

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENÍ TOXICITY POMOCÍ BUNĚČNÉHO  
MODELU**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Karolína Fojkesová

„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“.

.....

Karolína Fojkesová

## **Poděkování**

Zde bych chtěla poděkovat vedoucí práce RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a ochotu při konzultacích. Dále chci poděkovat své rodině a přátelům, za podporu a trpělivost, kterou mi věnovali po celou dobu studia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Karolína Fojkesová

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení toxicity pomocí buněčného modelu

V této práci bylo cílem změřit a zhodnotit *in vitro* cytotoxicitu 22 nově syntetizovaných látek s potenciálním využitím pro své antimykotické, antibakteriální a antimykobakteriální působení na standardní buněčnou linii HepG2. Látky byly syntetizovány na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, a jedná se o mafenidové deriváty MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11, MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I.

Cytotoxicita byla změřena pomocí kolorimetrické metody CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, tato metoda je založena na redukci MTS na barevný rozpustný produkt formazan a látky byly srovnávány a hodnoceny dle parametru IC<sub>50</sub>.

U 9 látek, konkrétně MAF, MAF-8, MAF-11, MAF-12, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-SA, A-5-Cl, bylo IC<sub>50</sub> větší než 500 μM, tedy tyto látky můžeme označit za netoxické u HepG2 linie. Dalších 9 látek dosáhlo IC<sub>50</sub> mezi hodnotami 168,1 a 470,3 μM, jednalo se o tyto látky: A-3-I-5-Cl, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Br<sub>2</sub>, MAF-14, MAF-9, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-5-I, MAF-10. Tyto látky prokázaly relativně nízkou cytotoxicitu a spolu s první skupinou jmenovaných látek jsou vhodné k dalšímu testování. Nejtoxičtější se ukázaly sloučeniny A-THIOF, MAF-4 a MAF-13.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Karolína Fojkesová

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of toxicity using a cell model

The subject of the diploma thesis was measure and evaluate the cytotoxicity in vitro of 22 newly synthesized substances with potential use for their antifungal, antibacterial and antimycobacterial activity on the standard HepG2 cell line. The tested substances were synthesized at the Department of Organic and Bioorganic Chemistry at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University and their chemical structure is mafenide derivative. The compounds are MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11, MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I.

Cytotoxicity has been measured using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, which is a colorimetric method based on the reduction of the tetrazolium salt of MTS to the colored soluble formazan, and substances have been compared and evaluated according to the IC<sub>50</sub> parameter.

In case of 9 substances, specifically MAF, MAF-8, MAF-11, MAF-12, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-SA, A-5-Cl, the IC<sub>50</sub> was greater than 500 µM, so these substances can be considered non-toxic in the HepG2 line. The next 9 substances reached an IC<sub>50</sub> between 168,1 and 470,3 µM, and the following substances: A-3-I-5-Cl, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Br<sub>2</sub>, MAF-14, MAF-9, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-5-I, MAF-10. These substances have shown relatively low cytotoxicity and together with the first group of the above - mentioned compounds are suitable for further testing. The most toxic substances have shown: A-THIOF, MAF-4 and MAF-13.

## Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod .....	2
3	Teoretická část.....	3
3.1	Registrovaná antimikrobiální léčiva v praxi .....	3
3.1.1	Inhibitory syntézy buněčné stěny.....	3
3.1.2	Inhibitory syntézy kyseliny tetrahydrolistové.....	3
3.1.3	Inhibitory syntézy bílkovin .....	4
3.1.4	Limity současné ATB terapie .....	5
3.2	Registrovaná antimykotická léčiva v praxi.....	6
3.2.1	Azolová antimykotika .....	6
3.2.2	Polyenová antimykotika.....	6
3.2.3	Ostatní systémová antimykotika .....	7
3.2.4	Limity současných antimykotik .....	7
3.3	Buněčné kultury .....	8
3.3.1	Primární kultury .....	8
3.3.2	Buněčné linie.....	9
3.3.3	Buněčná linie HepG2 .....	9
3.4	Použité standardy .....	10
3.4.1	Tamoxifen .....	10
3.4.2	Paracetamol.....	11
3.5	Stanovení cytotoxicity.....	12
3.5.1	Kolorimetrické testy cytotoxicity.....	12
3.5.2	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay .....	14
4	Cíl práce.....	15
5	Experimentální část .....	16
5.1	Použitý materiál .....	16

5.1.1	Přístroje a pomůcky .....	16
5.1.2	Chemikálie .....	16
5.1.3	Buněčné modely .....	17
5.1.4	Testované látky .....	17
5.2	Postup experimentu .....	20
5.2.1	Příprava PBS .....	20
5.2.2	Příprava testovaných látek .....	20
5.2.3	Příprava buněčné linie .....	20
5.2.4	Vlastní stanovení cytotoxicity a vyhodnocení dat .....	21
6	Výsledky .....	23
7	Diskuse .....	32
8	Závěr .....	34
9	Literatura .....	35

## 1 Seznam zkratek

ABC	superrodina ATP-Binding Cassette
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ATP	adenosintrifosfát
ATCC	American Type Culture Collection
CRP	C-reaktivní protein
DMSO	dimethylsulfoxid
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
HepG2	standardní buněčná linie lidských hepatálních buněk
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
MFS	superrodina hlavních facilitátorů
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
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PES	fenazin ethylsulfát
PMS	fenazin methylsulfát
SERM	selektivní estrogení receptorové modulátory
WST-1	(2-(4-jodofenyl)-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

Hodnocení cytotoxicity má svou nezastupitelnou roli nejen ve vývoji nových léčiv, což je finančně i časově velice náročný proces. Nejčastějšími orgány, které jsou vystaveny toxicitě nových léčiv jsou játra, ledviny a srdce. Stanovení toxicity *in vitro* na buněčných liniích se nejčastěji provádí na jaterních buňkách, u nových léčiv jsou důležitou součástí preklinického testování. V dnešní době je k testování cytotoxicity vyvinuto již mnoho metod, které můžeme rozdělit dle jejich mechanismu účinku na integritu buněčných membrán, funkcí mitochondrií (syntéza ATP) atd. (Aslantürk, 2018) U látek je stanovena hodnota  $IC_{50}$ , která označuje koncentraci testované látky, při které je viabilita buněk v experimentu 50 %. Největší výhodou *in vitro* testování cytotoxicity tkví v dostupnosti, jednoduchosti testů a v neposlední řadě omezení testování *in vivo* na živých laboratorních zvířatech. Díky hodnotě  $IC_{50}$  se dá odhadnout působení molekuly v celém organismu, i když odpověď izolovaných buněk může být v některých případech odlišná od odpovědi celého organismu. (Kubicová et al., 2016)

Předmětem této diplomové práce je hodnocení cytotoxicity 22 nových potencionálních léčiv s antimykotickou, antibakteriální a antimykobakteriální aktivitou. Látky budou hodnoceny na buněčné linii jaterních buněk HepG2, metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, která je principiálně založena na redukci MTS živými buňkami na barevný rozpustný produkt formazan. Látky budou srovnány se standardy v podobě molekul s predikovatelným výsledkem, paracetamolem a tamoxifenem. Hodnocení proběhne na základě parametru  $IC_{50}$ , střední inhibiční koncentrace.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Registrovaná antimikrobiální léčiva v praxi

Antimikrobiální léčiva lze v praxi označit také jako antibiotika či antibakteriální chemoterapeutika. Dříve byl pojem antibiotika užíván jen v souvislosti s látkami přírodního původu, s přibývajícím počtem syntetických a semisyntetických látek s obdobným účinkem se ale začal používat souhrnně pro všechny látky s antimikrobiální aktivitou, bez ohledu na původ. (*Hartl et al., 2019*) Antibiotika lze obecně rozdělit podle několika parametrů, dle mechanismu účinku, spektra účinku na gram negativní bakterie (G-) nebo gram pozitivní (G+) bakterie a chemické struktury. (*Etebu et al., 2016*) V následujících podkapitolách budou popsány antibiotika podle mechanismu účinku.

#### 3.1.1 Inhibitory syntézy buněčné stěny

Mechanismem inhibice syntézy buněčné stěny působí antibiotika ze skupiny  $\beta$ -laktamů a glykopeptidů. Cílovou strukturu účinku antibiotik této skupiny představuje peptidoglykan, který tvoří vnější kostru buňky bakterie.. Léčiva nemají schopnost peptidoglykan přímo rozštěpit, a proto účinkují v řetězci jeho syntézy. Zatímco  $\beta$ -laktamy se váží na transpeptidázy, což jsou enzymy zodpovědné za příčné vazby v molekulách peptidoglykanu, glykopeptidy interagují s volnými konci peptidových řetězců a tím zabraňují jejich spojení. Z tohoto faktu mj. vyplývá, že glykopeptidy účinkují pomaleji, ale mají nižší šanci na vznik rezistence, neboť pro bakterii je snazší změnit transpeptidázu než konce peptidových řetězců. Obecně lze však konstatovat, že léčiva působící mechanismem inhibice syntézy peptidoglykanu se dají s výhodou použít u léčby akutních infekcí, kdy je největší část mikrobiální populace ve stadiu růstu a množení. (*Beneš 2018*)

#### 3.1.2 Inhibitory syntézy kyseliny tetrahydrolistové

Do této skupiny řadíme sulfonamidy. Místem jejich působení je enzym dihydropteroát syntáza, který katalyzuje kondenzaci kyseliny p-aminobezoové a pteridin pyrofosfátu na kyselinu dihydropteroovou, která je předposledním článkem vzniku kyseliny dihydrolistové, z níž dále vzniká kyselina tetrahydrolistová. (*Sköld, 2000*) Kyselina tetrahydrolistová je nezbytná pro mnoho biosyntetických drah bakterie, která ji však není schopna přijímat, a proto je závislá na její endogenní produkci. Kyselina

tetrahydrofolátová figuruje jako koenzym při syntéze purinů a pyrimidinů. (*Bury-Moné, 2014*) V současné době se užívá ze skupiny sulfonamidů perorálně nejvíce sulfamethoxazol a to ve fixní kombinaci s chemoterapeutikem trimetoprimem. Trimetoprim rovněž působí v řetězci syntézy kyseliny tetrahydrofolátové, konkrétně inhibicí bakteriální reduktázy kyseliny dihydrofolátové. Tato kombinace se označuje jako cotrimoxazol. S výhodou je indikován u močových infekcí a infekcí horních dýchacích cest. (*Masters, 2003*) Další z léčiv sulfonamidů, sulfadiazin je využíván v kombinované terapii toxoplazmózy. (*Petersen et al., 2014*)

### 3.1.3 Inhibitory syntézy bílkovin

Využívaná antibiotika inhibují proteosyntézu v místě podjednotky 70S bakteriálního ribozomu, konkrétně 30S a 50S. Selektivita spočívá v odlišnosti ribozomů bakteriální – prokaryotické a eukaryotní buňky, kdy druhá jmenovaná nemá 70S s podjednotkami 30S a 50S, ale 80S s podjednotkami 60S a 40S. Mezi antibiotika účinkující v místě proteosyntézy řadíme např. tetracykliny, aminoglykosidy, amfenikoly, makrolidy nebo linkosamidy. (*Walsh et al., 2016*)

Významnou skupinou inhibitorů proteosyntézy jsou již zmíněné aminoglykosidy. Konkrétně působí vazbou na 30S a tím naruší proces translace. Prvním objeveným léčivem této skupiny byl streptomycin, první účinný lék na tuberkulózu a také první antibiotikum izolované z bakterií, konkrétně rodu *Streptomyces*. (*Arya, 2007*) Další ze skupiny starších aminoglykosidů je neomycin a kanamycin, z novějších pak gentamicin a amikacin. Hlavní indikace aminoglykosidů jsou vážné septické stavy, pneumonie, infekce CNS nebo komplikované močové infekce, kde je laboratorně stanovená citlivost původce na tuto skupinu ATB. (*Lincová et al., 2007*) Největší riziko terapie aminoglykosidy spočívá s ototoxicitě a renální toxicitě, přičemž ototoxicita je ireverzibilní a vede až ke ztrátě rovnováhy nebo ztrátě sluchu. Naopak renální toxicita je reverzibilní a poměrně snadno monitorovatelná pomocí laboratorních vyšetření moči a krve. (*Arya, 2007*)

### 3.1.4 Limity současné ATB terapie

Největší omezení v antibiotické terapii nepředstavují nežádoucí účinky nebo kontraindikace, ale právě tzv. antibiotická rezistence. Antibiotika měla v 60.–80. letech zlaté časy, kdy byla hojně a plošně podávána pacientům ve snaze vymýtit infekční onemocnění. Od té doby však vývoj nových látek nepokračuje takovým tempem, jakým se bakterie adaptují a vedou až ke vzniku multirezistentních kmenů. Tento fakt je nejvíce pocíťován na jednotkách intenzivní péče a popáleninových odděleních. Uvádí se, že v důsledku antibiotické rezistence umírá ročně v Evropě více než 33 tisíc pacientů a 23 tisíc pacientů v USA. (*AVex ČR, 2020*)

Rezistenci bakterií můžeme rozdělit na dva typy – fenotypovou a genotypovou. Navzájem se liší změnou genetické informace. Fenotypová rezistence není dědičná, je přechodná a nespočívá ve změně genetické informace bakterie. Jako hlavní příklady lze uvést aktivní eflux antibiotika, rezistence části populace ve stacionární fázi růstu nebo uzavření porinů, díky kterému se antibiotikum nedostane přímo do buňky. Genotypová rezistence naopak závisí na změně genomu bakterie, zejména přijetí mobilní genetické informace, kde lze jako příklad uvést přijetí plazmidu, který obsahuje geny zodpovědné za produkci enzymů rozkládajících molekuly antibiotik, např. beta-laktamáz. Vývoj antibiotické rezistence můžeme vysvětlit tzv. selekčním tlakem antibiotik, kdy máme přítomny jak bakterie rezistentní, tak citlivé. Při podání antibiotika jsou citlivé bakterie zničeny, naopak kolonie rezistentních jedinců stále roste. (*Krejčí, 2019*)

Racionální terapie antibiotiky a její zásady jsou součástí tzv. antibiotické politiky. Ta má za úkol zpomalit vývoj antibiotické rezistence a popsat základní pilíře, dle kterých by se měli lékaři řídit při indikaci těchto léčiv a při výběru konkrétního přípravku. Ve zkratce má tedy zajistit účinnost terapie a zvýšit bezpečnost pacientů. Prvním krokem při podezření na bakteriální infekci by mělo být celkové zhodnocení stavu. Klinický obraz a laboratorní vyšetření, zejména hodnota CRP a leukocytů, by měly být vodítkem pro určení druhu infekce a její lokalizaci. V případě nejasných výsledků lze k lokalizaci použít i zobrazovací techniky jako ultrazvuk nebo magnetickou rezonanci. Úplnou jistotu konkrétní bakterie odpovědné za zánět získáme z mikrobiologického vyšetření. Vzorek však musí být správně zvolen a odebrán ideálně ještě před podáním jakýchkoli ATB. Nejčastěji se jedná o moč nebo krev. Po zohlednění popsaných bodů by měl lékař stanovit, zda zahájí ATB terapii či nikoli. Vždy by k tomu ale měl mít racionální a

obhajitelný důvod, neměl by být např. ovlivněn požadavkem pacienta nebo rodičů, v případě dětských pacientů. Jako úvodní terapie se indikují léčiva první volby, zvolená dle nejčastějšího původce v případě empirické terapie anebo po kultivaci a zjištění citlivosti patogenu na konkrétní léčiva. (*Paterová et al., 2016*)

### **3.2 Registrovaná antimykotická léčiva v praxi**

Trendem posledních desetiletí je nárůst podílu invazivních mykotických infekcí, které se podílí na morbiditě a mortalitě pacientů zpravidla s poruchami imunity. Paradoxem ovšem je, že se jedná o následek pokroku dnešní medicíny – širokospektrá antibiotika, transplantační programy nebo katetrizace pacientů. Dalším rizikovým faktorem pro vznik mykotické infekce je AIDS. Ze současných antimykotik je valná většina pouze k terapii kožních či slizničních onemocnění. (*Doležal et al., 2006*) Při invazivních kandidózách se využívá vorikonazol a flukonazol ze skupiny azolů, amfotericin B, a zástupci echinokandinů – caspofungin, micafungin a anidulafungin. (*Rüping et al., 2008*) Obecně se dá říct, že všechna antimykotika, až na výjimky, působí v buněčné membráně houby, kde inhibují syntézu ergosterolu. (*Doležal et al., 2006*)

#### **3.2.1 Azolová antimykotika**

Do skupiny azolových antimykotik řadíme léčiva klotrimazol, ketokonazol, ekonazol, bifonazol, flukonazol, itrakonazol aj. Poslední dvě jmenované molekuly se využívají v terapii systémových fungálních infekcí. Mechanismem účinku azolů je inhibice katalytické funkce fungálního cytochromu P450, nutného pro proměnu lanosterolu na ergosterol. To vede k narušení plazmatické membrány a úhynu buňky. Spektrum účinku se společně s vývojem nových antimykotik této skupiny stále rozšiřuje, nejčastěji se užívají v terapii lokálních kandidóz či onychomykóz. (*Rozsypal, 2008*)

#### **3.2.2 Polyenová antimykotika**

Polyenová antimykotika reprezentují léčiva amfotericin B, natamycin a nystatin. Léčiva této skupiny tvoří v plazmatické membráně mykotického patogenu komplex s ergosterolem, a tím vznikne pór, přes který buňka přichází o bílkoviny, sacharidy, nukleotidy a v neposlední řadě o ionty. Jedná se o antimykotika s nejširším spektrem účinku, amfotericin B je, jak již bylo zmíněno, užíván k terapii mykotických infekcí

ohrožujících život, a to např. aspergilózy, kryptokokózy či mukormykózy. Amfotericin B se zpravidla podává intravenózně, existuje však i ve formě suspenze pro imunosupresované pacienty, kde se využívá k dekontaminaci gastrointestinálního traktu. Dále se i využívá možnosti lékové formy na lipidovém nosiči nebo koloidní suspenze. Nežádoucí účinky při intravenózním podání spočívají v renální toxicitě, kterou však lze podchytit zavodněním pacienta a přísunem iontů. (Doležal et al., 2008)

### 3.2.3 Ostatní systémová antimykotika

Z ostatních antimykotik užívaných systémově lze jmenovat flucytosin. Mechanismem účinku se jedná o antimetabolit, tedy vystupuje jako falešná pyrimidinová baze v ribozomální a transferové RNA. Ve výsledku tedy blokuje proteosyntézu. Výhodou této molekuly je její hydrofilita a tím vysoká biologická dostupnost a široká orgánová distribuce. Efekt prokazuje v terapii kandidóz, chromomykóz a kryptokokóz. Riziko terapie spočívá ve vysoké hematotoxicitě, která je dle všeho způsobena přeměnou menšího množství molekuly flucytosinu na myelotoxický 5-fluorouracil. (Rozsypal, 2008)

Další významnou skupinou jsou rovněž echinokandiny. Tři zástupci skupiny anidulafungin, caspofungin a micafungin se staly léčivy první volby u invazivních kandidóz. Oblíbenost této skupiny je dána vysokou mírou tolerance pacienty a farmakokinetickým profilem. (Arendrup et al., 2014) Chemicky se jedná o velké lipopeptidové molekuly, které inhibují syntézu  $\beta$ -1,3-glukanu. Tím poškozují mykotické buněčné stěny a působí fungicidně. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolest hlavy, horečka, flebitida, uvolnění histaminu a v krajních případech jaterní toxicita a hemolýza. (Denning, 2003)

### 3.2.4 Limity současných antimykotik

Jak již bylo zmíněno, efektivní antimykotická terapie je velmi důležitá pro přežití zejména imunosupresovaných pacientů. V současnosti jsou využívány pouze léčiva skupin polyenů, triazolů, echinokandinů a v adjuvantní terapii flucytosin. Bohužel se, ale také zvyšuje počet rezistentních kmenů rodu *Candida*, *Cryptococcus* a *Aspergillus*. (Buda De Cesare et al., 2020) Největšími problémy jsou tedy omezený výběr účinných léčiv, jejich toxicita a v neposlední řadě také rezistentní kmeny hub. (Wall et al., 2020)

Pro příklad uvedení do problematiky rezistence byla vybrána azolová antimykotika. Zde byly popsány hned 4 mechanismy vzniku rezistence. Prvním z nich je zvýšení lékového efluxu, kdy jsou aktivovány membránové efluxní pumpy, které aktivně snižují intracelulární koncentraci léčiva. V mykotické buňce se na rezistenci podílí dva typy efluxních systémů – superrodina ATP-Binding Cassette (ABC) a superrodina hlavních facilitátorů (MFS). (*Fuentefria et al., 2018*)

Dalším mechanismem rezistence je mutace cílové struktury léčiva anebo jeho snížená exprese. U azolových antimykotik se jedná o lanosterol 14 $\alpha$ -demethylázu, která je u některých kmenů rodu *Candida* syntetizována zvýšenou měrou. Stane se tak v reakci na konečnou depleci ergosterolu, kdy je více expresován gen ERG11, díky kterému se zvýší produkce právě zmíněné lanosterol 14 $\alpha$ -demethylázy, a koncentrace léčiva ve výsledku nepostačí na úplnou inhibici. Posledním popsáním mechanismem rezistence na azoly je změna dráhy biosyntézy ergosterolu. Při expozici mykotické buňky azoly se mj. v membráně akumuluje mykotický inhibitor růstu 14 $\alpha$ -methyl-3,6-diol, kterému je prostřednictvím mutace genu ERG3 zabráněno v tvorbě 14 $\alpha$ -methyl-fekosterolu. Mutace ERG3 tedy vede k hromadění prekurzorů, které jsou schopny nahradit samotný ergosterol. (*Fuentefria et al., 2018*)

### 3.3 Buněčné kultury

Buněčné kultury můžeme definovat jako laboratorní metodu, která umožňuje růst eukaryotických nebo prokaryotických buněk ve fyziologickém prostředí. Jsou velmi všestranným nástrojem pro vědecké výzkumy, kde jejich výhoda spočívá v homogenitě a z ní vyplývající reprodukovatelnost výsledků. Přesným typem kultivovaných buněk a kultivačních podmínek totiž odstraníme genetické a enviromentální proměnné, které hrají velkou roli při pokusech na celých orgánových systémech. Využití nachází buněčné kultury například ve výzkumech týkajících se buněčné biologie, mechanismů šíření onemocnění a v neposlední řadě testování toxicity nových léčiv. (*Segeritz et al., 2017*)

#### 3.3.1 Primární kultury

Za primární kulturu považujeme první kulturu buněk, které byly izolovány z tkáně laboratorního zvířete nebo člověka. Životnost takto vysazené kultury závisí na typu

buněk, liší se u normální a nádorové buňky. Běžné buňky podléhají stárnutí, kdy se po několika děleních buňky přestávají dělit a mění vlastnosti. Naopak nádorové buňky ve většině případů nestárnou a snadněji se kultivují. Jednou z možností založení primární kultury je nasazení přímo kousku tkáně na kultivační médium. Touto metodou se zakládá např. kultura fibroblastů. Další, majoritně zastoupená, metoda zahrnuje mechanické poškození tkáně a následné natrávení mezibuněčné hmoty enzymaticky, např. kolagenázou či trypsinem. Následně vznikne zpravidla směs různých typů buněk, k jejichž oddělení se využívá jak specifita kultivačních podmínek pro jednotlivé typy buněk, tak například rozdílná specifická hmotnost, která hraje roli při centrifugaci (tzv. izopyknická sedimentace). (*Vejražka, 2008*)

### 3.3.2 Buněčné linie

Jako buněčné linie označujeme buněčné kultury, které se prakticky neomezeně dělí a mohou se tak šířit a využívat pro výzkumy i celá desetiletí. Uplatňují se zde nádorové buňky díky své absenci mechanismu apoptózy a indukce buněčné smrti. I přesto nelze u každé nádorové buňky predikovat vznik buněčné linie. Buňky, které se chovají *in vivo* jako nádorové, takže se neomezeně dělí, se *in vitro* mohou zachovat zcela odlišně a postupně zaniknout. Algoritmus tohoto procesu ještě není zcela prozkoumán. (*Mirabelli et al., 2019*)

Za první izolovanou lidskou buněčnou linií označujeme HeLa buňky. Pochází z velmi agresivního adenokarcinomu děložního čípku Henrietty Lacks, která mu podlehla v roce 1951. (*Lucey et al., 2009*)

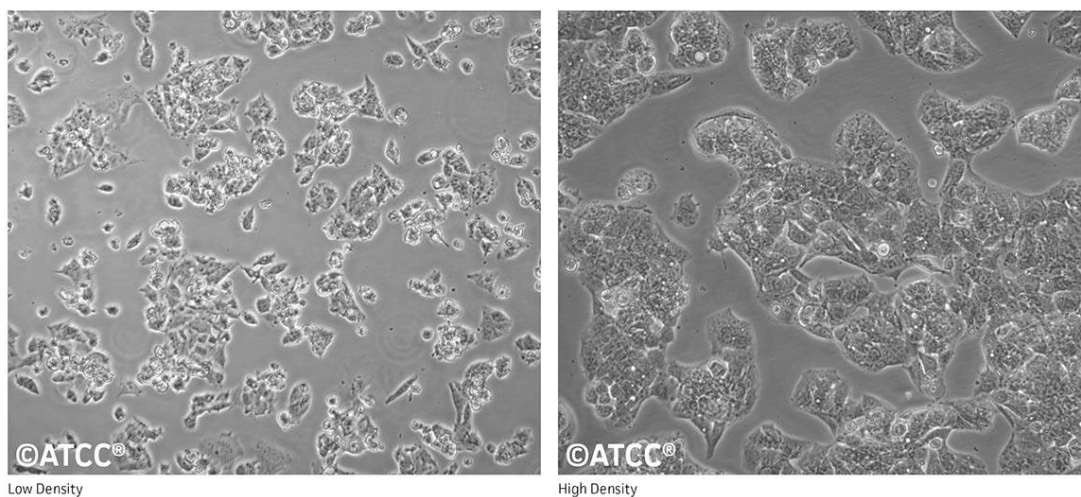
### 3.3.3 Buněčná linie HepG2

HepG2 buněčná linie byla založena v roce 1979 Barbarou Knowles a kol. z jaterní tkáně patnáctiletého pacienta (viz. Obr. 1). Původně byla malignita označena jako hepatocelulární karcinom, později ale bylo upřesněno, že se jedná o hepatoblastom. Hepatoblastom je embryonální malignita hepatocelulárního původu a jedná se o jeden z nejčastějších primárních nádorů jater u dětských pacientů. (*López-Terrada et al., 2009*)

Optimální podmínky pro růst HepG2 zahrnují teplotu 37 °C a vzduch saturovaný oxidem uhličitým na 5 %. Kultivační médium se dle doporučení výrobce doplní bovinním fetálním sérem do jeho konečné koncentrace 10 %. (*Anonym, 2016 c*)



Sérum je v tomto případě zdrojem růstových a adhezivních faktorů, lipidů, hormonů a minerálů. Dále reguluje pH média, které by mělo odpovídat pH lidského těla, tj. 7,4. Nevýhodou použití séra je jeho vysoká cena, problémy se standardizací a v neposlední řadě možná variabilita. (*Anonym, 2016 a*)



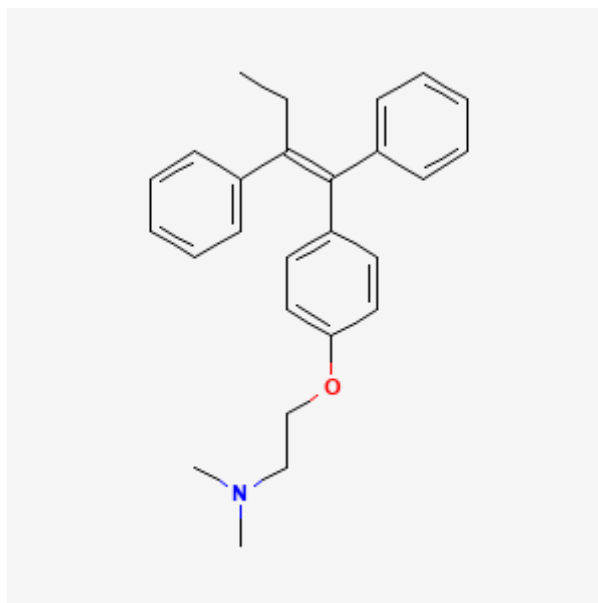
**Obr. 1** Mikroskopický snímek buněčné linie HepG2; (převzato z *Anonym, 2016 a*)

### 3.4 Použité standardy

#### 3.4.1 Tamoxifen

Tamoxifen (viz. Obr. 2) je látka působící jako antiestrogen a díky tomu je jednou z nejpoužívanějších látek v terapii karcinomu prsu s pozitivitou estrogenních receptorů. (*Ring et al., 2004*)

Léčba těchto typů nádorů zahrnuje právě blokaci estrogenní signalizace, která je zodpovědná za proliferaci nádorových buněk. Zde se uplatňují tzv. SERM – selektivní estrogenní receptorové modulátory, kam patří mimo tamoxifenu také raloxifen, toremifen a další. Tamoxifen je využíván i v prevenci vzniku karcinomu prsu u žen se zvýšeným rizikem. Kromě benefitů však tato léčba přináší i rizika a nežádoucí účinky. U tamoxifenu jsou významnými nežádoucími účinky hluboká žilní trombóza, plicní embolie a katarakta. Zároveň jeho estrogenní aktivita v endometriu vede k 7,5krát zvýšenému riziku vzniku nádorů endometria u pacientek s nádorem prsu. U zdravých žen je toto riziko 1,4-5krát vyšší proti placebo. (*Narod et al., 2004*)



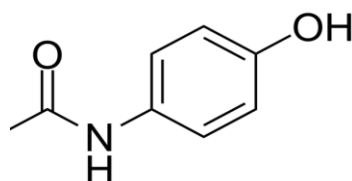
**Obr. 2** Struktura molekuly tamoxifenu; (převzato z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=2733526&t=1>)

### 3.4.2 Paracetamol

Paracetamol je jedním z nejčastějších léčiv používaných pro analgetický a antipyretický účinek. Oproti nesteroidním antiflogistikům nemá protizánětlivý účinek a nepůsobuje vedlejší účinky jako dráždění GIT či kardiotoxické a renálně toxické účinky. (*Bertolini et al., 2006*)

Kompletní mechanismus účinku byl popsán až po více než 100 letech od objevení molekuly paracetamolu. Účinků paracetamolu na lidský organismus je známo více, ať už se jedná o inhibici syntézy prostaglandinů, serotoninergní účinky a efekt na opioidních či kanabinoidních receptorech. Nejvýznamnější je díky antipyretickému a analgetickému účinku působení na syntézu prostaglandinů. Prostanoidy, zahrnující prostaglandiny a tromboxany, jsou díky enzymu prostaglandin H<sub>2</sub> syntázy tvořeny z arachidonové kyseliny. Nejprve za přítomnosti enzymu cyklooxygenázy vzniká nestabilní hyperoxid prostaglandin H<sub>2</sub>, který se následně prostřednictvím peroxidázy mění na samotné prostaglandiny, tromboxany a prostacykliny. Zásah paracetamolu do tohoto procesu spočívá v tom, že působí jako redukční ko-substrát pro peroxidázu a tím blokuje její fyziologickou regeneraci. (*Sharma et al., 2014*)

Chemickou strukturou se paracetamol (viz. Obr. 3) řadí mezi anilínové deriváty, je označován také jako acetaminofen. (*Bertolini et al., 2006*)



**Obr. 3** Struktura molekuly paracetamolu; (převzato z: [https://file.medchemexpress.com/product\\_pic/hy-66005.gif](https://file.medchemexpress.com/product_pic/hy-66005.gif))

Jde o slabou kyselinu, proto je z většiny při fyziologickém pH nedisociovaná. Díky tomu proniká molekula do tkáně volnou difuzí. Vrcholu plazmatické hladiny dosahuje už za 30–60 minut po perorální aplikaci. Co se týče rektální aplikace, je doporučeno použít 3-4krát vyšší dávkování (vztaženo na kg) než při podání per os. Metabolizován je konjugací v játrech, na glukuronid a sulfát. Minoritní část je také metabolizována přes CYP450 na N-acetyl-p-benzochinonimin, který je následnou konjugací v játrech s glutathionem eliminován a vyloučen ledvinami stejně jako v prvním případě. (*Hodis, 2015*)

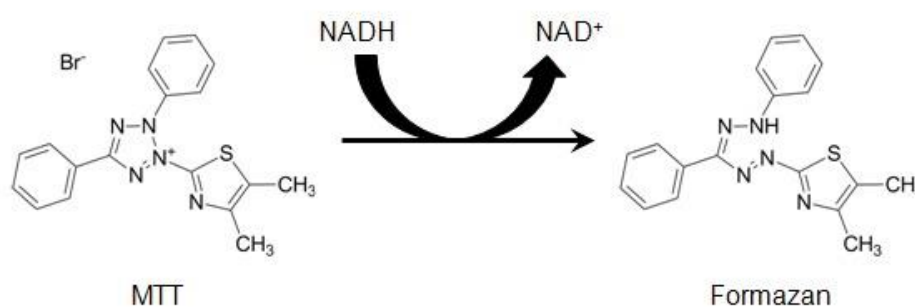
### 3.5 Stanovení cytotoxicity

Testy cytotoxicity jsou podstatnou součástí vývoje nových léčiv. Jedná se o poměrně rychlou a levnou možnost zjistit, jak působí molekula potencionálního léčiva na lidské buňky. Limitací může být vliv enviromentálních faktorů a chybějící údaje o závislosti toxicity na čase. (*Bácskay et al., 2018*) Samotné testy cytotoxicity a viability buněk se dají rozdělit do 4 skupin, podle principu. Jde o testy vyloučení barviva, kolorimetrické testy, fluorometrické a luminometrické testy. (*Aslantürk et al., 2018*)

#### 3.5.1 Kolorimetrické testy cytotoxicity

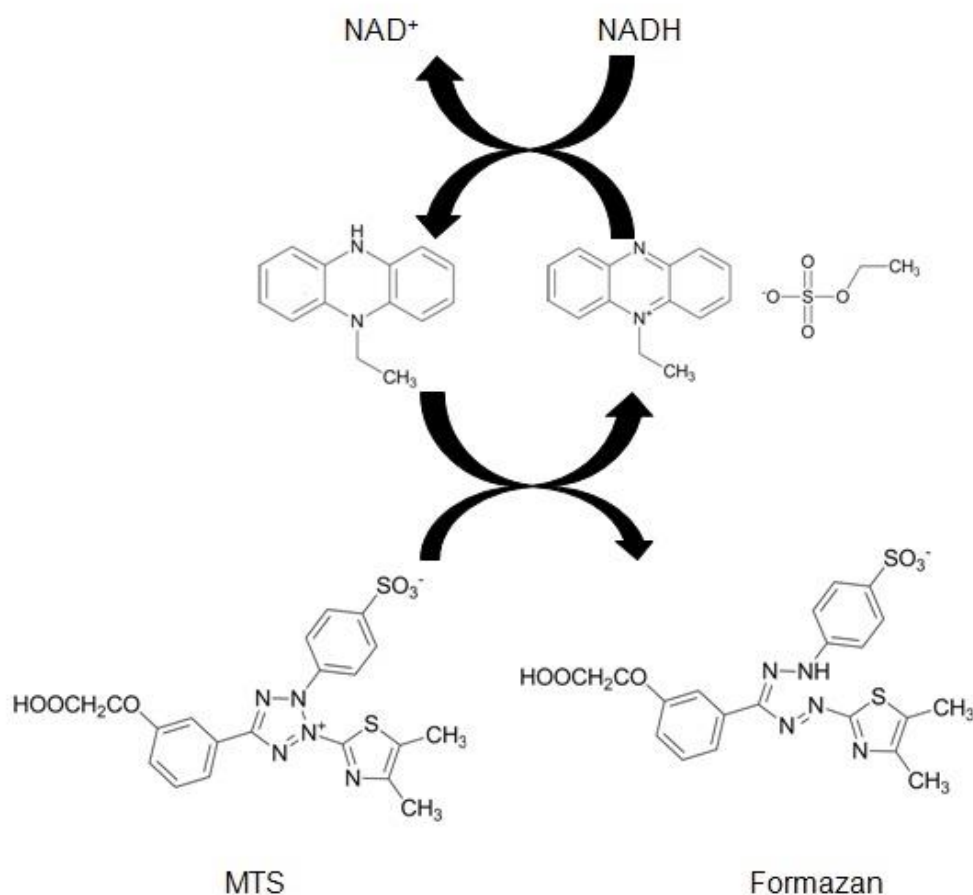
Principem těchto testů je měření biochemických markerů, pomocí kterých určíme metabolickou aktivitu buněk a tím jejich viabilitu. Výsledkem reakce, prováděné při

těchto testech, je barevný produkt. Míra zbarvení je úměrná počtu přeživších buněk a měří se spektrofotometricky. (Aslantiürk *et al.*, 2018) Sloučeniny využívané při kolorimetrických metodách se dají rozdělit do dvou skupin, dle náboje. První skupinu tvoří MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid), jehož molekula je kladně nabitá a snadno penetruje do eukaryotických buněk, kde v případě živých buněk proběhne redukce na fialový ve vodě nerozpustný formazan, který se rozpustí ve vhodném organickém rozpouštědle (například v dimethylsulfoxidu - DMSO). (Riss *et al.*, 2016) Schéma reakce je zobrazeno na obrázku č. 4.



**Obr. 4** Schéma redukce MTT v eukaryotické buňce na formazan; (převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F1/?report=objectonly>)

Druhou skupinu zastupují činidla MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), WST-1 (2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium), jejichž molekuly mají záporný náboj a tím pádem neprocházejí plazmatickou membránou do buňky. To je důvodem, proč se užívají společně s elektronovým akceptorem, který pronikne do buňky, kde je zredukován pomocí NADP<sup>+</sup> a NADPH, produkovanými dehydrogenázami živých buněk, a v redukované formě opouští buňku. Poté dojde k redukci činidla na formazan mimo buňku. Jako elektronové akceptory se uplatňují molekuly PES (fenazin ethylsulfát) a PMS (fenazin methylsulfát). (Riss *et al.*, 2016) Na obrázku č. 5 je znázorněné schéma vzniku rozpustného formazanu z činidla MTS za pomoci fenazin ethylsulfátu.



**Obr. 5** Redukce MTS na formazan, za účasti molekuly PES; (převzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/figure/mttassays.F6/?report=objectonly>)

### 3.5.2 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je komerční sada pro testování cytotoxicity na základě kolorimetrie. Roztok obsahuje činidlo MTS a jako elektronový akceptor molekulu PES. Schéma reakce je uvedeno na předchozím obrázku č. 4. Roztok se přidává přímo do jamek s buňkami, a po 1-4 hodinách se změří absorbance při 490 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk. (Anonym, 2012 b)

## 4 Cíl práce

- Stanovit potenciální cytotoxicitu *in vitro* 22 vývojových látek pomocí testu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na jaterní buněčné linii HepG2.
- Porovnat naměřené hodnoty cytotoxicity 22 látek s potenciálním antibakteriálním a antimykotickým účinkem s lékovými standardy.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Použitý materiál

#### 5.1.1 Přístroje a pomůcky

- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS-1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)
- Destičkový analyzátor TECAN (Infinite M200, Švýcarsko)
- Laminární box Micrological safety cabinet TOP-SAVE 1,8 (Bioair, Itálie)
- Vodní lázeň, TW 12 (Julabo, Německo)
- Centrifuga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Německo)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)
- Orbitální třepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Německo)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Kultivační láhve 25 cm<sup>2</sup> a 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)
- Skleněné Pasteurovy jednorázové pipety (Sigm Aldrich, USA)
- Jednorázové plastové pipety 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (TPP, Švýcarsko)
- Automatická pipeta Discovery 50-300 µl (HTL, Polsko)
- Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus 5–50 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl (Eppendorf, Německo)
- Mikrozkmavky Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Německo)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1–20 µl, 20–200 µl (Eppendorf, Německo)
- Falkonky 15 ml, 50 ml (TPP, Švýcarsko)
- Rukavice latexové, nesterilní (VWR, USA)

#### 5.1.2 Chemikálie

- Fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline; PBS, pH = 7,4) – chemikálie: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PENTA, Česká republika)
- DMEM (Dulbeccovo a Eagolovo modifikované médium) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetální hovězí sérum (Fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, USA)

- Trypsin (0,25 %, Trypsin-EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)) (SigmaAldrich, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (MEM, Non-essential Amino Acid Solution) (SigmaAldrich, USA)
- DMSO (dimethylsulfoxid pro molekulární biologii; > 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Paracetamol (Sigma-Aldrich, USA)
- Tamoxifen (Sigma-Aldrich, USA)
- Testované látky (MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11, MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I) (Faf UK)

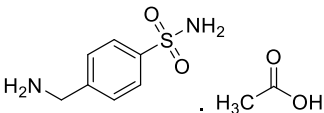
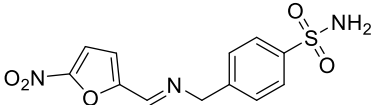
### 5.1.3 Buněčné modely

Pro účely experimentu byly využity lidské jaterní buňky linie HepG2 ze společnosti ATCC (American Type Culture Collection, USA).

### 5.1.4 Testované látky

Testované látky byly vyvinuty na katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Mají strukturu mafenidových derivátů s antimikrobiálním, antifungálním i antimykobakteriálním účinkem. Jednotlivé látky a jejich vzorce jsou uvedeny v tabulce č. 1.

**Tab. 1** Seznam testovaných látek

Kód	Vzorec	Název
MAF		mafenid-acetát; 4-(aminomethyl)benzensulfonamid-acetát
MAF-4		( <i>E</i> )-4-({[(5-nitrofuran-2-yl)methylen]amino}methyl)benzensulfonamid



MAF-8		( <i>E</i> )-4-[[[5-chloro-2-methoxybenzylidene]amino]methyl]benzenesulfonamid
MAF-9		( <i>E</i> )-4-([1-(3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl)ethylidene]amino)methyl)benzenesulfonamid
MAF-10		( <i>E</i> )-4-[[[4-hydroxy-3,5-dijodobenzylidene]amino]methyl]benzenesulfonamid
MAF-11		( <i>E</i> )-4-[[[furan-2-ylmethylene]amino]methyl]benzenesulfonamid
MAF-12		( <i>E</i> )-4-([1-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)ethylidene]amino)methyl)benzenesulfonamid
MAF-13		( <i>E</i> )-2,4-dijod-6-[[[4-sulfamoylbenzyl]imino]methyl]fenyl-acetát
MAF-14		4-[[[2-hydroxy-3,5-dijodobenzyl]amino]methyl]benzenesulfonamid
MAF-16		( <i>E</i> )-4-[[[thiophen-2-ylmethylene]amino]methyl]benzenesulfonamid
A-5-F		( <i>E</i> )-4-[[[5-fluor-2-hydroxybenzylidene]amino]methyl]benzenesulfonamid
A-3,5-F <sub>2</sub>		( <i>E</i> )-4-[[[3,5-difluor-2-hydroxybenzylidene]amino]methyl]benzenesulfonamid
A-3-I-5-Cl		( <i>E</i> )-4-[[[5-chloro-2-hydroxy-3-jodobenzylidene]amino]methyl]benzenesulfonamid

A-5-I		( <i>E</i> )-4- {[ (2-hydroxy-5-jod-benzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-3-Br-5-Cl		( <i>E</i> )-4- {[ (5-brom-3-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-3,5-Cl <sub>2</sub>		( <i>E</i> )-4- {[ (3,5-dichlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-3,5-Br <sub>2</sub>		( <i>E</i> )-4- {[ (3,5-dibrom-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-5-Br		( <i>E</i> )-4- {[ (5-brom-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-THIOF		( <i>E</i> )-4- ( {[ (5-nitrothiofen-2-yl)methylen]amino} methyl) benzensulfonamid
A-SA		( <i>E</i> )-4- {[ (2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-3,5-I <sub>2</sub>		( <i>E</i> )-4- {[ (2-hydroxy-3,5-dijod-benzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid
A-5-Cl		( <i>E</i> )-4- {[ (5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]methyl} benzensulfonamid

## 5.2 Postup experimentu

### 5.2.1 Příprava PBS

Všechny látky potřebné k přípravě fosfátového pufru (PBS) jsme navázili dle rozpisu v tabulce č. 2. Následně byly látky převedeny do kádinky a s pomocí elektromagnetické míchačky rozpuštěny v destilované vodě, ta byla poté doplněna do požadovaného objemu – 1 l. Požadovaného pH 7,4 jsme dosáhli postupným přidáváním NaOH, za soustavného měření pH na pH metru. Dále jsme takto připravený pufr sterilizovali a byl připraven k použití.

**Tab. 2** Příprava 1 litru PBS

Sloučenina	Molekulární hmotnost [g/mol]	Koncentrace [g/l]
NaCl	58,44	16,01
KCl	74,55	0,42
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	358,14	7,16
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	177,99	3,12

### 5.2.2 Příprava testovaných látek

Z testovaných látek jsme si nejdříve vytvořili zásobní roztoky o koncentracích 1 mM, 10 mM a 50 mM. Z důvodu jejich špatné rozpustnosti ve vodě, jsme použili vysoce polární rozpouštědlo DMSO, které je však ve vyšších koncentracích pro buňky toxické, takže jsme dbali na maximální obsah ve finálních roztocích 1 %. Ze zásobních roztoků jsme poté připravili roztoky určené k testování, o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu$ M.

### 5.2.3 Příprava buněčné linie

Buňky linie HepG2 byly kultivovány v kultivačních lahvích o velikosti 75 cm<sup>2</sup> v inkubátoru při teplotě 37 °C a koncentraci CO<sub>2</sub> 5 %. Každý týden byly buňky

pasážovány, kdy bylo nejdříve opatrně odsáto médium z lahve. Dále bylo nutné omýt přisedlé buňky 6 ml PBS a opět roztok odsát. Po přidání 3 ml roztoku trypsinu a jeho rozprostření se láhev umístila na 1-2 minuty zpět do inkubátoru. Po uplynutí inkubace jsme přidali 6 ml roztoku media se sérem pro zastavení účinku trypsinu. Suspenzi buněk jsme resuspendovali a přenesli 1 ml suspenze do čisté lahve s kultivačním médiem. Takto založenou pasáž jsme umístili do inkubátoru na 7 dní.

Pro samotný pokus jsme buňky nasadili na destičku o 96 jamkách, kdy v každé jamce je 15 000 buněk, tj. 100  $\mu$ l na jamku. Před samotným přidáním roztoků testovaných látek jsme destičky umístili na 24 hodin do 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub> 5 %.

#### **5.2.4 Vlastní stanovení cytotoxicity a vyhodnocení dat**

Po uplynutí kultivační doby jsme destičky s buňkami vyjmuli z inkubátoru a přemístili do laminárního boxu, kde jsme již přidali připravené roztoky testovaných látek o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu$ M, všechny koncentrace i kontroly byly měřeny ve 3 jamkách. Dále jsme připravili kontroly 100 % životaschopnosti buněk, kde byla koncentrace DMSO 1 % a 0 % životaschopnosti buněk, kde byla koncentrace DMSO 10 %. Rovněž jsme připravili kontrolu kultivačního média – pozadí, jehož hodnotu absorbance jsme odečetli od naměřených výsledků u testovaných látek. Dále jsme u každé koncentrace připravili kontrolu bez buněk, obsahující pouze roztok látky o příslušné koncentraci. Destičky jsme opět umístili do inkubátoru, za stejných podmínek, na dalších 24 hodin.

Po uplynutí času jsme do každé jamky napipetovali 20  $\mu$ l CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Opět jsme destičky umístili do inkubátoru, tentokrát na 90 minut. Poté jsme změřili absorbanci na přístroji TECAN (Infinita M200, Austria) při 490 nm.

Výsledky jsme převedli do programu Microsoft Excel 2018, kde jsme hodnoty jednotlivých jamek o shodné koncentraci testované látky zprůměrovali, dále jsme vypočítali relativní a směrodatnou odchylku. Viabilitu buněk jsme vypočítali dle následujícího vzorce:

$$\% Viability = \frac{(A_b - A_k) \times 100}{Av_{100} - A_m}$$

$A_b$  = průměr z hodnot absorbance buněk se stejnou koncentrací testované látky

$A_k$  = průměrná hodnota absorbance z jamek kontroly roztoků látek o příslušné koncentraci bez buněk

$Av_{100}$  = průměrná hodnota absorbance u jamek kontroly 100 % životaschopnosti buněk

$A_m$  = průměrná hodnota absorbance u jamek obsahujících pouze kultivační médium (Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Assay, Technical Bulletin, Promega. In: Promega. 2012)

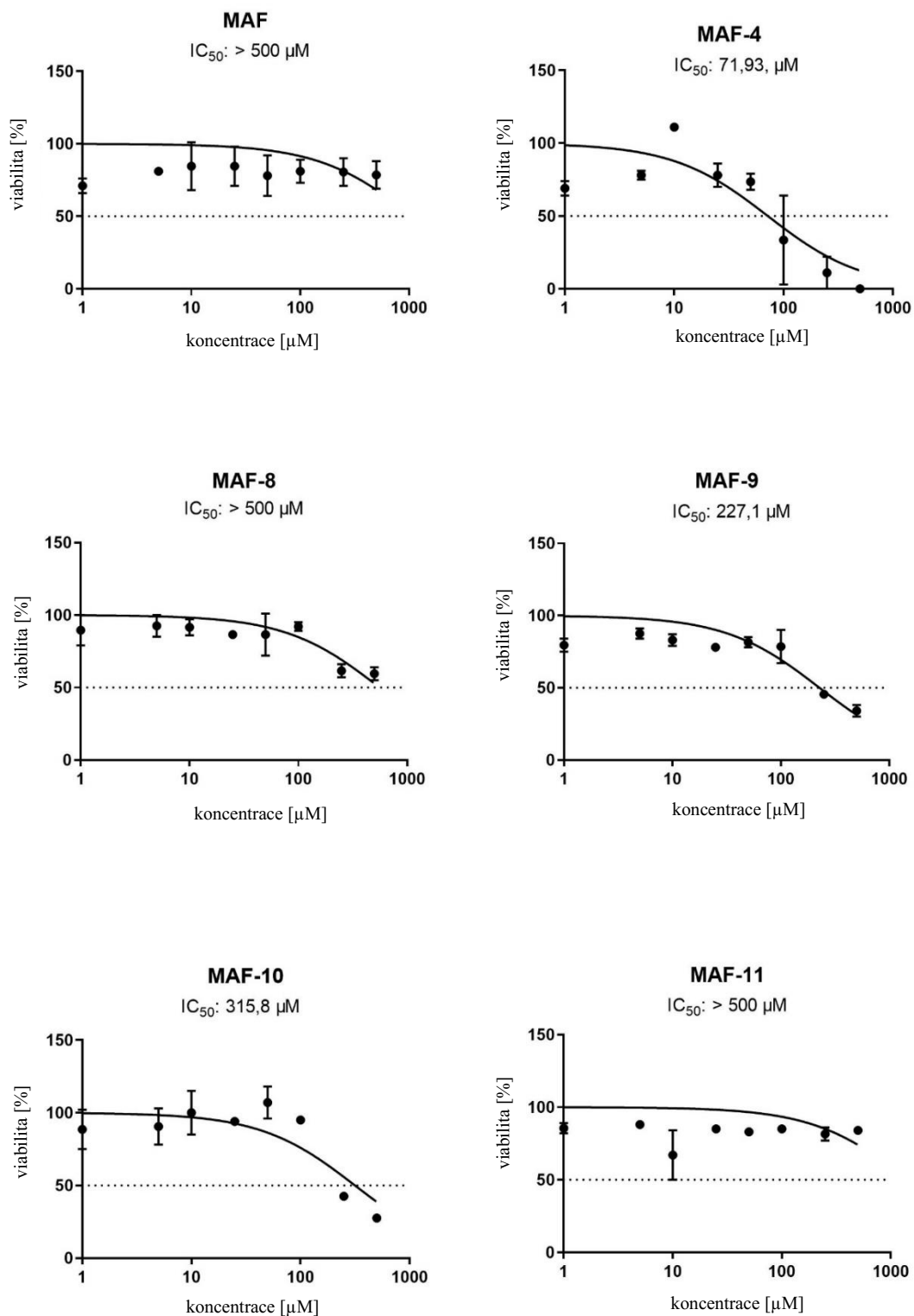
## 6 Výsledky

V následující tabulce č. 3 jsou uvedeny testované látky, standardy a jejich hodnoty  $IC_{50}$ , vyjadřující jejich toxicitu vůči buněčné kultuře HepG2.

**Tab. 3** Hodnoty  $IC_{50}$  u testovaných látek a standardů

Testovaná látka	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Rozsah koncentrací [ $\mu$ M]	Pasáž
MAF	> 500	1–500	P 8-11
MAF-4	71,93	1–500	P 8-11
MAF-8	> 500	1–500	P 8-11
MAF-9	227,1	1–500	P 8-11
MAF-10	315,8	1–500	P 8-11
MAF-11	> 500	1–500	P 8-11
MAF-12	> 500	1–500	P 8-11
MAF-13	103,1	1–500	P 8-11
MAF-14	225,3	1–500	P 8-11
MAF-16	> 500	1–500	P 8-11
A-5-F	> 500	1–500	P 8-11
A-3,5-F2	> 500	1–500	P 8-11
A-3-Br-5-Cl	183,6	1–500	P 10-12
A-3,5-Cl <sub>2</sub>	279,5	1–500	P 10-12
A-3,5-Br <sub>2</sub> ,	189,2	1–500	P 10-12
A-5-Br	470,3	1–500	P 10-12
A-THIOF	54,38	1–500	P 10-12
A-SA	> 500	1–500	P 10-12
A-3,5-I <sub>2</sub>	230,2	1–500	P 10-12
A-5-Cl	> 500	1–500	P 10-12
A-3-I-5-Cl	168,1	1–500	P 10-12
A-5-I	310,9	1–500	P 10-12
Tamoxifen	19,56	1–500	P 10-12
Paracetamol	>500	1–500	P 10-12

Závislost viability buněk na koncentraci jednotlivých testovaných látek a standardů je znázorněna graficky na obrázcích č. 6-11. Jak již bylo zmíněno, jako standardy byly použity tamoxifen a paracetamol.

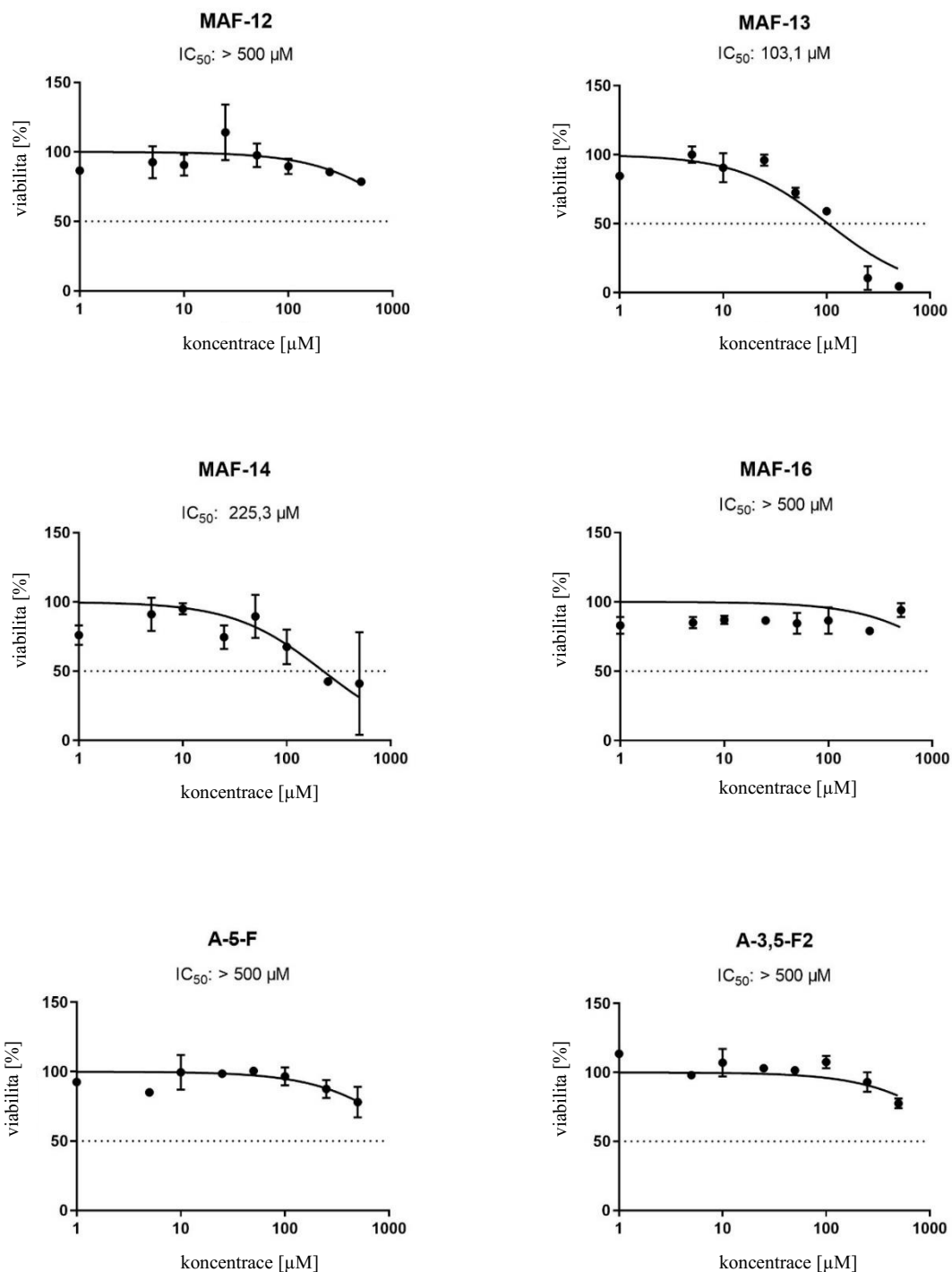


**Obř. 6** Grafické znázornění cytotoxicity látek MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11

Z obrázku č. 6 lze vyčíst hodnoty  $IC_{50}$  pro látky MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11. Hodnota byla zjištěna na základě cytotoxického působení testovaných látek o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  na buněčnou kulturu HepG2, kdy byly buňky vystaveny látkám po 24 hodin a inkubovány za standardních podmínek (37 °C a v atmosféře 5 %  $\text{CO}_2$ ). Z výsledků lze určit, že nejtoxičtější je látka MAF-4 s  $IC_{50}$  71,93  $\mu\text{M}$ , naopak nejméně toxicky se projevily látky MAF, MAF-8, MAF-11, kde  $IC_{50}$  je větší než 500  $\mu\text{M}$ . Látky po seřazení dle rostoucí cytotoxicity utvoří následující řadu: MAF, MAF-8, MAF-11 < MAF-10 < MAF-9 < MAF-4.

U látek s hodnotou  $IC_{50}$  do 500  $\mu\text{M}$ , kromě MAF-4, lze pozorovat relativně stálá hodnota viability buněk v koncentracích 1–100  $\mu\text{M}$ . Poté následuje prudký pokles viability v řádech desítek procent. Nejtoxičtější látka MAF-4 se liší tím, že prudký pokles viability nastává již při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , a při nejvyšší koncentraci 500  $\mu\text{M}$  je životaschopnost buněk nulová.



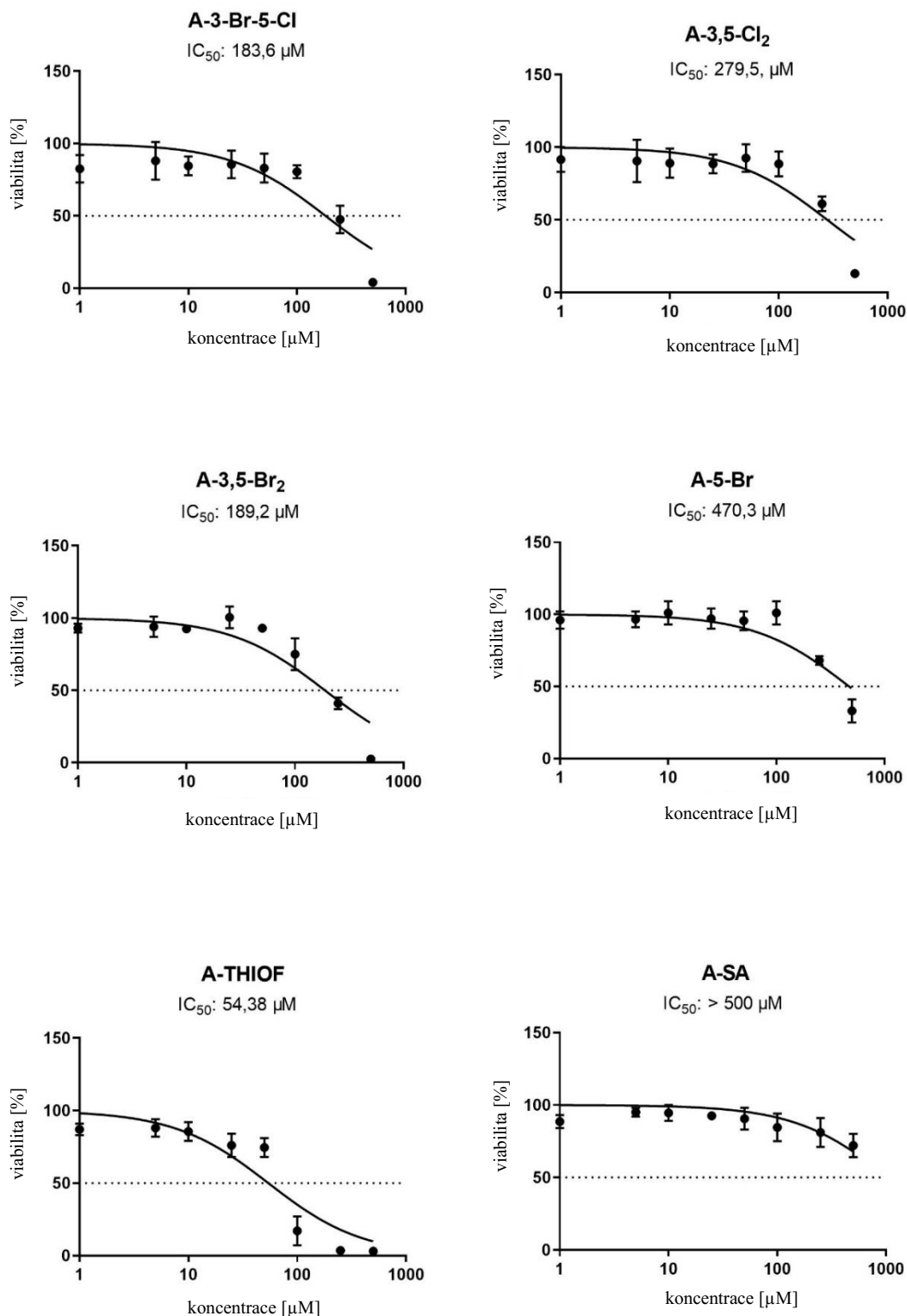


**Obr. 7** Grafické znázornění cytotoxicity látek MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>

Z obrázku č. 7 lze vyčíst hodnoty IC<sub>50</sub> pro látky MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>. Hodnota byla zjištěna na základě cytotoxického působení testovaných látek o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μM na buněčnou kulturu HepG2, kdy byly buňky vystaveny látkám 24 hodin a inkubovány za standardních podmínek, tedy 37 °C a v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Z výsledků lze určit, že nejtoxicičtější je

MAF-13 s  $IC_{50}$  103,1  $\mu$ M a MAF-14 s  $IC_{50}$  225,3  $\mu$ M, u ostatních látek se hodnoty  $IC_{50}$  pohybovaly nad 500  $\mu$ M. Látky po seřazení dle rostoucí cytotoxicity utvoří následující řadu: MAF-12, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub> < MAF-14 < MAF-13.

Kromě nejtoxičtější látky na tomto obrázku MAF-13 a MAF-14, lze grafy ostatních látek popsat jako poměrně příznivé pro další vývoj a výzkum. Jejich negativní vliv na viabilitu buněk v měřeném koncentračním rozmezí je mírný, tj. hodnoty viability klesají o jednotky procent od koncentrace 100  $\mu$ M. Naopak u dvou jmenovaných nejtoxičtějších látek je průběh grafu jiný. U látky MAF-13 se při koncentraci nad 100  $\mu$ M skokově sníží viabilita buněk, až do nulové hodnoty při koncentraci 500  $\mu$ M. Látka MAF-14 se rovněž projevila skokovým zvýšením toxického efektu při koncentraci nad 100  $\mu$ M, ale viabilita buněk v měřeném rozmezí koncentrací 1-500  $\mu$ M nedosáhla nuly.

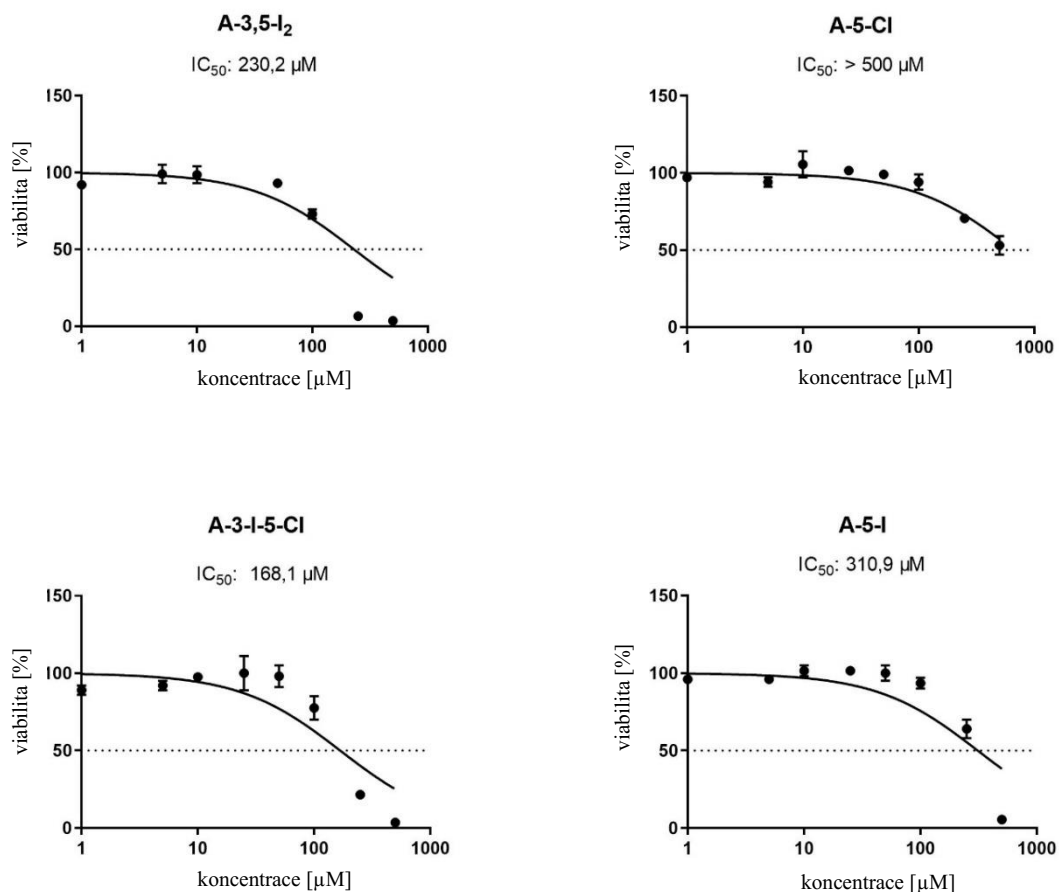


**Obr. 8** Grafické znázornění cytotoxicity látek A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA

Z obrázku č. 8 lze vyčíst hodnoty  $IC_{50}$  pro látky A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA. Hodnota byla zjištěna na základě cytotoxického

působení testovaných látek o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  na buněčnou kulturu HepG2, kdy byly buňky vystaveny látkám 24 hodin a inkubovány za standardních podmínek, tedy 37 °C a v atmosféře 5 %  $\text{CO}_2$ . Z výsledků lze určit, že nejtoxičtější je A-THIOF s  $\text{IC}_{50}$  54,38  $\mu\text{M}$ , naopak nejméně toxicky se projevila látka A-SA, kde  $\text{IC}_{50}$  je větší než 500  $\mu\text{M}$ . Látky po seřazení dle rostoucí cytotoxicity tvoří následující řadu: A-SA < A-5-Br < A-3,5-Cl<sub>2</sub> < A-3,5-Br<sub>2</sub> < A-3-Br-5-Cl < A-THIOF.

Z této skupiny látek se, jak již bylo řečeno, nejméně toxicky projevila látka A-SA, ale rovněž měla nejvíce vyrovnaný průběh křivky, viabilita buněk klesala postupně, v řádech jednotek % a bez výrazných prudkých poklesů. Naopak u nejtoxičtější látky A-THIOF byl průběh do koncentrace 50  $\mu\text{M}$  relativně obdobný, ale již u hodnoty koncentrace 100  $\mu\text{M}$  proběhl razantní pokles viability buněk o desítky procent. U koncentrace 250  $\mu\text{M}$  dosáhla viability buněk téměř nuly. Ostatní látky z obrázku č. 8 se do hodnoty koncentrace 100  $\mu\text{M}$  jevily poměrně málo toxicky, nad tuto koncentraci se však toxicita zvýšila, a to nejvíce u látek A-3-Br-5-Cl a A-3,5-Br<sub>2</sub>, kde se viabilita buněk při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  rovnala nule.

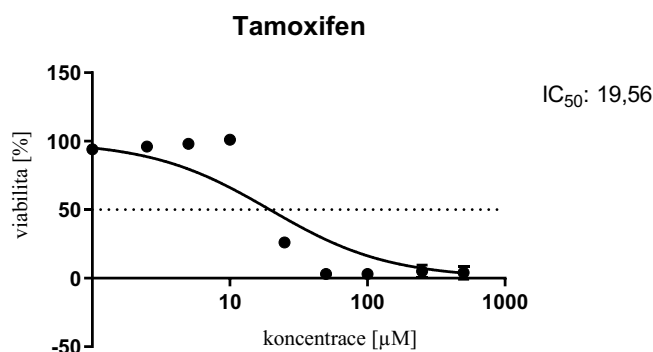


**Obr. 9** Grafické znázornění cytotoxicity látek A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I

Z obrázku č. 9 lze vyčíst hodnoty IC<sub>50</sub> pro látky A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I. Hodnota byla zjištěna na základě cytotoxického působení testovaných látek o koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μM na buněčnou kulturu HepG2, kdy byly buňky vystaveny látkám 24 hodin a inkubovány za standardních podmínek. Z výsledků lze určit, že nejtoxičtější je A-3-I-5-Cl s IC<sub>50</sub> 168,1 μM, naopak nejméně toxicky se projevila látka A-5-Cl, kde IC<sub>50</sub> je větší než 500 μM. Látky po seřazení dle rostoucí cytotoxicity utvoří následující řadu: A-5-Cl < A-5-I < A-3,5-I<sub>2</sub> < A-3-I-5-Cl.

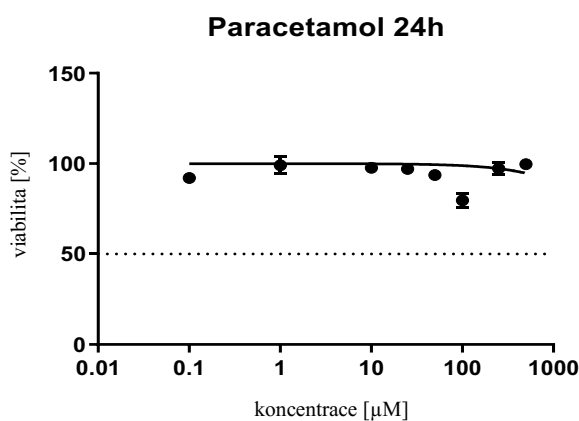
Nejmírnější průběh cytotoxického působení na buňky jsme zaznamenali u látky A-5-Cl s hodnotou IC<sub>50</sub> > 500 μM. Na grafickém vyjádření jejího toxického působení můžeme pozorovat relativně plynulý a pozvolný pokles viability buněk. Oproti tomu u ostatních látek na obrázku č. 9 můžeme vidět skokové snížení viability buněk, které se při koncentraci 500 μM rovná nule. Ostatní tři látky se v maximální testované koncentraci

projevily toxicky, Výrazný pokles hodnot životaschopnosti buněk jsme zaznamenali od koncentrace 250  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 10** Grafické znázornění cytotoxicity tamoxifenu

Na obrázku č. 10 je znázorněn vliv koncentrace na viabilitu buněk u použitého léčivého standardu – tamoxifenu. Hodnota IC<sub>50</sub> 19,56  $\mu\text{M}$  svědčí sama o sobě o vysoce toxickém působení na jaterní buňky HepG2. Rovněž o tom svědčí prudký pokles viability téměř o 80 % při zvýšení koncentrace nad 10  $\mu\text{M}$  a fakt, že v koncentraci 50  $\mu\text{M}$  je životaschopnost buněk skoro rovna nule.



**Obr. 11** Grafické znázornění cytotoxicity paracetamolu

Paracetamol jsme zvolili jako standard z opačné strany spektra než tamoxifen, jakožto zástupce méně toxických léčiv. Výsledkem měření jeho toxického působení na jaterní buňky HepG2 je křivka na obrázku č. 11, znázorňující 100 % viabilitu buněk ve všech měřených koncentracích, kromě 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Odchylka hodnoty viability u těchto koncentrací může být způsobena chybou měření nebo vnějšími vlivy.

## 7 Diskuse

Tato diplomová práce se zabývala stanovením cytotoxicity látek pomocí buněčného modelu, standardní jaterní buněčné linie HepG2. Látky byly hodnoceny podle  $IC_{50}$ , hodnota byla určena pomocí komerčního kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Následně byla zjištěná cytotoxicita látek porovnána se standardy z řad léčiv, s paracetamolem (negativní kontrola) a tamoxifenem (pozitivní kontrola).

Testování cytotoxicity má velký význam ve vývoji nových léčiv. Preklinický výzkum se skládá z *in vitro* a *in vivo* studií. Právě testování cytotoxicity *in vitro*, ať už na buněčných liniích nebo izolovaných orgánech, umožňuje velmi významně omezit počet laboratorních zvířat, nutných při *in vivo* studiích. (Součková *et al.*, 2015) Testované látky byly syntetizovány doc. Krátkým z Katedry organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Strukturně se jedná o mafenidové deriváty s antimikrobiální, antifungální a antimykobakteriální aktivitou, celkem 22 látek - MAF, MAF-4, MAF-8, MAF-9, MAF-10, MAF-11, MAF-12, MAF-13, MAF-14, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-3,5-Br<sub>2</sub>, A-5-Br, A-THIOF, A-SA, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-5-Cl, A-3-I-5-Cl, A-5-I. Mafenid je léčivo sulfonamidového typu, které se využívá lokálně k terapii závažných a hlubokých popálenin, infikovaných bakteriemi rodu *Aeruginosa* a *Clostridium*. (Gallagher *et al.*, 2012)

Jako buněčný model byla použita buněčná linie jaterních buněk HepG2, standardní lidská buněčná linie tvořená hepatocyty. Buňky byly kultivovány na 96-jamkových destičkách při teplotě 37 °C a koncentraci CO<sub>2</sub> 5 %. Použitá komerčně dostupná metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je kolorimetrická metoda založena na měření metabolicky aktivních buněk, které redukují tetrazoliové soli, konkrétně MTS na rozpustný barevný formazan, který se detekuje pomocí spektrofotometrie. Naměřené hodnoty byly upraveny a zpracovány v programech Microsoft Excel a GraphPad Prism 8.02.

Aby bylo možné toxicitu na jaterní buňky HepG2 kvantitativně porovnat u jednotlivých látek, použili jsme parametr  $IC_{50}$ , střední inhibiční koncentraci. Všechny látky byly měřeny v triplicátech o značně širokém rozmezí koncentrací 1-500  $\mu$ M, pro lepší zachycení koncentrací s významnou toxicitou. Jako standardy jsme použili tamoxifen a paracetamol.

Problém představovala zhoršená rozpustnost testovaných látek ve vodě, kterou jsme vyřešili zvolením vhodného rozpouštědla, tedy DMSO. Dimethylsulfoxid je však vysoce toxická sloučenina, čímž by jeho zvýšená koncentrace mohla vést ke zkreslení výsledků. Proto jsme dbali na to, aby jeho koncentrace v roztocích testovaných látek byla maximálně 1 %. (Galvao *et al.*, 2013)

Jak již bylo zmíněno, toxické působení na jaterní buňky HepG2 bylo porovnáno na základě hodnot  $IC_{50}$ . Na základě této hodnoty lze látky seřadit a seskupit do skupin s podobnou cytotoxickou aktivitou. Nejtoxičtěji se v experimentu projevila sloučenina A-THIOF s  $IC_{50}$  54,38  $\mu$ M, následovaná MAF-4 s  $IC_{50}$  71,93  $\mu$ M a trojici nejtoxičtějších látek uzavírá MAF-13 s  $IC_{50}$  103,1  $\mu$ M. Do skupiny se střední toxicitou na jaterní buňky HepG2 s  $IC_{50}$  mezi 168,1 a 315,8 řadíme celkem 8 testovaných látek. Srovnány od nejtoxičtějši po nejméně toxickou utvoří následující řadu: A-3-I-5-Cl > A-3-Br-5-Cl > A-3,5-Br<sub>2</sub> > MAF-14 > MAF-9 > A-3,5-I<sub>2</sub> > A-3,5-Cl<sub>2</sub> > A-5-I > MAF-10. Nejméně toxicky s hodnotou  $IC_{50}$  v použitém koncentračním rozmezí 1-500  $\mu$ M se projevila látka A-5-Br s hodnotou  $IC_{50}$  470,3  $\mu$ M. Ostatní látky v daném koncentračním rozmezí 1-500  $\mu$ M měly hodnotu  $IC_{50}$  nad 500  $\mu$ M. Jedná se o látky: MAF, MAF-8, MAF-11, MAF-12, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-SA, A-5-Cl. Rozdíly v cytotoxicitě lze zřejmě vysvětlit strukturálními rozdíly chemických sloučenin.

Výsledné  $IC_{50}$  u standardů, u tamoxifenu 19,56  $\mu$ M (pozitivní kontrola) a u paracetamolu (negativní kontrola) větší než 500  $\mu$ M, nám potvrdilo předpokládané působení těchto léčiv na jaterní buňky linie HepG2. Tamoxifen se tedy projevil velmi toxicky, naopak paracetamol nejevil skoro žádnou toxicitu vůči jaterním buňkám linie HepG2.

Celkově lze říct, že zejména látky z poslední skupiny, s výslednou hodnotou  $IC_{50} > 500 \mu$ M, jsou potenciálně využitelné a vhodné pro další stádia preklinických studií. Hodnoty  $IC_{50}$  by se daly upřesnit rozšířením koncentračního rozmezí. Ale ani ostatní látky, kromě trojice nejtoxičtějších, neprojevily přílišnou nebo výraznou cytotoxicitu *in vitro*, tudíž by se dalo pokračovat v jejich zkoumání a možném zavedení do praxe.



## 8 Závěr

V této práci byla změřena a srovnána cytotoxicita na jaterních buňkách kultury HepG2 potenciálně využitelných látek s antimykotickou, antibakteriální a antimykobakteriální aktivitou, vyvinutých na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jako standardy byly použity molekuly léčiv tamoxifenu a paracetamolu.

K pokusu byla využita buněčná linie lidských hepatálních buněk HepG2 a již zavedená metoda CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Látky byly porovnány pomocí parametru  $IC_{50}$ .

Nejvíce toxicky, se projevíly testované látky A-THIOF, MAF-4 a MAF-13. s hodnotou  $IC_{50}$  54,38  $\mu$ M - 103,1  $\mu$ M na buněčnou linii HepG2. U dalších 10 látek: A-3-I-5-Cl, A-3-Br-5-Cl, A-3,5-Br<sub>2</sub>, MAF-14, MAF-9, A-3,5-I<sub>2</sub>, A-3,5-Cl<sub>2</sub>, A-5-I, MAF-10 a A-5-Br byla naměřena hodnota  $IC_{50}$  od 168,1  $\mu$ M do 470,3  $\mu$ M. U zbývajících 9 látek: MAF, MAF-8, MAF-11, MAF-12, MAF-16, A-5-F, A-3,5-F<sub>2</sub>, A-SA a A-5-Cl byla hodnota  $IC_{50}$  nad 500  $\mu$ M. Tato hodnota nepředstavuje riziko cytotoxického poškození a proto jsou zejména tyto sloučeniny jsou vhodné pro další výzkum.

## 9 Literatura

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

Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. In: Promega. 2012. Dostupné na URL: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-andcytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-\\_mts\\_/?catNum=G3582#protocols](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-andcytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582#protocols) (b)

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

ARENDRUP, Maiken C. a David S. PERLIN. Echinocandin resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2014, 27(6), 484-492. ISSN 0951-7375. Dostupné z: doi:10.1097/QCO.0000000000000111

ARYA, Dev P. *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*. 2007. ISBN 978-0-470-14966-9

ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech, 2018, 2018-07-11. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923

Akademie věd České republiky. Antibiotická krize. AVex: expertní stanovisko AV ČR [online]. Mikrobiologický ústav AV ČR, 1/2020 Dostupné z: [https://www.avcr.cz/export/sites/avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/avex/files/2020-01-ATB-krize\\_.pdf](https://www.avcr.cz/export/sites/avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/avex/files/2020-01-ATB-krize_.pdf)

BENEŠ, Jiří. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3

BERTOLINI, Alfio, Anna FERRARI, Alessandra OTTANI, Simona GUERZONI, Raffaella TACCHI a Sheila LEONE. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Reviews*. Blackwell Publishing, 2006, **12**(3-4), 250-275

BUDA DE CESARE, Giuseppe, Shane A. CRISTY, Danielle A. GARSIN, Michael C. LORENZ a J. ANDREW ALSPAUGH. Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. *MBio*. 2020, **11**(6), e02123-20. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.02123-20

BURY-MONÉ, S. Antibacterial Therapeutic Agents. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2014, 2014. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00244-0

DENNING, David W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*. 2003, **362**(9390), 1142-1151. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(03)14472-8

DOLEŽAL, Martin a Vladimír BUCHTA. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství*. 2006, **2**(1), 10-14

ETEBU, Ebimieowei; ARIKEKPAR, Ibemologi. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, 2016, 4.2016: 90-101

FUENTEFRIA, A.M., B. PIPPI, D.F. DALLA LANA, K.K. DONATO a S.F. DE ANDRADE. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 2018, **66**(1), 2-13. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/lam.12820

GALLAGHER, James J., Ludwik K. BRANSKI, Natalie WILLIAMS-BOUYER, Cynthia VILLARREAL a David N. HERNDON. Treatment of infection in burns. *Total Burn Care*. Elsevier, 2012, 2012, 137-156.e2. ISBN 9781437727869. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-2786-9.00012-6

GALVAO, Joana, Benjamin DAVIS, Mark TILLEY, Eduardo NORMANDO, Michael R. DUCHEN a M. Francesca CORDEIRO. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2013, **28**(3), 1317-1330. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.13-235440

HARTL, Jiří, Martin DOLEŽAL, Miroslav MILETÍN, Veronika OPLETALOVÁ a Petr ZIMČÍK. Farmaceutická chemie IV. 3. vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2019. ISBN 978-80-246-4264-2

HODIS, Jiří. Nová fakta o paracetamolu, rizika předávkování, intoxikace a jejich zvládání. *Praktické lékařství*. Solen, 2015, **11**(3), 90-92

KREJČÍ, Eva. Vzdávající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. *Praktické lékařství*. Solen, 2019, **15**(4), 200-207

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

LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2007. [ISBN 978-80-7262-373-0](https://doi.org/10.1007/978-80-7262-373-0)

LÓPEZ-TERRADA, Dolores, Sau Wai CHEUNG, Milton J. FINEGOLD a Barbara B. KNOWLES. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*. 2009, **40**(10), 1512-1515. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/j.humpath.2009.07.003

LUCEY, Brendan P., Walter A. NELSON-REES a Grover M. HUTCHINS. *Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination*. 2009, **133**(9), 1463-1467. ISSN 1543-2165. Dostupné z: doi:10.5858/133.9.1463

MASTERS, Philip A., Thomas A. O'BRYAN, John ZURLO, Debra Q. MILLER a Nirmal JOSHI. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Archives of Internal Medicine*. 2003, **163**(4). ISSN 0003-9926. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.163.4.402

MIRABELLI, COPPOLA a SALVATORE. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers*. 2019, **11**(8). ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers11081098

NAROD, Steven a Safia NAZARALI. Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. ISSN 1179-1314. Dostupné z: doi:10.2147/BCTT.S43763

PATEROVÁ, Pavla, Pavlína KRÁLÍČKOVÁ, Petra VÁVROVÁ a Helena ŽEMLIČKOVÁ. Principles of rational antibiotic use (part I). *Intervenční a akutní kardiologie* [online]. 2016, **15**(2), 85-89 [cit. 2022-04-21]. ISSN 1213807X. Dostupné z: doi:10.36290/kar.2016.018

PETERSEN, Eskild a Dorte Remmer SCHMIDT. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options?. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014, **1**(1), 175-182. ISSN 1478-7210. Dostupné z: doi:10.1586/14787210.1.1.175

RING, Alistair a Mitch DOWSETT. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*. 2004, **11**(4), 643-658. ISSN 1351-0088. Dostupné z: doi:10.1677/erc.1.00776

Riss et al. Cell Viability Assays. In: National Center for Biotechnology Information. Last Updated 2016. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>

ROZSYPAL, Hanuš. Systémová antimykotika. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2008, **22**(1), 40-44

RÜPING, Maria J. G. T., Jörg J. VEHRESCHILD a Oliver A. CORNELLY. Antifungal treatment strategies in high risk patients. *Mycoses*. 2008, **51**, 46-51. ISSN 09337407. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01572.x

SEGERITZ, Charis-P. a Ludovic VALLIER. Cell Culture. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, 2017, 2017, 151-172. ISBN 9780128030776. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6

SHARMA, Chhaya V a Vivek MEHTA. *Paracetamol: mechanisms and updates*. 2014, **14**(4), 153-158. ISSN 17431816. Dostupné z: doi:10.1093/bjaceaccp/mkt049

SKÖLD, Ola. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*. 2000, **3**(3), 155-160. ISSN 1368-7646

SOUČKOVÁ, Lenka, Hana KOSTKOVÁ a Regina DEMLOVÁ. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*. Solen, 2015, **11**(4), 144 - 147

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

WALL, Gina a Jose L. LOPEZ-RIBOT. Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiotics*. 2020, **9**(8). ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9080445

WALSH, Christopher a Timothy WENCEWICZ. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. 2nd edition. ASM Press, 2016. ISBN 978-1-555-81930-9