

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENÍ POTENCIÁLNÍHO
CYTOTOXICKÉHO PŮSOBENÍ
EXPERIMENTÁLNÍCH LÁTEK *IN VITRO***

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Barbora Osinková

„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“.

.....

Barbora Osinková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Janě Maixnerové Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, její ochotu, trpělivost, věcné rady i připomínky a v neposlední řadě také za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala Katedře farmakologie a toxikologie za umožnění provést experiment a také Katedře organické a bioorganické chemie za vzorky testovaných látek.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Barbora Osinková

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení potenciálního cytotoxického působení experimentálních látek *in vitro*

Předmětem této diplomové práce bylo vyhodnocení cytotoxického potenciálu nově syntetizovaných látek *in vitro* na buněčném modelu HepG2, což je buněčná linie získaná z lidského jaterního karcinomu. Testované látky byly syntetizovány v rámci Univerzity Karlovy na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové (GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3). Tyto látky jsou zkoumány pro předpokládané antimikrobiální působení vůči G⁺ bakteriím a houbám nebo pro schopnost inhibovat cholinesterázy.

Pro *in vitro* stanovení cytotoxicity bylo využito komerční kolorimetrické metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, jejíž principem je měření metabolické aktivity buněk na základě redukce tetrazoliové soli MTS na barevný formazan. Pro stanovení počtu životaschopných buněk a vyhodnocení cytotoxického potenciálu zkoumaných látek na HepG2 buněčnou linii bylo využito střední inhibiční koncentrace IC₅₀. Získané hodnoty byly následně porovnávány s lékovými standardy – tamoxifenem a amfotericinem B.

Z výsledků získaných provedením MTS testu vyplývá, že poměrně nízká hodnota IC₅₀ většiny experimentálních látek (pod 100 μM) ukazuje na jejich významný cytotoxický potenciál vůči HepG2 buněčné linii. Největší cytotoxický potenciál vůči HepG2 buněčné linii byl vyhodnocen u látky GUAM-11. Zanedbatelný cytotoxický potenciál vůči HepG2 buňkám naopak vykazovaly látky GUAM-12, GUAM-NH₂, GUAM a THIOSEMIK s hodnotami IC₅₀ > 500 μM.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Barbora Osinková

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of potential cytotoxic effect of experimental substances *in vitro*

The subject of this master's thesis was to evaluate the cytotoxic potential of newly synthesized substances *in vitro* in the cell model HepG2, which is cell line obtained from a human liver carcinoma. These substances were synthesized within the Department of Organic and Bioorganic Chemistry at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University (GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3). These substances are being investigated for assumed antimicrobial activity against G⁺ bacteria and fungi or for their ability to inhibit cholinesterases.

The commercial colorimetric method CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay was used for *in vitro* determination of cytotoxicity, the principle of which is to measure the metabolic activity of cells based on the reduction of the tetrazolium salt of MTS to coloured formazan. The half-maximal inhibitory concentration IC₅₀ was used to determine the number of viable cells and for evaluation of cytotoxic potential of the experimental substances on the HepG2 cell line. The obtained values were subsequently compared with drug standards – tamoxifen and amphotericin B.

The results obtained by carrying out the MTS assay showed that the relatively low IC₅₀ value of most experimental substances (below 100 µM) indicates their significant cytotoxic potential against the HepG2 cell line. The greatest cytotoxic potential against the HepG2 cell line was evaluated for GUAM-11. In contrast, substances GUAM-12, GUAM-NH₂, GUAM and THIOSEMIK with IC₅₀ values > 500 µM showed negligible cytotoxic potential against HepG2 cells.

Obsah

1	Seznam zkratek	1
2	Úvod.....	3
3	Teoretická část	4
3.1	Vývoj nových léčiv	4
3.2	Cytotoxicita a její význam ve vývoji nových léčiv	6
3.3	Metody stanovení cytotoxicity a buněčné viability <i>in vitro</i>	6
3.4	Kolorimetrické metody využívající tetrazoliové soli.....	9
3.4.1	MTT test.....	9
3.4.2	XTT test	10
3.4.3	MTS test (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay).....	12
3.4.4	WSTs testy	13
3.5	Cholinesterázy a jejich inhibitory	14
3.5.1	Inhibitory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.....	16
3.6	Antimikrobiální léčiva	18
3.6.1	Antibiotika účinná proti G+ bakteriím.....	18
3.6.2	Antimykotika	19
3.7	Buněčné kultury	21
3.7.1	Typy buněčných kultur	21
3.7.2	Buněčná linie HepG2	22
3.8	Použité standardy	24
3.8.1	Amfotericin B.....	24
3.8.2	Tamoxifen	25
4	Cíle práce	28
5	Experimentální část.....	29
5.1	Použitý materiál	29

5.1.1	Přístroje a pomůcky.....	29
5.1.2	Testované látky a další chemikálie	29
5.1.3	Testované látky	30
5.1.4	Buněčný model.....	32
5.2	Použité metody.....	32
5.2.1	Příprava fosfátového pufru o pH 7,4.....	32
5.2.2	Příprava buněčné linie HepG2	33
5.2.3	Příprava roztoků testovaných látek	34
5.2.4	Stanovení cytotoxicity metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.....	35
6	Výsledky	37
6.1	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	37
7	Diskuse.....	42
8	Závěr	45
9	Literatura.....	46
10	Přílohy.....	53

1 Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
ACh	acetylcholin
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesteráza
CFDA-AM	5-karboxyfluorescein diacetát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
GF-AFC	glycylfenylalanyl-aminofluorokumarin
HepG2	lidská buněčná linie hepatoblastomu
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1
LDH	laktátdehydrogenáza
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid – oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid – redukována forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NR	neutrální červeň

NRU	neutral red uptake (příjem neutrální červeně)
PBS	fosfátový pufr
PES	fenazin ethylsulfát
PMS	fenazin methylsulfát
SERM	selektivní modulátory estrogenových receptorů
SRB	sulforhodamin B
TGF- β	transformující růstový faktor β
WSTs	ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (water-soluble tetrazolium salts)
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

2 Úvod

Hepatotoxicita je spolu s kardiotoxicitou jedním z nejčastějších důvodů stažení léčiv z trhu. Při vývoji nových léčiv je stěžejní provádět různé bezpečnostní a toxikologické studie. Mezi tyto studie řadíme například *in vitro* nebo *in vivo* stanovení cytotoxicity. (Giordanetto 2018)

Cytotoxicita je zásadní charakteristikou nově vyvíjených sloučenin, pomocí níž je možné odhadnout bezpečnostní rizika dané látky po podání člověku. Studie cytotoxicity probíhají již v raných fázích (tj. v preklinickém hodnocení), aby se předešlo případnému ohrožení zdraví pacientů, vyhnulo se významným finančním ztrátám a nemarnil se čas s vývojem neperspektivních sloučenin. (Bácskay et al. 2018)

V dnešní době je cytotoxicita testována zejména na *in vitro* modelech (izolovaných buňkách, tkáních či orgánech), které predikují cytotoxicitu *in vivo* a minimalizují použití laboratorních zvířat. Z důvodu komplexního působení léčiva na organismus se zatím nepodařilo vyvinout takový *in vitro* model, který by umožnil porozumět celé farmakokinetice i farmakodynamice vyvíjené látky a plně nahradil použití pokusných zvířat. (Giordanetto 2018)

Cílem teoretické části je seznámit s problematikou vývoje nových léčiv a rozličnými metodami stanovení buněčné viability a cytotoxicity *in vitro*. Dále bylo cílem stručně shrnout poznatky o antimikrobních léčivech, inhibitech cholinesteráz, buněčných kulturách a na závěr definovat buněčnou linii HepG2 spolu se standardy, kterých bylo využito v praktické části diplomové práce.

Praktická část diplomové práce se zabývá stanovením cytotoxicity *in vitro* 11 nových vývojových látek (GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3). Tyto látky jsou zkoumány pro svoji potenciální antimikrobní aktivitu proti gram pozitivním bakteriím a houbám, dále je u nich předpokládáno inhibiční působení na cholinesterázy. Jako buněčný model byla využita HepG2 buněčná linie. Ke stanovení střední inhibiční koncentrace IC₅₀ byla zvolena kolorimetrická metoda CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay.

3 Teoretická část

3.1 Vývoj nových léčiv

Výzkum a vývoj nových chemických látek se dostal do popředí zájmu na konci 19. století, a to především díky syntéze acetylsalicylové kyseliny chemikem Hoffmanem společně s uvedením Aspirinu na trh německou firmou Bayer. Výrazný rozmach farmaceutického průmyslu byl zaznamenán ve druhé polovině 20. století, a proto je toto období někdy označováno jako „zlatá éra“. Došlo k objevu a vývoji značného množství nových biologicky aktivních látek, které jsou dodnes využívány v terapeutické praxi a v mnoha případech stále nenahraditelné. V rámci Československa bylo vyvinuto více než 45 originálních léčiv, a to zásluhou zejména Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii v Praze a Československé akademie věd, na kterou poté navázala Akademie věd České republiky. Jako příklady látek vyvinutých v Československu lze uvést moxastin-teoklát (Kinedryl), kombinaci propyfenazonu s paracetamolem a kofeinem (Valetol), dosulepin (Prothiaden) nebo benzododecinium-bromid (Ajatin). (Kršiak 2006, Nicolaou 2017, Doležal 2018)

Vývoj nových sloučenin, jakožto potenciálních léčiv, je velmi složitý, multidisciplinární a vícefázový proces, do něhož vstupují tzv. kandidátní molekuly vyselektované ze základního výzkumu. Tyto molekuly následně procházejí jednotlivými vývojovými fázemi, ve kterých jsou podrobeny detailnímu zkoumání. Proces vývoje léčiva se jednoduše rozděluje do dvou etap – preklinické fáze a navazující klinické fáze. (Giordanetto 2018, Suchý 2009)

Preklinická fáze předchází klinickému hodnocení a jejím hlavním účelem je vyhodnocení potenciálního bezpečnostního rizika a dále testování účinnosti vyvíjené látky. V preklinických studiích dnes dominují zejména *in vitro* metody, při kterých se využívá buněčných, tkáňových či orgánových modelů a díky tomu lze minimalizovat využití pokusných zvířat v rámci *in vivo* metod. *In vivo* metody však stále hrají v preklinickém hodnocení nezastupitelnou roli a dosud se nepodařilo najít vhodnou alternativu, která by plně nahradila využití laboratorních zvířat při vývoji nových léčiv. V této fázi jsou zahrnuty farmakologické studie (farmakodynamiky i farmakokinetiky), toxikologické studie složené ze zkoušek akutní i chronické toxicity, včetně speciálních zkoušek hodnotících teratogenitu nebo kancerogenitu. Dále zde v rámci farmaceutického

hodnocení probíhají zkoušky na prokázání identity, složení, čistoty či stability dané látky. Všechny součásti preklinické fáze musí být v souladu s podmínkami Správné laboratorní praxe. (Kršiak 2006, Součková et al. 2015)

Pokud léčivo splní všechny podmínky v rámci preklinické fáze, následuje fáze klinického hodnocení, ve které dochází k prvnímu podání léčiva člověku. Klinické hodnocení se dělí do čtyř fází. První tři fáze se řadí do předregistrační části, poslední fáze pak nastupuje po registraci léčiva na trh. Každá fáze se provádí za jiným účelem. V první fázi je daná látka poprvé podána člověku, respektive malé skupince dobrovolníků – cílem je získat první informace o snášenlivosti a bezpečnosti léčiva, o jeho základní farmakokinetice a nastavit rozsah dávkování. Druhá fáze probíhá na větší skupině (desítky až stovky) pacientů s daným onemocněním a již si klade za cíl zhodnotit (mimo bezpečnost a snášenlivost) také terapeutickou účinnost léčiva. Třetí fáze pak slouží k prokázání terapeutické účinnosti i bezpečnosti léčiva na velkém počtu pacientů (tisíce) – vyvíjené léčivo se zde často srovnává s placebem nebo standardní léčbou (tzv. kontrolované studie). Poregistrační fáze probíhá u reálné populace pacientů v podmínkách běžné klinické praxe, kde se sleduje dlouhodobá bezpečnost, shromažďují se informace o možných rizicích, ale i přínosech (např. rozšíření indikačního spektra). Klinické hodnocení musí probíhat v souladu se zásadami Správné klinické praxe. (Kršiak 2006, Součková et al. 2015, Suchý 2009)

Za vývojem léčiv se skrývají vysoké finanční, časové i personální nároky. Vývoj jednoho léčiva trvá v průměru 12 až 15 let a vyžaduje široký mezioborový tým. Na konci 90. let 20. století činily náklady na výzkum a vývoj 200–300 milionů amerických dolarů. Recentní studie publikovaná časopisem JAMA udává, že průměrné náklady na výzkum a vývoj léčiva v USA činily v letech 2009 až 2018 zhruba 1,3 miliardy amerických dolarů. V předchozích studiích se dokonce odhadovaly průměrné náklady až k částce 2,8 miliard amerických dolarů. Finančně nejnáročnější je III. fáze klinického hodnocení, na kterou se v některých případech vynaloží až 90 % všech nákladů. Rostoucí trend nákladů je pozorován zejména z důvodu stále přísnějších podmínek na bezpečnost léčiv a vyšších požadavků na účinnost léčiv. (Blass 2015, Nicolaou 2014, Součková et al. 2015, Wouters et al. 2020)

Mimo finanční, časovou a personální náročnost se vývoj léčiv potýká také s velmi nízkou úspěšností, a tedy nejistým výsledkem celého procesu. Do preklinického

hodnocení se z 10 000 nových chemických sloučenin dostane průměrně 250 z nich. Pouze 1 z 10 molekul projde úspěšně klinickým hodnocením a stane se registrovaným léčivem. Zhruba 34 % kandidátních molekul pak projde úspěšně z II. fáze do III. fáze klinického hodnocení. Většina molekul je vyřazena z důvodu bezpečnostních rizik nebo nedostatečné terapeutické účinnosti. Pravděpodobnost úspěšného vývoje léčiva, které bude registrováno a uvedeno na trh je zhruba 1:5 000–10 000. (Blass 2015, Giordanetto 2018, Ritter et al. 2020)

3.2 Cytotoxicita a její význam ve vývoji nových léčiv

Cytotoxicita je dle Eisenbranda et al. (2002) potenciál sloučeniny vyvolat buněčnou smrt. Definice podle Čelika (2018) zase charakterizuje cytotoxicitu jako schopnost škodlivých látek nebo mediátorových buněk ničit živé buňky.

Pro vývoj úspěšného léčiva je zpravidla nutné, aby léčivo nevykazovalo cytotoxicitu vůči lidským buňkám. Hepatotoxicita a kardiotoxicita vyvolaná léčivými je nejčastější příčinou stažení léčiva z trhu. Z tohoto důvodu je dnes testování cytotoxicity již běžnou součástí rané fáze vývoje potenciálních léčiv a u kandidátních sloučenin není významný cytotoxický potenciál tolerován (s výjimkou protinádorových léčiv). (Blass 2015, Čelik 2018, Anonym 2022d)

Ukázalo se, že molekuly s vysokým cytotoxickým potenciálem (IC_{50} pod $10 \mu M$) mají daleko vyšší pravděpodobnost selhání již v raných bezpečnostních studiích, a proto může testování cytotoxicity léčiv významně ušetřit čas i náklady snížením pravděpodobnosti neúspěchu v preklinické nebo klinické fázi vývoje potenciálního léčiva. (Anonym, 2022d, Giordanetto 2018)

3.3 Metody stanovení cytotoxicity a buněčné viability *in vitro*

Stanovení cytotoxicity a buněčné viability je využíváno zejména pro „screening buněčné odpovědi“ na léčivo nebo jinou chemickou látku. V dnešní době rozeznáváme širokou škálu metod pro stanovení cytotoxicity či buněčné viability *in vitro*. Tyto metody jsou založené na hodnocení funkčních změn v buňce – změny metabolické aktivity, permeability buněčné membrány, produkce ATP, uvolňování enzymů, příjem barviv apod. (Adan et al. 2016)

Jednotlivé metody pro stanovení cytotoxicity a buněčné viability *in vitro* si lze rozdělit podle charakteru měření do čtyř skupin: mikroskopické metody založené na schopnosti vyloučení barviva, kolorimetrické metody, fluorometrické metody a luminometrické metody. (Aslantürk 2018, Kamiloglu et al. 2020)

Mikroskopické metody založené na schopnosti vyloučení barviva lze označit jako tzv. vitální testy. Jejich podstatou je skutečnost, že se v uhynulých buňkách hromadí tzv. vitální barviva z důvodu neschopnosti vylučovat barvivo aktivním transportem ven z buňky, a proto zůstávají takové buňky obarvené. Živé buňky naopak zůstávají neobarvené, jelikož mají integritu membrány zachovalou a vykazují schopnost aktivního transportu barviva ven z buňky. Mezi vitální barviva se řadí například eosin, erythrosin, kongo červeň nebo nejčastěji využívaná trypanová modř. Procentuální viabilita v buněčné kultuře se následně určuje mikroskopicky pomocí Bürkerovy komůrky, kdy se počítají obarvené (poškozené) buňky a neobarvené (živé) buňky. (Adan et al. 2016, Aslantürk 2018, Philips 1973, Vejražka 2004)

Kolorimetrické metody využívané pro stanovování *in vitro* cytotoxicity a buněčné viability jsou velmi oblíbené díky jejich jednoduchému provedení. Podstatou jednotlivých kolorimetrických testů je měření určitých biochemických markerů k vyhodnocení metabolické aktivity buněk. Principem kolorimetrických testů je použití chemických činidel, které po reakci s buněčnou kulturou mění své zbarvení v závislosti na viabilitě buněk. Barevné produkty jsou pak měřeny spektrofotometricky při dané vlnové délce a výstupem je určitá hodnota absorbance. Ze získaných hodnot absorbance lze dále určit procentuální viabilitu či cytotoxicitu v dané buněčné kultuře. Mezi kolorimetrické metody řadíme širokou škálu testů, přičemž největší skupinu tvoří testy využívající jako činidla různé typy tetrazoliových solí. Tetrazoliové soli jsou kvarterní amoniové soli, které se redukují na barevné formazany. Mezi nejvíce využívané tetrazoliové soli patří 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-karboxymethoxyfenyl]-2-[4-sulfofenyl]-2H-tetrazolium (MTS), 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) a dále novější generace ve vodě rozpustných tetrazoliových solí (WSTs). Kromě testů s tetrazoliovými solemi však do této kategorie řadíme i laktátdehydrogenázový test, který využívá jako indikátor cytotoxicity množství uvolněného enzymu laktátdehydrogenázy (LDH) z cytoplazmy buněk poškozených po jejich inkubaci s vyvíjenou látkou (zdravé buňky tento enzym neuvolňují). Na podobném

principu je založen test s neutrální červení (NRU), ve kterém vystupuje jako indikátor cytotoxicity míra absorpce neutrální červeně v buněčné kultuře po inkubaci s vyvíjenou látkou (pouze zdravé buňky jsou schopné přijímat barvivo a ukládat ho v lysozomech). Jako další příklad lze uvést test se sulforhodaminem B (SRB) nebo test s krystalovou violetí. (Aslantürk 2018, Blass 2015, Kamiloglu et al. 2020)

Fluorometrické metody jsou založeny na měření fluorescence daného vzorku s využitím nefluorescenčních vitálních barviv, které jsou v živé buňce konvertovány na látky schopné emitovat fluorescenční záření. Toto záření se poté detekuje pomocí fluorescenčního mikroskopu, fluorometru, fluorometrické čtečky mikrodestiček nebo průtokového cytometru. K takovýmto barvivům se řadí například 5-karboxyfluorescein diacetát (CFDA-AM), který je intracelulárně konvertován esterázami na fluoreskující karboxyfluorescein nebo dále vitální barvivo Alamarová modř (AlamarBlue) neboli resazurin, které je přeměněno na fluoreskující resorufin. Kromě barviv však mohou být využívány i další látky, jež přeměnou v buňce vysílají fluorescenční signál – například fluorogenní proteázový substrát glycyl-fenylalanyl-aminofluorokumarin (GF-AFC), díky němuž lze následně detekovat živé buňky podle proteázové aktivity, která u poškozených buněk neprobíhá. Fluorometrické metody se v mnohém podobají předešlým metodám, ale mají také řadu výhod, a to například vyšší citlivost oproti kolorimetrickým metodám. (Adan et al. 2016, Aslantürk 2018, Kamiloglu et al. 2020)

Poslední skupinou jsou luminometrické metody, jejichž princip je podobný jako u fluorometrických metod – v obou případech dochází k přeměně chemické energie na světelnou energii. V případě luminometrických metod však není potřeba dodávat vnější zdroj záření pro excitaci elektronů. Je zde využívána existence luminoforů, což jsou látky schopné generovat světlo zpravidla v důsledku změny vnějšího prostředí (pH, teplota apod.). Toto světelné záření je poté detekováno pomocí luminometrické čtečky mikrodestiček. Výhoda luminometrických metod spočívá v jejich rychlém a jednoduchém provedení. Mezi luminometrické metody patří například adenosintrifosfátový (ATP) test, jehož podstatou je přeměna luciferinu na oxyluciferin katalyzovaná luciferázou v přítomnosti ATP a hořčičných iontů za současného vyzáření světla. Existuje zde přímý vztah mezi intenzitou luminiscenčního signálu a intracelulární koncentrací ATP, jenž zde vystupuje jako hlavní indikátor viability buněk. Dalším příkladem je test viability v reálném čase využívající enzym luciferázu z vnějšího zdroje a pro-substrát, který je společně s luciferázou přidáván jako činidlo k buněčné kultuře.

Pro-substrát je pak prostřednictvím metabolických pochodů životaschopných buněk redukován na substrát, který je následně využíván luciferázou ke generování luminiscenčního signálu. (Aslantürk 2018, Kamiloglu et al. 2020, Šafarčík et al. 2018, Riss et al. 2013)

Pro jednotlivé metody existují také různé komerční sety. Jako příklad lze uvést komerční kolorimetrický test CellTiter 96 AQueous One Solution Assay od firmy Promega použitý při *in vitro* testování cytotoxicity experimentálních látek v rámci této diplomové práce.

Pro potřeby diplomové se dále zaměříme pouze na kolorimetrické testy využívající tetrazoliové soli.

3.4 Kolorimetrické metody využívající tetrazoliové soli

Tetrazoliové soli jsou velmi často využívané sloučeniny k detekci životaschopných buněk prostřednictvím měření jejich metabolické aktivity. Jedná se o kvarterní amoniové soli, které jsou bezbarvé nebo pouze slabě zbarvené a jejichž redukcí dochází k přeměně na jasně zbarvené formazanové produkty. (Berridge et al. 2005)

Tetrazoliové soli dělíme do dvou kategorií podle jejich náboje na pozitivně nabitě a negativně nabitě. Pozitivně nabitě sloučeniny jsou schopné samy vstupovat do buněk a mezi tyto sloučeniny řadíme tetrazoliovou sůl MTT. Negativně nabitě sloučeniny naopak nejsou schopné samy pronikat do buňky a je pro ně typická kombinace s intermediárním akceptorem elektronů, který slouží jako přenašeč elektronů a usnadňuje tak redukcí tetrazoliové soli na barevně zbarvený formazan. Negativně nabitě tetrazoliové soli jsou MTS, XTT a ve vodě rozpustné WSTs. (Riss et al. 2013)

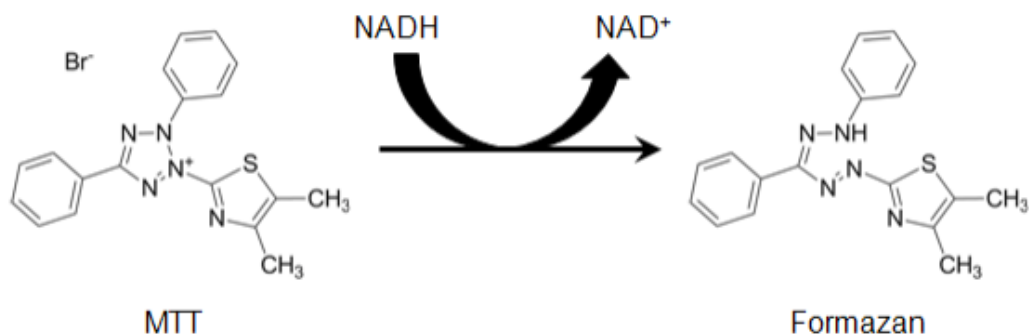
3.4.1 MTT test

MTT test je velmi populární metoda vyvinutá v roce 1983 Mosmannem pro stanovení buněčné viability v rámci proliferačních a cytotoxických testů. Principem je redukce ve vodě rozpustné žluté tetrazoliové soli MTT na fialově zbarvený ve vodě nerozpustný formazan, který se ve formě krystalků hromadí v buňce. Tento proces probíhá pouze u metabolicky aktivních buněk, jelikož je závislý na aktivitě

mitochondriálních enzymů (zpravidla dehydrogenáz nebo oxidoreduktáz) využívajících jako donory elektronů molekuly nikotinamidadenindinukleotid (NADH), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) apod. Zdravé a metabolicky aktivní buňky tak vykazují vysokou míru redukce MTT na formazan, zatímco v mrtvých či metabolicky neaktivních buňkách k přeměně na barevný produkt nedochází. (Almutary a Sanderson 2016, Adan et al. 2016, Bahuguna et al. 2017, Berridge et al. 2005)

Koncentraci formazanu stanovujeme spektrofotometricky po rozpuštění jeho krystalků ve vhodném organickém rozpouštědle (například v dimethylsulfoxidu – DMSO) zpravidla při 540 až 570 nm. Redukující množství MTT je přímo úměrné množství vzniklého formazanu. Naměřená absorbance je pak lineárně úměrná počtu životaschopných buněk v buněčné kultuře. (Adan et al. 2016, Bahuguna et al. 2017, Blass 2015)

Na obrázku 1 je znázorněna redukce žluté MTT tetrazoliové soli na barevný formazan za přítomnosti NADH a mitochondriálních enzymů (reduktáz).



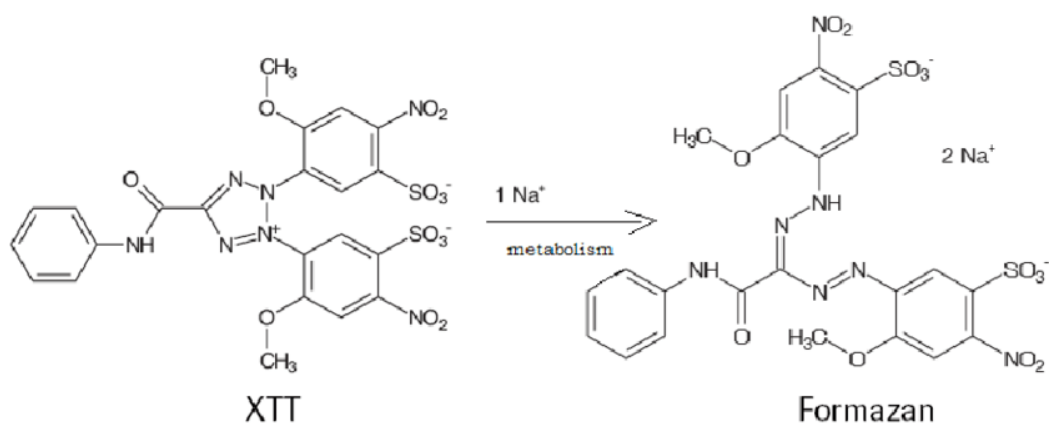
Obr. 1 Redukce MTT tetrazoliové soli na barevný formazanový produkt za současné oxidace redukované formy NADH na oxidovanou formu NAD⁺. Reakce je katalyzovaná mitochondriálními reduktázami. Převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/>

3.4.2 XTT test

Jedná se o kolorimetrickou metodu, která je v principu velmi podobná MTT testu. V této metodě se však využívá jiného typu ve vodě rozpustné tetrazoliové soli – XTT 2,3-

bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilidu. Zatímco u MTT testu vzniká formazanový produkt nerozpustný ve vodě a jeho krystalky je nutné ještě před detekcí rozpustit v organickém rozpouštědle, u XTT testu vzniká redukcí XTT oranžový a ve vodě rozpustný formazanový produkt, což je hlavní výhoda oproti MTT testu. Na reakci se opět podílí mitochondriální enzymy. Díky eliminaci solubilizačního kroku je tedy XTT test časově úspornější. Další postup je opět shodný s MTT testem – spektrofotometricky se měří barevný produkt při vlnové délce kolem 470 nm. Z výsledné absorbance se dále stanoví buněčná viabilita. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu životaschopných buněk. Reakci lze urychlit přidáním intermediárního akceptoru elektronů. (Aslantürk 2018, Berridge et al. 2005)

Na obrázku 2 je znázorněna redukce tetrazoliové soli XTT na oranžově zbarvený a ve vodě rozpustný formazanový produkt prostřednictvím mitochondriálních enzymů.



Obr. 2 Redukce tetrazoliové soli XTT za pomoci mitochondriálních enzymů na ve vodě rozpustný a oranžově zbarvený formazan. Převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-XTT-assay_fig1_279778205

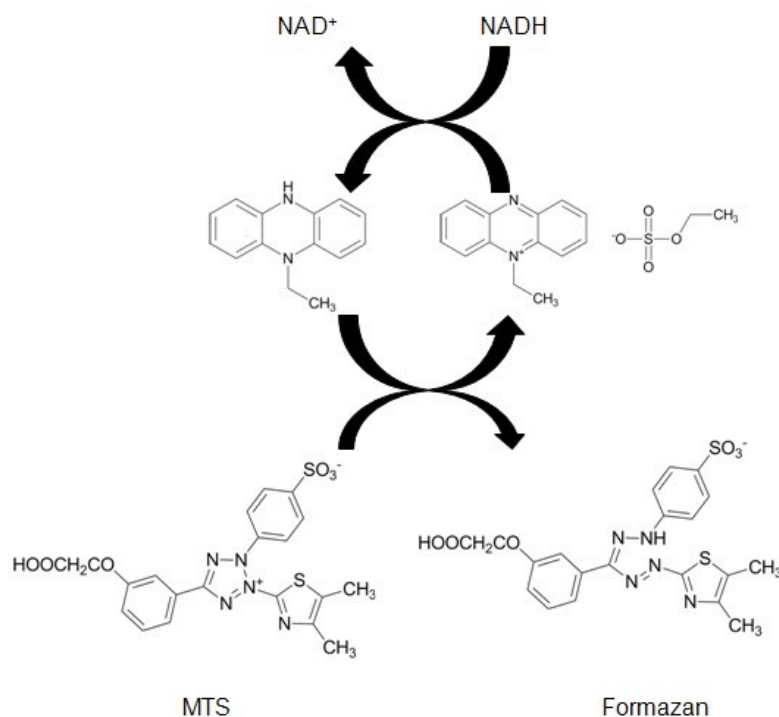
3.4.3 MTS test (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)

MTS test je kolorimetrická metoda určená pro stanovení buněčné viability v testech proliferace i cytotoxicity. V této metodě je využíváno Owenovo činidlo, což je tetrazoliová sůl MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium. Spolu s XTT a WSTs má tetrazoliová sůl MTS schopnost redukovat se v metabolicky aktivních buňkách na barevný formazanový produkt, který je rozpustný v buněčném médiu. Tento fakt je nespornou výhodou oproti MTT testu, jelikož díky tomu odpadá solubilizační krok. V dnešní době se MTS test využívá zejména v podobě komerčního kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. (Anonym 2012, Riss et al. 2013)

Dalším rozdílem od MTT testu je použití dvou reagentů – tetrazoliové soli MTS a intermediárního akceptoru elektronů. Tento akceptor je schopný pronikat do životaschopných buněk, přenášet elektrony z redukčních ekvivalentů NADH a využít je k redukcí MTS na ve vodě rozpustný formazanový produkt. Takovou látkou může být např. fenazin ethylsulfát (PES) a fenazin methylsulfát (PMS). Reakce probíhá pouze u životaschopných buněk s aktivním metabolismem prostřednictvím NAD(P)H-dependentních enzymů. (Anonym 2012, Kamiloglu et al. 2020, Riss et al. 2013)

Následně je spektrofotometricky měřena absorbance při vlnové délce 490 nm. Množství vzniklého barevného formazanu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk. (Anonym 2012)

Na obrázku 3 je zobrazena redukce tetrazoliové soli MTS na formazanový produkt a přenos elektronu pomocí PES, který slouží jako intermediární akceptor elektronů z NADH na tetrazoliovou sůl MTS za vzniku NAD^+ a barevného formazanového produktu, který je rozpustný ve vodě.



Obr. 3 Schéma reakce MTS testu: intermediární akceptor elektronů – fenazinethylsulfát (PES) přenáší elektron z NADH na tetrazoliovou sůl MTS za vzniku oxidované formy NAD^+ a barevně zbarveného formazanového produktu. Převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F6/>

3.4.4 WSTs testy

WSTs (angl. water soluble tetrazolium salts) je novější generace ve vodě rozpustných tetrazoliových solí, které se za účasti mitochondriálních dehydrogenáz redukují na vysoce rozpustné formazanové produkty. Jedná se o negativně nabitě tetrazoliové soli vyžadující pro průchod do buňky přítomnost intermediárního akceptora elektronů. Rozlišujeme WST-1, WST-3, WST-4, WST-5, WST-8 a WST-9. Nejvíce využívanými je sůl WST-1 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium a WST-8 2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium. (Chamchoy et al. 2019, Kamiloglu et al. 2020)

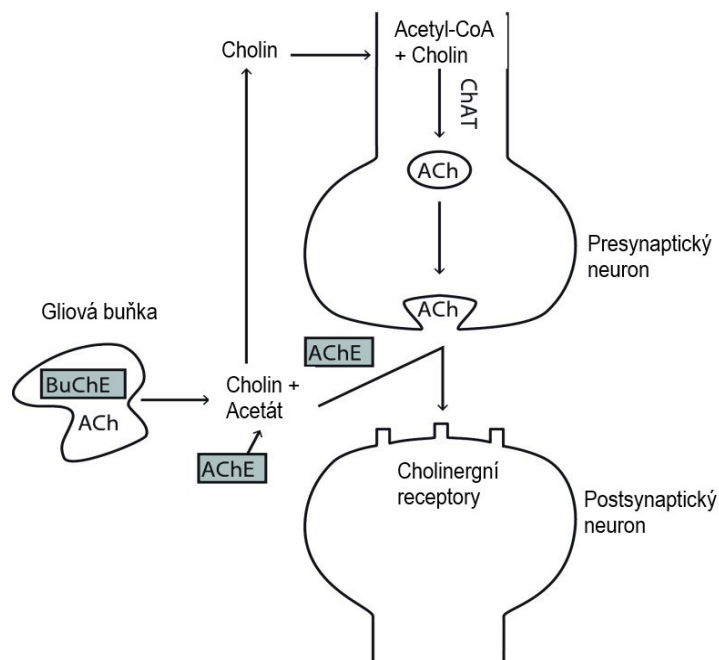
Testy s WSTs jsou v principu velmi podobné jako například MTT test, nicméně vzniklý formazan je rozpustný v buněčném médiu (a v porovnání s XTT a MST testem je vzniklý produktem ještě rozpustnější), díky čemuž odpadá solubilizační krok. WST-1 test je podobně citlivý jako XTT test, ale oproti němu je méně toxický. WST-8 je ze všech výše uvedených metod nejcitlivější. Výhodou těchto testů je také jejich stabilita a rychlost. (Chamchoy et al. 2019, Kamiloglu et al. 2020, Ngamwongsatit et al. 2008, Scarcello et al. 2020)

Metoda s WSTs je opět využívána ke stanovení buněčné viability a detekce probíhá spektrofotometricky. Získaná absorbance formazanového produktu je pak přímo úměrná metabolické aktivitě, resp. životaschopnosti buněk. (Chamchoy et al. 2019, Kamiloglu et al. 2020, Scarcello et al. 2020)

3.5 Cholinesterázy a jejich inhibitory

Již velmi dlouho se ví, že za odbourávání, tj. hydrolýzu acetylcholinu (ACh) z neuronálních synapsí v centrální nervové soustavě (CNS) jsou zodpovědné dva základní enzymy – acetylcholinesteráza (AChE) rozkládající ACh na cholin s acetátem a butyrylcholinesteráza (BuChE) štěpící ACh za vzniku cholinu a kyseliny máselné. Tímto enzymatickým procesem (viz. Obr. 4) je synaptický přenos ukončen a cholin, který se při tomto procesu uvolnil je recyklován a opětovně přenesen do neuronálních zakončení, kde je využit pro novou syntézu ACh. Obecně se tedy jedná o enzymy, jejichž hlavní rolí je snížit koncentraci ACh (případně dalších esterů cholinu) v neuronálních synapsích a utlumit cholinergní neurotransmisi v CNS. (Atatreh et al. 2019, Švihovec et al. 2018)

Ačkoliv oba enzymy AChE i BuChE odbourávají ACh, existují mezi nimi výrazné odlišnosti. Liší se jejich substrátová specificita, enzymová kinetika, exprese, aktivita v různých částech CNS, ale i genová regulace. (Lane et al. 2006)



Obr. 4 Odbourávání acetylcholinu acetylcholinesterázou a butyrylcholinesterázou (ACh = acetylcholin, AChE = acetylcholinesteráza, BuChE = butyrylcholinesteráza, ChAT = cholinacetyltransferázy, CoA = koenzym A. Převzato a upraveno : <https://europepmc.org/article/PMC/3733526>

Příkladem odlišnosti těchto enzymů může být jejich distribuce v lidském organismu a jejich specifická k ACh. AChE je enzym vázaný na membránu, vysoce specifický pro acetylcholin, který se nachází ve vysoké koncentraci v CNS. BuChE je naproti tomu enzym, který štěpí i jiné estery cholinu (butyrylcholin a propionylcholin) a v CNS dosahuje řádově nižších koncentrací než AChE. V CNS je BuChE lokalizována zejména v gliových a epiteliálních buňkách, ale spíše je distribuována mimo CNS. Uvádí se, že koncentrace BuChE v lidském těle je až 10x vyšší, než je koncentrace AChE. (Atatreh et al. 2019, Lane et al. 2006, Švihovec et al.)

Ukazuje se, že při některých neurodegenerativních chorobách slouží BuChE jako klíčový koregulator hladin ACh v CNS. Příkladem takového onemocnění může být Alzheimerova choroba (AD). Zatímco hladiny AChE v určitých částech CNS se zhoršením progresu AD klesají až o 85 %, hladiny BuChE s progresí onemocnění rapidně stoupají, čímž inhibice BuChE při terapii AD nabývá na významu. (Atatreh et al. 2019, Mushtaq et al. 2014)

Cholinerní deficit spojený se zvýšenou aktivitou cholinesteráz je typickým nálezem u neurodegenerativních onemocnění, jako je například AD. V terapii AD, ale případně i dalších typů demence, se proto jako kognitiva využívají v klinické praxi právě tzv. inhibitory cholinesteráz (zejména inhibitory AChE), které reverzibilně či ireverzibilně blokují tyto enzymy a zpomalují tak progresi onemocnění spojených s cholinerním deficitem. (Mushtaq et al. 2014)

3.5.1 Inhibitory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy

Jak už bylo zmíněno AChE a BuChE jsou hlavní enzymy odbourávající ACh a z toho důvodu se stávají hlavním terapeutickým cílem při terapii onemocnění spojených s cholinerním deficitem. Mechanismem účinku inhibitorů cholinesteráz je reverzibilní, pseudoireverzibilní nebo ireverzibilní vazba na AChE a v menší míře i BuChE, čímž dochází k posílení cholinerní aktivity a zamezení degradace ACh. (Švihovec et al. 2018)

Mezi ireverzibilní inhibitory cholinesteráz se řadí organofosfáty, které se v terapii nevyužívají, ale našly využití jako pesticidy nebo jsou zneužívány jako bojové látky. (Ritter et al. 2020, Švihovec et al. 2018)

Periferní reverzibilní inhibitory cholinesteráz se v souhrnu využívají k léčbě myastenia gravis, střevní atonie, atonické obstipace, atonie močového měchýře, pooperační retence moči, centrální a periferní parézy nebo jsou využívány při otravách anticholinergiky či ke zvrácení myorelaxačního účinku depolarizujících myorelaxancií. Řadí se sem edrofonium, ambenonium, neostigmin, pyridostigmin, distigmin a fysostigmin. (SPC přípravku Syntostigmin, SPC přípravku Mestinon, SPC přípravku Ubredit, SPC přípravku Mytelase, Švihovec et al. 2018)

Pro symptomatickou léčbu lehké až středně závažné AD či jiných typů demence se využívají centrální reverzibilní inhibitory cholinesteráz – donepezil a galantamin anebo pseudoireverzibilní inhibitor cholinesteráz – rivastigmin.

Mezi reverzibilní inhibitory selektivní k AChE řadíme donepezil a galantamin. Tyto látky se navážou na enzym a vytvoří s ním reverzibilní komplex pomocí slabých vazebných sil, v důsledku čehož je enzym reverzibilně blokován po dobu, kdy je látka přítomna v krevní plazmě. Galantamin je navíc alosterický modulátor na nikotinových

acetylcholinových receptorech, čímž zesiluje vlastní účinek ACh. (Lane 2006, Marques et al. 2010, SPC přípravku Galantamin Mylan, SPC přípravku Donepezil Mylan)

Rivastigmin je pseudoireverzibilní neselektivní inhibitor AChE a BuChE. Mechanismus účinku rivastigminu spočívá v kovalentní vazbě na tyto enzymy a tvorbě komplexu, který způsobí jejich dočasnou inaktivaci a znemožní jim tak degradovat ACh. Aktivita enzymu se navrácí cca za 9 hodin od podání inhibitoru. (Marques et al. 2010, SPC Rivastigmin Actavis)

3.6 Antimikrobiální léčiva

Mezi antimikrobiální léčiva řadíme látky, které působí na mikroorganismy a jsou tak využívány k prevenci a léčbě infekcí u lidí, zvířat i rostlin. Tato léčiva se mohou rozlišovat dle různých kritérií. Podle původu rozlišujeme látky přírodní, polosyntetické a syntetické. Dále dělíme antimikrobiální léčiva podle toho, zda mají schopnost inhibovat růst mikroorganismů na mikrobiostatická nebo mikrobicidní, pokud mají schopnost přímo dané mikroorganismy zabít. Nejzásadnější dělení je pak podle typu mikroorganismu, proti kterému látka působí. Rozlišujeme antibiotika (proti bakteriím), antivirotika (proti virům), antimykotika (proti houbám) a antiparazitika (proti parazitům). (Asif 2017)

Tato práce je věnovaná nově syntetizovaným látkám, u kterých je předpokládána různá míra aktivity proti grampozitivním (G+) bakteriím nebo houbám. Z tohoto důvodu se více zaměříme na tyto skupiny léčiv.

3.6.1 Antibiotika účinná proti G+ bakteriím

G+ bakterie mají silnou peptidoglykanovou buněčnou stěnu o tloušťce až 80 nm, pod kterou je dále cytoplazmatická membrána. Podle Gramova barvení se G+ bakterie jeví jako fialově nebo modře zbarvené (gramnegativní bakterie jsou zbarvené růžově až červeně). Mezi takové bakterie řadíme například stafylokoky, streptokoky, bacily, klostridia nebo listerie. (Asif 2017, Sizar a Unakal 2022)

Mezi antibiotika s širokým spektrem účinku působících i proti G+ bakteriím řadíme betalaktamová antibiotika (peniciliny a cefalosporiny), která cílí na membránové proteiny (proteiny vázající penicilin), tím narušují bakteriální buněčnou stěnu nebo její syntézu a navozují buněčnou smrt – jejich účinek je tedy baktericidní. Na úrovni buněčné stěny působí také glykopeptidy, které brání syntéze bakteriální buněčné stěny vazbou na lipid II (prekurzor peptidoglykanového řetězce) a dále například fosfomycin nebo daptomycin. (Ritter et al. 2020, Singh et al. 2017)

Zásahem do syntézy bakteriálních proteinů mohou inhibovat růst G+ bakterií antibiotika ze skupiny tetracyklinů, aminoglykosidů, makrolidů, oxazolidinonů, dále linkosamidy, amfenikoly, streptograminy nebo například fusidová kyselina. Účinek těchto antibiotik je tedy bakteriostatický. (Ritter et al. 2020, Singh et al. 2017)

Posledním místem zásahu je bakteriální DNA, a to narušení její syntézy, struktury anebo zásah do replikace bakteriální DNA. Antibiotika, která tímto mechanismem účinku působí mají bakteriostatický efekt. Příkladem mohou být fluorochinolony nebo fidaxomicin a nitroimidazoly, které se využívají pro léčbu klostridiálních infekcí. (Ritter et al. 2020, Singh et al. 2017)

Široké spektrum bakterií (gramnegativních i grampozitivních) si již bylo schopné vyvinout rezistenci vůči současně využívaným antibiotikům. V poslední době je míra rezistence velmi znepokojivá, a tak je velmi důležité soustředit se ve výzkumu a vývoji nových léčiv zejména na objevování antibiotických léčiv s alternativními mechanismy účinku, které budou působit i na mikroorganismy rezistentní vůči současné léčbě. (Singh et al. 2017)

3.6.2 Antimykotika

Antimykotika jsou látky využívané k terapii nebo profylaxi mykotických onemocnění, tedy infekcí vyvolaných mikroskopickými houbami. Tyto patogeny mohou napadat nejen kůži a sliznice, ale také jednotlivé vnitřní orgány, což je nebezpečné zejména u imunokompromitovaných pacientů. Jako příklad patogenních hub lze uvést rod *Aspergillus*, *Cryptococcus* nebo rod *Candida*, který je nejčastějším původcem slizničních infekcí. (Campoy a Adrio 2017, Horák 2010)

Podle místa působení rozlišujeme antimykotika systémová (např. amfotericin B, echinokandiny) a lokální (např. nystatin, natamycin). Dále je možné rozlišovat antimykotika fungistatická inhibující růst a replikaci buněk hub (většina antimykotik) nebo fungicidní, která přímo navozují buněčnou smrt (např. amfotericin B). (Asif 2017, Horák 2010)

Mechanismem účinku je nejčastěji cílení na základní stavební složku buněčných membrán hub – ergosterol. Existují antimykotika inhibující biosyntézu ergosterolu (azolová antimykotika, allylaminy a morfoliny) nebo antimykotika, která tvoří s ergosterolem vazbu a tím narušují permeabilitu buněčné membrány (polyenová antimykotika). Dalšími složkami buněčné membrány, na které lze cílit jsou sfingolipidy – takto působí například antimykotikum aureobasidin A. Další antimykotika mohou cílit na syntézu důležitých součástí buněčné stěny – polysacharid β -glukan (echinokandiny) nebo chitin (polyoxiny). Cílem antimykotik mohou být i nukleové kyseliny (antimetabolit

flucytosin), proteiny (např. tavaborol, sordarin) nebo mikrotubuly (griseofulvin). (Campoy a Adrio 2017, Pianalto a Alspaugh 2016)

Antimykotika jsou tedy primárně kategorizovány do několika hlavních skupin. Rozlišujeme polyenová antimykotika, azolová antimykotika, antimetabolity (analoga pyrimidinu), nejnovější skupinu antimykotik – echinokandiny, dále morfoliny, inhibitory mitózy (griseofulvin), polyoxiny nebo topicky používané allylaminy, případně ostatní antimykotika (aureobasidin A, nikkomycin Z, sordarin, tavaborol atd.). (Asif 2017, Campoy a Adrio 2017, Pianalto a Alspaugh 2016)

V současné době lze pozorovat nejen významný nárůst oportunních mykotických onemocnění u imunokompromitovaných jedinců, ale také stále rychlejší rozvoj rezistence vůči stávajícím antimykotikům (vývoj rezistence vůči dostupným antimykotikům je mnohem rychlejší než vývoj nových antimykotik). Jedním z hlavních důvodů vzniku rezistence je fungistatické působení většiny antimykotik, s výjimkou amfotericinu B ze skupiny polyenů a několika dalších sloučenin (např. triazolů vorikonazolu a posakonazolu). V porovnání s počtem dostupných antibiotických látek je očividné, že počet dostupných antimykotik je velmi omezený. Výzkum a vývoj nových antimykotických látek totiž ztěžuje fyziologická podobnost mezi buňkami hub, jakožto eukaryotických organismů a jejich eukaryotických hostitelů, což vysvětluje toxické působení mnoha antimykotik i vůči orgánovým systémům člověka (např. ledviny, játra). Z důvodu nárůstu rezistence, ale i vzhledem k nedostatečné znalosti cílů, které jsou specifické pouze pro buňky hub je nutné věnovat stále větší pozornost výzkumu a vývoji nových antimykotik, a to především objevování nových mechanismů účinků a cílů antimykotik specifických pro houby. (Asif 2017, Campoy a Adrio 2017, Pianalto a Alspaugh 2016)

3.7 Buněčné kultury

3.7.1 Typy buněčných kultur

Rozlišujeme 3 základní typy buněčných kultur: primární buněčné kultury (primokultury), buněčné linie a buněčné kmeny.

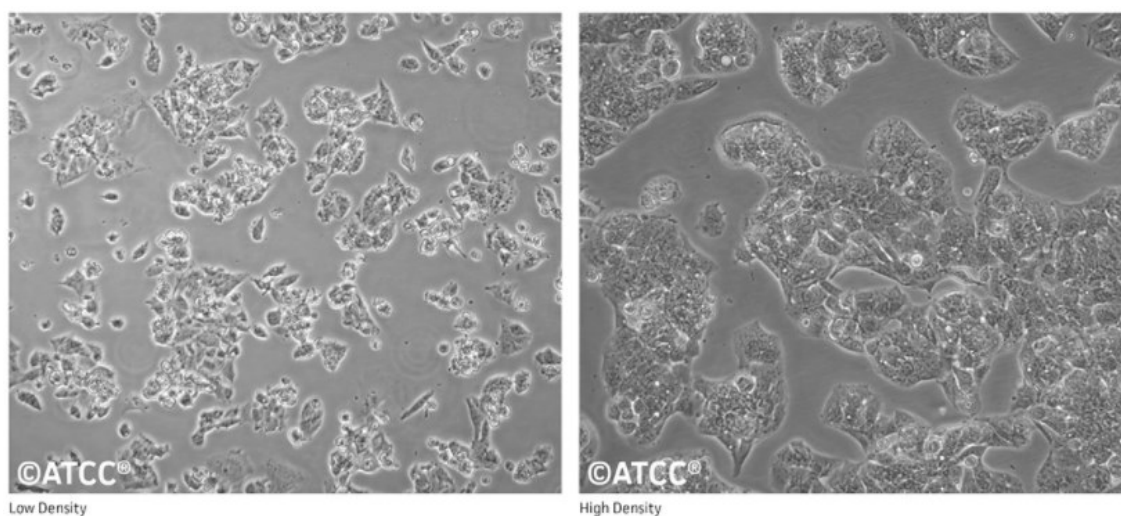
Primární kultura neboli primokultura se skládá z buněk přímo izolovaných z lidské či zvířecí tkáně (kardiomyocyty ze srdce, hepatocyty z jater atd.). Izolace buněk pak může probíhat enzymaticky prostřednictvím proteolytických enzymů (trypsinem, kolagenázou aj.) anebo mechanickým způsobem. Po izolaci z tkáně se buňky umísťují do plastových či skleněných kultivačních nádob s živným médiem, kde jsou schopné růst a dělit se. Podle závislosti na adhezi dále rozlišujeme kultury adherentní, které pro svůj růst vyžadují ukotvení ke kultivačnímu povrchu anebo kultury suspenzní, které nevyžadují ukotvení ke kultivačnímu povrchu, volně se „vznášejí“ a proliferyjí v živném médiu. V momentě, kdy buňky obsadí všechn dostupný substrát, tzn. ve stavu 100% konfluence, dochází k inhibici jejich růstu a je proto nutné přenést buňky do jiné kultivační lahve s čerstvým živným médiem pro zajištění jejich optimálního růstu prostřednictvím čerstvých živin a větší kultivační plochy. Tento proces je známý jako pasážování neboli subkultivace a získáváme tak buněčné linie. (Anonym 2016, Anonym 2020, Freshney 2005)

Buněčné linie vznikají pasážováním (subkultivací) z primární buněčné kultury. Buněčné linie odvozené od primárních kultur mají pouze omezenou životnost v důsledku geneticky podmíněného replikativního stárnutí buněk neboli procesu senescence, při kterém se u většiny buněk zkracují terminální sekvence DNA zvané telomery a takové buňky po určitém počtu buněčných cyklů ztrácí schopnost buněčného dělení. Tyto buněčné linie označujeme jako tzv. nespojitě (konečné) buněčné linie. Existují však buněčné linie, které replikační stárnutí nevykazují, mohou se neomezeně dělit a být nesmrtelné – tyto buněčné linie pak označujeme jako tzv. spojité (kontinuální). Takové buněčné linie mohou vznikat buďto z nespojitých buněčných linií procesem transformace, který může být spontánní nebo může být vyvolán pomocí virů, chemikálií či radiace anebo může jít o nádorové buněčné linie s buňkami, které byly původně izolované z nádorů. (Anonym 2016, Freshney 2005)

Buněčný kmen je subpopulací buněčné linie, která byla pozitivně selektována z buněčné kultury pomocí klonování či jiné selekční metody. Buněčný kmen nese určité specifické rysy a oproti rodičovské buněčné linii prošel různými genetickými změnami. Jedná se o kultury diploidních buněk (na rozdíl od buněčné linie, kde mohou být buňky aneuploidní), které zanikají cca po 40-50 pasážích. (Anonym 2016, Vrzalová 2020)

3.7.2 Buněčná linie HepG2

HepG2 je lidská epiteliální buněčná linie (viz. Obr. 5) založena původně v roce 1979, od roku 1980 patentována a uvedena v repositáři organizace American Type Culture Collection (ATCC) jako buněčná linie odvozená z jaterní tkáně 15letého bělocha s dobře diferenciováním hepatocelulárním karcinomem. Zhruba o 30 let později však Lopez-Terrada et al. (2009) přišel s převratným článkem, ve kterém uvádí, že původem buněčné linie není hepatocelulární karcinom, ale epiteliální hepatoblastom. (Lopez-Terrada et al. 2009)



Obr. 5 Buněčná linie HepG2. Převzato z: [HepG2 \[HEPG2\] | ATCC](#)

Jedná se o trvalou, adherentní buněčnou linii využívanou nejčastěji pro studium farmakokinetiky – metabolismu léčiv a studium hepatotoxicity v rámci *in vitro* studií. (Donata et al. 2014)

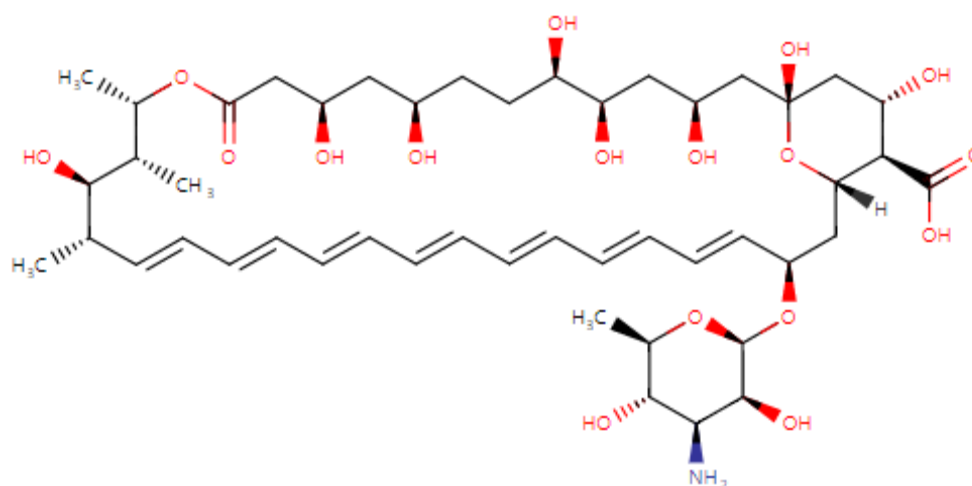
HepG2 jsou epiteliální, netumorigenní a intenzivně proliferující buňky. Jsou diferenciovány pro vykonávání rozličných metabolických funkcí typických pro játra včetně produkce a sekrece různých plazmatických proteinů atd. (Donata et al. 2014)

Hlavní nevýhodou HepG2 buněk je však omezená exprese enzymů a transportérů, které metabolizují léčiva. Například chybí důležité enzymy cytochromu P450 účastnících se 1. oxidativní fáze metabolismu léčiv, jelikož je v HepG2 buňkách výrazně nižší exprese genů pro tyto enzymy než v primárních hepatocytech, což komplikuje studie metabolismu léčiv. (Donata et al. 2014)

3.8 Použité standardy

3.8.1 Amfotericin B

Amfotericin B je širokospektré antimykotikum produkované bakterií *Streptomyces nodosus*, které se společně s natamycinem a nystatinem řadí do skupiny makrocyclických polyenových antibiotik. Byl objeven v roce 1954 a i dnes je považován za jeden z největších úspěchů 20. století. V závislosti na jeho koncentraci a na citlivosti patogenu vykazuje amfotericin B fungistatický až fungicidní efekt. (Rozsypal 2008, SPC přípravku Abelcet lipid complex)



Obr. 6 *Struktura amfotericinu B. Převzato z:*

<https://go.drugbank.com/drugs/DB00681>

Základ struktury amfotericinu B (viz. Obr. 6) tvoří 38členný makrocyclický laktonový kruh, na kterém je mimo jiné navázáno 7 volných hydroxylových skupin, což zajišťuje amfifilní charakter léčiva. (Cavassin et al. 2021)

Amfotericin B se jako jediný zástupce z polyenových antibiotik využívá pro systémovou léčbu, a to zejména život ohrožujících invazivních mykóz, případně protozoálních infekcí – např. kandidózy, aspergilózy, kryptokokózy, leishmaniózy, kokcidiózy a dalších závažných chorob. Aplikace je zpravidla intravenózní z důvodu nízké perorální biologické dostupnosti nebo také intratekální v případě CNS infekcí jako je například meningitida vyvolaná patogenem *Coccidioides immitis*. Mimo systémovou aplikaci lze amfotericin B využít i v topické a lokální terapii. (Cavassin et al. 2021, Rozsypal 2008)

Výhodou amfotericinu B není pouze jeho široké spektrum účinku, ale také minimální výskyt rezistentních patogenů. (Cavassin et al. 2021)

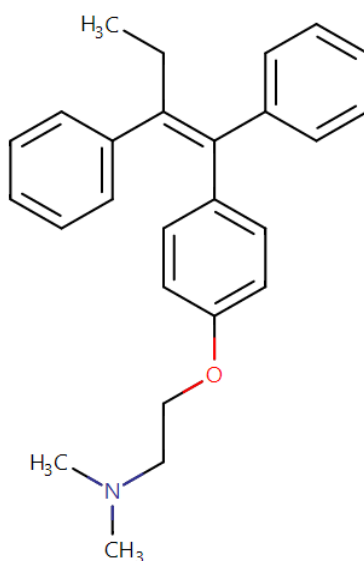
Hlavním mechanismem účinku amfotericinu B je jeho vazba na ergosterol, který představuje základní strukturní složku buněčné membrány hub. Tímto způsobem dochází k tvorbě porů v membráně, k porušení její celistvosti a úniku důležitých intracelulárních iontů z buňky, což ve finále vede k jejímu zániku. Dalším mechanismem amfotericinu B je oxidativní poškození buňky hub pomocí indukce volných radikálů, které peroxidují membránové lipidy a podílí se tak na destrukci buňky. (Cavassin et al. 2021, Rozsypal 2008)

Limitujícím faktorem amfotericinu B jsou nežádoucí účinky vycházející z jeho mechanismu účinku. Amfotericin B se totiž kromě ergosterolu váže s nižší afinitou také na steroly živočišných buněk – tzn. díky vazbě na membránový cholesterol v různých tkáních může vykazovat potenciální akutní toxicitu. Amfotericin B například působí nefrotoxicky díky vazbě na membránový cholesterol v ledvinných tubulech a glomerulech. (Švihovec et al. 2018)

3.8.2 Tamoxifen

Tamoxifen je antineoplastické hormonální léčivo ze skupiny selektivních modulátorů estrogenových receptorů, tj. selective estrogen receptor modifiers (SERM). V zásadě se jedná o antiestrogen, ale v některých tkáních se může chovat také jako estrogen nebo vykazovat smíšenou aktivitu. Například v prsní žláze a děloze se chová jako antagonist estrogenových ER- α receptorů, a naopak v játrech, kardiovaskulárním systému a kostech vystupuje jako agonista na estrogenových ER- β receptorech. (Jordan 2003, Švihovec et al. 2018)

Jedná se o relativně malou molekulu s nesteroidní strukturou na bázi trifenylethylenu (viz. Obr. 7), která je využívána především k adjuvantní léčbě karcinomu prsu u žen s pozitivními axilárními uzlinami, léčbě metastazujícího karcinomu prsu u mužů i žen anebo k terapii anovulační neplodnosti. Ačkoliv je tamoxifen využíván primárně k léčbě nebo chemoprolaxi hormon-dependentních karcinomů prsu, ukazuje se i jeho možné působení na nádory hormonálně nezávislé. (Anonym 2022a, Manna a Holz 2016, SPC tamoxifen, Švihovec et al. 2018)



Obr. 7 Struktura tamoxifenu. Převzato z:

<https://go.drugbank.com/drugs/DB00675>

Mechanismem účinku tamoxifenu v terapii nádorů pozitivních na estrogenové receptory je zejména vazba na jaderné estrogenové receptory ve tkáních citlivých na estrogen, kde působí jako kompetitivní inhibitor a brání tak vazbě estrogenu. Přednostní vazba tamoxifenu na estrogenní receptory způsobí potlačení signálních funkcí těchto receptorů. Ve finále tak tamoxifen potlačuje růst nádorů a podporuje apoptózu nádorových buněk, které exprimují estrogenové receptory. Mechanismus účinku v indikaci hormonálně nezávislých nádorů není zcela objasněný, ale zdá se, že je účinek závislý na dávce – v nanomolárních koncentracích působí tamoxifen pouze na nádorové buňky pozitivní na estrogenové ER receptory, nicméně v mikromolárních koncentracích již působí také na nádorové buňky negativní na estrogenové ER receptory. (Anonym 2022a, Anonym 2022b, Campbell 2001, Manna a Holz 2016, SPC přípravku Tamoxifen)

Nevýhodou tamoxifenu jsou pak jeho nežádoucí účinky. U postmenopauzálních žen dochází kvůli antiestrogenní aktivitě tamoxifenu k úbytku kostní hmoty a vyššímu

riziku vzniku osteoporózy, zatímco u premenopauzálních žen je kostní denzita zachována. Dalším závažným nežádoucím účinkem s mnohonásobně vyšším výskytem u postmenopauzálních žen je riziko karcinomu endometria. Mimo tyto nežádoucí účinky může tamoxifen, kromě méně závažných účinků (návaly horka, dysmenorea, nauzea, zvracení, alopecie nebo vaginální krvácení), vykazovat CNS toxicitu, hepatotoxicitu a hematotoxicitu, což limituje běžné využívání tamoxifenu v terapeutické praxi. I přes všechny rizika je však tamoxifen celosvětově nejvíce předepisovaným antineoplastikem, které již zachránilo život milionům pacientů s karcinomem prsu. (Lukešová a Kopecký 2014, SPC přípravku Tamoxifen)

Guo et al. (2009) studovali účinky tamoxifenu na buněčnou proliferaci, buněčný cyklus a apoptózu *in vitro* s využitím buněčné linie HepG2. Zjistili, že již při mikromolárních koncentracích tamoxifenu lze pozorovat antiproliferativní účinek na buňky HepG2. Zhao et al. (2014) pak ve svém článku udává, že tamoxifen ve vysoké dávce (nad 20 μM) vykazuje cytotoxický účinek na buňky linie HepG2. Z toho důvodu je možné tamoxifen využívat jako kontrolní sloučeninu při testování cytotoxicity potencionálních léčiv na HepG2 buněčné linii.

4 Cíle práce

- Cílem diplomové práce bylo stanovit *in vitro* potenciální cytotoxicitu 11 vývojových látek (GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3) s potenciálním antimikrobiálním a antifungálním účinkem na HepG2 buněčnou linii.
- Porovnat zjištěné hodnoty míry cytotoxicity 11 testovaných látek se zvolenými lékovými standardy.

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)
- CO₂ inkubátor (Shel Lab, USA)
- Orbitální třepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Německo)
- Centrifuga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen GmbH, Německo)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Vodní lázeň, TW 12 water bath (Julabo, Německo)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS-1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Destičkový analyzátor TECAN (Infinite M200, Švýcarsko)
- Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)
- Mikrozkmavky Eppendorf 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Automatické jednobanňové 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)
- Sterilní, nepyrogenní skleněné pipety 5, 10, 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1–20 µl; 20–200 µl (Eppendorf, Německo)
- Falkony (TPP, Švýcarsko)
- Rukavice latexové, nesterilní (VWR, USA)

5.1.2 Testované látky a další chemikálie

- Testované látky: GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3

(Katedra organické a bioorganické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova)

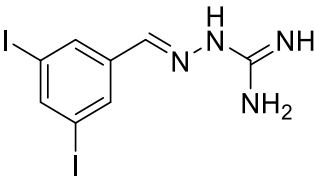
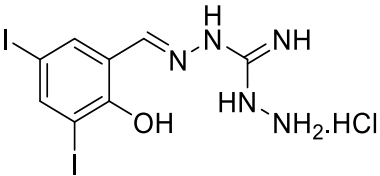
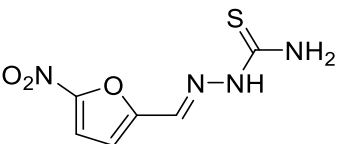
- Fosfátový pufr o pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline; PBS – obsahuje NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) (PENTA, Česká republika)
- Trypsin (0,25%, Trypsin-EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)) (Sigma-Aldrich, USA)
- Dulbeccovo a Eagolovo modifikované médium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin (2 mM) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální bovinní sérum (Fetal bovine serum, FBS) (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)
- Amfotericin B (Sigma-Aldrich, USA)
- Tamoxifen (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.3 Testované látky

K experimentu bylo využito 11 látek syntetizovaných na Katedře organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jedná se o látky ze skupiny aminoguanidinů, u nichž se předpokládá určitá míra inhibice AChE a BuChE a/nebo antimikrobiální působení proti houbám a G⁺ bakteriím. Zkratky, chemické názvy a strukturní vzorce těchto látek shrnuje tabulka 1.

Tab. 1 Přehled zkratek, chemických názvů a strukturních vzorců testovaných látek

Zkratka	Chemický název	Strukturní vzorec
GUAM	aminoguanidin-hydrochlorid	
GUAM-NH ₂	1,3-diaminoguanidin-hydrochlorid	
THIOSEMIK	thiosemikarbazid	
GUAM-2	(<i>E</i>)-2-(2-hydroxy-3,5-dijodbenzyliden)hydrazin-1-karboximidamid-hydrochlorid	
GUAM-6	(<i>E</i>)-2-[(5-nitrofuran-2-yl)methylen]hydrazin-1-karboximidamid	
GUAM-11	(<i>E</i>)-2-[(5-nitrothiofen-2-yl)methylen]hydrazin-1-karboximidamid	
GUAM-12	(<i>Z</i>)-2-(2-oxoindolin-3-yliden)hydrazin-1-karboximidamid	
GUAM-18	(<i>E</i>)-2-[(2-karbamidoylhydrazinyliden)methyl]-4,6-dijodfenyl-acetát	

GUAM-19	(<i>E</i>)-2-(3,5-dijodbenzyliden)hydrazin-1-karboximidamid	
GUAM-2-1	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2-hydroxy-3,5-dijodbenzyliden)hydrazinkarboximidhydrazid-hydrochlorid	
GUAM-6-3	(<i>E</i>)-1-[(5-nitrofuran-2-yl)methylen]semikarbazid	

5.1.4 Buněčný model

Buněčná linie HepG2 (American Type Culture Collection – ATCC; USA) je odvozená z jaterní tkáně 15letého bělocha s dobře diferenciovaným hepatocelulárním karcinomem. Lopez-Terrada et al. (2009) však ve svém článku uvádí, že původem buněčné linie není hepatocelulární karcinom, ale epiteliální hepatoblastom.

5.2 Použité metody

5.2.1 Příprava fosfátového pufru o pH 7,4

Pro přípravu fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4 se navázilo definované množství komponent, které bylo kvantitativně převedeno do kádinky a následně doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem. Ve finále bylo zapotřebí s využitím pH metru a hydroxidu sodného upravit pH na hodnotu 7,4. Jednotlivé komponenty PBS jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2 Komponenty fosfátového pufru, jejich molární hmotnost a koncentrace uvedených látek v 1 litru pufru

Název sloučeniny	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
Na ₂ H ₂ PO ₄ .2H ₂ O	177,99	3,12

5.2.2 Příprava buněčné linie HepG2

Buněčná linie HepG2 je uchovávána hluboce zmražená s přidavkem kryoprotektivního činidla (DMSO nebo glycerolu) zpravidla v tekutém dusíku, a proto bývá prvním krokem její rychlé rozmrazování. Následuje krok centrifugace a odstranění supernatantu s kryoprotektivním činidlem. Poté se buněčná peleta resuspenduje v čerstvém živném médiu, přeneso do kultivační nádoby a inkubuje.

Pro účely této diplomové práce byla využita buněčná linie, která se již několikrát pasážovala a inkubovala v kultivačních lahvích 75 cm² v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Z důvodu eliminování rizika kontaminace se s buňkami pracovalo pouze ve sterilním prostředí laminárního boxu. Předměty vkládané do prostoru laminárního boxu byly vždy předem ošetřovány 70% ethanolem (včetně nádoby s buňkami) a víka nádob případně ožehnuty nad plamenem.

Dalším krokem bylo pasážování (tzv. subkultivace), což je proces, při kterém dochází k výměně starého živného média za nové pro zajištění optimálního růstu buněk. Nejdříve se odsálo staré médium a nádoba se propláchla 6 ml PBS o pH 7,4. Po odsátí pufru následovala „trypsinizace“, kdy byly přidány 3 ml trypsinu, se kterým se buňky nechaly po dobu 1-2 minut inkubovat v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Trypsin enzymaticky uvolnil přisedlé buňky ze dna kultivační nádoby, což se následně mikroskopicky zkontrolovalo (mělo by být uvolněno alespoň 90 % buněk). Poté bylo k buněčné suspenzi přidáno zhruba dvojnásobné množství čerstvého živného média, do

něhož se přidalo fetální bovinní sérum (FBS), které zastavilo působení trypsinu a dále byl doplněn L-glutamin s neesenciálními aminokyselinami. Nakonec se provedla resuspendace buněk a byl odebrán finální vzorek. Následně se s využitím Bürkerovy komůrky mikroskopicky stanovil počet buněk a pomocí následujícího vzorce byla vypočítána koncentrace částic v 1 ml suspenze:

$$x = \frac{a \times 10^4}{n}$$

x vyjadřuje koncentraci buněk v 1 ml suspenze, a představuje stanovený počet buněk v 1 čtverci Bürkerovy komůrky a n vyjadřuje počet spočítaných čtverců v Bürkerově komůrce.

Po pasážování bylo odebráno 0,8 ml suspenze živného média s buňkami do nové kultivační lahve s 11,2 ml čerstvého živného média a následovala inkubace při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Následně byly nasazovány buňky na 96jamkovou destičku, přičemž se do každé jamky napipetovalo 15 000 buněk ve 100 μl média. Poté byly destičky s buňkami vloženy do inkubátoru a nechaly se inkubovat zhruba 24 hodin při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂.

5.2.3 Příprava roztoků testovaných látek

K experimentu bylo využito 11 nových vývojových látek, jejichž souhrn je uveden výše v tabulce 1. Jako standardy byly zvoleny amfotericin B a tamoxifen.

V prvním kroku bylo nutné navázat si potřebné množství testovaných látek na analytických vahách a dále je rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Jelikož se jedná o látky ve vodě nerozpustné, byl zde jako rozpouštědlo využit dimethylsulfoxid. DMSO je nejčastěji využívané organické rozpouštědlo pro léčiva nerozpustné ve vodě, které se však již v nízkých koncentracích chová k buňkám toxicky. Zanedbatelnou toxicitu k živým buňkám vykazuje DMSO v koncentraci do 1 %, a proto bylo při našem experimentu využito této maximální koncentrace k rozpuštění testovacích látek.

Pro tento experiment byly připraveny 3 zásobní milimolární roztoky o koncentraci 50 mM, 10 mM a 1 mM, ze kterých se dále připravily mikromolární roztoky

v koncentračním rozmezí 1 μM až 500 μM (tzn. 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM a 500 μM).

Jako pozitivní kontrola s 0% viabilitou posloužily buňky s 10% roztokem DMSO v médiu, který v této koncentraci spolehlivě zajišťuje usmrcení všech živých buněk. Negativní kontrolou se 100% viabilitou pak bylo samotné živné médium s 1% DMSO a buňkami. Dále byly připraveny pro každou koncentraci nebuněčné kontroly testovaných látek s médiem (100 μl /jamka).

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

Pro stanovení cytotoxicity byla využita metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Buňky s živným médiem byly nasazeny do 96jamkových destiček a následně k nim bylo napipetováno 100 μl roztoku 11 testovaných látek v různých koncentracích od 1 μM až po 500 μM (1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM a 500 μM).

Všechny testované látky o různých koncentracích se pipetovaly v triplikátech, kdy se buněčné médium opatrně odsálo a následně se k buňkám pomocí pipety přidalo 100 μl testované látky spolu s pozitivní a negativní kontrolou, která byla pipetována rovněž v triplikátech. Negativní kontrolu tvořily čisté buňky s živným médiem a pozitivní kontrolou byl 10% roztok DMSO v médiu s buňkami. Bylo nutné pracovat pečlivě, ale zároveň dostatečně rychle, aby nedošlo k usmrcení buněk. Poté se buňky přesně na 24 hodin inkubovaly v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Přesně po 24hodinové inkubaci bylo do jednotlivých jamek napipetováno 20 μl činidla CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent a nechalo se inkubovat 90 minut při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Dále bylo nutné napipetovat „pozadí“, které sestávalo ze samotných roztoků testovaných látek a činidla. Tento krok byl nezbytný pro zjištění možné interference dané testované látky s použitým činidlem. Pozadí se nanášelo v duplikátech. Také bylo třeba provést tzv. nebuněčnou kontrolu tvořenou čistým médiem s činidlem.

Po ukončení inkubační doby byla spektrofotometricky měřena absorbance pomocí destičkového analyzátoru TECAN při vlnové délce $\lambda = 490$ nm.

Získaná data byla dále zpracována pomocí tabulkového softwaru Microsoft Excel 2018 a statistického softwaru GraphPad Prism 9.2.0. Nejprve se pomocí programu Microsoft Excel 2018 vytvořil průměr z hodnot absorbancí naměřených u jednotlivých triplikátů testovaných látek o shodné koncentraci. Dále byla vypočtena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka pro posouzení míry přesnosti měření. Stejný postup se využil i pro hodnoty absorbancí pozitivních a negativních kontrol, včetně nebuněčné kontroly. Od průměru byla odečtena nebuněčná kontrola a ze získaných hodnot se následně určila procentuální viabilita pro jednotlivé koncentrace testovaných látek dle následujícího vzorce:

$$viabilita [\%] = \frac{A_{vz} - A_p}{A_{v100} - A_m} \times 100$$

A_{vz} značí zprůměrovanou hodnotu absorbance triplikátu buněk s testovanou látkou o dané koncentraci s činidlem, A_p představuje zprůměrovanou hodnotu absorbance duplikátu testované látky o dané koncentraci bez buněk s činidlem (tj. pozadí), A_m je zprůměrovaná hodnota absorbance triplikátu daného kultivačního média s činidlem a A_{v100} pak znamená zprůměrovanou hodnotu absorbance triplikátu negativní kontroly s činidlem (100% viabilita).

Na závěr byla data zpracována ve statistickém programu GraphPad Prism 9.2.0., který sestrojil inhibiční křivky testovaných látek a na základě modelu nelineární regrese byla určena hodnota střední inhibiční koncentrace IC_{50} , což je toxikologický parametr udávající koncentraci testované látky, při které dochází k 50% inhibici životaschopnosti buněk.

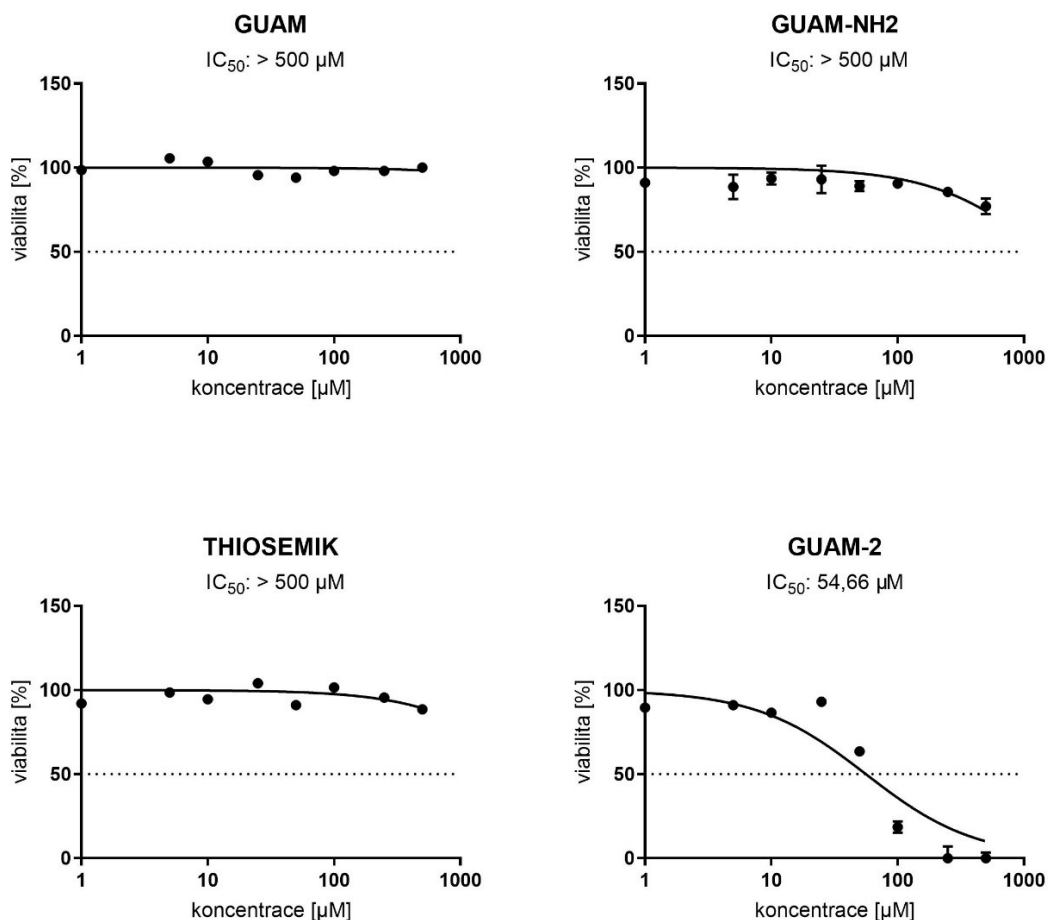
6 Výsledky

6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

V tabulce 3 jsou shrnuty názvy testovaných látek a standardů spolu s experimentálně zjištěnými hodnotami IC_{50} . Parametr IC_{50} byl použit k posouzení cytotoxického potenciálu 11 nových vývojových látek s potenciálním antimikrobiálním a antifungálním účinkem, a to v intervalu 24 hodin na standardní buněčné linii HepG2. Cytotoxický účinek látek GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK, GUAM-2, GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12, GUAM-18, GUAM-19, GUAM-2-1, GUAM-6-3 je graficky znázorněn na obrázcích 8 až 10 a na obrázku 11 jsou znázorněny křivky standardních látek tamoxifenu a amfotericinu B. Výsledky v grafech jsou prezentovány jako % viability.

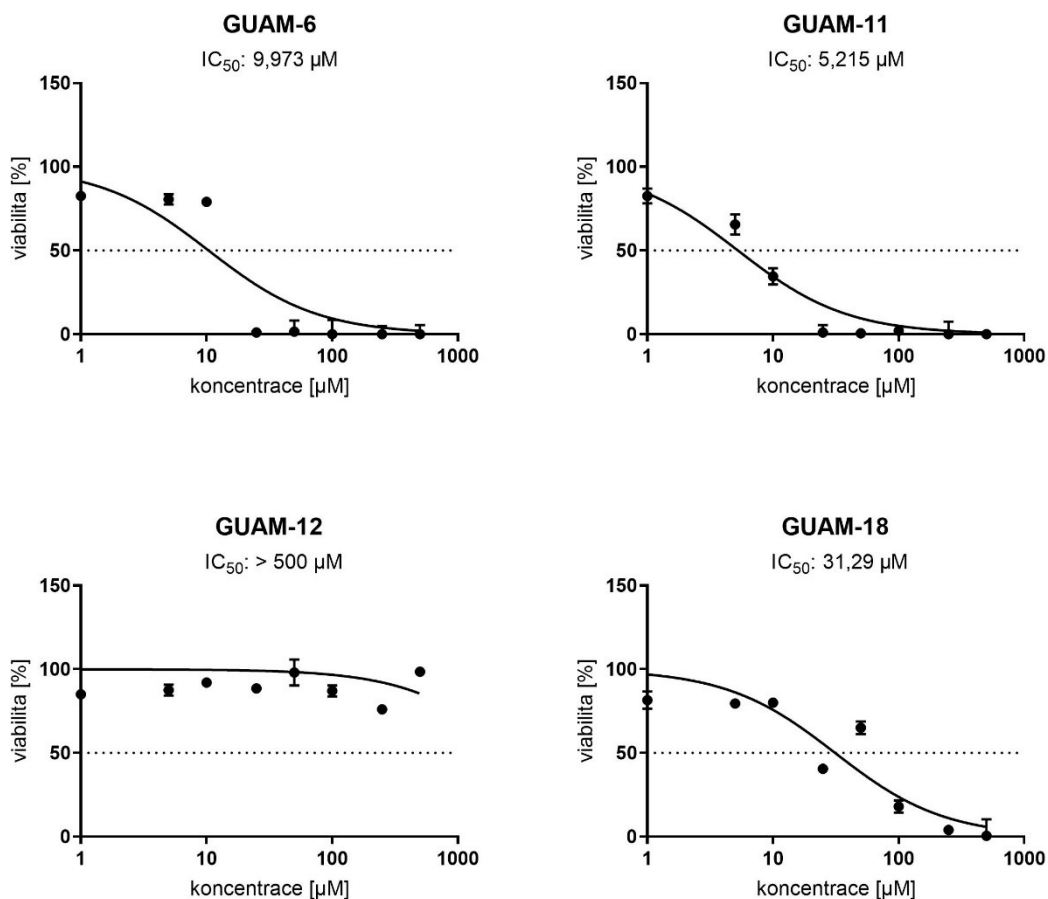
Tab. 3 Experimentálně zjištěné hodnoty IC_{50} testovaných látek a standardů za použití metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Název látky	Hodnota IC_{50} [μ M]
GUAM	> 500
GUAM-NH ₂	> 500
THIOSEMIK	> 500
GUAM-2	54,66
GUAM-6	9,973
GUAM-11	5,215
GUAM-12	> 500
GUAM-18	31,29
GUAM-19	9,203
GUAM-2-1	121,8
GUAM-6-3	29,72
Amfotericin B	> 500
Tamoxifen	19,56



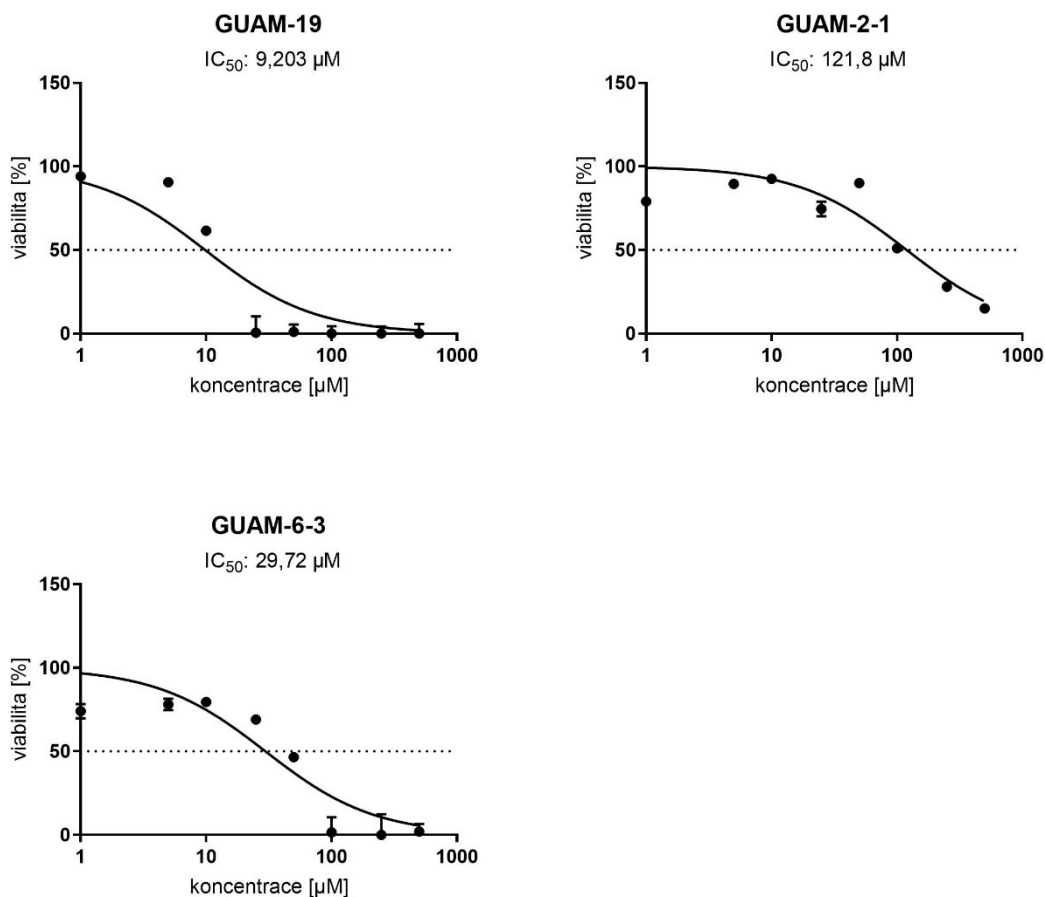
Obr. 8 Cytotoxické působení testovaných látek GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK a GUAM-2 na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku 8 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk na rostoucí koncentraci testovaných látek GUAM, GUAM-NH₂, THIOSEMIK a GUAM-2. Testované látky byly inkubovány s buňkami v triplikátech a po dobu 24 hodin o stejných koncentracích v rozmezí 1 až 500 µM. Z grafů na obrázku 8 je možné odvodit, že nejvyšší cytotoxicitu vůči buňkám HepG2 vykazuje GUAM-2 s naměřenou hodnotou IC₅₀ 54,66 µM. Grafy na obrázku 8 dále ukazují, že testované látky GUAM, GUAM-NH₂ a THIOSEMIK lze považovat za sloučeniny se zanedbatelnou cytotoxicitou, protože jejich naměřené hodnoty IC₅₀ jsou vyšší jak 500 µM, tedy jsou netoxické. Seřazením těchto látek dle klesající toxicity vůči buňkám HepG2 se vytvoří následující řada: GUAM-2 > GUAM-NH₂ > THIOSEMIK > GUAM.



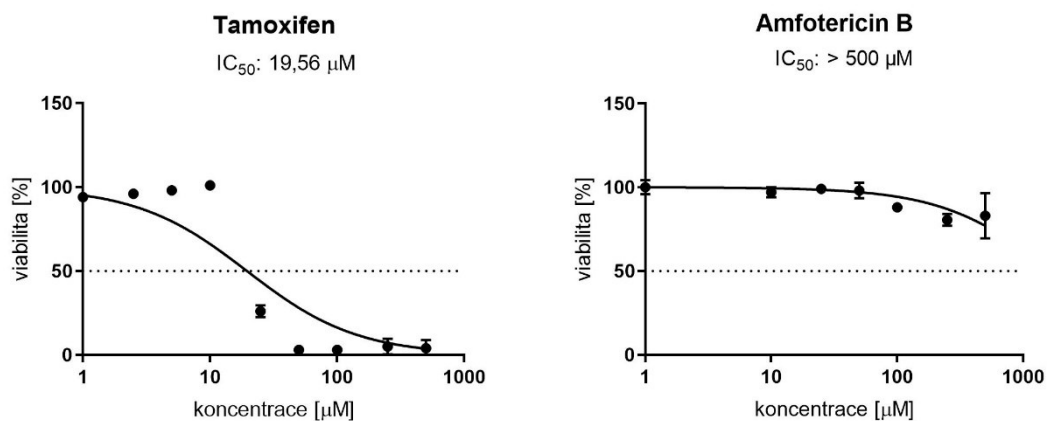
Obr. 9 Cytotoxické působení testovaných látek GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12 a GUAM-18 a buněčnou linií HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Obrázek 9 zachycuje grafy závislosti buněčné viability na rostoucí koncentraci dalších 4 testovaných látek: GUAM-6, GUAM-11, GUAM-12 a GUAM-18. Testované látky byly inkubovány s buňkami v triplicátech a po dobu 24 hodin o stejných koncentracích v rozmezí 1 až 500 µM. Z grafů na obrázku 9 lze vyvodit, že nejvyšší cytotoxicitu vůči HepG2 buňkám vykazuje GUAM-11 s naměřenou hodnotou IC₅₀ 5,215 µM, silně cytotoxický účinek vůči HepG2 buňkám byl naměřen i u látky GUAM-6, kde byla naměřena hodnota IC₅₀ 9,973 µM a také u látky GUAM-18 s hodnotou IC₅₀ 31,29 µM. Naopak zanedbatelnou cytotoxicitu je možné pozorovat u GUAM-12, jelikož jeho naměřená hodnota IC₅₀ je vyšší než 500 µM. Seřazením těchto látek podle klesající toxicity vznikne následující řada: GUAM-11 > GUAM-6 > GUAM-18 > GUAM-12.



Obr. 10 Cytotoxické působení testovaných látek GUAM-19, GUAM-2-1 a GUAM-6-3 na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku 10 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk HepG2 na rostoucí koncentraci testovaných látek GUAM-19, GUAM-2-1 a GUAM-6-3. Testované látky byly inkubovány s buňkami v triplicátech a po dobu 24 hodin o stejných koncentracích v rozmezí 1 až 500 µM. Na základě grafů z obrázku 10 je možné konstatovat, že všechny tři látky jsou silně cytotoxické vůči HepG2 buněčné linii. Nejvyšší cytotoxicitu vůči HepG2 buňkám vykazuje GUAM-19 s hodnotou IC₅₀ 9,203 µM, další v pořadí je GUAM-6-3 s naměřenou hodnotou IC₅₀ 29,72 µM a nejméně cytotoxický z těchto látek se ukázal GUAM-2-1 s naměřenou hodnotou IC₅₀ 121,8 µM. Cytotoxicita vůči HepG2 buňkám klesá v tomto pořadí: GUAM-19 > GUAM-6-3 > GUAM-2-1.



Obr. 11 Cytotoxické působení testovaných látek GUAM-19, GUAM-2-1 a GUAM-6-3 na buněčnou linii HepG2 po 24hodinové inkubaci.

Na obrázku 11 jsou znázorněny grafy závislosti viability buněk HepG2 na rostoucí koncentraci standardů – tamoxifenu a amfotericinu B. Na základě grafů z obrázku 11 lze konstatovat, že tamoxifen s hodnotou IC₅₀ 19,56 μM vykazuje výrazný cytotoxický účinek na buněčnou linii HepG2 na rozdíl od amfotericinu B, jehož cytotoxický potenciál je na HepG2 buněčnou linii zanedbatelný, jelikož jeho naměřená hodnota IC₅₀ dosahovala hodnot vyšších než 500 μM.

7 Diskuse

In vitro testování cytotoxicity je dnes zásadní součástí raného vývoje léčiv. Vzhledem k neznalosti všech účinků vyvíjených léčiv na organismus člověka je obzvlášť důležité předejít jejich případné toxicitě. *In vitro* testování je tak jedna z možností pro zajištění bezpečnějšího podávání léčiva zvířatům a lidem v dalších vývojových fázích a jedna z cest, která částečně nahrazuje *in vivo* toxikologické testování v rámci preklinického vývoje. *In vitro* stanovení cytotoxicity umožňuje zastavit vývoj neperspektivních látek již v rané fázi vývoje a díky tomu snižuje nákladnost na vývoj léčiv a šetří čas, které by byl v rámci vývoje obětován. (Bácskay et al. 2018, Giordanetto 2018)

Cílem této diplomové práce bylo *in vitro* stanovit a dále posoudit cytotoxické působení nově syntetizovaných látek ze skupiny aminoguanidinů na HepG2 buněčnou linii. Cytotoxický potenciál látek byl stanoven a porovnán prostřednictvím toxikologického parametru IC₅₀ (střední inhibiční koncentrace), který udává koncentraci, při které dochází k 50% snížení viability buněk v buněčné populaci. Hodnoty IC₅₀ byly získány pomocí komerčně dostupné kolorimetrické metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, která je využívána ke stanovení buněčné viability. Získané hodnoty byly rovněž porovnávány s lékovými standardy – amfotericinem B, který je známý svým nefrotoxickým působením a tamoxifenem, který má hepatotoxický účinek. (Lukešová a Kopecký 2014, Švihovec et al. 2018)

Z důvodu omezené rozpustnosti testovaných látek ve vodě bylo zapotřebí použít organické rozpouštědlo DMSO. Jelikož se jedná o látku, která působí ve vyšších koncentracích toxicky, využila se maximálně 1% koncentrace. Látky byly testovány pro každou koncentraci v triplikátech. Koncentrace jednotlivých testovaných látek se pohybovaly v rozmezí 1–500 μM.

Hepatotoxicita je jedním z nejčastějších důvodů ukončení vývoje potenciálního léčiva v pozdních fázích vývoje nebo stažení léčiv z trhu. Z tohoto důvodu je nezbytné včasně detekovat hepatotoxický účinek léčiv před jejich podáním zvířatům nebo před vstupem do klinické fáze vývoje. Z tohoto důvodu byla pro tento experiment zvolena, jako buněčný model, HepG2 standardní buněčná linie odvozená z lidské jaterní tkáně. (Gerets et al. 2012, Giordanetto 2018)

Pro stanovení buněčné viability byla využita kolorimetrická metoda MTS v rámci komerčního kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, který se skládá z tetrazoliové soli MTS a intermediárního akceptoru elektronů PES. Metoda je založená na principu redukce ve vodě rozpustné tetrazoliové soli MTS na barevný ve vodě nerozpustný formazan. Tato redukce probíhá pouze u metabolicky aktivních buněk a proto platí, že čím metabolicky aktivnější buňka je, tím intenzivněji jsou zbarvené formazanové produkty. (Riss et al. 2013)

Přednost MTS metody (kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) spočívá v rychlém, přesném, jednoduchém a relativně levném provedení. Metoda je také vysoce spolehlivá, bezpečná a reprodukovatelná. Tuto metodu je možné využít pro měření buněčné viability či cytotoxicity u adherentních i suspenzních typů buněk. S výhodou lze provádět i vícenásobné čtení absorbance, nicméně je nutné opatrně manipulovat s destičkami při jejich opětovném vkládání do inkubátoru a snažit se udržovat konstantní prostředí. Také je potřeba mít na paměti, že by inkubační doba neměla překročit 4 hodiny. (Adan et al. 2016, Aslantürk 2018, Riss et al. 2013)

Nevýhodou MTS metody (kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) je limitovaná citlivost, dlouhá doba inkubace, práce s vysokým počtem buněk, toxicita činidel k buňce a neschopnost rozlišit cytostatický a cytotoxický účinek zkoušené látky. Výsledné hodnoty absorbance mohou být také ovlivněny délkou inkubační doby, typem použité buněčné linie, počtem buněk a množstvím přidaného detekčního činidla. (Adan et al. 2016, Aslantürk 2018, Kamiloglu 2020)

Jako standardy byly zvoleny léčivé látky tamoxifen a amfotericin B. Tamoxifen je antineoplastické hormonální léčivo ze skupiny SERM, jehož limitujícím faktorem jsou zejména CNS toxicita, hematotoxicita a hepatotoxicita. V experimentu vystupuje jako pozitivní kontrola pro svůj antiproliferativní a cytotoxický účinek na HepG2 buněčnou linii při koncentraci nad 20 μM . (Guo et al. 2009, Zhao et al. 2014) Zjištěná hodnota IC_{50} tamoxifenu byla 19,56 μM . Amfotericin B je širokospektré polyenové antimykotikum, které je známé zejména pro své nefrotoxické působení. Na základě naměřené hodnoty $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$ je možné označit amfotericin B jako látku, která nepůsobí cytotoxicky na HepG2 buněčnou linii a nevykazuje tak žádné známky hepatotoxického působení.

Z výsledků měření je možné vyvodit závěr, že většina testovaných sloučenin vykazuje poměrně vysoké cytotoxické působení na buněčnou linii HepG2. Pokud si

seřadíme dané sloučeniny dle zvyšující se hodnoty IC_{50} (tj. dle klesajícího cytotoxického potenciálu látek) získáme následující pořadí: GUAM-11 > GUAM-19 > GUAM-6 > GUAM-6-3 > GUAM-18 > GUAM-2 > GUAM-2-1 >> GUAM-12 \approx GUAM-NH₂ \approx GUAM \approx THIOSEMIK. Jako látka s nejvyšším cytotoxickým potenciálem se ukázala v experimentu sloučenina GUAM-11 s hodnotou IC_{50} 5,215 μ M. Naopak nejméně toxickými sloučeninami v experimentu se ukázaly látky GUAM-12, GUAM-NH₂, GUAM a THIOSEMIK.

Hodnota IC_{50} většiny testovaných látek se pohybovala pod hodnotou nebo blízko hodnoty 100 μ M. Pouze GUAM-12, GUAM-NH₂, GUAM a THIOSEMIK měly hodnotu IC_{50} nad 500 μ M. Je nutné upřesnit, že sloučeniny GUAM, GUAM-NH₂ a THIOSEMIK se stanovenou hodnotou IC_{50} nad 500 μ M byly vyhodnoceny již na začátku experimentu spíše jako výchozí sloučeniny pro další modifikaci a biologická aktivita u nich není příliš očekávána.

Z hlediska hepatotoxicity se bez ohledu na biologickou aktivitu jeví jako perspektivní látky pro další vývoj GUAM, GUAM-NH₂, GUAM-12 a THIOSEMIK, jelikož jejich cytotoxické působení na HepG2 buněčnou linii bylo v tomto experimentu zanedbatelné.

Obecně vidím jako velmi důležité, aby léčivo nevykazovalo významný cytotoxický potenciál, s výjimkou cytostatických léčiv. V této práci jsou zkoumány látky, které mohou být potenciálně využívány v terapii mykotických či bakteriálních infekcí. V této oblasti, kde se rapidním tempem rozvíjí rezistence bakterií a hub na většinu současně využívaných léčiv, se „hraje“ o čas i finanční prostředky, které se ušetří právě včasným zkoumáním cytotoxicity v raných fázích vývoje. Je zde potřeba vyvinout takové léčivo, které bude dostatečně selektivní k buňkám patogenů a nebude tedy převažovat riziko léčby (nežádoucí účinky – hepatotoxicita, nefrotoxicita apod.) nad její prospěšností. Stejně tak je tomu u potenciálnímu využití těchto látek pro inhibici cholinesteráz, které hrají významnou roli při Alzheimerově demenci či jiných typech demencí. S ohledem na dlouhodobé používání těchto léčiv je nutné opět zajistit minimální nežádoucí účinky a významnější cytotoxický potenciál je u takových látek nežádoucí.

8 Závěr

Podářilo se úspěšně stanovit cytotoxický účinek *in vitro* 11 nových vývojových látek s potenciálním inhibičním působením na cholinesterázy a antimikrobním účinkem proti G+ bakteriím a houbám na buněčnou linii HepG2 odvozenou z lidské jaterní tkáně. Pro stanovení buněčné viability *in vitro* se využila kolorimetrická metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Pomocí toxikologického parametru IC₅₀ byla porovnána cytotoxicita testovaných látek s cytotoxickým působením standardů – tamoxifenu a amfotericinu B. Z naměřených dat vyplývá, že tamoxifen je výrazně cytotoxický vůči HepG2 buněčné linii, zatímco amfotericin B vykazuje pouze zanedbatelný cytotoxický potenciál vůči této linii.

Cytotoxický potenciál testovaných látek klesá v následujícím pořadí: GUAM-11 > GUAM-19 > GUAM-6 > GUAM-6-3 > GUAM-18 > GUAM-2 > GUAM-2-1 >> GUAM-12 ≈ GUAM-NH₂ ≈ GUAM ≈ THIOSEMIK. Látky GUAM-11, GUAM-19 a GUAM-6 jsou toxičtější než tamoxifen. Největší cytotoxický potenciál byl stanoven u sloučeniny GUAM-11 s hodnotou IC₅₀ 5,215 μM. Zanedbatelnou cytotoxicitu (s hodnotou IC₅₀ > 500 μM) vůči HepG2 buněčné linii vykazují v testovaném koncentračním rozmezí pouze sloučeniny GUAM, GUAM-12, GUAM-NH₂, a THIOSEMIK.

9 Literatura

1. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2016;17(14):1213–21. doi: 10.2174/1389201017666160808160513
2. Almutary A, Sanderson BJ. The MTT and Crystal Violet assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International Journal of Toxicology*. 2016;35(4):454–62. doi: 10.1177/1091581816648906
3. Asif M. Antimicrobial agents. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 2017;4(3).
4. Aslantürk ÖS. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. 2018. doi: 10.5772/intechopen.71923
5. Atatreh N, Al Rawashdah S, Al Neyadi SS, Abuhamdah SM, Ghattas MA. Discovery of new butyrylcholinesterase inhibitors via structure-based Virtual Screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2019;34(1):1373–9. doi: 10.1080/14756366.2019.1644329
6. Bácskay I, Nemes D, Fenyvesi F, Váradi J, Vasvári G, Fehér P, et al. Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. *Cytotoxicity*. 2018
7. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2):8. doi: 10.3329/bjp.v12i2.30892
8. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 2005;:127–52
9. Blass B. *Basic principles of drug discovery and development*. Elsevier; 2015. ISBN 978-0-12-411508-8
10. Campbell MJ. IGF status is altered by tamoxifen in patients with breast cancer. *Molecular Pathology*. 2001;54(5):307–10.

11. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. 2017;133:86–96.
12. Cavassin FB, Baú-Carneiro JL, Vilas-Boas RR, Queiroz-Telles F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. *Infect Dis Ther*. 2021;10(1):115-147. doi: 10.1007/s40121-020-00382-7
13. Çelik TA. Introductory chapter: Cytotoxicity. *Cytotoxicity*. 2018. doi: 10.5772/intechopen.77244
14. Doležal M. Farmaceutická chemie a Sekce syntetických léčiv v roce 2018. *Praktické lékárenství*. 2018; 14(2): 47
15. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, et al. Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(2-3):193-236. doi:10.1016/s0278-6915(01)00118-1
16. Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. 2005. ISBN 9780471747598. 696 stran
17. 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.
18. Giordanetto F. *Early Drug Development: Bringing a preclinical candidate to the clinic*. Weinheim: Wiley-VCH; 2018. ISBN: 978-3-527-80175-6. 816 stran
19. Guo R, Huang Z, Shu Y, Jin S, Ge H. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2009;63(5):375-379. doi: 10.1016/j.biopha.2008.09.010
20. Horák P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Prakt. Lékařn*. 2010; 6(4): 182-186

21. Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thougard AV, Toft DB, et al. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. part I: Why and how. *Drug Discovery Today*. 2014;19(8):1131–6.
22. Chamchoy K, Pakotiprapha D, Pumirat P, Leartsakulpanich U, Boonyuen U. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*. 2019;20(1). doi: 10.1186/s12858-019-0108-1
23. Jordan VC. Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003;2(3):205–13.
24. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020;1(3):332–49. doi: 10.1002/fft2.44
25. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2005;9(01):101.
26. Lukešová Š, Kopecký O. Praktické aspekty hormonální léčby karcinomu prsu. *Klin Farmakol Farm*. 2014; 28(3): 120-123
27. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*. 2009;40(10):1512-1515. doi: 10.1016/j.humpath.2009.07.003
28. Manna S, Holz MK. Tamoxifen action in ER-negative breast cancer. *Signal Transduction Insights*. 2016;5.
29. Marques AL, Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Analysis of acetylcholinesterase inhibitors: Bioanalysis, degradation and metabolism. *Biomedical Chromatography*. 2010;25(1-2):278–99.
30. Mushtaq G, Greig NH, Khan JA, Kamal MA. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(8):1432-1439. doi: 10.2174/1871527313666141023141545

31. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic bacillus species using CHO Cell Line. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;73(3):211–5. doi: 10.1016/j.mimet.2008.03.002
32. Nicolaou K. Advancing the Drug Discovery and Development Process. *Angewandte Chemie*. 2014: 9280-9292. doi: 10.1002/anie.201404761
33. Phillips HJ. Dye exclusion tests for cell viability. *Tissue Culture*. 1973: 406–8. doi: 10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7
34. Pianalto K, Alspaugh J. New horizons in antifungal therapy. *Journal of Fungi*. 2016;2(4):26.
35. Rozsypal H. Systémová antimykotika. *Klin Farmakol Farm*. 2008;22(1):40-4.
36. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 [Aktualizováno 1. července 2020]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-
37. Ritter J, Flower R, Henderson G, Loke YK, McEwan D, Rang HP. Rang and Dale's Pharmacology. Ninth. Edinburgh: Elsevier; 2020.
38. Scarcello E, Lambremont A, Vanbever R, Jacques PJ, Lison D. Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PLOS ONE*. 2020;15(4). doi: 10.1371/journal.pone.0231634
39. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an “ideal” antibiotic? Discovery Challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*. 2017;133:63–73.
40. Součková L, Kostková H, Demlová R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*, 2015; 11(4): 144–147
41. Suchý D, Hora M, Fínek J. Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv. *Ces Urol*. 2009: 141-8.
42. Švihovec J et. al. *Farmakologie*. Grada Publishing. 2018. ISBN 978-80-247-5558-8. 956 stran

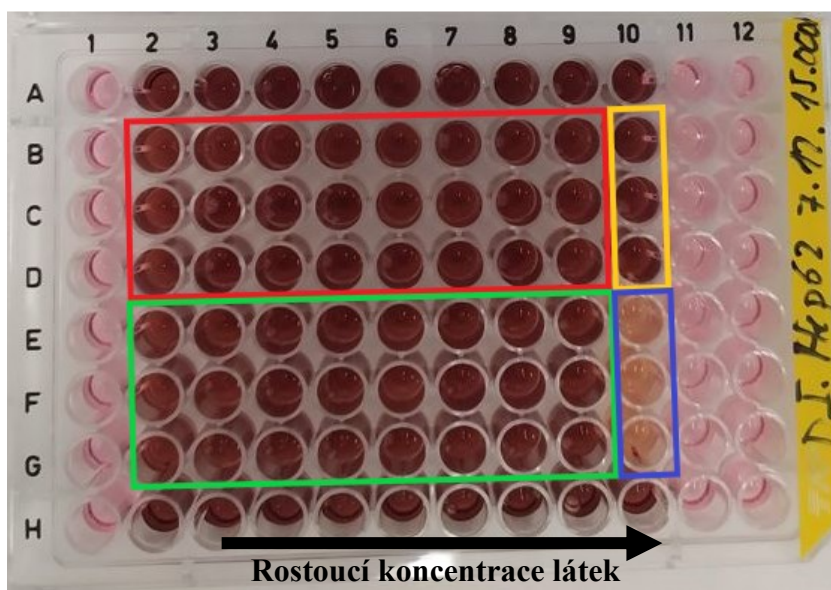
43. Vejražka M. Základní techniky práce s tkáňovými kulturami. Praha, 2004
44. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. JAMA. 2020;323(9):844
45. Zhao F, Xie P, Jiang J, Zhang L, An W, Zhan Y. The effect and mechanism of tamoxifen-induced hepatocyte steatosis in vitro. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(3):4019–30. doi: 10.3390/ijms15034019

Elektronické zdroje

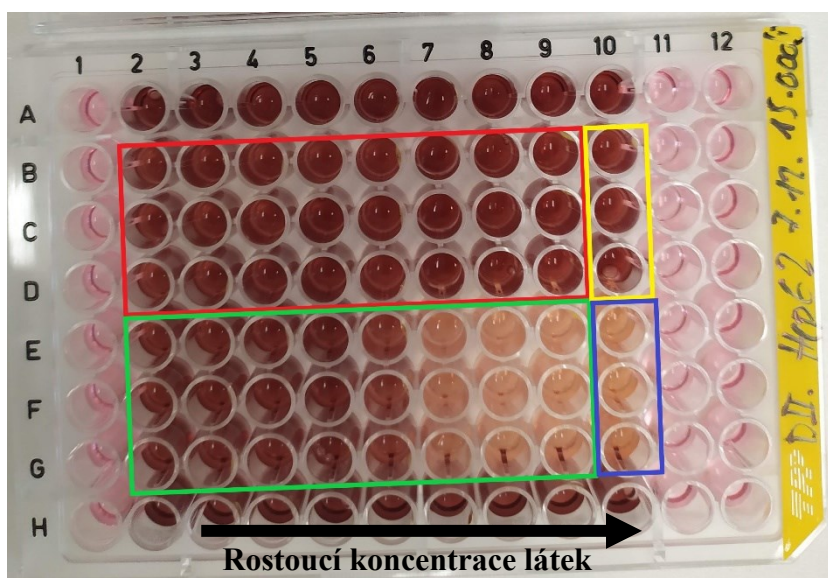
1. Anonym. Cell Culture Basics Handbook. In: Thermo Fisher Scientific 2016. Dostupné na URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>. Datum přístupu: 29. 01. 2022
2. Anonym. *In vitro* toxicity. Creative Bioarray. 2022d Dostupné na URL: <https://www.creative-bioarray.com/Services/in-vitro-toxicity.htm>
3. Anonym. Tamoxifen: Uses, Interactions, Mechanism of Action. 2022a. In: DrugBank Online. Dostupné na URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00675>. Datum přístupu 18. 01. 2022
4. Anonym. Tamoxifen. In: Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2022b. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tamoxifen>. Datum přístupu 18. 01. 2022
5. Anonym. An Introduction to Primary Cell Culture. 2022c. In: Lonza [online]. Dostupné na URL: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CZ/en/an-introduction-to-primary-cell-culture?_bt=521225818500&_bk=primary+cell+culture&_bm=p&_bn=g&_bg=125577874481&_gclid=EAIaIQobChMIyYyvx_zC9AIVY7R3Ch0qQQ4fEAAYASAAEgJJfvD_BwE. Datum přístupu 29. 01. 2022
6. Anonym. Cis-Diamminedichloroplatinum. 2022e. In: Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [online]. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-Diamminedichloroplatinum>. Datum přístupu: 31. 01. 2022
7. Anonym. Úvod do živočišných buněčných kultur. 2020. In: baria [online]. Dostupné na URL: <https://www.baria.cz/blog/uvod-do-zivocisnych-bunecnych-kultur/>. Datum přístupu: 29.01.2022
8. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Technical Bulletin). 2012. In: Promega [online]. Dostupné na URL: <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bull>

- [etins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferatio
n%20assay%20system%20protocol.pdf](#). Datum přístupu: 13. 02. 2022
9. Kršiak M. Objevy a testování léků v zahraničí a u nás: minulost a současnost. 2006. *Acro sborník* [online]. Praha, Česká univerzita. Dostupné na URL: https://www.lf3.cuni.cz/3LF-1416-version1-sbornik_krsiak.pdf
 10. Sizar O, Unakal CG. Gram Positive Bacteria. 2022. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 leden-. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>. Datum přístupu: 22. 03. 2022.
 11. Šafarčík K, Bartoš V, Karlíková M. Principy imunoanalytických metod. 2018. In: PO>STUDIUM [online]. Dostupné na URL: <https://postudium.cz/course/view.php?id=454>. Datum přístupu: 21. 02. 2022.
 12. Vrzalová A. Buněčné kultury, metody hodnocení buněčného poškození. 2020. [online PowerPoint prezentace]. Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné na URL: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuuce/MTSB/MTSB_2020/3.MTSB_-_Bunecne_kultury_a_cytotoxicita.pdf. Datum přístupu: 31. 01. 2022.

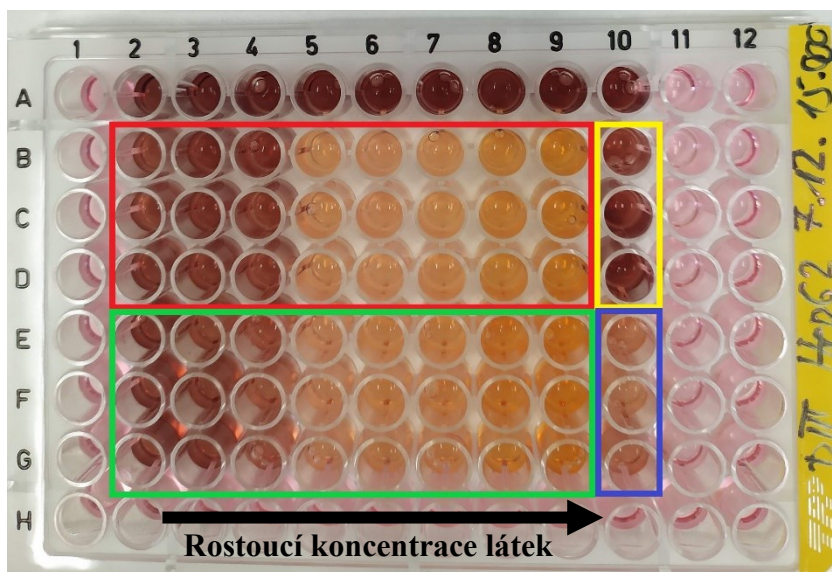
10 Přílohy



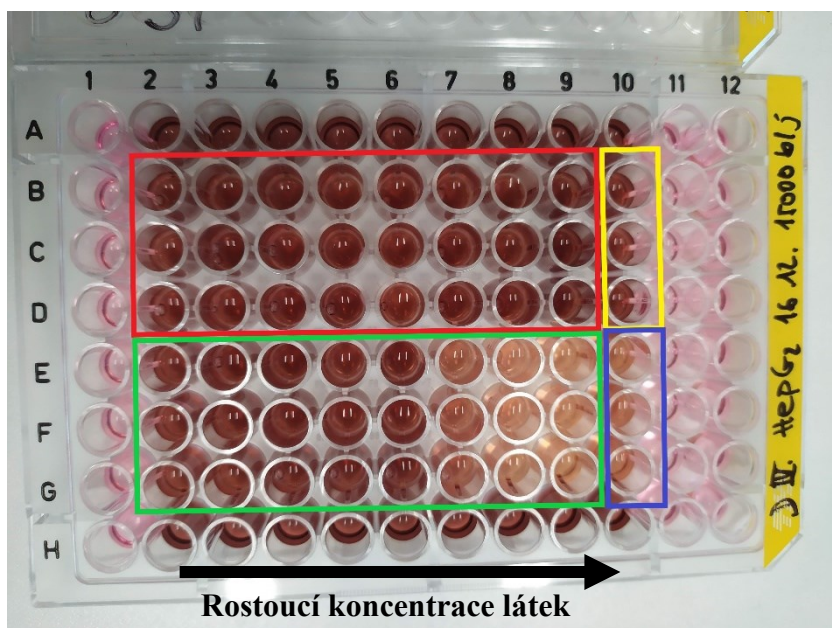
Příloha 1 GUAM (červeně), GUAM-NH₂ (zeleně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.



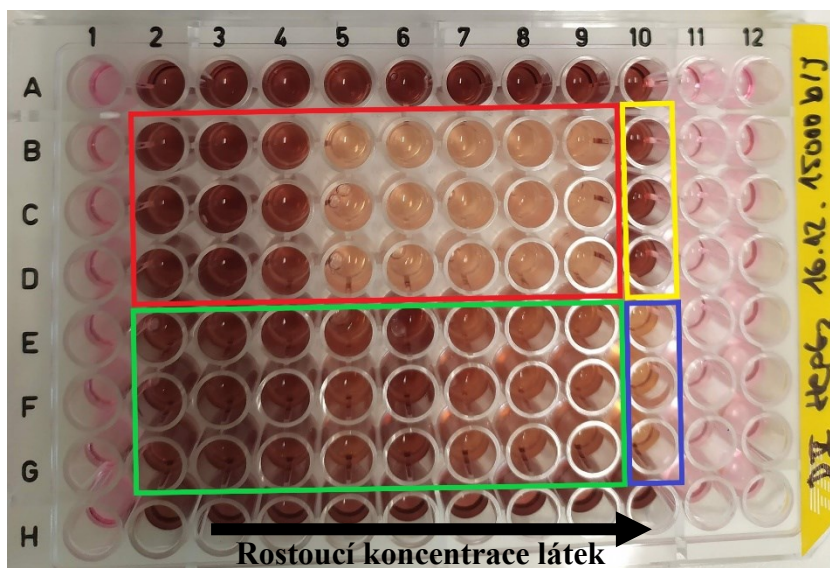
Příloha 2 THIOSEMIK (červeně), GUAM-2 (zeleně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.



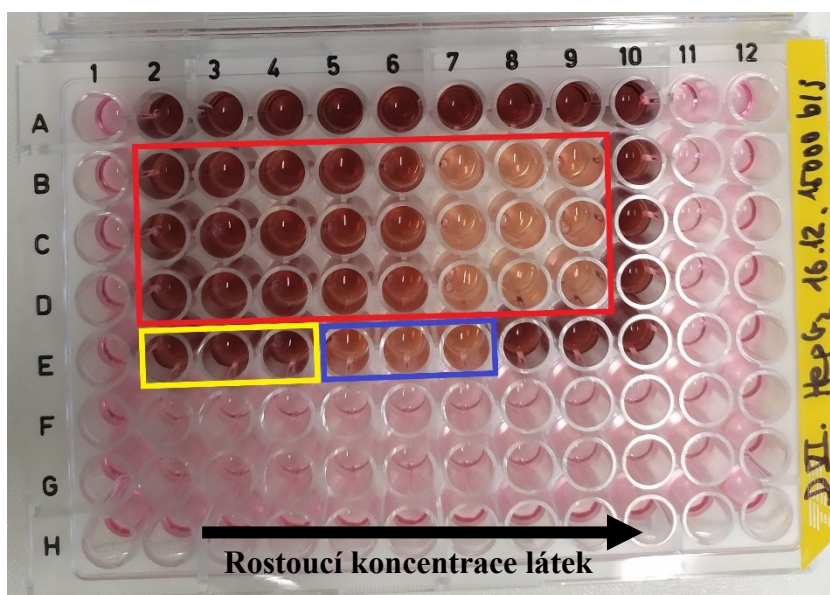
Příloha 3 GUAM-6 (červeně), GUAM-11 (zeleně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.



Příloha 4 GUAM-12 (červeně), GUAM-18 (zeleně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.



Příloha 5 GUAM-19 (červeně), GUAM-2-1 (zeleně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.



Příloha 6 GUAM-6-3 (červeně), negativní kontrola (žlutě), pozitivní kontrola (modře) po 24hodinové inkubaci s HepG2 buňkami při 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 90minutové inkubaci s činidlem CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent.