskay et al. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. In: intechopen.com. 2017. Dostupné na URL: <https://www.intechopen.com/books/cytotoxicity/role-of-cytotoxicity-experiments-in-pharmaceutical-development>. Datum přístupu: 19. 3. 2021
12. Eske, 2020 *In vivo* vs. *in vitro*: What is the difference?. Medical and health information. In: medicalnewstoday.com. Dostupné na URL: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/in-vivo-vs-in-vitro>. Datum přístupu: 8. 4. 2021
13. Gillespie et al. Antimycobacterial Drugs. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2011. Dostupné na URL: <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0002001.pub2] Datum přístupu: 19. 12. 2020
14. Meenakshi, A. Cell Culture Media. In: Labome. 2013. Dostupné na: <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>. Datum přístupu: 19. 12. 2020. doi: //dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175.

15. O'Connor et al. Isoniazid. In: StatPearls. 2020. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557617/>. Datum přístupu: 15. 12. 2020
16. Riss et al. Cell Viability Assays. In: National Center for Biotechnology Information. Last Updated 2016. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>. Datum přístupu: 20. 12. 2020
17. Souhrn charakteristických vlastností léku Cisplatina Ebewe. In: SÚKL. Datum revize textu: 16. 10. 2019. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0189992&tab=texts>
Datum přístupu: 20. 3. 2021
18. Souhrn charakteristických vlastností léku Nidrazid. In: SÚKL. Datum revize textu: 11. 3. 2019. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0003303&tab=texts>
Datum přístupu: 20. 3. 2021
19. Souhrn charakteristických vlastností léku Tamoxifen Ebewe. In: SÚKL. Datum revize textu: 27. 6. 2018. Dostupné na URL: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0058702&tab=texts>
Datum přístupu: 20. 3. 2021