

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**TESTOVANIE VPLYVU NOVO NASYNTETIZOVANÝCH LÁTKOK NA  
VIABILITU BUNIEK *IN VITRO***

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Dominika Šebová

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k dosiahnutiu rovnakého alebo iného titulu.

V Hradci Králové

Dominika Šebová

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce PharmDr. Lucii Smutnej, Ph.D. a doktorandke Mgr. Anete Hornovej za odborné vedenie, metodickú pomoc a cenné rady pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Dominika Šebová

Školiteľ: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Testovanie vplyvu novo nasynthesizedovaných látok na viabilitu buniek *in vitro*

Výskum a vývoj nových substancií zamýšľaných k terapeutickému použitiu je náročný a dlhotrvajúci proces. Neodmysliteľnou súčasťou tohto procesu za účelom zaistenia bezpečnosti, účinnosti a kvality nového liečiva sú preklinické a neskôr aj klinické hodnotenie liečiv.

Táto práca je zameraná na štúdie cytotoxicity, ktoré sú nevyhnutnou súčasťou preklinického hodnotenia liečiv. Vplyv potencionálnych liečiv bol testovaný na bunkovom modeli *in vitro*. Boli použité bunky bunkovej línie HepG2, odvodenej od dobre diferencovaného hepatocelulárneho karcinómu. Sledovaným parametrom bola viabilita, teda životaschopnosť buniek. Počas experimentu sa testovalo 9 látok o 9 rôznych koncentráciách v koncentračnom rozmedzí 1-1000  $\mu\text{M}$ . Testované boli látky s antimykobakteriálnym pôsobením, ktorých základná chemická štruktúra bola odvodená od antituberkulotika isoniazidu. Sledovaná bola viabilita buniek po 24 a 48-hodinovom pôsobení jednotlivých látok na HepG2 bunky. Viabilita buniek bola stanovená pomocou kolorimetrického MTS testu, pri ktorom dochádza k redukcii činidla na farebný produkt formazan len v životaschopných bunkách.

Výsledky experimentu sú znázornené graficky ako závislosť percenta viability buniek bunkovej línie HepG2 na koncentrácii testovanej látky. Výpočtom boli získané taktiež hodnoty stredných inhibičných koncentrácií  $\text{IC}_{50}$  pre jednotlivé skúmané látky.

Z výsledkov vyplýva, že látka HE-4H je prakticky netoxická, ostatné látky boli toxické až vo vysokých koncentráciách, radovo niekoľko stovkách až tisíckach  $\mu\text{M}$ , v závislosti na testovanej látke.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Dominika Šebová

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Testing of influence of newly synthesized compounds on viability of cells *in vitro*

Research and development of new substances intended for therapeutic use is very difficult and time consuming process. Preclinical and clinical studies are essential part of this process in order to ensure safety, efficacy and quality of a new drug.

This thesis is focused on cytotoxicity studies, that form important part of preclinical studies of a new substance. An effect of potential drugs was tested *in vitro* on a cellular model. Cells of the HepG2 cell line, derived from well-differentiated hepatocellular carcinoma, were used in our experiment. The monitored parameter was cell viability. During the experiment, 9 substances with 9 different concentrations in concentration range 1-1000  $\mu\text{M}$  were tested. Substances, that were tested had antimycobacterial effect and their basic chemical structure was derived from the antituberculous drug isoniazide. Cell viability was monitored after 24 and 48 hours of incubation of individual substance with HepG2 cells. Cell viability was determined by using colorimetric MTS assay, in which the reagent is reduced on coloured product formazan only in viable cells.

The results of the experiment are shown on graphs as a dependence of the percentage of cell viability of the HepG2 cell line on the concentration of tested substance. The half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ , was calculated for all tested substances.

The results show that the substance HE-4H is practically non-toxic, other substances had cytotoxic effect only in high concentrations, in the order of magnitude of several hundreds to thousands  $\mu\text{M}$ , depending on the tested substance.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ZOZNAM SKRATIEK.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>10</b>
3.1	BUNKOVÁ SMRŤ .....	10
3.1.1	<i>Apoptóza</i> .....	10
3.1.2	<i>Kaspázy</i> .....	11
3.1.3	<i>Vonkajšia a vnútorná cesta aktivácie apoptózy</i> .....	12
3.1.4	<i>Nekróza</i> .....	14
3.2	VÝVOJ LIEČIV .....	15
3.3	PREKLINICKÁ FÁZA HODNOTENIA LIEČIV .....	16
3.4	ŠTÚDIE TOXICITY .....	17
3.4.1	<i>Akútna toxicita</i> .....	18
3.4.2	<i>Chronická toxicita</i> .....	18
3.4.3	<i>Ďalšie testy toxicity</i> .....	18
3.5	KLINICKÉ HODNOTENIE LIEČIV .....	19
3.6	PREKLINICKÉ A KLINICKÉ ŠTÚDIE GENERICKÝCH LIEKOV.....	22
3.7	<i>IN VITRO</i> TESTY VIABILITY A CYTOTOXICITY .....	22
3.8	ANTIMYKOBAKTERIÁLNE PÔSOBIACE LÁTKY .....	23
3.9	TESTOVANÉ LÁTKY .....	25
<b>4</b>	<b>CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>29</b>
5.1	MATERIÁL.....	29
5.2	CHEMIKÁLIE.....	29
5.3	PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE .....	30
5.4	BUNKOVÝ MODEL .....	30
5.5	METODIKA .....	31
5.5.1	<i>CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS)</i> .....	31
5.5.2	<i>Kultivácia buniek</i> .....	32
5.5.3	<i>Pasážovanie buniek</i> .....	32
5.5.4	<i>Nasadenie buniek na doštičku</i> .....	33
5.5.5	<i>Priprava roztokov testovaných látok</i> .....	33
5.5.6	<i>Štúdium cytotoxicity</i> .....	35
5.5.7	<i>Vyhodnotenie experimentu</i> .....	35
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>37</b>
6.1	LÁTKA HE-4H .....	38
6.2	LÁTKA HE-4Me.....	39
6.3	LÁTKA HE-4OMe.....	40
6.4	LÁTKA HE-4F .....	41
6.5	LÁTKA HE-4Cl .....	42
6.6	LÁTKA HE-Br .....	43
6.7	LÁTKA HE-IRGAS .....	44
6.8	LÁTKA HE-THYM.....	45
6.9	LÁTKA HE-1NAFT .....	46
<b>7</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>50</b>

9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	51
---	----------------------------------	----

## 1 Zoznam skratiek

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>AUC</b>	„Area under the curve“
<b>CYP</b>	cytochróm P450
<b>DMEM</b>	„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>FBS</b>	fetálne bovinné sérum
<b>GCP</b>	„Good clinical practice“
<b>GLP</b>	„Good laboratory practice“
<b>IC<sub>50</sub></b>	stredná inhibičná koncentrácia
<b>KHL</b>	klinické hodnotenie liečiv
<b>LI</b>	liekové interakcie
<b>MTD</b>	„Maximum tolerated dose“
<b>MTS</b>	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>NÚ</b>	nežiadúce účinky
<b>PMS</b>	fenazín metosulfát
<b>PBS</b>	„Phosphate-Buffered Saline“
<b>SÚKL</b>	Státní Ústav pro kontrolu léčiv



## 2 Úvod

Výskum a vývoj nových liečiv je stále sa rozvíjajúci proces. V minulosti spočíval prevažne v pozorovaní účinku extraktov z rôznych rastlín, prípadne jednoduchých chemických látok na živý organizmus. Dnes je skôr zameraný na rozsiahly screening veľkého množstva látok, pričom sa sleduje ich schopnosť interagovať so špecifickým molekulovým cieľom, či schopnosť vyvolať špecifickú bunkovú odpoveď. Rozlišujeme viacero prístupov vo výskume a vývoji nových substancií. Medzi prístupy vedúce k vývoju nových potencionálnych liečiv patrí napríklad chemická obmena známych molekúl vedúca k vzniku me-too analógov, nové použitie už známej látky či obmena štruktúry látok prírodného pôvodu, ale aj vývoj na základe poznatkov o mechanizme účinku či prípadne štruktúre cieľového receptora (Goodman a kol., 2011, Katzung a kol. 2012).

Po ukončení základného výskumu, ktorý nám poskytuje látky potencionálne vhodné pre ďalší výskum, nasleduje fáza preklinického a neskôr klinického hodnotenia liečiv. Preklinické a klinické štúdie sú nevyhnutné pre zaistenie základných požiadaviek na liečivo, ktorými sú bezpečnosť, účinnosť a kvalita. Súčasťou preklinického hodnotenia sú aj testy cytotoxicity. Cieľom toxikologických štúdií je identifikovať potenciálnu toxicitu látky na ľudský organizmus a taktiež predpovedať riziko pred prvým podaním substancie človeku. Testy cytotoxicity sú základnými testami pre stanovenie bezpečnostného profilu látky, prebiehajú *in vitro* na izolovaných bunkách resp. bunkových modeloch, pričom sa sleduje rast buniek, prípadne ich morfológické zmeny. Testy cytotoxicity predchádzajú testom *in vivo*, ktoré prebiehajú na zvieracích modeloch v rámci preklinického hodnotenia liečiv (Součková, 2015, Rang, Dale, 2012, Katzung a kol., 2012).

Výskum a vývoj nových liečiv je dôležitý nielen z hľadiska hľadania novej terapie zatiaľ neliečiteľných ochorení, ale je taktiež potrebný pre hľadanie nových možností v terapii ochorení, pri ktorých vzniká rezistencia na už známe a používané liečivá.

Takýmto ochorením je aj tuberkulóza, ktorá patrí celosvetovo medzi pomerne časté infekčné choroby. Veľkým problémom z hľadiska terapie mykobakteriálnych infekcií je práve rozvoj rezistencie mykobaktérií voči dostupným liečivám, ktorý vedie k stúpajúcim počtom mykobakteriálnych infekcií. Rezistencia mykobaktérií ale aj toxicita používaných liečiv je podnetom pre výskum a vývoj nových látok s antimykobakteriálnym pôsobením ako aj pre vypracovanie nových protokolov pre liečbu pacientov súčasne dostupnými liečivami (Tomioka a kol., 2006).

## 3 Teoretická časť

### 3.1 Bunková smrť

Bunková smrť je nevratný proces, charakterizovaný zástavou funkcie jednotlivých organel, dochádza taktiež k ukončeniu riadených biochemických procesov a v neposlednom rade k rozpadu bunky (Kittnar a kol., 2011).

Tento dej prebieha dvoma hlavnými cestami, a to apoptózou a nekrózou.

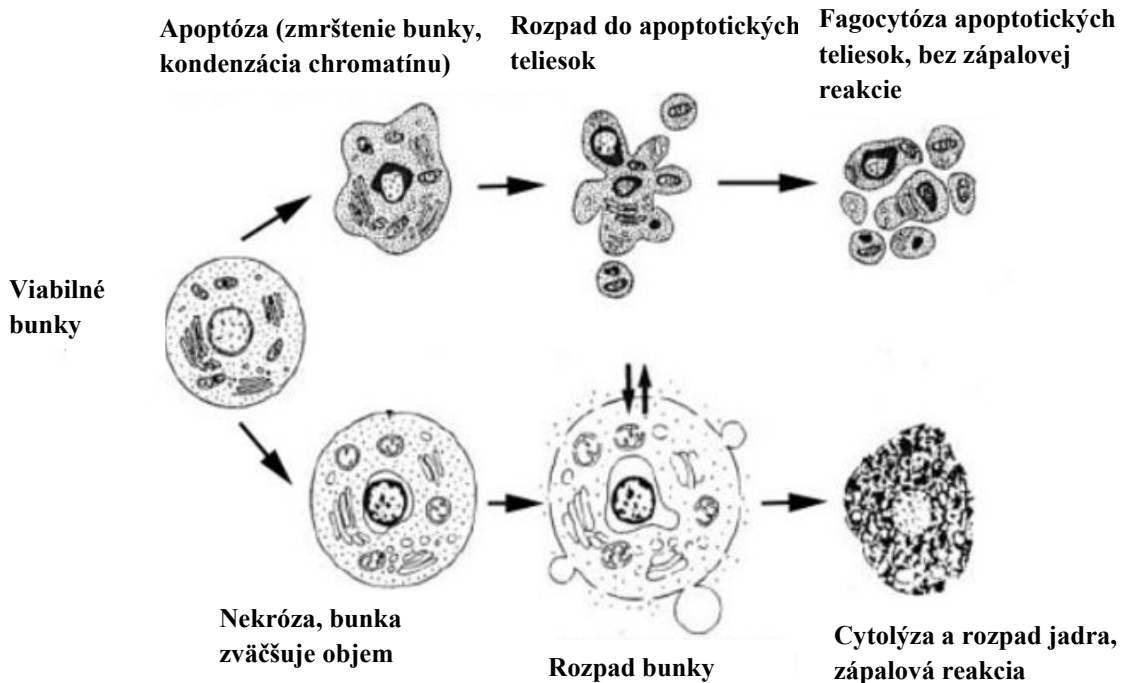
#### 3.1.1 Apoptóza

Apoptóza, nazývaná tiež programovaná bunková smrť alebo bunková samovražda, je nevyhnutnou súčasťou života bunky. Je to dôležitý proces, ktorý zabezpečuje reguláciu počtu buniek behom vývoja, elimináciu abnormálnych, nebezpečných a nefunkčných alebo poškodených buniek. Uplatňuje sa napríklad pri formovaní prstov behom embryonálneho vývoja či odstraňovaní nefunkčných buniek nervového systému. Apoptózu môžeme pozorovať taktiež pri chemickom a mikrobiologickom poškodení rôznych orgánových systémov. Jedná sa o dej fyziologický, ktorý sa vyskytuje behom vývoja organizmu, ale aj v dospelosti a vystupuje ako mechanizmus udržania homeostázy organizmu (Elmore, 2007, Tower, 2015, Kinloch et al., 1999).

Narušená apoptóza hrá rolu v patofyziológii viacerých chorôb, ako sú napríklad neurodegeneratívne ochorenia (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), osteoartróza, nádorové ochorenia, autoimunitné ochorenia a mnohé ďalšie patologické stavy (Rang, Dale, 2012).

Pri apoptóze dochádza k štrukturálnym zmenám, prvé zmeny sa objavujú na bunkovom jadre, kde dochádza ku kondenzácii jadrového chromatinu. Dochádza taktiež k zmršteniu bunky, charakteristické je zmenšenie bunky až o 30 %. Bunky nadobúdajú sférický tvar s hladkým povrchom, pričom plazmatická membrána zostáva intaktná, môže sa taktiež vyskytovať zväčšené endoplazmatické retikulum a kondenzácia mitochondrií. Nakoniec nastáva rozpad bunky do apoptotických teliesok rôznej veľkosti, vid'. Obr. 1. Apoptotické telieska sú následne odstraňované fagocytózou makrofágmi. Na rozdiel od nekrózy nedochádza k vyliatiu obsahu bunky do medzibunkového priestoru a následne k rozvoju zápalu. Rozsah apoptózy je častokrát obtiažné odhadnúť kvôli rýchlemu pohlteniu apoptotických teliesok a ich fragmentov fagocytmi. Biochemickým znakom apoptózy je

strata mitochondriálneho membránového potenciálu, čo sa môže využívať aj v rôznych testoch na detekciu (Sládek, 2007, Trump a kol., 1997, Elmore, 2007, Kerr a kol., 1972, Wyllie et al., 1980).



**Obr. 1** Hlavné znaky procesu apoptózy a nekrózy.  
Prevzaté z: Gewies (2003)

### 3.1.2 Kaspázy

Každá bunka je naprogramovaná pre bunkovú smrť v prípade nedostatku ATP či narušenia plazmatickej membrány. Programovaná bunková smrť je realizovaná prostredníctvom intracelulárnej proteolytickej kaskády. Kľúčovými enzýmami sú proteázy (t.j. enzýmy, ktoré štiepia proteíny) s cysteínom v aktívnom mieste, nazývané kaspázy. Kaspázy sú v bunke syntetizované vo forme zymogénov, teda neaktívnych prekursorov enzýmov, ktoré sú následne čiastočnou proteolýzou vyvolanou špecifickými aktivačnými faktormi aktivované na funkčné enzýmy (Fink, 2005).

Kaspázy sú zložené z jednej N-koncovej prodomény a taktiež jednej veľkej a malej podjednotky, pričom prodoména je obvykle odstránená pri premene zymogénu na aktívny enzým. Aktivované kaspázy sú tetraméry, ktoré obsahujú dve indentické veľké podjednotky a taktiež dve identické malé podjednotky. Rozlišujeme dve základné skupiny kaspáz-kaspázy, ktoré sa účastnia procesu apoptózy a kaspázy, ktoré hrajú rolu v zápalovej reakcii.

Medzi zápalové kaspázy patrí kaspáza-1, -4, -5, -12 u človeka a kaspáza-1, -11, -12 u myši. Apoptotické kaspázy sú kaspáza-3, -6, -7, -8, -9, ktoré nájdeme u všetkých cicavcov (McIlwain a kol., 2013, Papaliagkas a kol., 2007).

Apoptotické kaspázy sa ďalej rozdeľujú na iniciačné a efektorové. Iniciačné kaspázy (kaspáza-2, -8, -9, -10) sú zodpovedné za aktiváciu ďalších kaspáz. Exekutorové (efektorové) kaspázy (kaspáza-3, -6, -7) zodpovedajú za vlastný proces apoptózy. Proces apoptózy vyžaduje dodanie energie vo forme ATP, ak nie je dostatok ATP k dispozícii prechádza apoptóza do procesu nekrózy (Kroemer, 2009, McIlwain a kol., 2013).

### **3.1.3 Vonkajšia a vnútorná cesta aktivácie apoptózy**

Rozlišujeme dve hlavné cesty aktivácie apoptózy – vnútornú a vonkajšiu. Vonkajšia cesta je charakterizovaná prítomnosťou receptorov smrti v cytoplazmatickej membráne bunky. Po väzbe ligandu na receptor dochádza k aktivácii iniciačných kaspáz (napr. kaspáza 8), následne k štiepeniu exekutorových kaspáz (napr. kaspáza 3) až vznikajú apoptotické telieska, vid' Obr. 2. Najznámejším receptorom smrti je Fas receptor, na ktorý sa viaže jeho príslušný ligand, Fas Ligand. Ďalším príkladom je TNF (tumor necrosis factor) receptor, ktorý viaže TNF $\alpha$ , či TRAILR1 receptor (TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1), na ktorý sa viaže príslušný ligand – TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) (Elmore, 2007, Ashkenazi, Dixit, 1998).

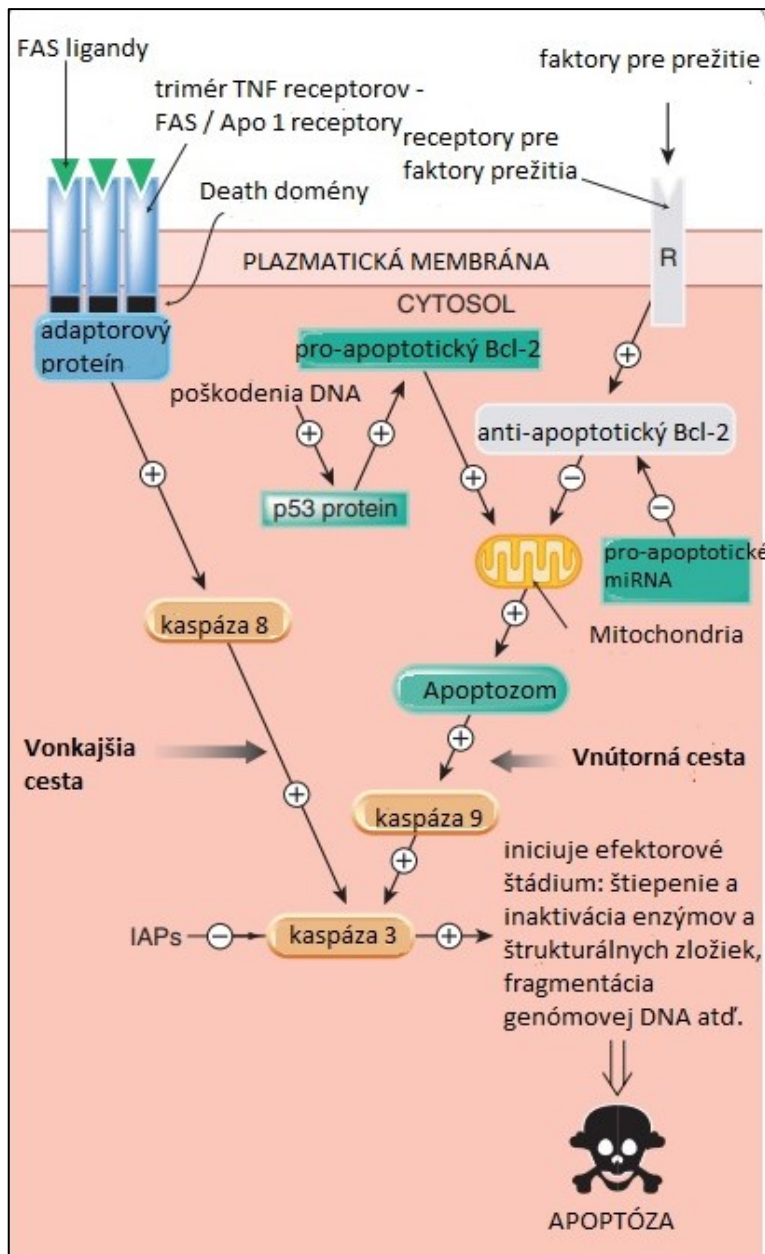
Vo vnútornej (mitochondriálnej) ceste hrajú rolu pro-apoptotické signály, ako napríklad oxidačný stres, toxíny, poškodenie DNA, radiácia, hypoxia atď. Tieto signály vedú k zmenám na vnútornej mitochondriálnej membráne, ktoré vyúsťujú v otvorenie mitochondriálneho póru, stratu mitochondriálneho transmembránového potenciálu a uvoľnenie pro-apoptotických proteínov do cytosolu. Zároveň dochádza k zmene pomeru pro-apoptotických a anti-apoptotických proteínov, ktoré sa nachádzajú v mitochondriách (Alberts a kol. 2005, Fink, 2005, Czabotar a kol., 2014).

Veľkú rolu v indukcii procesu apoptózy hrajú proteíny rodiny Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2 gene). Patrí sem približne 15 zástupcov, pričom niektoré sú pro-apoptotického charakteru, tie sa ďalej delia do dvoch kategórií - multidoménnové (Bak, Bax, Bok) a BH3 only proteíny (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma), ktoré obsahujú len jednu doménu. Medzi proteíny rodiny Bcl-2 patria taktiež proteíny anti-apoptotického charakteru (A1, Bcl-B, Bcl-W, Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1). BH3 only proteíny aktivujú

multidoménové pro-apoptotické druhy proteínov a tým narušujú funkciu anti-apoptotických proteínov Bcl-2 rodiny ( Czabotar a kol., 2014, Papaliagkas a kol., 2007).

V mechanizme aktivácie mitochondriálnej cesty sa uplatňuje aj proteín p53, ktorý reaguje na nevratné poškodenie DNA aktiváciou ďalších mechanizmov. Proteín p53 stimuluje expresiu niektorých proteínov rodiny Bcl-2 ako sú Bax a BH3 only proteíny, pričom dochádza k dejom, ktoré vyúsťujú v uvoľnenie cytochrómu c v mitochondriách. Následne dochádza k aktivácii iniciačnej kaspázy, v tomto prípade kaspázy 9, vid'. Obr. 2 (Rang, Dale, 2012, Papaliagkas a kol., 2007).

Obe cesty aktivácie apoptózy pokračujú aktiváciou efektorových kaspáz (na Obr. 2 kaspáza 3), ktorých pôsobením dochádza k vyššie uvedeným morfológickým zmenám v bunke až následne vznikajú apoptotické telieska. Apoptotické bunky produkujú viacero signálov, ktoré vedú k ich rozpoznaní a likvidácii makrofágmi. Medzi tieto signály patria napríklad chemotaktické faktory, ktoré sú zodpovedné za lokálne nahromadenie makrofágov (Fink, 2005).



**Obr. 2** Schéma vnútornej a vonkajšej cesty apoptózy.

Prevzaté z: Rang, Dale (2012)

### 3.1.4 Nekróza

Nekróza, neprogramovaná bunková smrť alebo náhla bunková smrť, je dejom nefyziologickým (patologickým). Jedná sa o zmeny, ktoré sa dejú v bunkách alebo tkanivách ako následok ich poškodenia a odumretia. Vytvárajú ju rôzne vplyvy na bunku ako napríklad infekčné agens (baktérie, vírusy, huby, paraziti), hypoxia, teplo, toxíny, voľné radikály, radiácia atď. Nie všetky druhy bunkovej smrti sú nevyhnutne nasledované procesom nekrózy. Typickým príkladom sú orgány, resp. tkanivá zakonzervované

formaldehydom, u ktorých dochádza k rýchlej bunkovej smrti, no k nekróze tkaniva nedochádza (Adigun a kol., 2020, Trump a kol., 1997).

Pri tomto procese dochádza k zväčšeniu bunky a nabobtnaniu organel, dezintegrácii jadra, strate asymetrie aj integrity bunkovej membrány a to bez potreby dodania energie. Dochádza k cytolýze, teda plazmatická membrána praská a obsah bunky sa vylieva do okolia. V dôsledku pôsobenia enzýmov z intracelulárneho obsahu na okolné tkanivo vzniká obvykle v mieste nekrózy zápal (Šípek, 2012, Adigun a kol., 2020, Wyllie et al., 1980).

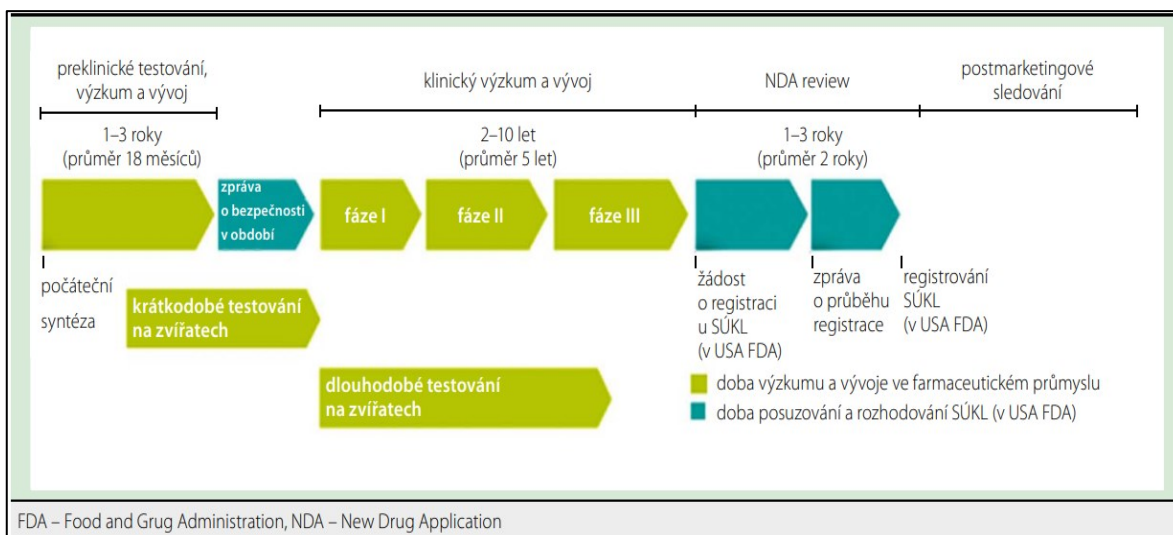
Proces nekrózy sa odohráva vo viacerých štádiách. Prvým je štádium reverzibilných zmien, identické s akutným poškodením bunky, kde dochádza k poruche vo funkčnosti bunky. V tejto fázi môžeme, ale nemusíme pozorovať mikroskopické a makroskopické zmeny v postihnutej oblasti, záleží to na rozsahu poškodenia tkaniva a taktiež na sile nekrogenného podnetu.

Nasleduje štádium ireverzibilných zmien a degradácie, kedy dochádza k totálnemu rozvratu vnútorného prostredia bunky. Prejavuje sa poklesom pH, inaktiváciou pre bunku životne dôležitých enzýmov a dochádza k deštrukcii kompartmentov v bunke. Toto štádium plynulo prechádza do fáze autolýzy a heterolýzy. Autolýza (autodegradácia) je rozklad nekrotického tkaniva jeho vlastnými lyzozomálnymi enzýmami, hydrolázami. Naopak heterolýzou rozumieme rozklad buniek a tkaniva enzýmami, ktoré pochádzajú z okolia.

Konečnou fázou nekrózy je štádium hojenia a reziduálnych zmien (LF1, 2010).

### **3.2 Vývoj liečiv**

Vývoj nového lieku je časovo aj finančne náročný proces, ktorého cieľom je nájsť látku s výhodnejšími vlastnosťami ako majú látky momentálne používané vo farmakoterapii. Výskum spojený s vývojom nových látok ako potencionálnych liečiv je veľmi drahý a riziko neúspechu je veľké. Náklady na vývoj nového lieku sú odhadované približne na 1 miliardu amerických dolárov. Výskum od počiatocnej fáze až po finálny produkt je časovo odhadovaný na 12-15 rokov, no môže trvať aj oveľa dlhšie. Tento proces môžeme rozdeliť do 3 fáz – základný výskum, preklinické hodnotenie a klinické hodnotenie liečiv, viď. Obr. 3 (Brodniewicz-Proba, 2008, Hughes a kol., 2011).



**Obr. 3** Vývoj nového liečiva od počiatkovej syntézy až po registráciu a využitie v klinickej praxi. Prevzaté z: Součková (2015)

Zdrojom nových látok (potencionálnych liečiv) môže byť modifikácia už známych štruktúr, objavenie nových účinkov už používaných liečiv či syntéza analógov prírodných látok. Z pomerne vysokého množstva nasyntetizovaných substancií (približne 15 000) počas základného výskumu, pokračuje len malá časť do preklinického a klinického hodnotenia (Lincová, Farghali, 2002).

### 3.3 Preklinická fáza hodnotenia liečiv

Preklinická fáza prebieha na viacerých úrovniach výskumu a zahŕňa *in vitro* aj *in vivo* testy. *In vitro* modely sú napríklad izolované bunky, tkanivá alebo orgány. *In vivo* testy prebiehajú na zvieracích modeloch či už na zdravých jedincoch alebo v niektorých prípadoch aj na jedincoch s modelovým ochorením, tieto jedince sú získané umelým navodením patologického stavu u zdravého organizmu. Táto časť vývoja nového liečiva má za úlohu overiť biologickú aktivitu testovanej substancie, odhadnúť prínos a riziko jej pôsobenia na živý organizmus a v neposlednom rade získať čo najviac informácií z oblasti farmakokinetiky a farmakodynamiky pred zahájením klinického hodnotenia a teda pred prvých podaní testovanej látky človeku. V priebehu testovania je nutné dodržiavať zásady správnej laboratórnej praxe (GLP, good laboratory practice) (Součková, 2015, Rang, Dale, 2012, Polson a kol., 2012).



Preklinická fáza výskumu sa člení na 4 stupne:

1. Farmakologický screening
2. Farmakodynamická štúdia
3. Farmakokinetická štúdia
4. Štúdie toxicity – akútna, chronická a špeciálna toxicita (Rang, Dale, 2012).

Úvodnou štúdiou v preklinickom testovaní je farmakologický screening, ktorého účelom je stanoviť základný farmakologický profil testovanej látky, t.j. objasniť jej účinnosť a selektivitu. Táto fáza zahŕňa veľký počet relatívne jednoduchých testov, ktoré prebiehajú *in vitro* na izolovaných orgánoch či bunkových líniiach (Starobová a kol., 2006).

Testy farmakokinetiky sú zamerané na absorpciu, distribúciu, metabolizmus a exkréciu látky. Farmakodynamika sa zaoberá pôsobením látky v organizme. Tieto testy prebiehajú na niekoľkých úrovniach – molekulárna, bunková, orgánová úroveň a testy na úrovni celého organizmu (Starobová a kol., 2006, Honek, 2017).

Testy v preklinickej fáze výskumu vyžadujú veľké množstvo experimentálnych zvierat, cieľom je znížiť množstvo použitých zvierat ale zároveň zachovať spoľahlivosť testov, preto sa stále viac využívajú tkanivové modely a počítačové programy.

Z preklinickej fáze výskumu vyplývajú indikácie potencionalneho liečiva, dávky pre prvé podanie človeku v klinickom hodnotení liečiv, očakávané nežiadúce účinky, toxicita a bezpečnosť látky (Honek, 2017).

### **3.4 Štúdie toxicity**

Úlohou toxikologických štúdií je určiť stupeň toxicity študovanej látky, stanoviť vzťah medzi dávkou a nežiadúcimi účinkami a taktiež stanoviť aké orgány toxicita postihuje. Tieto štúdie poskytujú informácie o nebezpečí a riziku, ktoré vyplýva z podania študovanej látky a prípadne ako vieme tomuto riziku predchádzať. Toxicita je v priebehu preklinickej fáze testovaná *in vivo* na 2 až 3 druhoch zvierat. V prípade, že z terapeutického hľadiska predpokladáme dlhodobé podávanie látky, musí pokračovať štúdium toxicity substancie aj počas klinickej fáze a to za účelom získania informácií o dlhodobej toxicite látky (Rang, Dale, 2012; WHO, 2004).

### 3.4.1 Akútna toxicita

Rozlišujeme viacero štúdií toxicity. Prvou je štúdia akútnej toxicity (toxicita po podaní jednej dávky substancie), jej cieľom je určiť orgán, ktorý látka svojou toxicitou postihuje. V rámci tejto štúdie sa stanoví LD<sub>50</sub> (stredná letálna dávka), ktorá vyjadruje úhyn 50 % jedincov po podaní tejto dávky. Látka je obvykle testovaná na dvoch rôznych druhoch experimentálnych zvierat, no vždy to musí byť 1 hlodavec a 1 nehlodavec. Testovaná látka je podávaná v rôznych koncentráciách a sleduje sa jej efekt na organizmus po dobu 14 dní. Stanovenie LD<sub>50</sub> vyžaduje veľké množstvo experimentálnych zvierat, preto sa tento test už nepoužíva. Dnes preferujeme stanovenie maximálnej tolerovanej dávky – MTD, ktorá vyjadruje maximálnu dávku látky bez špecifického toxického účinku a bez neakceptovateľných nežiadúcich účinkov. MTD následne slúži na stanovenie dávky, ktorá bude prvý krát podaná človeku v rámci klinického hodnotenia liečiv (Parasuraman, 2011, FDA, 2010).

### 3.4.2 Chronická toxicita

Ďalšou fázou je štúdium chronickej toxicity (toxicita po opakovanom podávaní substancie) za účelom zisku informácií o toxicite látky pri dlhodobom užívaní. Látka sa testuje na dvoch zvieracích druhoch, opäť na 1 hlodavcovi a 1 nehlodavcovi. Doba trvania štúdie prevyšuje 90 dní. V priebehu štúdie sa sledujú hematologické a biochemické parametre, fyziologické funkcie a zmeny správania experimentálnych zvierat. Na záver testovania sa odoberie tkanivo z rozličných častí zvierat a hodnotia sa makroskopické a histopatologické zmeny (Parasuraman, 2011, Takagi a kol., 2005).

### 3.4.3 Ďalšie testy toxicity

Ďalšími testami sú v rámci štúdie toxicity sú testy špeciálnej toxicity, ktoré zahŕňajú:

1. testy reprodukčnej toxicity, ktoré prebiehajú na samčích aj samičích zvieracích modeloch.
2. testy genotoxicity (mutagenity), ktorých cieľom je rozpoznať potencionálne mutácie či poškodenie chromozómov buniek.
3. testy karcinogenity, ktoré odhalia prípadný kancerogenný efekt na organizmus.

4. testy lokálnej tolerancie, pri ktorých sa cesta podania substancie musí zhodovať so zamýšľanou cestou podania humánnym subjektom v klinickom hodnotení (Brodiewicz-Proba, 2008, WHO, 2004, Honek, 2017, Mohs a kol., 2017).

### **3.5 Klinické hodnotenie liečiv**

Ak potencionálne liečivo úspešne prejde preklinickou fázou výskumu, postupuje do klinického hodnotenia na ľudských subjektoch, ktoré sa delí do 4 fází, ktoré na seba nadväzujú, prípadne sa môžu čiastočne prekrývať. Základné znaky jednotlivých fází môžeme vidieť v tabuľke 1.

1. Fáza – prvé podanie liečiva človeku
2. Fáza – úvodná klinická štúdia
3. Fáza – rozšírená klinická štúdia
4. Fáza – post-marketingová štúdia

**Tab. 1** Typické charakteristiky fází 1-4 klinického hodnotenia liečiv.

	<b>1.fáza</b> <b>prvé</b> <b>podanie</b> <b>človeku</b>	<b>2.fáza</b> <b>prvé podanie</b> <b>pacientom</b>	<b>3.fáza</b> <b>rozšírená</b> <b>štúdia</b>	<b>4.fáza</b> <b>post-</b> <b>marketingová</b> <b>štúdia</b>
<b>Počet</b>	10-100	50-500	stovky–tisíccky	tisíccky
<b>subjektov</b>	subjektov	subjektov	subjektov	subjektov
<b>Druh</b>	zdraví	pacienti	pacienti	pacienti
<b>subjektov</b>	dobrovoľníci, výnimočne pacienti			
<b>Typ</b>	otvorená	randomizovaná,	randomizovaná,	otvorená
<b>štúdie</b>	štúdia	kontrolovaná, môže byť zaslepená	kontrolovaná, môže byť zaslepená	štúdia
<b>Cieľ</b>	bezpečnosť,	účinnosť,	potvrdenie	NÚ,
<b>štúdie</b>	znášateľnosť	rozsah dávok	účinku vo väčšej populácii	compliance, LI
<b>Trvanie</b>	mesiace až 1 rok	1-2 roky	3-5 rokov	variabilné
<b>Náklady</b>	10 mil.USD	20 mil.USD	50-100 mil.USD	-----
<b>Úspešnosť</b>	50 %	30 %	25-50 %	-----

Modifikované podľa: Goodman a kol. (2011)

V počiatočnej fázi dochádza k prvému podaniu testovanej substancie človeku. Testuje sa na malom počte zdravých dobrovoľníkov (10-20 osôb), výnimočne na pacientoch, napr. pacientoch s onkologickým ochorením, kde je podanie látky zdravému človeku nevhodné alebo v prípade, keď neúčinkuje žiadna dostupná liečba. V tejto fázi sú známe informácie o liečive vyplývajúce len z preklinického hodnotenia, preto je potrebná vysoká opatrnosť pri podávaní liečiva a preto sa obvykle podáva len jednorázovo alebo krátkodobo. Do klinického

hodnotenia liečiv nesmú byť zaradené zraniteľné osoby ako sú napríklad deti a tehotné ženy. Cieľom je overiť bezpečnosť, toleranciu a znášanlivosť hodnotenej látky a získať základné informácie o farmakokinetike a farmakodynamike látky v ľudskom organizme (Brodniewicz-Proba, 2008, Součková, 2015, Starobová, 2006).

Ak je liečivo v prvej fázi KHL vyhodnotené ako bezpečné pokračuje do druhej fáze. V úvodnej klinickej štúdii sa liečivo po prvý krát podáva malému počtu – desiatky až stovky – pacientov v predpokladanej indikácii. Cieľom je overiť a doplniť farmakologické údaje, sledovať nežiadúce účinky atď. Hlavným cieľom ale zostáva hodnotenie bezpečnosti a tolerancie látky (Brodniewicz-Proba, 2008).

V tretej fázi je cieľom stanovenie terapeutickej hodnoty (pomer benefit/risk), preukazuje sa účinnosť a bezpečnosť látky na veľkom počte pacientov – stovky až tisíce. Jedná sa o multicentrické štúdie, ktoré prebiehajú vo viacerých štátoch a taktiež vo viacerých klinických centrách. Dopĺňujú sa taktiež údaje o farmakokinetike, farmakodynamike a nežiadúcich účinkoch látky. Štúdie v tretej fázi sú často:

1. Kontrolované – liečivý prípravok je porovnávaný s kontrolnou skupinou, ktorou môže byť placebo (neúčinná látka v rovnakej liekovej forme ako hodnotený liečivý prípravok) alebo štandardná liečba daného ochorenia (komparátor).
2. Randomizované – subjekty hodnotenia sú náhodne rozdelené do pokusných skupín.
3. Zaslepené – používa sa z dôvodu zvýšenia objektivity experimentu. Pacient nevie do akej pokusnej skupiny bol zaradený, a teda či užíva liek alebo placebo.
4. Dvojito zaslepené – pacient ani lekár nevedia do akej pokusnej skupiny bol pacient zaradený. Používa sa v prípade ak porovnávame látky s rozdielnymi liekovými formami, napr. tablet a injekčná forma prípravku. Pacient v tomto prípade užíva obe formy (Suchý, 2009).

Po ukončení rozšírenej klinickej štúdie podáva výrobca žiadosť o registráciu liečiva na SÚKL. Následne ak je liečivo úspešne zaregistrované a používané k terapii nastáva 4. fáza vývoja – post-marketingová štúdia. Hlavným cieľom post-marketingovej štúdie je sledovať bezpečnosť, detekovať vzácne nežiadúce účinky látky, ktoré je možné odhaliť len na veľkom počte pacientov. Sleduje sa taktiež výskyt nových liekových interakcií a účinky pri dlhodobom podávaní.

Táto fáza trvá aj niekoľko rokov a je založená na spontánnom hlásení nežiadúcich účinkov. Získané informácie slúžia k doplneniu registračného materiálu, prehodnoteniu používania liečiva. Niekedy môže nastať situácia, že liečivo je na základe informácií z post-

marketingovej štúdie stiahnuté z trhu na základe rozhodnutia výrobcu alebo kontrolného úradu (Součková, 2015, Starobová, 2006).

Klinické hodnotenie liečiv (KHL) povoľuje príslušná štátna autorita. Počas KHL je nutné postupovať podľa zásad správnej klinickej praxe (GCP), študovaná látka sa testuje na zdravých dobrovoľníkoch aj pacientoch. Cieľom KHL je preukázať terapeutickú účinnosť, bezpečnosť v stanovených indikáciách a dávkach, stanoviť nežiadúce účinky, kontraindikácie a liekové interakcie testovanej substancie (Rang, Dale, 2012).

### **3.6 Preklinické a klinické štúdie generických liekov**

Generický liečivý prípravok je prípravok, ktorý obsahuje rovnakú liečivú látku, má rovnakú silu, liekovú formu a cestu podania ako originálny liečivý prípravok (FDA, 2017).

V momente, keď vyprší originálnemu liečivému prípravku patentová ochrana, je umožnené generickým prípravkom vstúpiť na trh. Podmienkou registrácie generika je preukázanie jeho farmakokinetickej bioekvivalencie s referenčným liečivým prípravkom. Ak je preukázana bioekvivalencia, predpokladá sa, že sa výsledky a zistenia v preklinických aj klinických štúdiách originálneho prípravku budú vzťahovať aj na prípravok generický vzhľadom na jeho veľmi podobné zloženie (Andrade, 2015).

Cieľom bioekvivalenčných štúdií je preukázať zhodné vlastnosti generika s originálom. V rámci týchto štúdií sa hodnotí len farmakokinetika, keďže vlastnosti originálu už poznáme a u generika predpokladáme podobné vlastnosti (Andrade, 2015).

Sledujú sa základné parametry ako sú plocha pod krivkou (AUC), maximálna koncentrácia ( $C_{max}$ ), čas maximálnej koncentrácie od podania ( $T_{max}$ ) a čas dosiahnutia polovice maximálnej koncentrácie ( $T_{1/2}$ ). Hodnoty týchto parametrov musia byť s 90 % spoľahlivosťou v rozmedzí 80 – 125 % referenčného liečiva, vtedy môžeme povedať, že prípravky sú navzájom zameniteľné (Andrade, 2015, Brodniewicz-Proba, 2008).

### **3.7 *In vitro* testy viability a cytotoxicity**

*In vitro* testy cytotoxicity novo nasyntetizovaných látok sú základnými testami v preklinickom štádiu výskumu liečiv. Predchádzajú testom na zvieracích modeloch a sú súčasťou základného screeningu pri vývoji liečiv.

Pri výbere vhodnej metódy testovania viability (životaschopnosti) buniek musíme brať do úvahy viacero faktorov. Je potrebné si uvedomiť aký výstup nám daná metóda poskytne, ako merania korelujú s viabilitou buniek a aké sú limitácie použitých reagentov a chemikálií.

Dnes sú k dispozícii rôzne typy testov, ktoré sa líšia vo svojich meraniach a výstupoch – testy založené na určení počtu mŕtvych buniek (testy cytotoxicity), testy indikujúce počet živých buniek (testy viability), testy udávajúce celkový počet buniek, prípadne mechanizmus bunkovej smrti (napr. apoptóza) (Promega, 2006).

Testy indikujúce počet živých buniek sú založené na detekcii metabolických biomarkerov ako sú napríklad aktivita ATP a mitochondriálnej reductázy či aktivita homeostatických (“housekeeping”) enzýmov. Táto enzýmová aktivita je priamo úmerná počtu živých buniek (Niles a kol., 2009).

### **3.8 Antimykobakteriálne pôsobiace látky**

Medzi hlavné mykobakteriálne infekcie vyskytujúce sa u človeka patria tuberkulóza, spôsobená infekčným agens *Mycobacterium tuberculosis* a lepra, ktorej pôvodcom je *Mycobacterium leprae*. Veľkým problémom u mykobakteriálnych infekcií je rezistencia mykobaktérií k väčšine antibiotík. Mykobakteriálna infekcia sa taktiež môže určitý čas nachádzať v latentnej (spiacej) fázi, čo vo výsledku vedie k úplnej rezistencii k väčšine liečiv, prípadne k veľmi nízkemu účinku týchto liečiv. Ďalším aspektom neúčinnosti mnohých látok je mykobakteriálna bunková stena bohatá na lipidy, ktorá je nepriepustná pre mnoho látok (Katzung a kol., 2012, Rang, Dale, 2012).

V liečbe mykobakteriálnych infekcií je nutné použiť kombináciu 2 a viacerých liečiv, aby sme predišli rozvoju rezistencie. Terapia trvá mesiace až roky, pretože odpoveď infekčného agens na liečbu je pomalá. Liečba tuberkulózy spočíva v iniciálnom podávaní štvorkombinácie isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol alebo streptomycin po dobu približne 2 mesiacov. V pokračovacej fázi, po dobu 4 mesiacov, je podávaná dvojkombinácia isoniazid a rifampicin. Pri zlyhaní terapie prvou líniou liečiv s antimykobakteriálnym účinkom sa prechádza na kombinácie s druhou líniou antituberkulotík, vid'. Tab.2. (Katzung a kol., 2012, Ritter a kol., 2008).

**Tab. 2** Antimikrobiálne látky v terapii tuberkulózy.

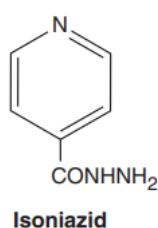
Liečivo	Dávka (dospelí)
<b>Prvá línia (poradie podľa preferencie)</b>	
Isoniazid	300 mg/d
Rifampicin	600 mg/d
Pyrazinamid	25 mg/kg/d
Etambutol	15-25 mg/kg/d
Streptomycin	15 mg/kg/d
<b>Druhá línia</b>	
Amikacin	15 mg/kg/d
Kyselina aminosalicyllová	8-12 g/d
Kapreomycin	15 mg/kg/d
Ciprofloxacín	1500 mg/d, rozdelená
Klofazimin	200 mg/d
Cykloserin	500-1000 mg/d, rozdelená
Etionamid	500-750 mg/d
Levofloxacín	500 mg/d
Rifabutin	300 mg/d
Rifapentin	600 mg 1-2x týždenne

Modifikované podľa: Katzung a kol. (2012)

Medzi najúčinnšie látky využívané v terapii tuberkulózy patrí isoniazid, charakterizovaný malou molekulou a dobrou rozpustnosťou vo vode. Po chemickej stránke sa jedná o hydrazid kyseliny nikotínovej, vid' Obr. 4. Isoniazid je proliečivo, jeho aktívna forma vzniká po aktivácii bakteriálnymi enzýmami. Mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy kyseliny mykolovej, ktorá je nevyhnutnou súčasťou mykobakteriálnej bunkovej steny. Liečivo sa absorbuje z gastrointestinálneho traktu, metabolizmus prebieha v pečeni, acetyláciou prostredníctvom pečenej N-acetyltransferázy. Metabolizmus isoniazidu je závislý na genetických faktoroch, u rýchlych acetylátorov je plazmatický poločas rovný 1 hodine, naopak u pomalých acetylátorov sa plazmatický poločas pohybuje okolo 3 hodín, preto je u nich liečba efektívnejšia. Nežiaduce účinky sprevádzajúce terapiu isoniazidom sú závislé na dávke liečiva, medzi najčastejšie patrí alergická kožná reakcia prejavujúca sa napríklad vyrážkou. Ďalšími nežiadúcimi účinkami sú horúčka,



hematologická toxicita, nespavosť, liekovo navodený lupus erythematosus, neuropatia. Najzávažnejším nežiadúcim účinkom je hepatotoxicita, ktorá môže byť až fatálna. Isoniazid je silným inhibítorom isoformiem cytochrómu P450 – CYP 2C19, CYP 3A4 a slabým inhibítorom isoformy CYP 2D6, môže preto dochádzať k zníženej exkrécii súčasne podávaných liečiv, ktoré sa metabolizujú cez tieto isoformy, čo vedie k zvýšenej plazmatickej koncentrácii daných liečiv. Medzi liečivá, ktoré takto interagujú s isoniazidom patria napríklad antikonvulzíva karbamazepín a fenytoín (Katzung a kol., 2012, Ritter a kol., 2008, Rang, Dale, 2012, Goodman a kol., 2011, Martínková, 2018).



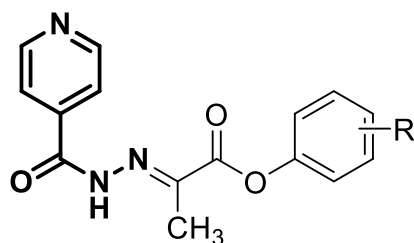
**Obr. 4** Chemická štruktúra isoniazidu.  
Prevzaté z: Katzung a kol. (2012)

### 3.9 Testované látky

Testované látky majú antimykobakteriálne pôsobenie. Základná štruktúra (viď Obr. 5) je odvodená od antituberkulotika isoniazidu. V tabuľke 3 môžeme vidieť prehľad chemických názvov a molekulových hmotností jednotlivých látok. Jednotlivé látky sú estery odvodené od základnej štruktúry, líšiace sa substituentom R. Prehľad substituentov R na základnej štruktúre je uvedený v tabuľke 4. Štruktúrny vzorec látky HE-1NAFT je znázornený osobitne na obrázku 6.

**Tab. 3** Prehľad testovaných látok, ich chemický názov a molekulová hmotnosť.

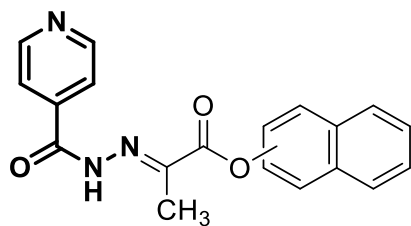
Látka	Chemický názov	Mr
HE-4H	fenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	283,29
HE-4Me	<i>p</i> -tolyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	297,31
HE-4OMe	4-methoxyfenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	313,31
HE-4F	4-fluorfenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	301,28
HE-4Cl	4-chlorfenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	317,73
HE-4Br	4-bromfenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	362,18
HE-IRGAS	5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	478,71
HE-THYM	4-isopropyl-2-methylfenyl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	339,40
HE-1NAFT	naftalen-1-yl-( <i>E</i> )-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanoát	333,35



**Obr. 5** Všeobecná štruktúra látok HE-4H až HE-THYM, odvodená od isoniazidu (zvýraznená časť).

**Tab. 4** Prehľad substituentov R u jednotlivých testovaných látok.

Látka	R
HE-4H	H
HE-4Me	4-CH <sub>3</sub>
HE-4OMe	4-CH <sub>3</sub> O
HE-4F	4-F
HE-4Cl	4-Cl
HE-4Br	4-Br
HE-IRGAS	5-Cl-2-(2,4-dichlorfenoxy)
HE-THYM	2-CH <sub>3</sub> -4-isopropyl



**Obr. 6** Štruktúra látky HE-1NAFT, odvodená od isoniazidu (zvýraznená časť).

## 4 Cieľ práce

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo posúdiť cytotoxicitu novo nasyntetizovaných látok, potenciónálnych antimykobakteriálne pôsobiacich liečiv, na životaschopnosť buniek hepatocelulárneho karcinómu (bunkovej línie HepG2) v *in vitro* podmienkach po 24 resp. 48 hodinovom pôsobení študovaných látok na bunky.

Súčasne bolo potrebné teoretické štúdium dostupných informácií zo zadaných zdrojov a databáz.

## 5 Experimentálna časť

### 5.1 Materiál

- Centrifugačná skúmavka so šrubovacím uzáverom (TPP, Švajčiarsko)
- Jednokanálové pipety (Eppendorf, USA)
- Kultivačné fľaše (TPP, Švajčiarsko)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, USA)
- Sklenené Pasteurove pipety (Sigma Aldrich, USA)
- Sterilné nepyrogenné pipety 5, 10, 25 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné polypropylenové falkonky (TPP, Švajčiarsko)
- Sterilné špičky (Eppendorf, USA)
- Viackanálové pipety (Eppendorf, USA)
- 96-jamkové kultivačné doštičky (TPP, Švajčiarsko)
- Nesterilné latexové rukavice (VWR, USA)

### 5.2 Chemikálie

- CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Dimetylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, USA)
- Etanol denaturovaný 70 %
- Fosfátový pufor (PBS, pripravený na pracovíšti)
- Kultivačné médium DMEM (Sigma Aldrich, USA)
- Fetálne bovinné sérum (Biotech)
- Neesenciálne aminokyseliny (Sigma Aldrich, USA)
- 0,25% Trypsin-EDTA Solution (Sigma Aldrich, USA)
- Testované látky s označením:
  - HE-4H
  - HE-4Me
  - HE-4OMe
  - HE-4F
  - HE-4Cl

- HE-Br
- HE-IRGAS
- HE-THYM
- HE-1NAFT

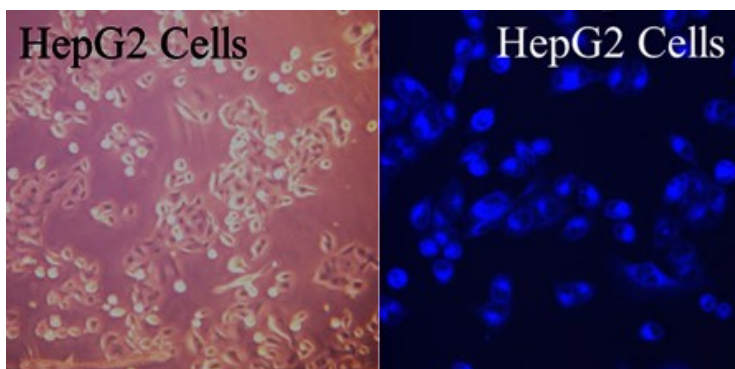
### 5.3 Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy (Boeco, Nemecko)
- Box s laminárnym prúdením (TopSafe 1.8 Bioair Instruments, Taliansko)
- Bunkový inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- Doštičkový spektrofotometer Infinite M200 TECAN (Nemecko)
- Miešačka
- Plynový kahan
- Svetelný mikroskop (Optika Microscopes, Taliansko)
- Vakuová odsávačka
- Vodná kúpeľ TW12 (Julabo, Nemecko)

### 5.4 Bunkový model

Pri *in vitro* testovaní viability sme použili bunkovú líniu HepG2.

HepG2 bunková línia znázornená na Obr. 7 pochádza z dobre diferencovaného hepatocelulárneho karcinómu, ktorý je celosvetovo piatym najčastejším nádorovým ochorením. Výhodnými vlastnosťami HepG2 bunkovej línie sú jej neobmedzená životnosť, stabilný fenotyp, vysoká dostupnosť a predovšetkým ľahká manipulácia s bunkami (Donato, 2015). Táto bunková línia má vysoký proliferačný potenciál. Je vhodná a preto aj najčastejšie používaná v *in vitro* testoch metabolizmu a hepatotoxicity novo nasyntetizovaných liečiv ako lacnejšia a dostupnejšia alternatíva primárnych ľudských hepatocytov v počiatočných fázach výskumu (Fanelli, 2016).



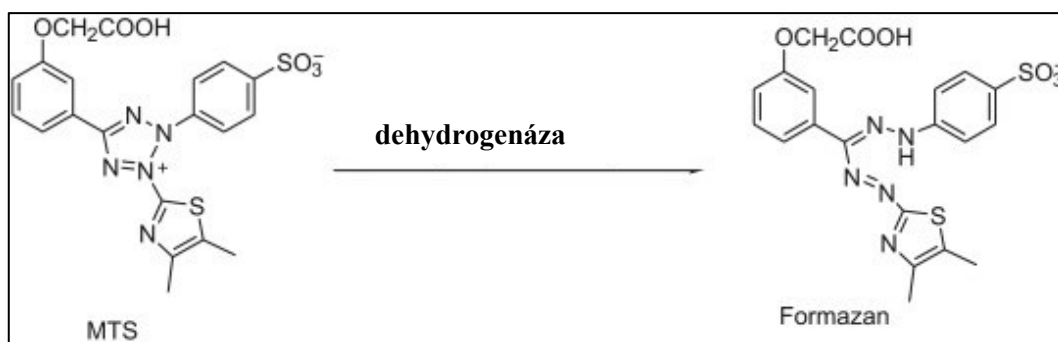
**Obr. 7** Bunková línia HepG2 pod mikroskopom.  
Prevzaté z: Fanelli (2016)

## 5.5 Metodika

### 5.5.1 CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS)

MTS test je kolorimetrická metóda, ktorá slúži na detekciu počtu živých buniek pri testovaní cytotoxicity látok zamýšľaných k terapeutickému použitiu. Využíva schopnosť viabilných buniek redukovať zlúčeninu tetrazolia, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), v prítomnosti PMS (fenazín metosulfátu) na farebný produkt, formazan, ktorý je rozpustný v médiu. Reakcia premeny žltó sfarbeného MTS na purpurový formazan je znázornená na Obr. 8 (Peternel et al., 2009, Arab et al., 2016, Belcher a kol., 2017).

Konverziu MTS na vo vode rozpustný formazan zabezpečujú enzýmy dehydrogenázy, ktoré sú prítomné v metabolicky aktívnych bunkách. Následne je meraná absorbanca priamo z 96-jamkovej doštičky, kde sú kultivované bunky a to pri vlnovej dĺžke 490 nanometrov. Absorbanca je priamo úmerná množstvu vzniknutého formazanu. Platí teda, že s klesajúcou viabilitou buniek klesá ich schopnosť produkovať farbivo a preto analogicky klesá aj hodnota absorbanacie (Promega, 2020, Anonym, 2020, Teicher, Andrews, 2004).



**Obr. 8** Redukcia MTS na formazan.  
 Prevzaté z: Kuete a kol. (2017)

### 5.5.2 Kultivácia buniek

Bunky bunkovej línie HepG2 sme kultivovali v kultivačných fľaškách za použitia média DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium doplnené o 10 % FBS (fetálne bovinné sérum) a 1 % neesenciálnych aminokyselín. Kultivovali sme v bunkovom inkubátore pri teplote 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a vo vlhčenej atmosfére, pretože tieto podmienky sa najviac približujú podmienkam *in vivo*. Pravidelne sme mikroskopicky kontrolovali úroveň proliferácie buniek a ak bola dostatočná (približne 80%) bunky sme pasážovali.

### 5.5.3 Pasážovanie buniek

Pasážovanie prebiehalo v laminárnom boxe. Do boxu sme si pripravili všetky potrebné sterilné pomôcky, pričom médium, trypsín a fosfátový pufr sme pred tým zahriali vo vodnom kúpeli na 37 °C, aby sme bunkám nespôsobili teplotný šok. Pracovali sme za aseptických podmienok. Všetky pomôcky a chemikálie potrebné k pasáži buniek sme pred vstupom do laminárneho boxu ošetrili 70% etanolom, aby sme predišli kontaminácii, ktorá by následne mohla spôsobiť skreslené výsledky testu.

Z kultivačnej fľaše s bunkami sme opatrne odsali sklenenou Pasteurovou pipetou staré médium. Následne sme k bunkám pridali 6 ml fosfátového pufru (PBS), aby sme odstránili zvyšky starého média, potom sme PBS odsali sklenenou Pasteurovou pipetou a pridali sme 3 ml trypsínu, ktorý napomohol bunkám uvoľniť sa z povrchu kultivačnej nádoby. Bunky sme vložili na pár minút späť do inkubátora, čím sme ešte viac podporili ich uvoľnenie z povrchu kultivačnej fľaše.

Do novej kultivačnej fľaše sme napipetovali čerstvé médium DMEM. Po chvíli sme vybrali bunky z inkubátora a mechanickým poklepaním steny nádoby o dlaň sme ešte



napomohli ich uvoľneniu. K bunkám sme pridali 3 ml média na neutralizáciu trypsínu, ktorý by bol pre ne pri dlhšom pôsobení toxický. Roztok sme rozsuspendovali za pravidelného nasávania a vypúšťania suspenzie pipetou pritlačenou o stenu nádoby. Následne sme časť suspenzie pridali k médiu do novej kultivačnej fľaše a novú pasáž sme uložili na kultiváciu do inkubátora.

Zbytok suspenzie sme nariedili za použitia média na požadovanú koncentráciu buniek (t.j. 200 000 buniek na 1 ml).

#### **5.5.4 Nasadenie buniek na doštičku**

Pomocou multikanálovej pipety sme nasadili 100 µl suspenzie buniek do každej jamky 96-jamkovej doštičky, kultivovali sme 24 hodín v bunkovom inkubátore pri teplote 37 °C a 5 % obsahu CO<sub>2</sub> a vo vlhčenej atmosfére. Pripravili sme aj kontrolnú doštičku, kde sme napipetovali do každej jamky 100 µl média bez buniek.

Po uplynutí 24 hodín sme k bunkám pridávali roztoky testovaných látok. Obvodové jamky doštičky sme nevyužívali priamo na testovanie, keďže tekutina v nich má tendenciu vysychať, čo by viedlo k úhynu buniek.

#### **5.5.5 Príprava roztokov testovaných látok**

Testovali sme 9 látok, každú z nich sme testovali v 9 koncentráciách – 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5 a 1 µM.

Pripravili sme si zásobné roztoky každej látky o 9 rôznych koncentráciách, a to 100, 50, 10 a 1 mM. Požadované koncentrácie testovaných látok v jamkách 96-jamkovej doštičky sme získali riedením zásobných roztokov látok dimetylsulfoxidom (DMSO) do konečného objemu 1 ml podľa tabuľky 5.

K riedeniu roztoku o vyššej koncentrácii na roztok o nižšej koncentrácii sme použili zmiešavaciu rovnicu.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = C_2 \cdot V_2 / C_1$$

$$V_{\text{DMSO}} = V_2 - V_1$$

$V_1$  = objem zásobného (koncentrovanejšieho) roztoku testovanej látky v ml

$V_2$  = objem roztoku testovanej látky o požadovanej koncentrácii v ml (vždy 1 ml)

$C_1$  = koncentrácia zásobného (koncentrovanejšieho) roztoku testovanej látky

$C_2$  = požadovaná koncentrácia testovanej látky

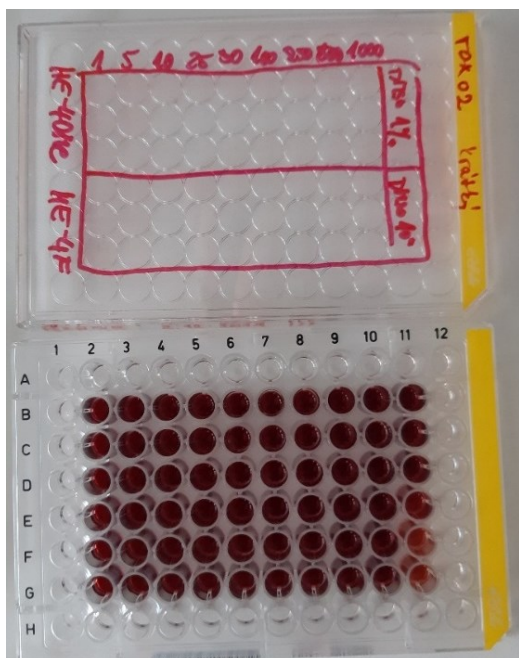
$V_{\text{DMSO}}$  = objem dimetylsulfoxidu

**Tab. 5** Riedenie zásobných roztokov testovaných látok na požadované koncentrácie. Riedením vznikol 1 ml roztoku látok v DMEM médiu. Pomocou DMSO bola upravená celková koncentrácia tohto rozpúšťadla v médiu na 1 %.

Požadované koncentrácie testovaných látok	Zásobné koncentrácie testovaných látok				
	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM	DMSO
1000 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{l}$				
500 $\mu\text{M}$		10 $\mu\text{l}$			
250 $\mu\text{M}$		5 $\mu\text{l}$			5 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{M}$		2 $\mu\text{l}$			8 $\mu\text{l}$
50 $\mu\text{M}$		1 $\mu\text{l}$			9 $\mu\text{l}$
25 $\mu\text{M}$		0,5 $\mu\text{l}$			9,5 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$			1 $\mu\text{l}$		9 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$			0,5 $\mu\text{l}$		9,5 $\mu\text{l}$
1 $\mu\text{M}$				1 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$
1% DMSO					10 $\mu\text{l}$
10% DMSO					100 $\mu\text{l}$

### 5.5.6 Štúdium cytotoxicity

Po 24 hodinách kultivácie buniek na 96-jamkovej doštičke sme k nim pridávali roztoky testovaných látok. Zároveň bola použitá kontrola 100 % toxicity, t.j. pozitívna kontrola (bunky v médiu s 10 % roztokom DMSO, ktorý je pre bunky toxický) a kontrola vplyvu DMSO na bunky, t.j. negatívna kontrola (bunky v médiu s 1 % roztokom DMSO, ktorý je pre bunky netoxický), vid'. Obr. 9. Po pridaní testovaných látok k bunkám, sme bunky uložili do inkubátora na kultiváciu po dobu 24 resp. 48 hodín za štandardných podmienok. Po uplynutí tohto času sme do jamiek pridali MTS z kitu CellTiter 96 a inkubovali sme 2 hodiny. Po uplynutí inkubačnej doby sme vybrali plato z inkubátora a nechali ho vychladnúť na pokojovú teplotu, potom sme zmerali absorbanciu pri 490 nm.



**Obr. 9** 96-jamková doštička s 2 testovanými látkami v koncentračnom rozmedzí 1-1000  $\mu$ l, do obvodových jamiek bolo napipetované PBS, aby sa predišlo vysychaniu buniek.

### 5.5.7 Vyhodnotenie experimentu

Vyhodnocovali sme počet živých buniek kolorimetricku metódou za použitia MTS, kde dochádza k redukcii pridaného MTS viabilnými bunkami. Pri tejto reakcii dochádza k vzniku farbiva, nazývaného formazan, ktoré je rozpustné v médiu.

Pre vyhodnotenie experimentu sme merali absorbanciu pomocou dosičkového spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 490 nm. Namerané hodnoty sme spracovali v programe

Microsoft Excel a štatisticky vyhodnotili v programe GraphPad Prism 8. Z hodnôt nameranej absorbancie sme vypočítali parametre ako sú smerodatná odchýlka a percento viability buniek.

Graficky sme zobrazili výsledky taktiež pomocou programu GraphPad Prism 8, kde sme využívali nasledujúci parameter: percento viability, koncentrácia testovanej látky a smerodatná odchýlka odpovedajúca danému percentu viability. Vypočítali sme, taktiež pomocou tohto programu, hodnoty stredných inhibičných koncentrácií  $IC_{50}$  pre všetky testované látky. Hodnota parametru  $IC_{50}$  udáva koncentráciu látky, ktorá je potrebná na zníženie viability buniek o 50 %. Platí vzťah, že čím nižšia je hodnota  $IC_{50}$ , tým nižšia koncentrácia testovanej látky je pre bunky toxická, teda látka s nižšou hodnotou  $IC_{50}$  je pre organizmus viac toxická ako látka s vyššou hodnotou, pretože k usmrteniu buniek stačí nižšia koncentrácia hodnotenej látky.

## 6 Výsledky

Vyhodnotili sme viabilitu buniek bunkovej línie HepG2 po 24 a 48 hodinovej inkubácii s testovanými látkami. Výsledky experimentu sú znázornené graficky ako percento viability buniek v závislosti na koncentrácii testovanej látky na Obr. 10 až Obr. 27. Tabuľka 6 uvádza súhrn hodnôt  $IC_{50}$  pre jednotlivé testované látky.

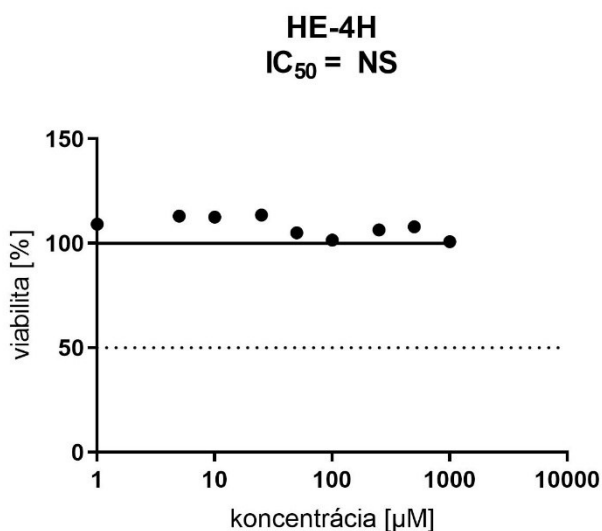
Z tabuľky 6 je patrné, že najviac cytotoxická bola látka HE-IRGAS, naopak látka HE-4H bola pre bunky v testovanom koncentračnom rozmedzí prakticky netoxická.

**Tab. 6** Prehľad hodnôt  $IC_{50}$  testovaných látok po 24 a 48 hodinovej inkubácii.

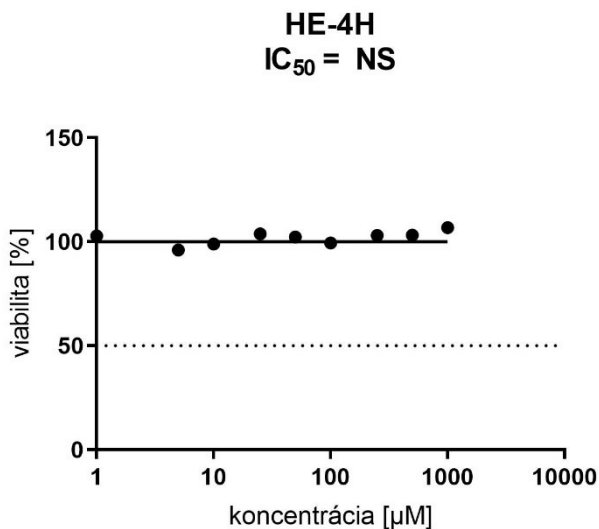
Látka	$IC_{50}$ po 24 h	$IC_{50}$ po 48 h
HE-4H	NS	NS
HE-4Me	4047 $\mu$ M	48887 $\mu$ M
HE-4OMe	4871 $\mu$ M	13722 $\mu$ M
HE-4F	4848 $\mu$ M	2552 $\mu$ M
HE-4Cl	5753 $\mu$ M	3858 $\mu$ M
HE-4Br	2195 $\mu$ M	NS
HE-IRGAS	227,9 $\mu$ M	34,77 $\mu$ M
HE-THYM	1723 $\mu$ M	6425 $\mu$ M
HE-1NAFT	807,2 $\mu$ M	539 $\mu$ M

## 6.1 Látka HE-4H

Na obrázku 10 je znázornená viabilita buniek po inkubácii s látkou HE-4H po dobu 24 hodín. Viabilita po inkubácii po dobu 48 hodín je znázornená na obrázku 11. Látka HE-4H bola pre bunky línie HepG2 prakticky netoxická ako po 24 tak aj po 48 hodinovej inkubácii. Hodnota  $IC_{50}$  sa v tomto prípade nedala stanoviť (NS).



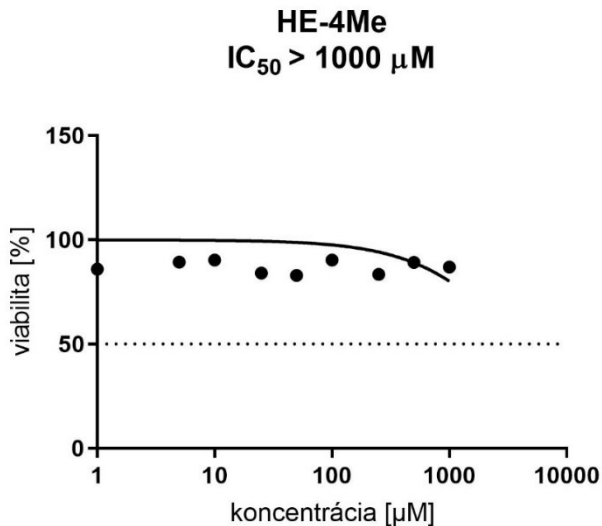
**Obr. 10** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-4H.



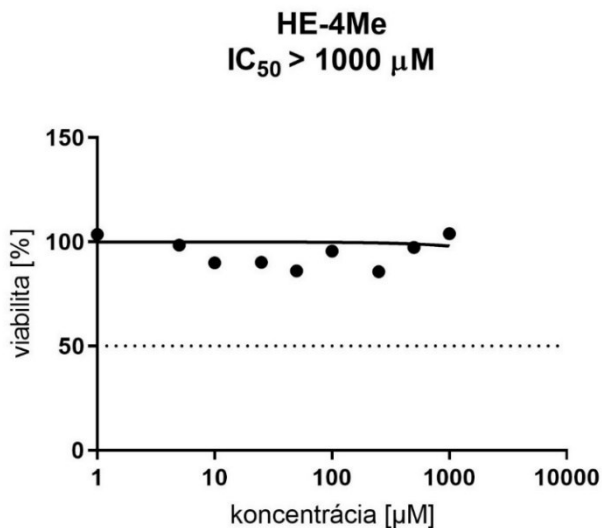
**Obr. 11** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-4H.

## 6.2 Látka HE-4Me

Látka HE-4Me vykazovala cytotoxický efekt na bunky až v koncentráciách značne prevyšujúcich niekoľko stoviek  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovom pôsobení (Obr. 12). Po 48 hodinách inkubácie sme opäť pozorovali rovnaký efekt (Obr. 13). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  u tejto látky značne prevyšovala najvyššiu testovanú koncentráciu, látka HE-4Me bola v testovaných koncentráciách pre bunky netoxická.



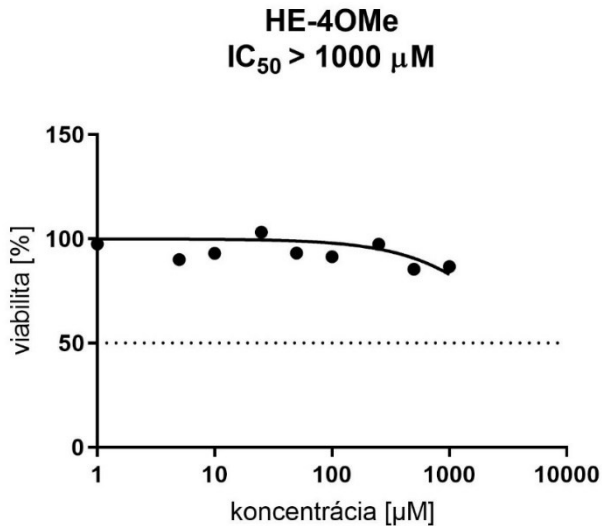
**Obr. 12** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-4Me.



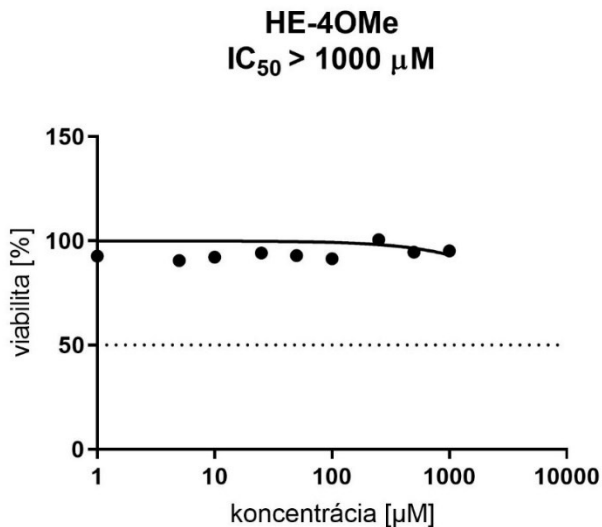
**Obr. 13** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-4Me.

### 6.3 Látka HE-4OMe

Pri testovaní viability buniek bunkovej línie HepG2 sme u látky HE-4OMe pozorovali cytotoxický efekt až pri koncentrácii radovo v niekoľko stovkách  $\mu\text{M}$  (Obr. 14, 15), môžeme teda povedať, že látka aj v tomto prípade nebola v testovaných koncentráciách cytotoxická. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  vypočítaná pomocou software GraphPad PRISM mnohonásobne prevyšovala najvyššiu testovanú koncentráciu.



**Obr. 14** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-4OMe.

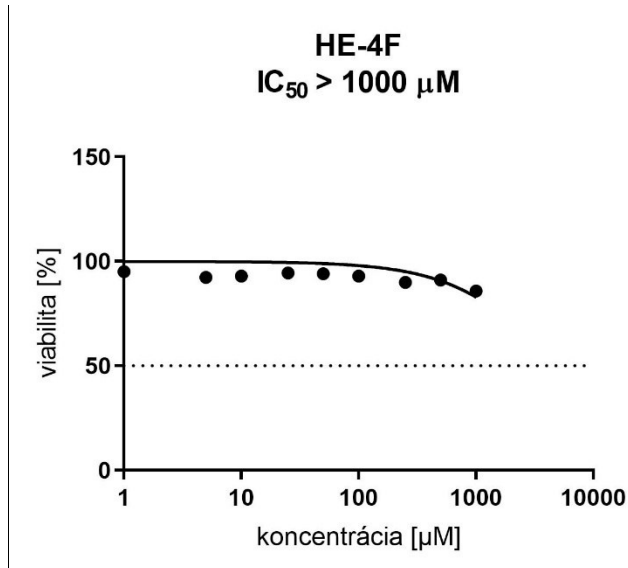


**Obr. 15** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-4OMe.

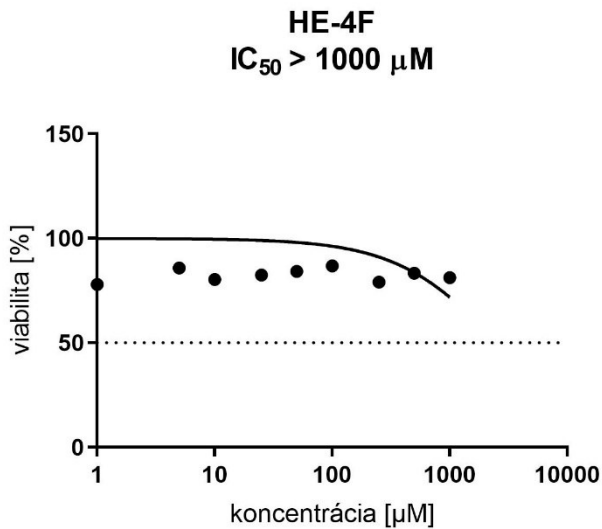


## 6.4 Látka HE-4F

Na obrázkoch 16 a 17 môžeme pozorovať, že študovaná látka HE-4F vykazovala mierne zníženie viability buniek línie HepG2 až v koncentráciách značne prevyšujúcich niekoľko stoviek  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovom pôsobení. Po 48 hodinách inkubácie sme pozorovali rovnaký efekt, avšak študovaná látka pôsobila cytotoxicky už pri nižších koncentráciách.



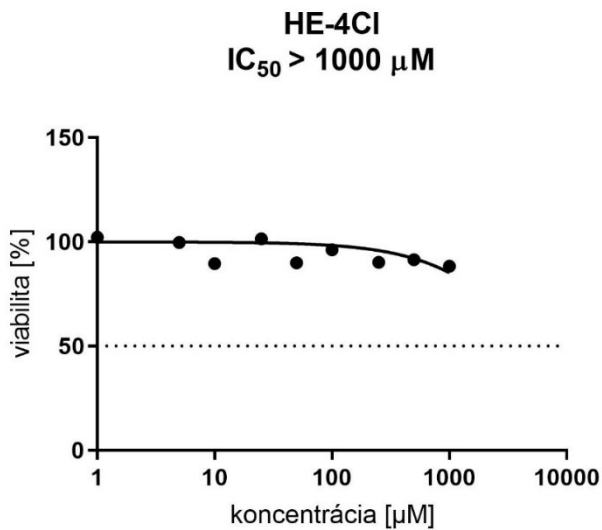
Obr. 16 Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-4F.



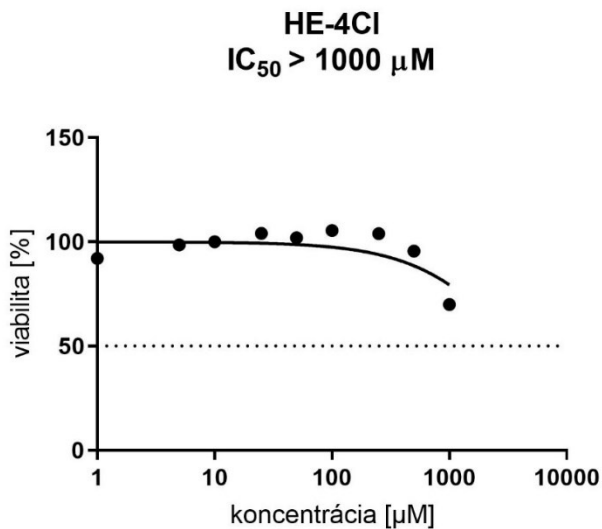
Obr. 17 Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-4F.

## 6.5 Látka HE-4Cl

Grafické znázornenie na obrázkoch 18 a 19 znázorňuje vplyv látky HE-4Cl na viabilitu buniek bunkovej línie HepG2. Z grafov je patrné, že látka pôsobila cytotoxicky až vo vysokých koncentráciách, môžeme konštatovať, že v testovanom koncentračnom rozmedzí bola látka HE-4Cl netoxická. Aj u tejto látky sme zaznamenali vysoké hodnoty  $IC_{50}$ .



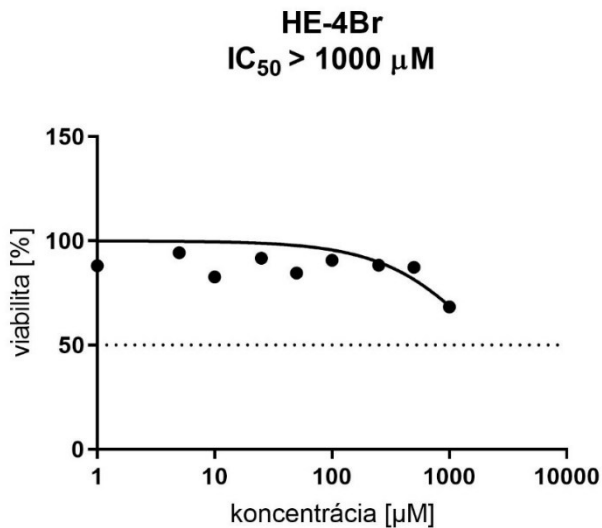
**Obr. 18** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-4Cl.



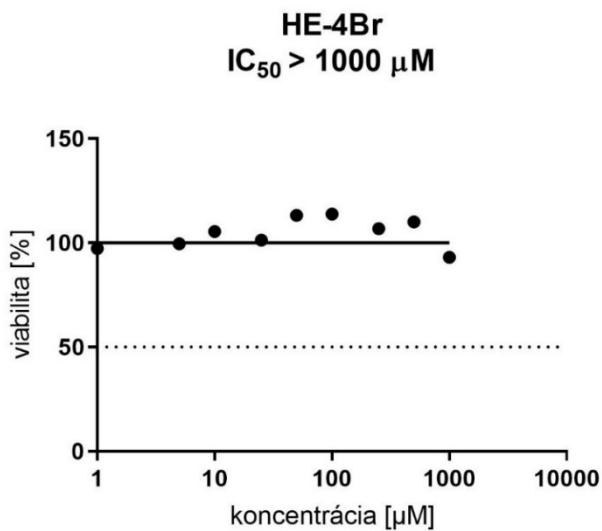
**Obr. 19** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-4Cl.

## 6.6 Látka HE-Br

Látka HE-Br vykazovala cytotoxický efekt na bunky línie HepG2 až vo vysokých koncentráciách, podobne ako predchádzajúce látky. Hodnota  $IC_{50}$  po 24 hodinovom pôsobení bola vyššia ako najvyššia testovaná koncentrácia (vid'. Obr.20), hodnota  $IC_{50}$  po 48 hodinovom pôsobení sa v tomto prípade nedala stanoviť (vid'. Obr.21).



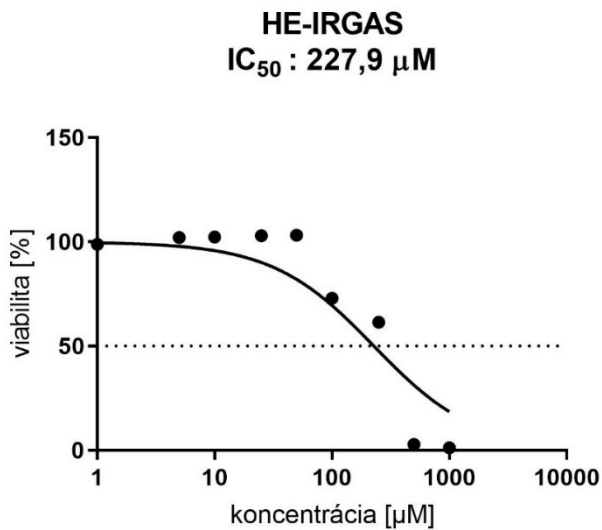
**Obr. 20** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-Br.



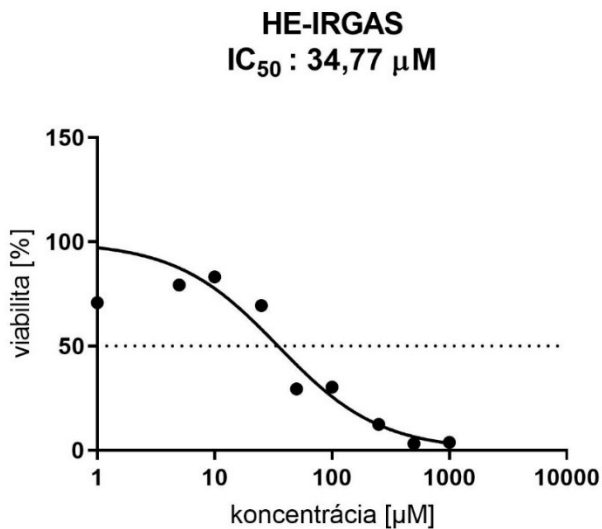
**Obr. 21** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-Br.

## 6.7 Látka HE-IRGAS

Látka HE-IRGAS bola, spomedzi všetkých testovaných látok, pre bunky bunkovej línie HepG2 najviac cytotoxická ako po 24, tak aj po 48 hodinách inkubácie (môžeme vidieť na obrázkoch 22, 23). Pokles viability buniek o 50% bol zaznamenaný pri koncentrácii 227,9  $\mu\text{M}$  po 24 hodinách respektive 34,77  $\mu\text{M}$  po 48 hodinách inkubácie.



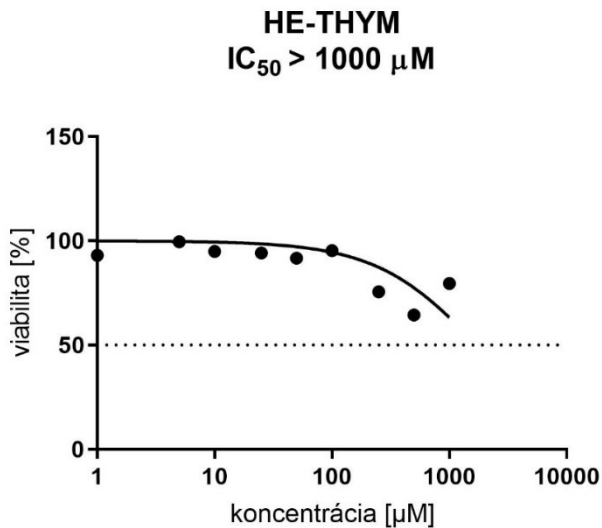
**Obr. 22** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-IRGAS.



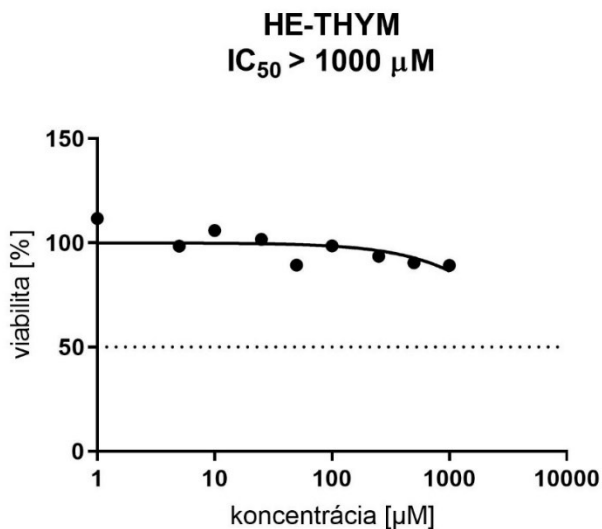
**Obr. 23** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-IRGAS.

## 6.8 Látka HE-THYM

U látky HE-THYM sme pozorovali cytotoxické pôsobenie po 24 hodinách inkubácie pri koncentrácii radovo v stovkách  $\mu\text{M}$  (Obr. 24). Rovnaký efekt tejto látky bol pozorovaný aj po 48 hodinovej inkubácii (Obr. 25). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  po 24 hodinách bola mierne zvýšená oproti najvyššej testovanej koncentrácii, po 48 hodinách bola táto hodnota už radovo omnoho vyššia.



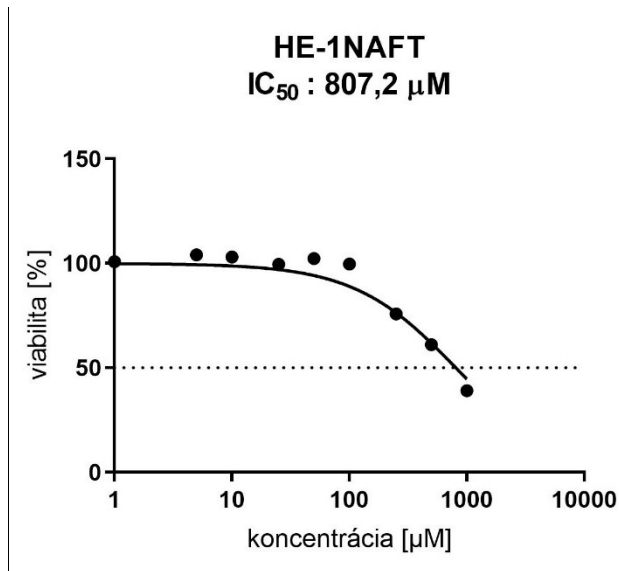
**Obr. 24** Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-THYM.



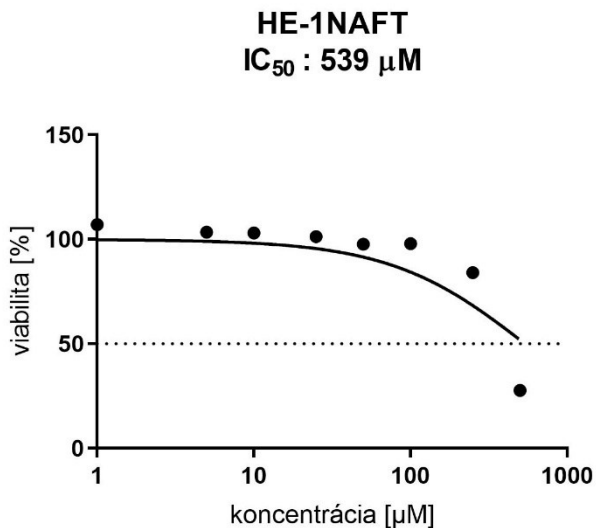
**Obr. 25** Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-THYM.

## 6.9 Látka HE-1NAFT

Na obrázku 26 môžeme pozorovať, že látka HE-1NAFT pôsobila na bunky línie HepG2 cytotoxicky v koncentrácii niekoľko stovkách  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovej inkubácii. Z obrázka 27 vyplýva, že po 48 hodinách vykazovala látka toxicitu už pri nižších koncentráciách. Pokles viability o 50% nastal pri koncentrácii radovo v stovkách  $\mu\text{M}$ .



Obr. 26 Viabilita HepG2 buniek po 24 hodinovej aplikácii látky HE-1NAFT.



Obr. 27 Viabilita HepG2 buniek po 48 hodinovej aplikácii látky HE-1NAFT.

## 7 Diskusia

Vývoj nových liečiv má významné miesto v modernom zdravotníctve. Vývoj nového lieku prináša možnosti do terapie doposiaľ neliečiteľných chorôb, prípadne dochádza k zlepšeniu vlastností doposiaľ používaných liečiv v terapii či eliminácii ich nežiadúcich účinkov. Základnými parametrami liečiva sú jeho účinnosť, bezpečnosť a kvalita, preto je nevyhnutné pred uvedením liečiva na trh urobiť množstvo testov, ktoré zahŕňajú aj testy cytotoxicity (Švihovec a kol., 2018).

Tuberkulóza je celosvetovo jedným z najčastejších mykobakteriálnych ochorení. Jedná sa o infekčné ochorenie, ktorého pôvodcom je *Mycobacterium tuberculosis*. V posledných rokoch boli zaznamenané čoraz častejšie prípady výskytu rezistentných kmeňov mykobaktérií voči dostupným antituberkulotikám a taktiež čoraz častejšie prípady výskytu multirezistentných kmeňov. Rezistencia je závažný problém, ktorý vzniká následkom génovej mutácie v *M. tuberculosis*. V klinickej praxi sa jej snažíme predchádzať kombináciou viacerých dostupných antituberkulotík. Vždy je nutné v terapii použiť kombináciu minimálne 2 liečiv s antimykobakteriálnym pôsobením. Základnú schému terapie tvorí iniciálne podávanie štvorkombinácie liečiv (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol alebo streptomycin) po dobu 2 mesiacov, následne sa 4 mesiace podáva dvojkombinácia liečiv (isoniazid, rifampicin). K vzniku multirezistentných kmeňov baktérií významne prispieva aj non-compliance zo strany pacientov, ktorá taktiež prispieva aj k zvyšujúcej sa mortalite. Práve z dôvodu čoraz častejšieho výskytu multirezistencie je nutné vyvíjať nové látky s antimykobakteriálnou aktivitou. Ďalším stimulom pre vývoj nových antituberkulotík môže byť relatívne vysoký hepatotoxický potenciál súčasne používaných antimykobakteriálnych liečiv, pričom kombinácia viacerých antituberkulotík vykazuje synergistický účinok na hepatotoxicitu v porovnaní s monoterapiou. Lepšie poznanie mykobaktérií by mohlo byť nápomocné pri vývoji nových liečiv, resp. hľadani nových cieľov, voči ktorým bude účinok liečiva zameraný (Palomino, Martin, 2014, Katzung a kol., 2012, Singh a kol., 2011).

V experimentálnej časti diplomovej práce sme sa zaoberali štúdiom cytotoxicity látok s preukázaným antimykobakteriálnym pôsobením. Základná chemická štruktúra testovaných novo nasyntetizovaných látok je odvodená od antituberkulotika isoniazidu, ktoré je liečivom prvej línie v terapii tuberkulózy. Jednotlivé látky sa odlišujú substituentom R na základnej štruktúre.

Viabilita buniek bola hodnotená *in vitro* po 24 a 48 hodinách inkubácie s príslušnou testovanou látkou. V experimente bola použitá bunková línia HepG2, pochádzajúca z hepatocelulárneho karcinómu, ktorá sa považuje za zlatý štandard pri testovaní cytotoxicity v *in vitro* podmienkach. Bunky bunkovej línie HepG2 boli použité ako lacnejšia alternatíva primárnych ľudských hepatocytov, ktoré sú drahé, vzácne kvôli nedostatku darcov, vyžadujú zložitejšie laboratórne uchovávanie a vyznačujú sa veľkou mierou heterogenity. HepG2 bunky síce majú schopnosť vylučovať špecifické pečenevé plazmatické proteíny, no v porovnaní s primárnymi ľudskými hepatocytmi je ich biotransformačná aktivita veľmi nízka. V experimente bola použitá kolorimerická metóda (MTS test), pri ktorej dochádzalo k chemickej redukcii reagentu (MTS) na farebný produkt (formazan) a to vplyvom enzymatickej aktivity prítomnej len vo viabilných bunkách (Bulutoglu a kol., 2020, Fröhlich, 2018).

Sledovaným parametrom pre určenie miery cytotoxického pôsobenia testovaných látok bola hodnota strednej inhibičnej koncentrácie  $IC_{50}$ , ktorá predstavuje koncentráciu potrebnú na zníženie viability buniek o 50%.

Vačšina novo nasyntetizovaných látok, ktoré boli testované, nemala v testovanom koncentračnom rozmedzí 1-1000  $\mu\text{M}$  cytotoxický efekt na bunky bunkovej línie HepG2. Testovaná látka HE-4H sa javila po 24 aj 48 hodinách inkubácie ako netoxická v testovanom koncentračnom rozmedzí, jej hodnota  $IC_{50}$  sa nedala stanoviť. Hodnoty  $IC_{50}$  pre látky HE-4Me, HE-4OMe, HE-4F, HE-4Cl, HE-4Br, HE-THYM prevyšovali hodnotu najvyššej testovanej koncentrácie ako po 24, tak aj po 48 hodinách inkubácie s HepG2 bunkami. Hodnoty  $IC_{50}$  sa u týchto látok pohybovali v rozmedzí 1723-48887  $\mu\text{M}$ . U látok HE-IRGAS a HE-1NAFT bolo zaznamenané cytotoxické pôsobenie na bunky radovo v stovkách  $\mu\text{M}$ , pričom najviac cytotoxická bola látka HE-IRGAS s hodnotami  $IC_{50}$  227,9  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovej inkubácii a 34,77  $\mu\text{M}$  po 48 hodinovej inkubácii. V prípade, že posledné dve zmieňované látky nebudú vykazovať výrazne lepšie výsledky v ďalších preklinických testoch, by bolo vhodné sa z toxikologického hľadiska zamerať na ostatné látky skupiny, ktoré vykazujú aspoň o rad vyššie hodnoty  $IC_{50}$ , teda nižšiu cytotoxicitu. Vyradenie neúčinných látok a látok neperspektívnych z hľadiska ich cytotoxicity je prínosné taktiež z hľadiska redukcie počtu použitých laboratorných zvierat v rámci preklinického hodnotenia liečiv.

U látok HE-4Me, HE-4OMe a HE-THYM bola zaznamenaná hodnota  $IC_{50}$  po 48 hodinách inkubácie vyššia ako hodnota po 24-hodinovom pôsobení látky na bunky.



Očakávali sme vyššie hodnoty strednej inhibičnej koncentrácie  $IC_{50}$  po 24 hodinovej inkubácii a naopak nižšie hodnoty  $IC_{50}$  po 48 hodinovej inkubácii, keďže látka pôsobila na bunky dlhší čas. Predpokladali sme teda, že čím dlhšie bude látka na bunky pôsobiť, tým nižšia koncentrácia látky bude stačiť na usmrtenie 50% buniek. Odchýlka môže byť daná faktom, že väčšina látok sa javila v testovanom koncentračnom rozmedzí ako netoxické, preto stanovená hodnota  $IC_{50}$  nemusí byť presná, u niektorých látok sa dokonca nedala táto hodnota stanoviť. Ďalšou možnosťou vysvetlenia môže byť adaptácia buniek na toxický efekt skúmaných látok v čase. Keďže sa jedná o vývojové látky, nevieme s určitosťou odhadnúť ich celkové pôsobenie na bunky, ak by látky podporovali bunkovú proliferáciu, mohlo by dôjsť k zvýšeniu počtu buniek, čo by sa v našom prípade prejavilo zvýšením metabolickej aktivity, pomocou ktorej určujeme viabilitu buniek a to by sa následne prejavilo vyššou hodnotou  $IC_{50}$ . Odchýlka mohla taktiež vzniknúť pri výpočte strednej inhibičnej koncentrácie, či pri spracovaní a analýze dát.

Hodnota  $IC_{50}$  isoniazidu bola podľa štúdie kolektívu autorov Vavříková a kol. (2011) stanovená pre HepG2 bunky na 6,26  $\mu$ M. Vývojové látky v porovnaní s isoniazidom majú výrazne vyššie hodnoty stredných inhibičných koncentrácií ( $IC_{50}$ ), vykazujú teda výrazne nižšiu cytotoxicitu na HepG2 bunky. Ak by sme brali ohľad len na toto hľadisko, tak sú všetky skúmané látky vhodné na ďalšie testovanie, pretože vykazujú výrazne nižšiu cytotoxicitu (hodnoty  $IC_{50}$  sú o niekoľko rádov vyššie) než isoniazid. Keďže sa ale jedná o novo nasyntetizované látky, nemáme ešte k dispozícii údaje o účinnej koncentrácii daných látok v terapii a preto momentálne nemôžeme posúdiť ich bezpečnosť (Vavříková a kol., 2011).

## 8 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo určiť vplyv novo nasyntetizovaných látok s preukázaným antimykobakteriálnym pôsobením na viabilitu buniek *in vitro* podmienkach. V experimente bola použitá bunková línia HepG2 pochádzajúca z hepatocelulárneho karcinómu. Sledovaná bola viabilita buniek po 24 a 48-hodinovej inkubácii s jednotlivými testovanými látkami. Viabilita bola hodnotená prostredníctvom kolorimetrickej metódy CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS test). Namerané hodnoty boli štatisticky spracované a bola určená hodnota strednej inhibičnej koncentrácie IC<sub>50</sub> pre jednotlivé skúmané látky.

Zo získaných hodnôt vyplýva, že najviac cytotoxická bola látka HE-IRGAS s hodnotami IC<sub>50</sub> 227,9 μM po 24 hodinách a 34,77 μM po 48 hodinách inkubácie. Druhou v poradí bola látka HE-1NAFT s hodnotami IC<sub>50</sub> 807,2 μM po 24 hodinách a 539 μM po 48 hodinách inkubácie. U látky HE-4H nebolo možné stanoviť hodnotu IC<sub>50</sub>, pretože v testovanom koncentračnom rozmedzí bola pre bunky netoxická. Hodnota IC<sub>50</sub> u ostatných látok značne prevyšovala najvyššiu testovanú koncentráciu.

Všetky hodnotené novo nasyntetizované látky s antimykobakteriálnym pôsobením sú vhodné pre ďalšie preklinické hodnotenie za predpokladu, že antimykobakteriálne účinná koncentrácia pre jednotlivé látky je nižšia ako ich hodnota IC<sub>50</sub>. V prípade, že antimykobakteriálne účinná koncentrácia bude u všetkých látok radovo rovnaká, bolo by potrebné zvážiť ďalšie preklinické testovanie dvoch najviac toxických látok HE-IRGAS a HE-1NAFT, ktorých hodnoty IC<sub>50</sub> sú aspoň o 1-2 rady nižšie než je tomu u ostatných testovaných látok. V prípade, ak by boli hodnoty účinnej koncentrácie a strednej inhibičnej koncentrácie blízke, je nutné v ďalšom preklinickom hodnotení postupovať veľmi opatrne.

## 9 Zoznam použitej literatúry

1. Adigun R, Basit H, Murray J. Cell Liquefactive Necrosis. 2020. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
2. Alberts, B. Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 1998; 572-590.
3. Andrade C. Bioequivalence of generic drugs. J Clin Psychiatry. 2015;76(9):1130-1.
4. Andrade C. Bioequivalence of generic drugs: a simple explanation for a US Food and Drug Administration requirement. J Clin Psychiatry. 2015;76(6):742-4.
5. Anonym. Protocols & Applications Guide. Promega. 2006: 1-243.
6. Arab, Zahra & Shahbazi-Gahrouei, Daryoush & Abbasian, Mahdi & Fesharaki, Mehrafarin. Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells. Journal of Medical Signals and Sensors. Vol 6,2. 2016; 112-6.
7. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998; 28;281(5381):1305-8.
8. Belcher SM, Burton CC, Cookman CJ, Kirby M, Miranda GL, Saeed FO, Wray KE. Estrogen and soy isoflavonoids decrease sensitivity of medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor cells to chemotherapeutic cytotoxicity. BMC Pharmacol Toxicol. 2017;18(1):63.
9. Bertram G. Katzung, Susan B. Masters & Anthony J. Trevor. Basic and Clinical Pharmacology. Mcgraw-Hill Book Co. 2012: 839-849
10. Brodniewicz-Proba T. The scope and requirements related to preclinical and clinical studies of a new medicinal product, including biotechnological and biosimilar products. Acta Pol Pharm. 2008; 65(6):641-645.
11. Bulutoglu B, Rey-Bedón C, Mert S, Tian L, Jang YY, Yarmush ML, Usta OB. A comparison of hepato-cellular in vitro platforms to study CYP3A4 induction. PLoS One. 2020;15(2):e0229106.
12. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(1):49-63.
13. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. Methods Mol Biol. 2015;1250:77-93.
14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

15. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907-16.
16. Fröhlich E. Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46: 1091-1107.
17. Goodman, Louis S., Laurence L. Brunton, Bruce Chabner, and Björn C. Knollmann. *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: McGraw-Hill, 2011: 1-17, 1549-1571.
18. Honek, J. Preclinical research in drug development. *Medical writing.* 2017; 26(4): 1-4.
19. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239-49.
20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
21. Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(1):35-42.
22. Kittnar, O. *Lékařská fyziologie.* Praha: Grada, 2011; 11-59.
23. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
24. Kuete, V., O. Karaosmanoglu a H. Sivas. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa.* Elsevier, 2017: 271-297.
25. Lincová, D. a Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie.* Praha: Galén, 2002; 495-500.
26. Martínková, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2., zcela přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada Publishing, 2018; 319-321
27. McIlwain, David R., et al. "Caspase Functions in Cell Death and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 5, no. 4, 2013. MOHS, Richard C. a Nigel H. GREIG. *Drug discovery and development: Role of basic biological research. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions.* 2017; 3(4): 651-657.

28. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:489-517.
29. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr Chem Genomics.* 2009;3:33-41.
30. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel).* 2014;3(3):317-40.
31. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia.* 2007;11(3):108-13.
32. Parasuraman, S. "Toxicological screening." *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics,* 2011; 2(2): 74-79.
33. Peternel L, Kotnik M, Prezelj A, Urleb U. Comparison of 3 cytotoxicity screening assays and their application to the selection of novel antibacterial hits. *J Biomol Screen.* 2009;14(2):142-50.
34. Polson AG, Fuji RN. The successes and limitations of preclinical studies in predicting the pharmacodynamics and safety of cell-surface-targeted biological agents in patients. *Br J Pharmacol.* 2012;166(5):1600-2.
35. Rang, H., Ritter, J., Flower, R., Henderson, G. and Dale, M. *Rang And Dale's Pharmacology.*: Elsevier, Churchill Livingstone. 2016: 66-77.
36. Ritter, J., Lewis, L., Mant, T., Ferro, A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics,* 5Ed. London: CRC Press. 2008: 334-340.
37. Sládek, Z. *Buněčná biologie.* Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 2007: 83-94.
38. Singh, Meenakshi & Sasi, Preetha & Rai, Gaurav & Gupta, Vinod & Amarapurkar, Deepak & Wangikar, Pramod. Studies on toxicity of antitubercular drugs namely isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in an in vitro model of HepG2 cell line. *Medicinal Chemistry Research.* 2011: 1611-1615.
39. Součková, L., et al. "Jak se vyvíjí nový lék." *Practical pharmacy* 2015; 11(4): 144-147.
40. Starobová, O., et al. "Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity." 2006: 3-17.
41. Suchý, D., et al. "Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv." *Czech urology.* 2009; 13(2): 141-148

42. Švihovec, J., Bultas J., Anzenbacher P. , Chládek J., Příborský J. , Slíva J., Votava M., ed. Farmakologie. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2018; 353-380.
43. Takagi, Atsuya, Kiyoshi Sekita, Minoru Saitoh a Jun Kanno. ACUTE, SUBCHRONIC AND CHRONIC TOXICITY STUDIES OF A SYNTHETIC ANTIOXIDANT, 2,2'-ISOBUTYLIDENE BIS(4,6-DIMETHYLPHENOL) IN RATS. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2005, 30(4).
44. Teicher, Beverly A. a Paul A. Andrews. *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2004.
45. Tomioka H, Namba K. Development of antituberculous drugs: current status and future prospects. *Kekkaku*. 2006;81(12):753-74.
46. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev*. 2015;23:90-100.
47. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*. 1997;25(1):82-8.
48. Vavříková E et al. Cytotoxicity decreasing effect and antimicrobial activity of chitosan conjugated with antituberculous drugs. *Carbohydr Polym*. 2011; 83: 1901-7.
49. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.

## ELEKTRONICKÉ ZDROJE

1. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; USA. In: Promega. 2020. Dostupné na URL: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-\\_mts\\_/?catNum=G3582](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582) Prístup 29. 3. 2020
2. Anonym. Cell Culture Basics Handbook, In: TermoFisher Scientific. 2020. Dostupné na URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf> Prístup 29.3.2020
3. FDA. Generic Drugs: Overview and Basics,USA. 2017. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/drugs/generic-drugs/overview-basics> Prístup: 5.9.2020
4. FDA. Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals, USA. 2010. Dostupné na URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m3r2-nonclinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-and-marketing-authorization> Prístup: 5.9.2020
5. Gewies A. Introduction to apoptosis. 2003, 1-26. Dostupné na URL: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm> Prístup 16.4.2020
6. LF1 (1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy). Buněčná smrt. 2010. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/nekroza/nekrosa.pdf> Prístup 23.4.2020
7. Šípek A. jr. Genetika - Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii. 2012. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/bunecna-smrt> Prístup 25.3.2020
8. World Health Organization. Handbook: Non-clinical Safety Testing. WHO drug information (Vol. 18). 2004. Dostupné z [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68533/1/TDR\\_PRD\\_NCT\\_04.1.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68533/1/TDR_PRD_NCT_04.1.pdf) Prístup 10.9.2020