

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

***IN VITRO* HODNOCENÍ CYTOTOXICITNÍHO  
PŮSOBENÍ NOVÝCH POTENCIÁLNÍCH  
ANTITUBERKULOTIK ZE SKUPINY  
AROMATICKÝCH NITROLÁTEK**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Bc. Dorota Turoňová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky, ochotu a trpělivost a za vstřícnost při vypracování diplomové práce. Děkuji také svému konzultantovi doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D. Chtěla bych velmi poděkovat i své rodině a přátelům za veškerou podporu při studiu.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14. 5. 2018

.....

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	12
1. ÚVOD.....	13
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	14
2.1 Tuberkulóza.....	14
2.1.1 Epidemiologie .....	14
2.1.2 Patogeneze.....	15
2.1.3 Tuberkulóza a HIV .....	17
2.1.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
2.1.5 Léčba TB.....	18
2.1.5.1 AT 1. řady.....	19
2.1.5.2 AT 2. řady.....	20
2.1.5.3 AT 3. řady.....	20
2.1.6 Rezistentní formy TB a jejich léčba.....	20
2.1.7 Očkování .....	23
2.1.8 Naděje v oblasti farmakologie .....	24
2.1.8.1 Bedachilin (TMC207) .....	25
2.1.8.2 Delamanid (OPC-67683).....	26
2.1.8.3 Pretomanid (PA-824).....	27
2.1.8.4 SQ109 .....	28
2.1.8.5 Sutezolid (PNU-100480).....	28
2.1.8.6 PBTZ169 .....	29
2.1.8.7 Delpazolid (LCB01-0371).....	30
2.1.9 Potenciální AT ze skupiny aromatických nitrolátek .....	30



3. CÍLE PRÁCE.....	35
4. METODICKÁ ČÁST .....	36
4.1 Vybavení pro práci s buněčnými liniemi .....	36
4.2 Látky ke kultivaci buněk.....	37
4.3 Studované látky.....	37
4.4 Chemikálie a reagentie .....	37
4.5 Technické vybavení laboratoře .....	38
4.6 <i>In vitro</i> hodnocení cytotoxicity .....	39
4.6.1 Příprava kultivačního media .....	39
4.6.2 Buněčná linie HaCaT a 3T3 .....	39
4.6.3 Zacházení s buněčnými liniemi a jejich kultivace .....	40
4.6.4 Pasážování.....	40
4.6.5 Stanovení počtu živých buněk .....	41
4.6.6 Nasazování buněk .....	41
4.6.7 Převedení testovaných látek do roztoku.....	41
4.6.8 Nasazování testovaných látek .....	42
4.6.9 Hodnocení životaschopnosti buněk.....	42
4.6.10 Zpracování dat.....	43
4.7 Fotografická dokumentace .....	43
4.7.1 Barvení vzorků pro fotografickou dokumentaci .....	44
4.7.1.1 Barvení mitochondrií.....	44
4.7.1.2 Barvení aktinových vláken .....	44
4.7.1.3 Barvení jader .....	44
5. VÝSLEDKY .....	46
5.1 Látka T6030 .....	46
5.2 Látka 6693.....	48

5.3	Látka 6694.....	49
5.4	Látka 6722.....	50
5.5	Látka 6725.....	51
5.6	Látka 6733.....	52
5.7	Látka 6734.....	53
5.8	Látka 6735.....	54
5.9	Látka 6797.....	55
5.10	Výsledky fotografické dokumentace.....	56
5.10.1	Kontrolní vzorek 3T3.....	56
5.10.2	Kontrolní vzorek HaCaT.....	57
5.10.3	T6030 3T3.....	58
5.10.4	T6030 HaCaT.....	59
5.10.5	T6693 3T3.....	60
5.10.6	T6693 HaCaT.....	61
5.10.7	T6694 3T3.....	62
5.10.8	T6694 HaCaT.....	63
5.10.9	T6722 3T3.....	64
5.10.10	T6722 HaCaT.....	65
5.10.11	T6725 3T3.....	66
5.10.12	T6725 HaCaT.....	67
5.10.13	T6733 3T3.....	68
5.10.14	T6733 HaCaT.....	69
5.10.15	T6734 3T3.....	70
5.10.16	T6634 HaCaT.....	71
5.10.17	T6735 3T3.....	72
5.10.18	T6735 HaCaT.....	73
5.10.19	T6797 3T3.....	74

5.10.20	T6797 HaCaT.....	75
6.	ZÁVĚRY .....	76
7.	DISKUZE .....	77
8.	LITERATURA .....	81

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Dorota Turoňová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Název diplomové práce: *In vitro* hodnocení cytotoxického působení nových potenciálních antituberkulotik ze skupiny aromatických nitrolátek

Každoročně se objeví více než 10 milionů nových případů onemocnění tuberkulózou. Nedostatek a nedostupnost léků, špatná diagnostika, ale především nevhodná léčba komplikují eradikaci tuberkulózy. Už tak závažné onemocnění se v posledních letech stává ještě závažnějším, a to hlavně výskytem lékově rezistentní tuberkulózy, především tzv. MDR-TB a XDR-TB. Díky chromozomálním mutacím, které bakterie činí rezistentní k lékům, je potřeba stále vyvíjet účinné nové látky, které by nahradily dosavadní léky, které jsou často toxické a s tím je spojen výskyt nežádoucích účinků.

Výzkumná skupina z Katedry organické a bioorganické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy zabývající se řadu let výzkumem nových antituberkulotik vytvořila nové struktury aromatických nitrolátek s velmi vysokým antimykobakteriálním účinkem. Cílem této diplomové práce bylo *in vitro* stanovit cytotoxicitu devíti nových látek z této skupiny.

Hodnocení cytotoxicity bylo prováděno na nenádorových buněčných liniích 3T3 a HaCaT. Pomocí testu vychytávání neutrální červeně byla stanovena životaschopnost buněk. Následně byla za použití konfokální mikroskopie pořízena fotografická dokumentace buněk značených specifickými fluorescenčními sondami MitoTracker Red CMXRos, Hoechst 33342 a ActinGreen 488. Díky těmto sondám bylo možné zvýraznit

mitochondrie, jádra buněk a aktinová vlákna v buňce a zhodnotit vliv cytotoxického účinku látek na tyto buněčné struktury.

Díky cytotoxicitním experimentům jsme zjistili, že látky nevykazují žádnou, nebo jen nízkou toxicitu až do limitu jejich rozpustnosti v kultivačním médiu a fotografická dokumentace rovněž potvrdila díky nepřítomnosti změn u buněčných organel netoxický účinek za použitých experimentálních *in vitro* podmínek. Všechny látky se jeví jako velice nadějní kandidáti pro další preklinické hodnocení potenciálních AT.

**Klíčová slova:** antituberkulotika, *in vitro* hodnocení cytotoxicity, aromatické nitrolátky, substituované oxadiazoly, cytotoxicita, test vychytávání neutrální červeně, fluorescenční mikroskopie

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Dorota Turoňová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Consultant: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* assessment of cytotoxic action of novel potencial nitro group-containing antitubercular agents

More than 10 million new cases of tuberculosis occur every year. Lack of efficient antitubercular drugs and their unavailability, poor diagnostic and especially inappropriate treatment are drawbacks complicating and even precluding eradication of tuberculosis. An already serious disorder has become even more serious in the last years, especially because of the occurrence of drug-resistant tuberculosis, especially MDR-TB and XDR-TB. Due to chromosomal mutations that make bacteria resistant to drugs it is still necessary to develop new effective drugs to replace those in current use, which are often toxic and associated with the occurrence of side effects.

The research group at the Department of Organic and Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, which has been researching new antitubercular agents for many years, has created new structures of aromatic nitrocompounds with very high antimycobacterial effect. The aim of this diploma thesis was to *in vitro* evaluate the cytotoxicity of nine new compounds from this group.

Assessment of cytotoxicity was performed on non-malignant 3T3 and HaCaT cell lines. Using the neutral red uptake assay the cells viability was determined. Microphotographs of the cells labeled with specific fluorescence probes MitoTracker Red CMXRos, Hoechst 33342 and ActinGreen 488 were taken using confocal microscopy to assess changes on mitochondria, nuclei and actin fibers, respectively.

Due to cytotoxicity experiments we found that the compounds have shown negligible or very low cytotoxicity up to the limit of their solubility in cell culture medium. Photographic documentation has shown absence of morphological changes of the cells which further confirmed non-toxic effect of studied antituberculous drugs. All studied compounds appear to be very promising candidates for further pre-clinical evaluation of potential antitubercular agents.

**Key words:** antitubercular agents, *in vitro* cytotoxicity assessment, aromatic nitrocompounds, substituted oxadiazoles, cytotoxicity, neutral red uptake test, fluorescent microscopy

## SEZNAM ZKRATEK

AT	Antituberkulotika
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BHK21	Fibroblasty ledvin mláďat křečka
BSA	Bovinní sérový albumin
DMEM	Médium pro kultivaci buněk
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPR	Dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-ribofuranóza
FBS	Fetální bovinní sérum
HeLa	Buňky nádoru děložního hrdla
HepG2	Buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
HuH7	Buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
KB	Kochův bacil, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LTBI	Latentní tuberkulóza
MDCKII	Buňky pocházející ze psích ledvin
MDR-TB	Tuberkulóza rezistentní na léky
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NR	Neutrální červeň
SCM	Sérum obsahující médium
TB	Tuberkulóza
TDR-TB	Tuberkulóza zcela rezistentní na léky
XDR-TB	Extenzivně rezistentní tuberkulóza



# 1. ÚVOD

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění, které trápí lidstvo už od nepaměti. I přesto, že žijeme v 21. století a léky pro léčbu TB máme možnost využívat více než padesát let, se s tímto onemocněním stále setkáváme po celém světě. Závažnost onemocnění tkví v jeho chronicitě, dlouze se vlekoucí léčbě, nedostatku prevence v chudých oblastech světa a tvorbě rezistentních kmenů. Právě proto je TB v některých zemích dokonce i velmi vážným problémem, který má na svědomí velké množství životů. Ačkoli byl od roku 2000 zaznamenán pozvolný pokles v počtu zemřelých na toto onemocnění, čísla zůstávají pořád velmi vysoká (Vašáková, 2013; WHO, 2017).

Pro udržení klesající tendence počtu nemocných s TB a mortality spojené s touto chorobou je nutné onemocnění včas odhalit, pacienty izolovat a léčit (Vašáková, 2013; WHO, 2017). I přes existující velký panel antituberkulotik se zvyšuje množství případů TB rezistentní na léky (MDR-TB), extenzivně rezistentní TB (XDR-TB) a dokonce TB zcela rezistentní na léky (TDR-TB), díky nimž je důležité stále hledat a vyvíjet nové vysoce účinné antimykobakteriální látky. Mnohé výzkumy kladou důraz na relativní toxicitu a vedlejší účinky léků aktuálně používaných pro léčbu, nízkou snášenlivost medikamentů a na potenciální lékové interakce antituberkulotik a antiretrovirotik v léčbě HIV-pozitivních pacientů s TB, kteří často, díky kombinaci s HIV, TB podléhají (Karabanovich et al., 2014; WHO, 2017). Výzkum nových antituberkulotik se vyvíjí v různých směrech. Ať už jde o vývoj nových látek, či modifikaci již známých struktur, rovněž i testování látek přírodního původu a také vývoj nových lékových forem. Snaha je rovněž i o zkrácení doby léčby a to díky různým kombinacím léků (Krátký a Vinšová, 2010). Vývoj nové vakcíny vůči TB či vylepšování stávající BCG (bacille Calmette-Guérin) vakcíny je bohužel velmi pomalý. Nicméně v posledních letech se v oblasti farmakologie TB nachází několik potenciálních léčiv, které dosáhly brzkých či pozdějších fází klinických studií (Beena a Rawat, 2012).

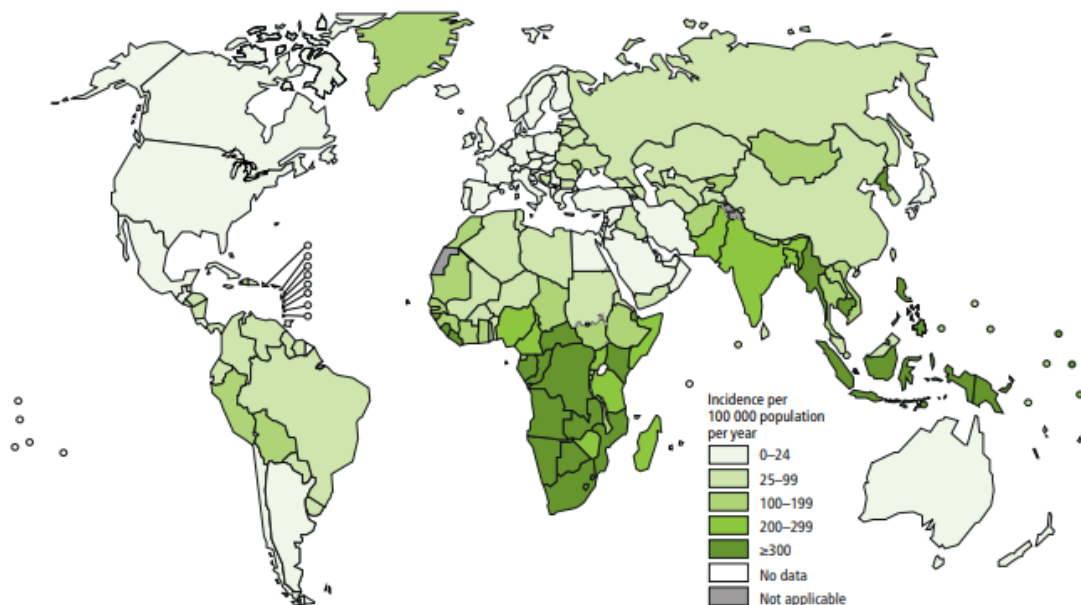
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tuberkulóza

Jak již bylo zmíněno v úvodu, TB je závažným infekčním onemocněním. Toto onemocnění je vyvoláno mykobakteriemi komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, který zahrnuje především *Mycobacterium tuberculosis* (Kochův bacil, KB), které je hlavním původcem onemocnění, také *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* a další. Tato choroba se nevyhýbá žádným věkovým skupinám a postihuje všechny orgány, zejména plíce (Bártů, 2008; Buchta, 2002). TB se prezentuje buď jako latentní forma infekce (LTBI z angl. latent tuberculosis infection, latentní tuberkulóza) nebo jako vyvíjející se aktivní onemocnění (Chisholm-Burns et al., 2013).

#### 2.1.1 Epidemiologie

TB patří mezi ta onemocnění, která se doposud nepodařila eradikovat. V žebříčku infekčních chorob se svým výskytem ve světě řadí na přední příčky (Bártů, 2008). Přestože počet zemřelých na toto onemocnění má klesající tendenci, tak v roce 2016 zemřelo na následky tuberkulózy 1,3 mil. osob. Celkový počet zemřelých v tomto roce, který zahrnuje i nemocné, kteří byli HIV pozitivní, dosahuje téměř k 1,8 mil. osob, kteří nezvládli boj s touto chorobou. Dle reportu Světové zdravotnické organizace (WHO) počet nově nalezených případů TB za rok 2016 dosahuje 10,4 mil. Nejvíce těchto případů pochází z Indie, Indonésie, Číny, Filipín a Pákistánu. Problémovými jsou i četné africké oblasti (viz Obr. 1) (WHO, 2017).



**Obr. 1** Incidence TB v roce 2016, Upraveno (WHO, 2017)

Cesta šíření TB je podmíněná způsobem života, stavem imunity, hygienickými návyky i zeměpisnou polohou. Problémovými bývají chudé oblasti, kde je výskyt onemocnění i mortalita vysoká. V rozvinutých zemích je situace rozdílná. Co se týče České republiky, tak u nás je situace kolem TB velmi dobře zvládnutá, díky právnímu prostředí a organizaci péče o osoby s TB, nebo jen s podezřením na ni. Dohled na tyto osoby je tak účinný, že i přes zrušení plošné vakcinace nedochází k nárůstu počtu jedinců infikovaných TB (Vašáková, 2013). Za rok 2016 onemocnělo v České republice 517 osob TBC a 26 osob této chorobě podlehl (ÚZIS, 2016).

### 2.1.2 Patogeneze

Důležitou roli v patogenitě mykobakterií hraje pravděpodobně fakt, že kyseliny mykolové obsažené v buněčné stěně silně stimulují zánětlivou odpověď hostitele. Ve virulenci má svou úlohu glykolipid trehaloso-6,6-dimykolát, jinak zvaný *cord factor*, díky němuž virulentní kmeny KB rostou v provazcích (Votava, 2003). Záleží pak na obranyschopnosti hostitele, na tom, zda je dostatečně silná. Pokud imunita hostitele selže, dojde k rozvinutí onemocnění a to může dospět až k fatálnímu konci. Nicméně většina zdravých osob potenciální infekci přemůže, zvládne, a to pomocí aktivovaných makrofágů (Tortora et al., 2016).

KB nevytváří žádné toxiny nebo jiné produkty, které by poškozovaly buňky. Jejich pomalé růstové signály nemají žádné záměry rychle přemocit hostitele, pouze stojí v pozadí. Nicméně jejich přítomnost je zaznamenána imunitním systémem hostitele, který nepřímo způsobuje poškození tkání. Ve skutečnosti je odpověď hostitele na tyto mikroorganismy příčinou většiny symptomů (Schaechter et al., 2006). Míra patogenity KB je určena způsobilostí přežít uvnitř makrofágu neimunního jednotlivce, a to díky schopnosti omezovat snižování pH uvnitř fagosomů a jejich následné splývání s lyzosomy. Jsou to právě makrofágy, díky kterým dochází k transportu přežívajících KB z uzlin do krve a následně do orgánů (Votava, 2003).

KB je primárně příčinou respirační infekce, ale může být i diseminován pomocí krevního řečiště do různých částí těla a tvořit abscesy v orgánech. TB se přenáší díky kašli, nejvíce zjevnému symptomu plicní infekce, a to aerosolem od nemocného s aktivní formou TB. Vstupní bránou může být ale i gastrointestinální trakt či kůže. Sputum může nést známky krve, pokud jsou poškozeny tkáně, případně pokud jsou cévy natolik zerodovány, že prasknou a tato situace může vyústit až ve fatální krvácení. Diseminovaná forma infekce se označuje rovněž i jako miliární rozsev, a to kvůli mnohému výskytu malých uzlíků, které se tvoří v infikované tkáni (Slonczewski a Foster, 2011; Tortora et al., 2016).

Pokud se na celý proces podíváme trochu detailněji, tak můžeme rozpoznat dále následující souhrn okolností. Po vniknutí mikroorganismu do těla hostitele a po dosažení alveolů v plicích jsou bacily pohlceny makrofágy. Často ale některé přežijí. V tomto stádiu je přítomná infekce v organismu, ale zatím se neobjevují žádné příznaky onemocnění. Následně dochází ke zmnožení mikroorganismů v makrofázích díky chemotaktické odpovědi, která svolává další makrofágy a další obranné buňky do místa postižení. V tomto okamžiku se vytváří granulom. Většina z obklopujících makrofágů není ve zneškodňování bakterií úspěšná, ale uvolňují enzymy a cytokiny, které poškozují plíce. Za několik týdnů se s umírajícími makrofágy, uvolněnými bacily z granulomu a s formováním kaseózní dutiny uvnitř granulomu, začínají objevovat symptomy onemocnění. Jelikož je KB aerobní organismus, tak v tomto prostředí dobře neroste. Nicméně mnoho z nich zůstává dormantními a slouží jako základ pro pozdější reaktivaci onemocnění. Onemocnění může zůstat pouze v tomto stádiu a v tomto případě dochází k hojení léze a její kalcifikaci. Do tohoto okamžiku se u nemocných s TB jedná o primární TB, ze které se většina pacientů vyléčí. V některých případech po měsících či letech

dochází k progresi choroby a vzniká tzv. sekundární TB. V tomto stádiu dochází k prasknutí granulomu a již ke zmíněnému miliárnímu rozsevu, při němž se tvoří velmi početné granulomy v orgánech. Sekundární TB se vyznačuje závažnějšími symptomy, včetně silného kašle, krvavého sputa, horečky s nočním pocením a také zřetelného váhového úbytku u nemocného a únavy (Slonczewski a Foster, 2011; Tortora et al., 2016; Votava, 2003).

### **2.1.3 Tuberkulóza a HIV**

HIV je nejdůležitější riskantní faktor pro aktivní TB. Koinfekce HIV a TB urychlují rozvoj obou chorob. Je tedy nutné, aby byly rychle diagnostikovány a léčeny obě tato onemocnění (Chisholm-Burns et al., 2013).

U osob s HIV, pokud dojde k vystavení organismu infekci, je riziko vývinu TB zvýšené. Většina případů TB u pacientů s HIV jsou převážně následkem reaktivace předešle získané infekce, ale reaktivace může být významnou v populaci s vysokou prevalencí TB (Walker et al., 2007).

Vliv HIV na epidemii TB bude nutit k vývoji nových strategií a technologií pro realizaci snu o eliminaci TB (Minneman, 2005).

### **2.1.4 *Mycobacterium tuberculosis***

KB je aerobní acidorezistentní tyčinka, kterou v preparátech z biologického materiálu můžeme nalézt samostatně nebo ve shlucích. Typickou pro KB je přítomnost kyseliny mykolové na povrchu bakterie, která je připojená k peptidoglykanu. Díky kyselině mykolové je obtížné mykobakteria obarvit běžnými barvicími technikami, jelikož právě díky ní jsou mykobakteria acidorezistentní. Při použití barvicí techniky Ziehl-Neelson se používá karbolfuchsin za horka, dále následuje diferenciací pomocí kyselého alkoholu a celý proces je zakončen dobarvením malachitovou zelení nebo methylenovou modří. Kyselina mykolová silně váže karbolfuchsin a ani diferenciací kyselým alkoholem se bakterie neobarví. Díky barvení dle Ziehl - Neelsona vidíme v mikroskopu acidorezistentní bakterie růžovo-červeně na zeleném či modrém pozadí (Staley et al., 2007; Schaechter et al., 2006; Votava, 2003).

Acidorezistence není mezi bakteriemi typickou vlastností. Acidorezistentní bakterie mají voskovitou buněčnou membránu, která obsahuje již zmíněnou kyselinu

mykologovou, díky které odolávají i germicidnímu působení nemocničních chemikálií a jsou rovněž odolné i k vyschnutí (Schaechter et al., 2006; Tortora et al., 2016).

### 2.1.5 Léčba TB

Adekvátní a efektivní léčba je pro uzdravení jedince nezbytná. Je také základem pro kontrolu šíření TB a rovněž i pro minimalizování výskytu MDR-TB (Walker et al., 2007). Je nezbytné toto onemocnění včas diagnostikovat a léčit a také provádět screening na lékovou rezistenci a rovněž i otestovat pacienta na HIV. Nezbytným krokem u TB je i izolace aktivně nemocného a tím i zabránění dalšímu šíření onemocnění (WHO, 2017).

Mykobakterie jsou známé pro svou schopnost vytvoření rezistence k lékům. Kombinace minimálně dvou nebo více léků je vyžadována k překonání těchto překážek a pro předejití objevu rezistence během léčby. Odpověď mykobakteriálních infekcí na léčbu na léčbu je pomalá a léčba musí být vedena po dobu měsíců až roku, v závislosti na volbě léků (Katzung, 2007).

Monoterapie může být použita u pacientů s LTBI. Jakmile se objeví aktivní forma TB musí být použita kombinace minimálně dvou léků, běžně se však používá kombinace tří či čtyř léků zároveň od začátku léčby. V úvodní fázi léčby běžně podává pacientovi kombinace čtyř nebo pěti léků po dobu dvou až tří měsíců. Tento stejný postup je vyžadován i u recidivy TB. Během pokračovací fáze léčby, která trvá čtyři až pět měsíců, je pacientovi podávána kombinace dvou až tří léků. Během celé léčby je nutné, aby léky byly nemocnému podávány za dohledu zdravotnického personálu. U většiny pacientů je minimální délka léčby šest měsíců a může trvat i dva až tři roky, pokud se objeví rozvinutá forma MDR-TB. (Bártů, 2008; Chisholm-Burns et al., 2013).

Antituberkulotika (AT) se dělí na AT 1. řady, AT 2. řady a AT 3. řady. Jedná se o bakteriocidní a bakteriostatické látky, které se v dnešní době používají téměř výhradně jen k léčbě TB. Dle mechanismu účinku můžeme AT rozdělit do tří skupin. Patří k nim inhibice proteosyntézy, inhibice syntézy buněčné stěny a poslední skupinu tvoří další (ostatní) mechanismy účinků (Minneman et al., 2005).

KB může přežívat ve čtyřech typech prostředí. Aktivita AT v těchto prostředích bude mít vliv na výběr skupiny léků. Otevřené plicní dutiny jsou bohatě zásobovány kyslíkem a budou obsahovat velký počet rychle rostoucích mikroorganismů. Nicméně

bacily v uzavřených dutinách budou trpět nedostatkem kyslíku a tím pádem budou růst pomalu nebo budou nečinné. Intracelulární mikroorganismy budou růst pomalu a to díky nízkému intracelulárnímu pH a díky nedostatku kyslíku. Některé bacily mohou růst nesouvisle podle toho, jak se mění jejich prostředí. AT se liší v jejich schopnostech zabít tyto rozdílné populace bacilů. Isoniazid, který je považován za baktericidní, je efektivní vůči intracelulárním organismům. Rifampicin, také baktericidní, je účinný u nesouvisle dělících se bacilů. Spící, nečinné bakterie běžně nalézáme v uzavřených lézích, kde se schovávají před účinkováním léků a také před působky imunitního systému. Tyto bakterie jsou z těla hostitele odstraňovány pomocí enkapsulace (Walker et al., 2007).

### **2.1.5.1 AT 1. řady**

Isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, streptomycin a ethambutol jsou léky 1. řady AT. Isoniazid a rifampicin jsou dva nejvíce aktivní léky a ve většině případů je doporučováno je podávat společně jako prevenci pro vznik lékové rezistence. V praxi je většinou terapie iniciována kombinací izoniazidu, rifampicinu a pyrazinamidu, která je doplněna ethambutolem či streptomycinem (který někteří autoři řadí mezi AT 2.řady). U všech pacientů by se z úvodního izolátu mělo provést testování na citlivost antimykotik. Výsledky testů na citlivost by měly posloužit pro výběr optimální kombinace léků. Testování citlivosti může být zopakováno v případech kdy pacientovy kultury zůstávají pozitivní osm nebo více týdnů během léčby (Chisholm-Burns, 2013; Katzung, 2007).

Podávání výše zmíněných AT nese s sebou jistá rizika. AT mají mnoho nežádoucích účinků. Mezi nejzávažnější z nich patří toxicita izoniazidu na játra a na periferní nervy. Hepatitida a periferní neuropatie jsou typickými následky léčby izoniazidem. Mnohé závažné nežádoucí účinky má i rifampicin. I ten je hepatotoxický, nefrotoxický či můžeme po jeho užívání zaznamenat i trombocytopenii. Velkým problémem u rifampicinu je rovněž i indukce většiny izoform cytochromu P450, díky níž je mnoho z léků rychleji eliminováno z organismu. Streptomycin je ototoxický a nefrotoxický. Nejzávažnější nežádoucím účinkem ethambutolu je neuritida zřetelného nervu. Hepatotoxický účinek vykazuje i pyrazinamid (Katzung, 2007; Koda-Kimble et al., 2005).

### **2.1.5.2 AT 2. řady**

Alternativní 2. řada AT zahrnuje amikacin, kanamycin, capreomycin, viomycin, enviomycin, cykloserin, terizidon, ethionamid, prothionamid, kyselinu paraaminosalicylovou a fluorochinolony (Beena a Rawat, 2012).

Většina preparátů 2. řady AT má nižší účinnost vůči KB a podstatně vyšší toxicitu. Obecně jsou používány v případě léčby lékové rezistence u TB, v případě, že selže klinická odpověď na konvenční terapii, v případě vážných léčbu omezujících nežádoucích účinků nebo pokud odborný dohled rozhodne, že léčba těmito preparáty je nutná i přes závažnost nežádoucích účinků. U mnoho léků z této řady nebylo pevně stanoveno dávkování, není znám objev rezistence a ani vývoj nežádoucích účinků a jejich riziko v dlouhodobém výhledu. U léků, u kterých jsou nežádoucí účinky známy, se pak jedná o nefrotoxicitu, neurotoxicitu, ototoxicitu, hepatotoxicitu, různé hematologické potíže a mnoho dalších závažných zdravotních potíží. I u AT 2. řady je nutné provádět testy citlivosti na AT (Chisholm-Burns, 2013; Katzung, 2007; Minneman, 2005).

### **2.1.5.3 AT 3. řady**

Do třetí řady AT se řadí látky, které se používají pro léčbu TB, ale nejsou řazeny mezi AT první a druhé řady. Látky 3. řady AT nejsou velmi účinné nebo jejich efektivita ještě nebyla pevně stanovena. Řadíme zde linezolid, rifabutin, makrolidy, vitamin D, thioacetazon, thiorizadin a arginin (Beena a Rawat, 2012).

## **2.1.6 Rezistentní formy TB a jejich léčba**

Ačkoli účinné léky na TB jsou dostupné již řadu let, tak léčba TB není jednoduchou záležitostí. Rezistence vůči AT není novým problémem. Už ve čtyřicátých letech dvacátého století, a to krátce po představení streptomycinu, se objevily případy získané lékové rezistence. Stejný závěr měla i izoniazidová monoterapie. Následné studie ukázaly, že výskyt lékové rezistence může být minimalizován pomocí podávání kombinace více léků a díky plně dohlíženému léčebnému režimu (directly observed treatment short course, DOTS). Globální zátěž lékově rezistentních kmenů TB zůstává špatně kvantifikována, neboť rutinní mikroskopie rozpadu sputa není schopna odlišit lékově rezistentní kmen od kmenů citlivých na léčbu. Lepší přístup k rychlým molekulárním metodám, jako je XpertMTB/FIF, také tradiční testování rezistence



na léky, stejně jako průzkumy prevalence provedené v mnoha nastaveních vysokého zatížení, pomalu zvyšují kvalitu dat. Problémovou se v dnešní době jeví i migrace lidí. I přes zavedený vstupní screening se v neendemických oblastech vyskytují mezi imigranty případy TB. S běžně dostupnými diagnostickými testy je obtížné identifikovat latentní infekci s MDR-TB kmeny nebo detekovat reinfekci u osob, které navštívily oblast s výskytem TB (Marais, 2016).

MDR-TB je definována jako případ, kdy KB se stává rezistentním minimálně vůči izoniazidu a rifampicinu. Mikrobiální rezistence k AT dělíme na primární a získanou. Primární léková rezistence se vyskytuje u pacientů, u kteří jsou hostiteli rezistentní kmenů na léky, a přitom u nich není zaznamenána předešlá léčba TB. Získaná léková rezistence se vyskytuje u pacientů, kteří jsou hostiteli rezistentních kmenů a již byli někdy předtím léčeni AT minimálně po dobu jednoho měsíce, včetně selhání léčby a relapsů (Herfindal, 2000; Koda-Kimble, 2005).

Léčba MDR-TB vyžaduje více toxické AT. 2. řady, díky kterým je léčba finančně náročnější a má i delší trvání. Nejvíce limitujícím pro léčbu MDR-TB je nedostatek kontrolovaných léčebných strategií. Léčebná doporučení pro MDR-TB zahrnují podávání pyrazinamidu a minimálně čtyři účinné léky z druhé řady AT. Léčba musí být vedena minimálně po dobu dvaceti měsíců se čtyřmi účinnými látkami s přerušným podáváním injekčních přípravků na konci osmého měsíce terapie, ale to jen za předpokladu, že odpověď na léčbu v intenzivní fázi je pozitivní (Field et al., 2012).

XDR-TB je komplikovanější formou MDR-TB, kdy souhrn rezistentní látek je rozšířen ještě o fluorochinolonové antibiotika a současně také o capreomycin, kanamycin či amikacin. Kombinace XDR-TB s HIV/AIDS má smrtelné následky (Bártů, 2008).

V porovnání s MDR-TB je léčba XDR-TB ještě více časově náročná a je rovněž i dražší, jelikož je nezbytné použít látky z třetí řady AT. Bohužel podávání těchto léků je spojeno s větším výskytem vedlejších účinků, než je tomu u první či druhé řady AT. Tento druh TB se vyznačuje i vyšší mortalitou. Díky agresivní léčbě a komplexnímu přístupu je pravděpodobnost vyléčení pacienta bez HIV vyšší než 60 %. Při léčbě rezistentních forem TB se AT prioritně vybírají shora dolů (viz Tab. 1). Pokud se objeví rezistence na dané léčivo, většinou se pokračuje v léčbě s některým následujícím AT.

**Tab. 1** Současně dostupná AT. Upraveno (Marais, 2016)

1. Skupina – léky první řady AT – orální podání	Isoniazid Rifampicin Ethambutol Pyrazinamid Streptomycin
2. Skupina – injekčně podávané AT	Kanamycin Amikacin Capreomycin Streptomycin
3. Skupina – Fluorochinolony	Moxifloxacin Levofloxacin Ofloxacin
4. Skupina – orálně podávané bakteriostatické látky	Ethionamid Prothionamid Cykloserin Terizidon Kys. Paraaminosalicylová
5. Skupina – látky s nejasnou účinností	Clofazimin Linezolid Thiacetazon Imipenem/Meropenem Isoniazid (ve vysokých dávkách) Clarithromycin
Nové látky	Bedachilin Delamanid

Od roku 2012 známe další druh TB. TDR-TB je vysoce rezistentní na léky TB, která svou rezistencí převyšuje XDR-TB. Nejen i díky tomuto léčebně náročnému druhu TB je nutné vyvíjet další látky, které by účinně léčily TB (Zumla et al., 2013).

Lékově rezistentní TB vzniká díky tomu, že bacily mají samovolný, předvídatelný počet chromozomálních mutací, které propůjčují bacilům rezistenci vůči lékům. Jedná se o rozpojené mutace, proto daný lék nemá co do činění s rezistencí na nesouvisející látku. Na základě znalosti, že mutace nejsou spojené, je postaven základní princip terapie. Díky monoterapii, nepravidelnému užívání léků, vynechání jednoho nebo více léčiv, suboptimální dávky, nedostatečného počtu aktivních léčiv v léčebném režimu, slabé

absorpci léků, se může náchylný kmen stát rezistentním vůči více lékům během několika měsíců. Toto jsou hlavní důvody, proč jsou plně dohlížené léčebné režimy důležité pro uzdravení nemocného s TB (Willey et al., 2014). Díky nesprávným léčebným postupům se celý proces uzdravení nemocného stává ekonomicky náročným (Herfindal, 2000).

### 2.1.7 Očkování

Základní, současně používanou vakcínu BCG vyvinuli Albert Calmette a Camille Guérin mezi léty 1906 a 1919. Použili tehdy atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis*. První testování na lidech proběhlo v roce 1921. Navzdory obtížnému startu tato vakcína zůstává jedinou licencovanou vakcínou proti TB a byla podána již více než 4 miliardám osob (Kaufmann, 2013).

Vakcína BCG zachránila život mnoho dětem bez dopadu na prevalenci. BCG je preexpoziční vakcínou, která působí preventivně po omezenou dobu a tím pádem oddaluje, ale ne nutně předchází vzniku aktivnímu onemocnění. Navíc je obecně předpokládáno, že imunita vyvolaná vakcínou ani nepředchází, ani neeliminuje TB infekci (Kaufmann, 2013).

Očkování hrají důležitou roli v prevenci a kontrole infekčních onemocnění. Naneštěstí jediná licencovaná preventivní vakcína proti TB, je v prevenci vůči plicní TB, hlavní nakažlivé formě TB, u dospělých neefektivní. Proto je důležité vyvíjet nové vakcíny pro kontrolu a prevenci TB. Nové vakcíny jsou vyvíjeny tak, aby nahradily stávající vakcínu, nebo aby ji zesílily (Gong, Liang, Wu, 2018; Coppola et al., 2018).

BCG vakcína byla také spojena s celkovým snížením dětské mortality a to díky stimulující imunitní odpovědi. Pro zlepšení účinnosti BCG byly vyvinuty dvě hlavní strategie. První z nich zahrnuje vývoj rekombinantní živé mykobakteriální vakcíny s lepší účinností a bezpečností vakcíny. Druhou strategií je zesílení BCG podjednotkovými vakcínami obsahujícími mykobakteriální antigeny (Kaufmann a Nieuwenhuizen, 2018).

V předklinických studiích byla testována široká škála kmenů rekombinantních BCG-rBCG a podjednotkových vakcín. V klinických studiích se nyní nachází pouze jediná rBCG vakcína, a to VPM1002 vakcína (Kaufmann a Nieuwenhuizen, 2018). VPM1002 vakcína se momentálně nalézá v II/III fázi klinického testování u dospělých s vyléčenou tuberkulózou a očekává 10% recidivu (relaps nebo reinfekci) po dobu

12 měsíců sledování (Voss et al., 2018). Další kandidátní vakcíny v klinických studiích zahrnují inaktivované celobuněčné vakcíny, atenuované kmeny mykobakterií a boostery podjednotkových vakcín, které jsou zaměřené převážně na úzký rozsah antigenů. Testování kandidátů na vakcínu v předklinických modelech může být užitečné pro identifikaci nejslibnějších kandidátů, kteří stojí za posunutí vpřed do klinických studií. Celkově se zdá být pravděpodobné, že lze dosáhnout lepšího vakcinačního režimu proti TBC, ale překonání stávajících limitů v ochranném účinku bude ještě vyžadovat nové přístupy (Kaufmann a Nieuwenhuizen, 2018).

V Global Tuberculosis Report 2017 můžeme rovněž najít informace o licencované *Vaccae*<sup>TM</sup> vakcíně. Jde o specifický lyzát, který byl licencován Čínským úřadem pro potraviny a léčiva jako imunoterapeutický prostředek ke zkrácení léčby tuberkulózy u pacientů s TB citlivou na léky (WHO, 2017).

V České republice se rovněž používá k vakcinaci kmen *Mycobacterium bovis* a to v podobě živé vakcíny. Tato vakcína nezaručuje stoprocentní ochranu vůči nemoci, ale zabraňuje vývinu život ohrožujícím formám, jako jsou TB meningitida a miliární TB (Bártů, 2008). Od podzimu roku 2010 je vakcinace proti TB nepovinná. Povinně se očkují pouze novorozenci, pobývající v rizikovém prostředí, kde by mohlo dojít k nákaze a brzkému vývinu onemocnění. Dobrovolná vakcinace dítěte, která se provádí na základě přání rodičů, je možná až po šestém měsíci věku dítěte (Vašáková, 2013).

### **2.1.8 Naděje v oblasti farmakologie**

Je těžké uvěřit, že stále bojujeme proti patogenu, který strašil lidskou rasu po tisíce let, a přesto TB nepřestává infikovat miliony světové populace a nepřestává ani zabíjet. Objev antibiotik, jako je streptomycin (objevený v roce 1944) a "zlatý věk" antibiotického léčiva, který na to následoval, vedl k objevu izoniazidu a pyrazinamidu (1952), ethambutolu (1961) a rifampicinu (1963). Tato antituberkulotika zůstávají základními kameny terapie dodnes. Po schválení rifampicinu v roce 1967 existovala pauza přes 40 let až do schválení bedachilinu v roce 2012. Naneštěstí již mnoho let ale tato antituberkulotika nezvládají TB stoprocentně léčit (Mikušová a Ekins, 2017).

I přes existující vakcínu, je stále kriticky potřebné vyvíjet nové AT kvůli velkému počtu osob s momentálně se vyvíjejícím aktivním onemocněním a kvůli velmi velkému počtu osob s LTBI, kteří jsou v ohrožení, že se u nich vyvine aktivní forma choroby.

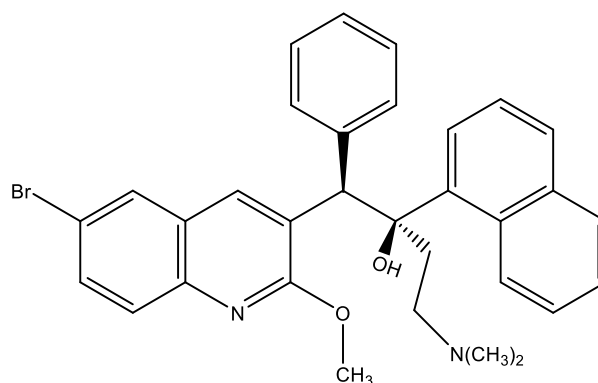
Nové léky jsou potřebné pro zkrácení délky léčby TB, která je vnímavá k lékům, pro zlepšení léčebných možností a výsledků u pacientů s MDR-TB a pro zaručení efektivnějšího a kratšího režimu léčby u pacientů s LTBI. Velmi důležité je rovněž i to, aby léky byly levné a dostupné, a to nejen v rozvinutých zemích, ale hlavně i v rozvojových oblastech (Minneman, 2005; Tomioka, 2014; Vašáková, 2013). Snahou rovněž je, aby nový lék měl i dobrou orální biologickou dostupnost. Dalšími požadavky jsou zjednodušení léčby, nízký výskyt nežádoucích účinků, účinnost proti lékově rezistentním formám TB či snížené interakce s jaterními enzymy CYP450 (Field et al., 2012). Po dekadách opomíjení tohoto směru výzkumu je zde nějaká naděje ve vývoji nových AT.

Zdá se, že způsob, jak přemoci TB v dnešní době, je vyvinout látky takové, aby se jednalo o nové struktury a měly nový způsob účinku. To vyžaduje cílený screening nových molekul proti různým kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Aby se vyřešila rezistence vůči lékům, byly zkoumány alternativní látky k těm již stávajícím. Jedná se o chinoliny, diaminy, chinolony, fluorochinolony, nitroimidazoly, terpenoidy, isonikotiny, oxazolidinony, pyrimidiny, puriny a další (Beena a Rawat, 2012).

V první, druhé či třetí fázi klinických studií se nachází 17 léčivých přípravků pro léčbu TB, která je citlivá k lékům, MDR-TB a také LTBI. Mezi těmito léky najdeme osm nových léků, jako je: delpazolid, GSK-3036556, OPC-167832, PBTZ169, pretomanid, Q203, SQ109 a sutezolid. Další dva léky bedachilin a delamanid již získaly zrychlené nebo podmíněné regulační schválení, a to na základě výsledků z IIb fáze klinických studií. Léky, jako jsou klofazimin, linezolid, levofloxacin, moxifloxacin, nitazoxanid, rifampicin a rifapentin jsou nadále testovány (WHO, 2017).

#### **2.1.8.1 Bedachilin (TMC207)**

Jak již bylo zmíněno Bedachilin (Obr. 2) je prvním lékem, který byl schválen pro léčbu TB od doby, kdy byl objeven rifampicin. Po více než čtyřiceti letech se objevil na trhu lék s novým mechanismem účinku. Bedachilin se řadí mezi diarylchinoliny a jeho cílem je ATP-syntáza, životně důležitý enzym pro vytváření energie v mykobakterii. Bedachilin se k tomuto enzymu váže v centrální oblasti jeho c podjednotky, dojde k zastavení procesu výroby energie a k inhibici mykobakteriální reprodukce, díky čemuž má bedachilin baktericidní účinky vůči replikujícím se, tak i vůči spícím mykobakteriím (Field, 2015; Gaulooze et al., 2015; Nguyen et al., 2016).

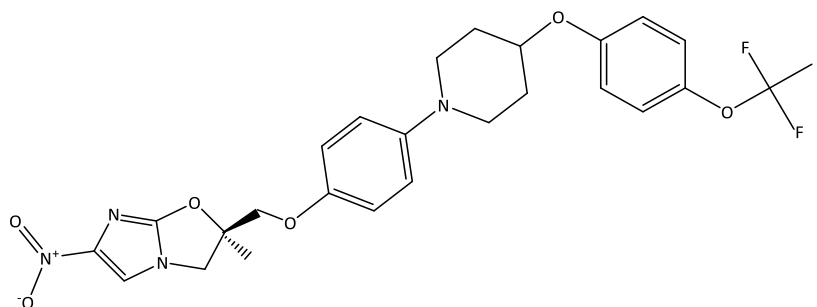


**Obr. 2** Chemická struktura bedachilinu

Bedachilin se používá jako součást kombinovaného léčebného režimu plicní TB, která je rezistentní na léky, zejména MDR-TB. Ohledně bezpečnosti bedachilinu se nedá dospět k určitému závěru, jelikož ještě nebyla dokončena třetí fáze klinických studií u tohoto léku (Gaulooze et al., 2015; Singh et al., 2017). S podáváním bedachilinu se ale i pojí dvě významné nepříznivé skutečnosti. Bedachilin může mít za následek prodloužení QT intervalu na EKG a rovněž v klinických studiích byla zaznamenána zvýšená úmrtnost bedachilinu ve srovnání s léčbou placebem, jehož důvod nebyl dodnes nalezen. Z tohoto důvodu by měl být bedachilin předepisován pouze v případech, kdy nejsou k dispozici alternativní možnosti léčby. I přesto, že je bedachilin novým léčivem, se můžeme setkat s rezistencí vůči němu. Tento fakt je velmi alarmující a je potřeba vyvinout takové postupy užívání bedachilinu, aby rezistence vůči němu nevznikala a nové léčivo nebylo ztraceno (Gaulooze et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

### **2.1.8.2 Delamanid (OPC-67683)**

Delamanid (Obr. 3) se řadí mezi dihydroimidazooxazoly a stejně jako bedachilin se používá pro léčbu MDR-TB. Jeho účinek vůči mykobakteriím pravděpodobně spočívá v inhibici syntézy kyseliny mykolové, které jsou složkami mykobakteriální buněčné stěny. Delamanid inhibuje jak kyselinu metoxymykolovou, tak i ketomykolovou. Delamanid nepůsobí vůči grampozitivním a gramnegativním bakteriím, což se může projevit jako výhoda pro použití jen pro mykobakteriální infekce a tím i proti vzniku rezistence vůči léku. Tato látka je proléčivem, takže k získání svého antituberkulotického účinku vyžaduje aktivaci. Předpokládá se, že aktivace delamanidu je zprostředkována prostřednictvím mykobakteriálního koenzymového systému F420.20 (Lewis a Sloan, 2015; Szumowski a Lynch, 2015).



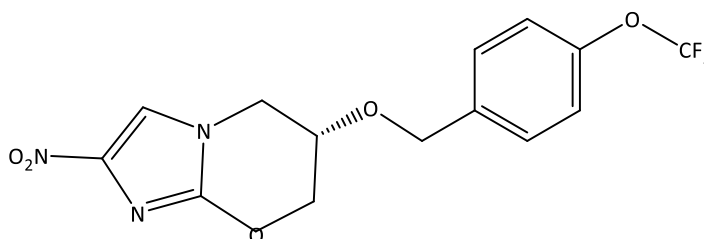
**Obr. 3** Chemická struktura delamanidu

Mezi AT vykazuje delamanid nejnižší MIC vůči citlivým i rezistentním kmenům na léky. Je účinný vůči replikujícím se i vůči nereplikujícím se bakteriím, vůči intracelulárním i extracelulárním bacilům. V klinických studiích delamanid prokázal svůj časný baktericidní účinek s významným zlepšením konverze sputa (Fujiwara et al., 2018)

Stejně jako badachilin i delamanid má kardiotoxické účinky. Zbylé nežádoucí účinky, které se u tohoto AT vyskytly, byly více méně běžnými nežádoucími účinky (Szumowski a Lynch, 2015).

### 2.1.8.3 Pretomanid (PA-824)

Po bedachilinu a delamanidu je pretomanid třetí léčivem nacházejícím se ve třetí fázi klinických studií. Pretonamid (Obr. 4) je momentálně testován pro léčbu MDR-TB a rovněž i XDR-TB (WHO, 2017). Stejně jako delamanid i pretomanid inhibuje syntézu mykolových kyselin a rovněž vykazuje nízkou MIC vůči mykobakteriálním kmenům. Toto léčivo je v klinických studiích podáváno v kombinaci s dalšími AT (D'Ambrosio et al., 2015). Je efektivní vůči replikujícím i nereplikujícím se organismům. Pretomanid, stejně jako několik další léčiv, je méně efektivní, pokud není podáván v kombinaci s pyrazinamidem (Murray et al., 2015).

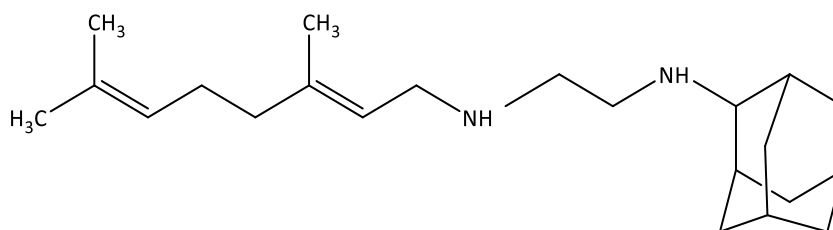


**Obr. 4** Chemická struktura pretomanidu

Pretomanid se řadí mezi nitroimidazoly a je prolečivem, a tak vyžaduje pro získání svého antimykobakteriálního účinku aktivaci. Děje se tak cestou F420 dependentní glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Aktivace produkuje des-nitro metabolit, který produkuje reaktivní formy dusíku, což vede k poklesu intracelulárního ATP a anaerobnímu usmrcování. Toto je druhý způsob, jak toto léčivo působí vůči mykobakteriím. Pretomanid vykazuje sterilizační i baktericidní účinek (Olaru et al., 2015).

#### 2.1.8.4 SQ109

Látka SQ109 (Obr. 5), 1,2-ethylendiamin, je analogem ethambutolu a momentálně se nachází ve fázi II klinických studií. Toto léčivo je účinné vůči replikujícím i nereplikujícím se bakteriím díky cílení MmpL3 genu transmembránového transportéru, díky kterému se kyselina mykolová inkorporuje do mykobakteriální buněčné stěny. Účinek SQ109 je srovnatelný s izoniazidem a vyšší než u ethambutolu. Výhodnou se zdá být i kombinace SQ109 s izoniazidem a rifampicinem, jelikož efekt je synergický. Toto zjištění by mohlo přispět ke zlepšení léčby TB. Hlavním cílem v budoucnosti léčiva SQ109 je nahrazení ethambutolu v léčbě TB (Olaru et al., 2015; Sacksteder et al., 2012).

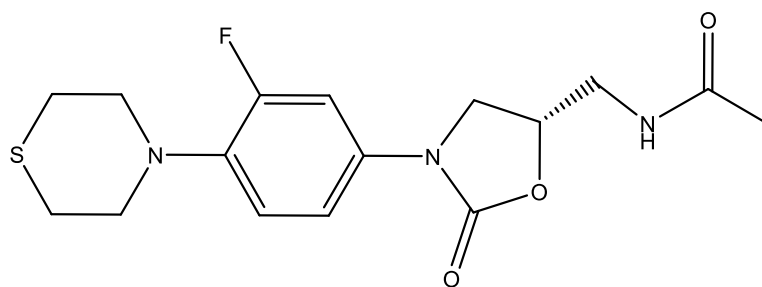


Obr. 5 Chemická struktura SQ109

#### 2.1.8.5 Sutezolid (PNU-100480)

Sutezolid (Obr. 6) patří mezi oxazolidony a má baktericidní účinek. Jeho mechanismus účinku tkví v inhibici proteosyntézy. Účinnost sutezolidu se porovnatelná s izoniazidem a v kombinaci s pyrazinamidem má synergický účinek. Výskyt mezilékových interakcí u sutezolidu je nízký, jelikož neinhibuje CYP3A4 enzym (Jadhavar et al., 2015).



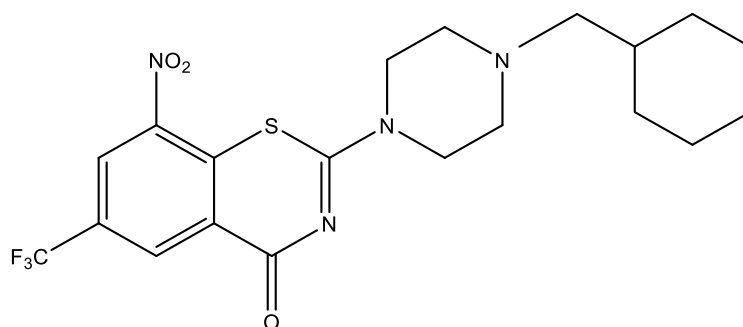


**Obr. 6** Chemická struktura sutezolidu

Mezi nežádoucí účinky sutezolidu zdá se nepatří prodloužení QT intervalu na kardiogramu a suprese kostní dřeně, ale stále existují obavy týkající se potenciální neurotoxicity a hepatotoxicity (Olaru et al., 2015)

#### 2.1.8.6 PBTZ169

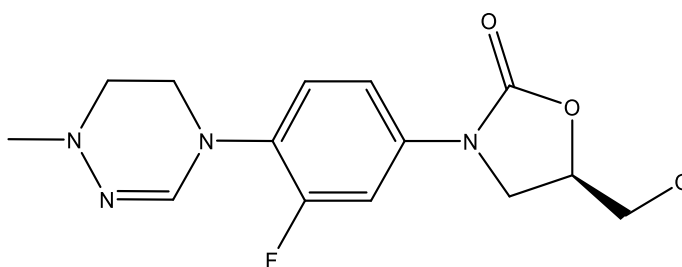
Látka PBTZ169 (Obr. 7) patří do skupiny benzothiazininů a vykazují silný inhibiční účinek vůči mykobakteriálním kmenům, které jsou citlivé na léčbu, i vůči rezistentním kmenům, zejména k léčbě MDR-TB. Podstatou antituberkulotického účinku PBTZ169 je cílení dekaprenyl fosforyl- $\beta$ -D-ribóza- 2' -epimerázy (Lv et al., 2018). Tento heterodimerní enzym obsahuje proteiny DprE1 a DprE2. DprE1 je klíčovým enzymem v biosyntéze dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-arabinofuranózy a prekurzor složky mykobakteriální buněčné stěny arabinogalaktanu, jejichž syntéza začíná dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-ribofuranózou-DPR. DprE1 je zapojen do prvního kroku konverze DPR na dekaprenylfosforyl-D-2-ketoerytro-pentofuranózu (Borsari et al., 2017).



**Obr. 7** Chemická struktura PBTZ169

### 2.1.8.7 Delpazolid (LCB01-0371)

Delpazolid (Obr. 8) je oxazolidinon s cyklickým amidrazonem. Jeho mechanismus účinku spočívá ve vazbě na 23S ribozomální RNA 50S podjednotky, čímž se zabrání tvorbě 70S iniciačního komplexu a dochází k inhibici syntézy proteinů. (Cho et al., 2017). Delpazolid vykazuje dobrou biologickou dostupnost po perorálním i po intravenózním podání. Klinické testování probíhá v USA a v Jižní Koreji (Karpiuk a Tyski, 2017).



Obr. 8 Chemická struktura delpazolidu

### 2.1.9 Potenciální AT ze skupiny aromatických nitrolátek

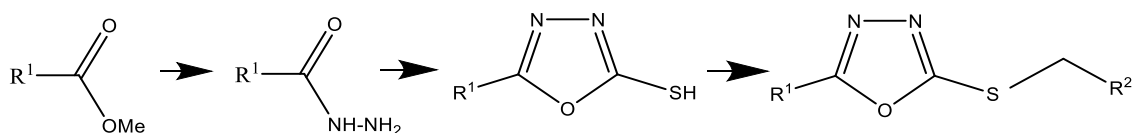
Na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové má výzkum v oblasti vývoje nových AT dlouholetou tradici. Ve spolupráci s dalšími institucemi jako je Zdravotní ústav v Ostravě a Centrum biologické ochrany v Těchtíně se provádí antimykobakteriální hodnocení vyvinutých látek. Pro svou antimykobakteriální aktivitu byly studovány mnohé sloučeniny. Mezi zkoumané látky s aktivitou proti multirezistentním kmenům patří rovněž i heterocykly (Waisser, 2014).

V nedávné době bylo výzkumnými skupinami ve světě studováno několik potenciálních látek s antimykotickým účinkem, které ve své struktuře obsahují nitroskupinu. Mnohé studie zabývající se těmito látkami nadále pokračují. Jedná se o již zmíněný delamanid či pretomanid nebo benzothiazinony. Dále se jedná o látky TBA-354, CGI-17341 a další potenciální AT (Karabanovich et al., 2017).

V této diplomové práci byly testovány deriváty oxadiazolů. Deriváty fenyl-1,3,4-oxadiazolů jsou známé díky svým různorodým působením a vykazují antifungální, antibakteriální, protizánětlivé, antituberkulotické a další účinky (Pal et al., 2014; Rane et al., 2013). 2,5-disubstituované oxadiazoly prokázaly účinnost i vůči extrémně rezistentním mykobakteriálním kmenům. Na Katedře organické a bioorganické chemie,

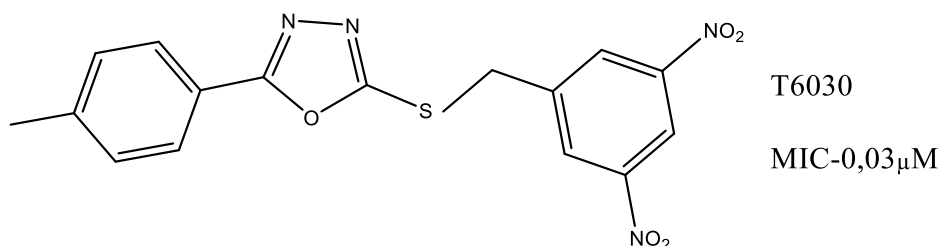
Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzitě Karlově byla nasyntetizována série derivátů oxadiazolů. Z látek T6030 a T6797 byly odvozeny analogy k následnému prostudování jejich vztahu mezi strukturou a aktivitou vůči mykobakteriálním kmenům, k jejich cytotoxicitě a selektivitě.

Syntéza oxadiazolového derivátu proběhla dle schématu na Obr. 9. V prvním kroku byl metylester připraven Fisherovou esterifikací karboxylové kyseliny, nebo za použití komerčně dostupného metylesteru. Ten reagoval s hydrazin hydrátem v etanolu za vzniku acylhydrazidu, který dále reagoval se sirouhlíkem v bazickém etanolu za tvorby 2-substituovaného-1,3,4-oxadiazol-5-thiolu. V posledním kroku dochází k alkylationi oxadiazolu za přítomnosti tetrabutylamonium bromidu a vznikne nitrosubstituovaný 2-aryl-5-benzulfanyl-1,3,4-oxadiazol (Karabanovich, 2016).

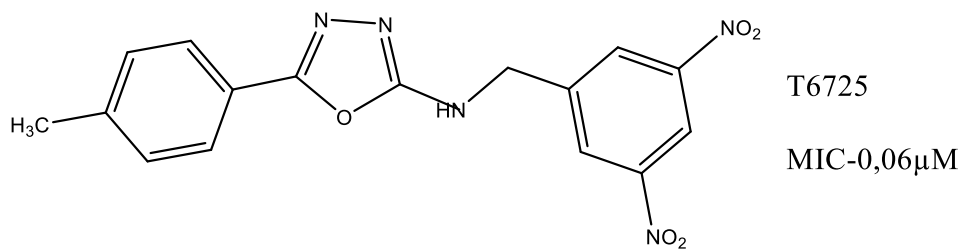


**Obr. 9** Schéma přípravy oxadiazolového derivátu- $R^1$ -4- $CH_3Ph$ ,  $R^2$ -3,5-( $NO_2$ ) $_2Ph$ . Upraveno (Karabanovich et al., 2016)

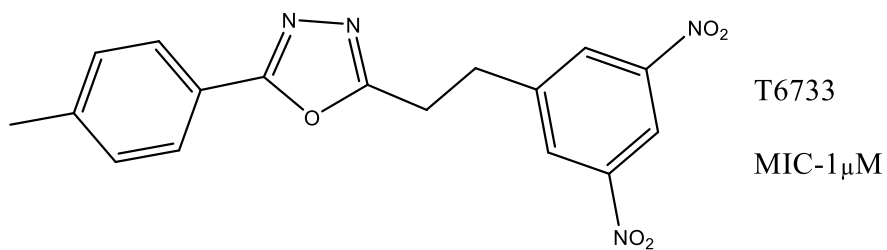
Účinná látka s interním označením T6030 (Obr.10) posloužila jako vzor pro syntézu dalších analog. Látky T6733 (Obr. 12), T6734 (Obr.13) a T6735 (Obr. 14) jsou karbanalogy a T6725 (Obr. 11) je aminovým analogem látky T6030. Analogy T6030 byly odvozeny pro studium vlivu atomu síry na účinek látek (Karabanovich et al., 2016). Látka T 6797 (Obr. 18) byla nasyntetizována v další sérii derivátů oxadiazolů, aby se prozkoumal vliv struktury látek a jejich aktivitu, zejména jaký má vliv přímé napojení 3,5-dinitrofenyl skupiny k heterocyklu na antimykobakteriální účinek syntetizovaných látek.



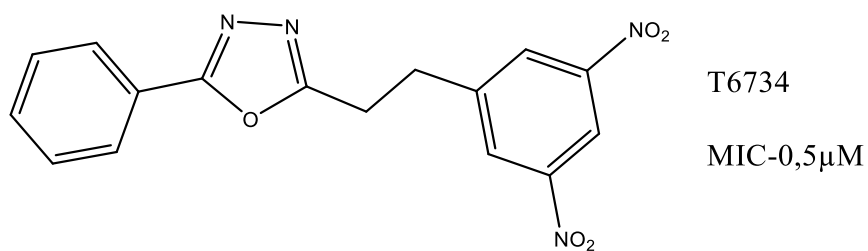
**Obr. 10** Studovaná látka T6030



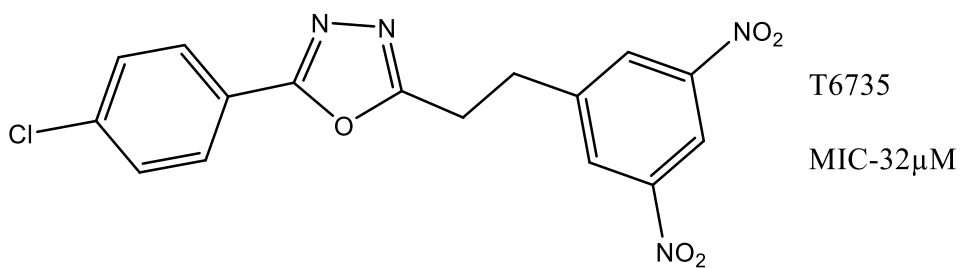
*Obr. 11 Aminový analog T6725*



*Obr. 12 Karbanalog T6733*

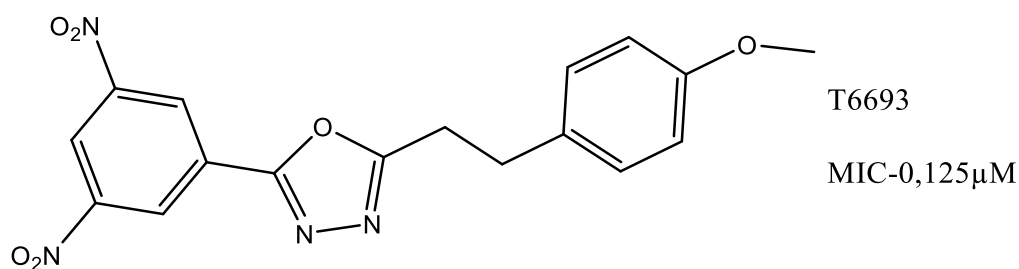


*Obr. 1311 Karbanalog T6734*

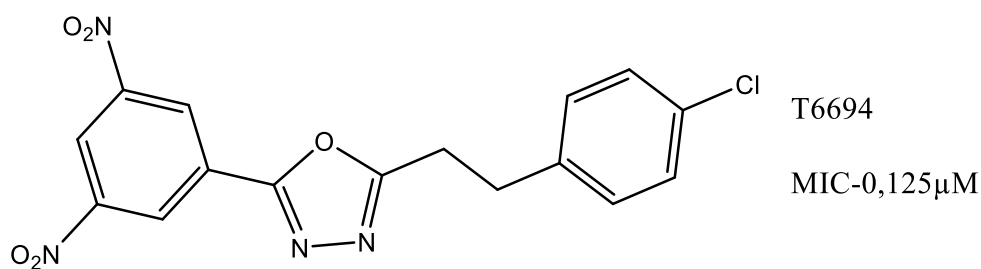


*Obr. 1412 Karbanalog T6735*

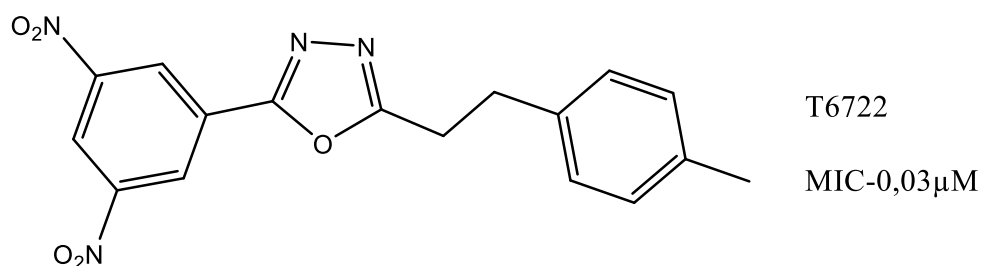
Látka T6797 byla připravena syntetickou cestou vyobrazenou na Obr. 19. Pomalým přidáním hydrazin hydrátu do ledově studené suspenze metyl-3,5-benzoátu v etanolu vedlo k formování hydrazidu. Ten následně reagoval se sirouhlíkem a KOH ve vodě při 90°. Tato reakce vyústila k formaci dvou produktů, přičemž pro látku T6797 byl důležitý 5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol. Ten byl převeden na 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol díky alkylation oxadiazolu-2-thiolu s různými alkylhalogenidy v acetonitrilu v přítomnosti triethylaminu. Díky modifikaci této reakce byl získán derivát oxadiazolu, T6797. Z T6797 byly odvozeny karbanalogy T6722 (Obr. 17), T6693 (Obr. 15) a T6694 (Obr. 16) opět se záměrem prozkoumání vlivu přítomnosti atomu síry na účinek látky (Karabanovich, 2017).



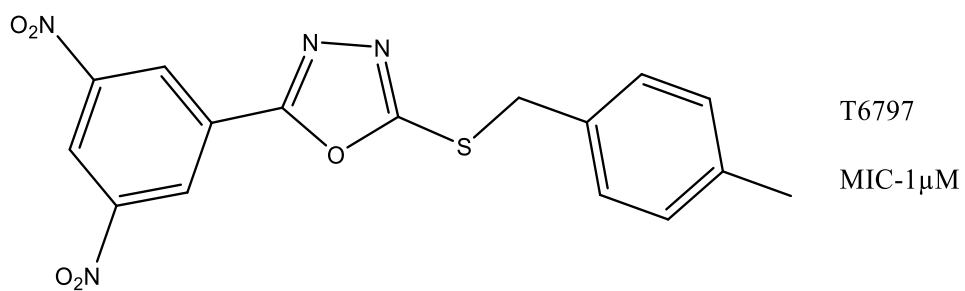
*Obr. 135* Karbanalog T6693



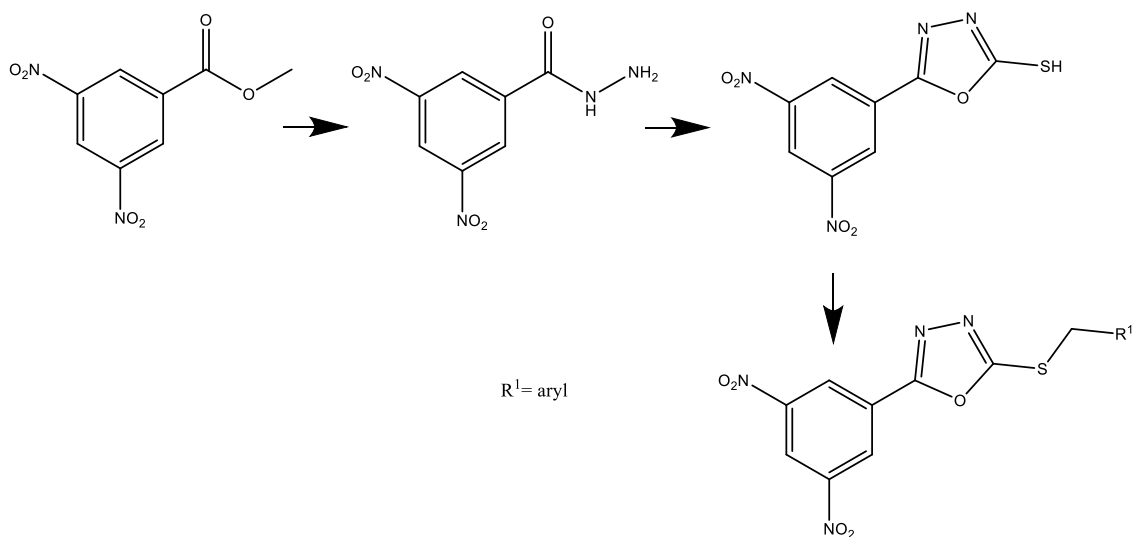
*Obr. 16* Karbanalog T6694



*Obr. 147* Karbanalog T6722



**Obr. 18** Studovaná látka T6797



**Obr. 15** Schéma přípravy 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolového derivátu. Upraveno (Karabanovich, 2017).

### **3. CÍLE PRÁCE**

- hodnocení cytotoxicity u nových potenciálních antituberkulotik ze skupiny aromatických nitrolátek (T6030, T6693, T6694, T6722, T6725, T6733, 6734, T6735 a T6797) na nemaligních buněčných liniích 3T3 a HaCaT
- zhotovení fotografické dokumentace buněčných linií 3T3 a HaCaT a sledování změn u buněčných struktur vlivem toxického působení hodnocených látek
- porovnání cytotoxického působení látek
- stanovení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie

## 4. METODICKÁ ČÁST

### 4.1 Vybavení pro práci s buněčnými liniemi

- sterilní vaničky s víčkem, plastové - (Eppendorf, Německo)
- sterilní sérologické pipety (TTP, Švýcarsko) – plastové pipety o objemu 5, 10, 25ml, jednotlivě balené
- elektrické pipetovací nástavce BiohitMidi Plus – (Biohit, Finsko)
- sterilní Pasteurovy pipety – (Brand, Německo) – plastové, jednotlivě balené
- automatické pipety - (Eppendorf, Německo) – různý objem
- Bürkerova komůrka - (Brand, Německo) – skleněná
- sterilní kultivační nádoby-plocha dna 75 cm<sup>2</sup> – (T75, TTP, Švýcarsko) – plastové
- sterilní mikrozkuhavky s víčkem (Eppendorf, Německo) – plastové, o objemu 1,5 ml a 2 ml
- automatická osmikanálová mikropipeta e-PET BioHit (BioHit Finsko) – rozsah 50-1200 µl
- sterilní špičky k pipetám (Eppendorf, Německo) – plastové, různý objem
- sterilní 96-jamkové mikrotitrační destičky – (TTP, Švýcarsko) – s plochým dnem, plastové
- sterilní Petriho misky (WillCo Wells, Nizozemí) – plastové
- kádinky (ThermoFisherScientific, Česká republika) – skleněné



## 4.2 Látky ke kultivaci buněk

- médium pro kultivaci buněk DMEM (DMEM-Dulbecco's modified Eagle's medium; Lonza, Belgie)
- HEPES pufr (1M 4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina; Sigma, Německo)
- PBS pufr (Sigma, Německo / MP Biomedicals, USA); fosfátový pufr, tablety
- fetální bovinní sérum (FBS; Lonza, Belgie) tepelně inaktivované
- trypsin/EDTA (Lonza, Belgie) – 10× koncentrovaný T/E, 0,5% trypsin a 0,02% EDTA
- penicilin/streptomycin (Lonza, Belgie) - (P/S), 100× koncentrovaný roztok, 10000 jednotek/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu

## 4.3 Studované látky

- látka T6030 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6733 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6725 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6797 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6735 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6722 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6734 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6693 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)
- látka T6694 (syntéza Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychra a Mgr. J. Němeček)

## 4.4 Chemikálie a reagenty

- neurální červeň (Sigma, Německo; NR-neutral red), 3,3 mg/ml
- peroxid vodíku (Sigma, Německo), 3% roztok

- trypanová modř (Sigma, Německo), 0,4% roztok
- paraformaldehyd (Sigma, Německo)
- fixační roztok pro NR (1% roztok CaCl<sub>2</sub> v 0,5% formaldehydu)
- lyzační roztok pro NR (1% roztok ledové kyseliny octové v 50% EtOH)
- pufr PBS (Phosphate Buffered Saline; Sigma, Německo) pH 7,2-7,4
- dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Německo) ≥ 99,9%
- ethanol (Penta, Česká republika) – absolutní, p.a čistota
- purifikovaná ultračistá voda (Millipore, USA)
- Triton X-100 (Sigma, Německo)
- blokovací roztok (3% BSA v PBS pufru; Sigma, Německo)
- fluorescenční sonda ActinGreen 488 (MolecularProbes, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (MolecularProbes, USA)
- fluorescenční sonda Mito Tracker Red CMXRos (MolecularProbes, USA)

## **4.5 Technické vybavení laboratoře**

- vodní lázeň (Mettler, Německo)
- ultrazvuková lázeň (Elma, Německo)
- desková třepačka (Heidolph, Německo)
- vortex IKA MS3 basic (IKA, Německo)
- analytické váhy Sartorius CP2225D (Sartorius AG; Německo)
- buněčné inkubátory (Sanyo a Esco) s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub>
- box s laminárním prouděním BioAirTopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- mikrocentrifuga Hermle Z 300 (HERMLE Labortechnik, Německo)

- třepačka k třepání mikrotitračních destiček Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- multifunkční čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd.; Švýcarsko)
- invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko)
- konfokální Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)

## **4.6 *In vitro* hodnocení cytotoxicity**

### **4.6.1 Příprava kultivačního media**

Jelikož byly všechny cytotoxicitní experimenty prováděny *in vitro*, bylo nutné nahradit buňkám extracelulární tekutinu kultivačním médiem. Kultivační médium je nezbytné pro kultivaci buněk v podmínkách *in vitro*. Díky vhodnému obsahu živin poskytuje médium buňkám podmínky pro jejich růst a diferenciaci *in vitro*. Pro kultivaci buněčných linií 3T3 a HaCaT, které byly zvoleny pro cytotoxicitní experimenty, bylo použito DMEM médium se suplementy. Před přípravou kultivačního média byly všechny suplementy i základní médium předeřhřaty ve vodní lázni na 37°C. Jak při přípravě kultivačního média, tak i při dalších krocích testování cytotoxicity je velmi důležité dbát na sterilitu, proto pracujeme asepticky v laminárním boxu. V prvním kroku se z láhve s médiem odebere 50 ml média, které je nahrazeno přidáním 50 ml FBS (10%), 5 ml HEPES pufru (1%) a 5 ml P/S (1%). Vše se promíchá a hotové kultivační médium je skladováno v lednici.

### **4.6.2 Buněčná linie HaCaT a 3T3**

HaCaT buněčná linie je linií aneuploidních imortalizovaných nenádorových keratinocytů získaných z lidské kůže dospělého jedince. Tento typ buněk je ve výzkumu široce využíván, jelikož mají velmi rozvinutou schopnost diferenciaci a proliferace. Oproti tomu 3T3 buněčná linie pochází z ze zvířecího zdroje, a to z embryí laboratorních myší Swiss albino a jedná se o fibroblasty. Buněčné linie, které byly použity pro experimenty, pocházejí z Americké buněčné banky (American Type Culture Collection) v Rockville, ve státě Maryland v USA. Obě buněčné linie dosahují určitého počtu

buněčných cyklů, pasáží a poté se na nich začíná projevovat proces stárnutí. Když buněčná linie dosáhne kritického počtu pasáží a již není schopná další diferenciaci a proliferace v požadujícím rozsahu, je nutné sáhnout po buněčné linii s nízkým počtem pasáží.

### **4.6.3 Zacházení s buněčnými liniemi a jejich kultivace**

Aby buňky byly schopné přežít v *in vitro* podmínkách, a zároveň si zachovaly svou schopnost proliferace, a tím i reprodukovatelnost výsledků, je nutné jim poskytnout takové prostředí, které by napodobovalo prostředí jejich přirozeného výskytu. Je nezbytné zvolit vhodné kultivační médium i kultivační nádoby. V neposlední řadě je nutné zajistit také vyhovující teplotní a tlakové prostředí a rovněž i potřebnou vlhkost prostředí.

Pro kultivaci HaCaT i 3T3 buněčné linie byly zvoleny T75 kultivační nádoby, kde byly buňky resuspendovány v médiu a ponechány v inkubátoru při 37 °C, za stálé vlhkosti a 5% obsahu CO<sub>2</sub> v atmosféře. Obnova pasáže byl prováděna co 3-4 dny, dle potřeb buněk, aby se jim dostávalo dostatek živin.

### **4.6.4 Pasážování**

Buňky se v kultivačním médiu za jim vyhovujících podmínek dokáží exponenciálně množit. Exponenciální nárůst můžeme pozorovat do té doby, než začne docházet k úbytku živin a růst se začne zpomalovat. Děje se tak díky inhibičním mechanismům Každé 3 – 4 dny těsně před začátkem inhibice růstu se provádělo pasážování buněk.

Vytváření subkultur, tzv. pasážování, se provádí ve sterilním prostředí laminárního boxu. Všechny látky používané při pasážování byly před zahájením práce vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Po odstranění původního média se buňky 2x opláchly PBS pufrém po 5 ml a pufr se pokaždé odsál. Následně byl přidán 1 ml trypsin/EDTA (v případě HaCaT buněk 2 ml). Uzavřená láhev s buňkami se nechala inkubovat při 37 °C u 3T3 buněk po dobu maximálně 5 minut a v případě HaCat buněčné linie 10-15 minut. Působením trypsinu v inkubátoru dochází ke štěpení extracelulárních bílkovin a buňky, které byly přichyceny ke dnu kultivační láhve, se díky tomu ze dna uvolní. Po uplynutí daného času se trypsinované buňky vyjmuly z inkubátoru a působení trypsinu bylo zastaveno přidáním 9 ml kultivačního média (sérum obsahující médium,

SCM) a buňky v něm byly resuspendovány. Podle aktuálního nárůstu buněk a předchozího pasážovacího poměru se potřebný objem buněk přenesl do nové láhve a doplnil se požadovaným množstvím SCM. Láhev byla uzavřena a vložena do inkubátoru na 3 – 4 dny tak, aby bylo pokryté dno kultivační láhve z přibližně 90 %.

#### **4.6.5 Stanovení počtu živých buněk**

Pro zajištění stejných podmínek u experimentu a pro jeho reprodukovatelnost bylo nutné znát počet živých buněk, který se pak použije pro experiment. Díky trypanové modři, která prochází přes plazmatickou membránu dovnitř do buňky, můžeme rozeznat živé buňky od mrtvých. Živé buňky jsou totiž schopny vypudit barvivo zpět z buňky, mrtvé buňky tuto schopnost postrádají. V Bürkerově komůrce se pak provádí přepočítání buněk. Živé buňky poté v mikroskopu vidíme jako bezbarvé kulaté útvary, mrtvé buňky jsou obarveny tmavě modře.

V mikrozkušavce se smíchaly resuspendované buňky z pasážování s trypanovou modří v poměru 1:1. Směs se promíchala a nechala se chvíli inkubovat. Po opětovném promíchání se na obě strany Bürkerovy komůrky nanoslo po 10 $\mu$ l suspenze. Po mikroskopickém spočítání následoval přepočítání buněk na 1 ml buněčné suspenze.

#### **4.6.6 Nasazování buněk**

Testování cytotoxicity látek se provádí v 96-jamkových destičkách. Proto je nutné před experimentem nasadit buňky do destiček. Po stanovení počtu buněk a jejich přepočtu na mililitry buněčné suspenze se požadované množství buněk smíchalo s vypočteným množstvím předehřátého SCM, aby počet buněk odpovídal 100 000 buněk/ml. Promíchaná suspenze byla pipetována do destiček v objemu 100  $\mu$ l. Destičky s buňkami byly vloženy do inkubátoru a byly v něm ponechány při 37 °C 1 den. Po 24 hodinách buňky narostly a byly připraveny k použití pro experiment.

#### **4.6.7 Převedení testovaných látek do roztoku**

Před zahájením experimentu bylo nutné připravené látky T6030, T6693, T6694, T6722, T6725, T6733, T6734, T6735 a T6797 převést z původní krystalické podoby do roztoku. Díky rozdílné rozpustnosti látek v bezvodém DMSO byly připraveny zásobní

roztoky o koncentraci 0,02 – 0,2 M. Tyto připravené roztoky byly skladovány v uzavřených mikrozkuvkách ve tmě za pokojové teploty.

Před nasazováním testovaných látek se musely vytvořit z jednotlivých zásobních roztoků roztoky pracovní. Zásobní roztoky bylo nutné rozmíchat na vortexu, případně u zásobních roztoků, ve kterých testované látky za dobu svého skladování vykristalizovaly, byla použita ultrazvuková lázeň pro rozbití krystalů a následně se vzorky stočily v mikrocentrifuze. Důkladně rozmíchané zásobní roztoky následně byly pipetovány do mikrozkuvek s víčky a následně doplněny přehřátým SCM tak, že byly vytvořeny pracovní roztoky o koncentracích 1 – 500 $\mu$ M. Roztoky byly opět důkladně promíchány na vortexu.

#### **4.6.8 Nasazování testovaných látek**

Den předem připravené destičky s nasazenými buňkami se vytáhly z inkubátoru a jeden sloupec buněk se usmrtil přidáním letální dávky peroxidu vodíku. Tento sloupec posloužil později pro odečtení pozadí při stanovení životaschopnosti buněk. Do šesti sloupců byly v tripletech napipetovány dobře rozmíchané pracovní roztoky o koncentracích 1, 10, 50, 100, 200 a 500 $\mu$ M příslušné testované látky. Ve zbylých jamkách bylo vyměněno médium, které předem bylo vytemperováno na 37°C. Jamky s médiem posloužily jako neovlivněné kontroly. Tento postup se opakoval jak u buněčné linie 3T3, tak i u HaCaT buněčné linie. Destičky opět byly vloženy do inkubátoru po dobu 72 hodin. Po inkubaci následovalo hodnocení životaschopnosti buněk.

#### **4.6.9 Hodnocení životaschopnosti buněk**

Hodnocení životaschopnosti buněk je nedílnou součástí hodnocení cytotoxicity. Díky hodnocení životaschopnosti (viability) buněk, stanovíme poměr mezi živými a mrtvými buňkami, což nám dá odpověď na to, zda jsou testované látky toxické, či nikoliv a v jakých koncentracích.

Test neutrální červené cytotoxicity je založen na schopnosti živých buněk vychytávat a vázat NR. NR je pozitivně nabitě barvivo, které pasivně difunduje přes buněčnou membránu buněk, akumuluje se v buněčné cytoplazmě a uchovává v kyselém prostředí lysosomů. Princip testu spočívá ve skutečnosti, že pouze živé buňky jsou schopny absorbovat a vázat NR, zatímco tato schopnost klesá v poškozených nebo

mrtvých buňkách. Množství nahromaděné NR je tedy přímo úměrné množství živých buněk v buněčné kultuře (Ittiyavirah et al., 2014; Perez et al., 2017).

Po třídní inkubaci buněk s látkami následovalo stanovení životaschopnosti buněk. K předem přehřátému médiu se přidala NR o výsledné koncentraci 40 µg/ml. Tento roztok byl pipetován k buňkám. Poté buňky byly ponechány v inkubátoru 2 hodiny. Po skončení inkubace byla barva z destiček odstraněna a následovala fixace fixačním roztokem (100µl) po dobu 15 minut. Po odstranění fixačního roztoku byly buňky 2x opláchnuty 100µl PBS pufru a po jeho odstranění byl přidán lyzační roztok (200µl). Po 30 minutách lyzace buněk na třepačce se změřila spektrofotometricky změřila absorbance na multifunkční čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite 200M Pro při vlnové délce 540nm. Životaschopnost buněk byla porovnávána s neovlivněnou kontrolou a výsledek byl vyjádřen v procentech této kontroly.

#### **4.6.10 Zpracování dat**

Získané výsledky měření byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). Ze zpracovaných výsledků byly poté vytvořeny grafy k jednotlivým látkám a stanovena hodnota IC<sub>50</sub>. Rovněž proběhlo statistické zpracování dat formou one-way ANOVA metody s Bonferroniho *post hoc* testem, to vše v softwaru GraphPad Prism verze 6.04 (GraphPad Software, USA). Výsledky testovaných látek byly porovnány s kontrolami a zprůměrovány a na výsledky, které odpovídaly \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01 a \*\*\**p* < 0,001 bylo pohlíženo jako na statisticky významné. Hodnoty v grafech jsou uváděny jako průměry se směrodatnou odchylkou.

### **4.7 Fotografická dokumentace**

Záměrem zhotovení fotografické dokumentace bylo sledování případných morfologických změn buněk vlivem působení studovaných látek. Pro znázornění buněčných struktur (jádra, mitochondrie a aktinový cytoskelet) byly použity fluorescenční sondy. S použitím konfokálního laserového rastrovacího mikroskopu Nikon A1+ (Nikon, Japan) byly pořízeny snímky předem obarvených buněčných kompartmentů ve čtyřech konfokálních řezech tak, aby se pokryl celý objem preparátu v zorném poli 20× objektivu.

## **4.7.1 Barvení vzorků pro fotografickou dokumentaci**

Po inkubaci buněk se studovanými látkami následovalo barvení 0,3  $\mu$ M MitoTracker Red CMXRos po dobu 20 minut v inkubátoru. Poté se buňky opláchly a inkubovaly 5 minut s čistým médiem k odstranění zbytků nenavázané sondy. Následně se buňky fixovaly 15 minut přehřátým fixačním roztokem (3,6% paraformaldehyd v SCM). Po fixování se buňky 3x opláchly PBS pufrem po dobu 5 minut na deskové třepače. Od tohoto kroku se vše provádí na deskové třepače. V dalším kroku se nechal 15 minut působit permeabilizační roztok (0,5% Triton X-100 v PBS) a opět se buňky 3x opláchly PBS pufrem. Po hodinovém působení blokačního roztoku (3% BSA v PBS). Dále následuje barvení aktinových vláken 30 min ActinGreen 488 (7 kapek/10ml PBS; MolecularProbes, USA) a barvení jader fluorescenční sondou Hoechst 33342 (5  $\mu$ l/10ml PBS) po dobu 20 minut. Nakonec se buňky opláchnou 2x PBS pufrem a 10 minut purifikovanou ultračistou vodou (Millipore, USA).

### **4.7.1.1 Barvení mitochondrií**

MitoTracker Red CMXRos je červené fluorescenční barvivo, které obarvuje aktivní mitochondrie v živých buňkách. Tato fluorescenční sonda je vhodná pro experimenty s vícebarevným značením, protože její červená fluorescence je dobře odlišená od zelené fluorescence dalších sond (MolecularProbes, 2008).

### **4.7.1.2 Barvení aktinových vláken**

ActinGreen 488 ReadyProbes Reagent je selektivní vysoce afinitní F-aktinová sonda konjugovaná s jasnými fotostabilními zeleně fluoreskujícím barvivem Alexa Fluor 488. Faloidin je bicyklický peptid, který je běžně používán v zobrazovacích aplikacích pro selektivní značení F-aktinu. Fluorescenčně značený faloidin má několik výhod oproti protilátkám pro značení aktinu, včetně prakticky identických vazebných vlastností s aktinem z různých druhů rostlin a zvířat a nízké nescifické vazby (ThermoFisher Scientific, 2018).

### **4.7.1.3 Barvení jader**

Modré fluorescenční barvivo Hoechst 33342 je vitální barvivo, které barví nukleové kyseliny. Fluorescence tohoto barviva je velmi citlivá na konformaci DNA

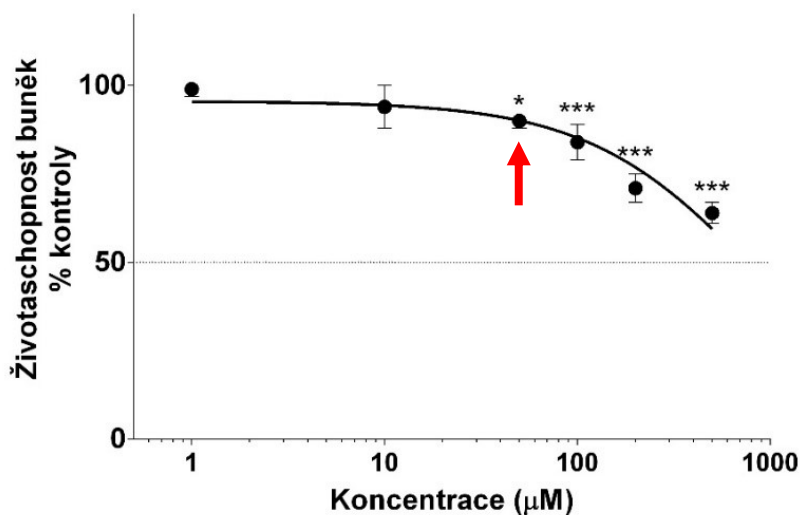


a stav chromatinu v buňkách. V důsledku toho může detekovat stupeň jaderného poškození (MolecularProbes, 2005).

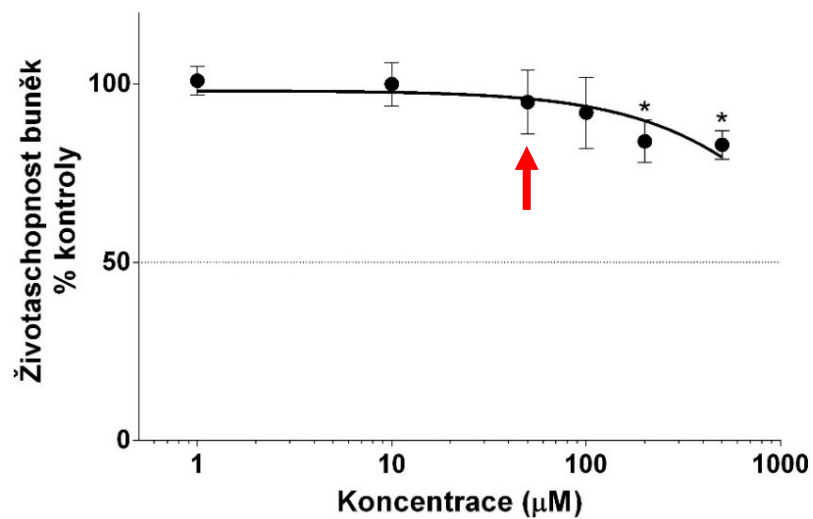
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Látka T6030

Hodnocení cytotoxicity látky bylo provedeno na nenádorových buněčných liniích 3T3 a HaCaT. Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila svou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení životaschopnosti buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná – od koncentrace 50  $\mu\text{M}$  precipituje a vytváří krystaly. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 20 a 21).



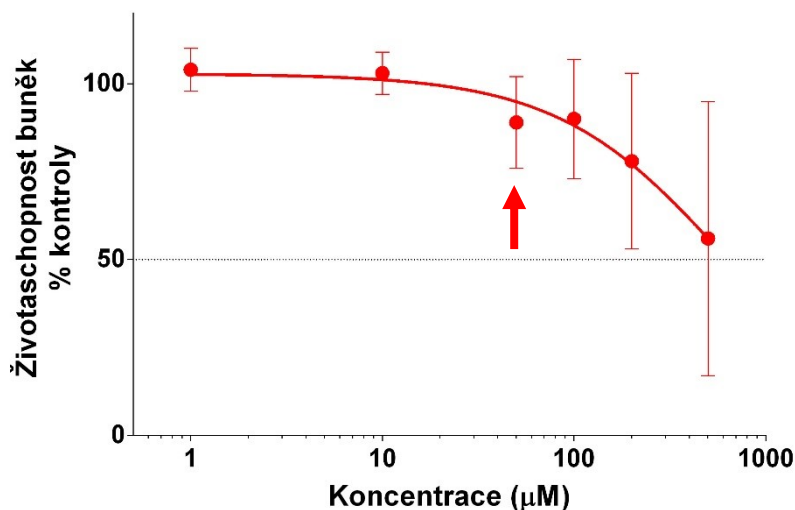
**Obr. 16** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6030. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



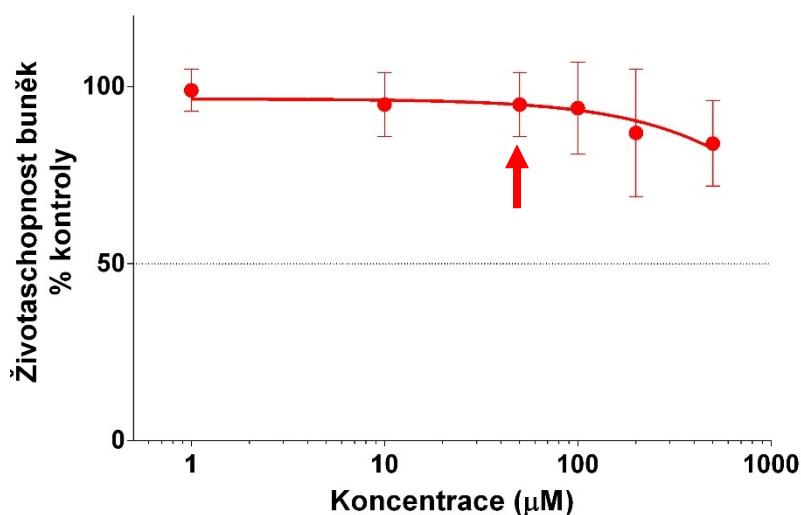
**Obr. 17** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6030. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

## 5.2 Látka 6693

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila statisticky významnou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrací mezi 50 a 100  $\mu\text{M}$  vytváří krystaly. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 22 a 23).



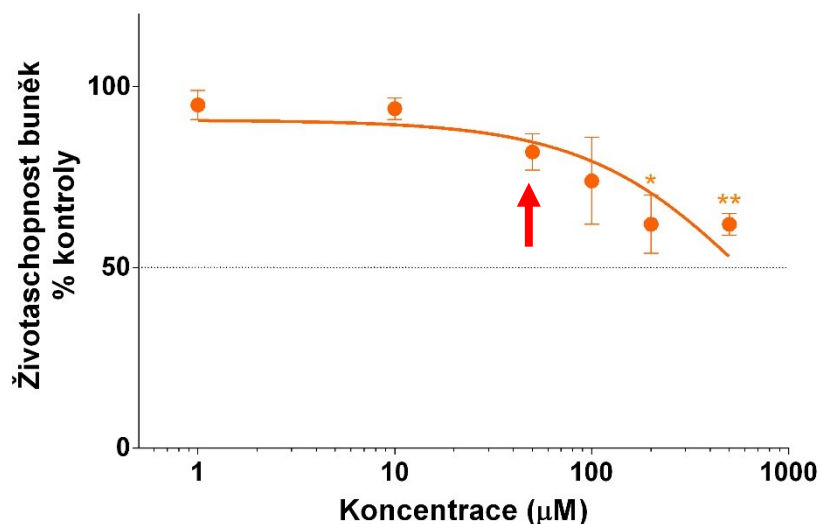
**Obr. 18** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6693. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



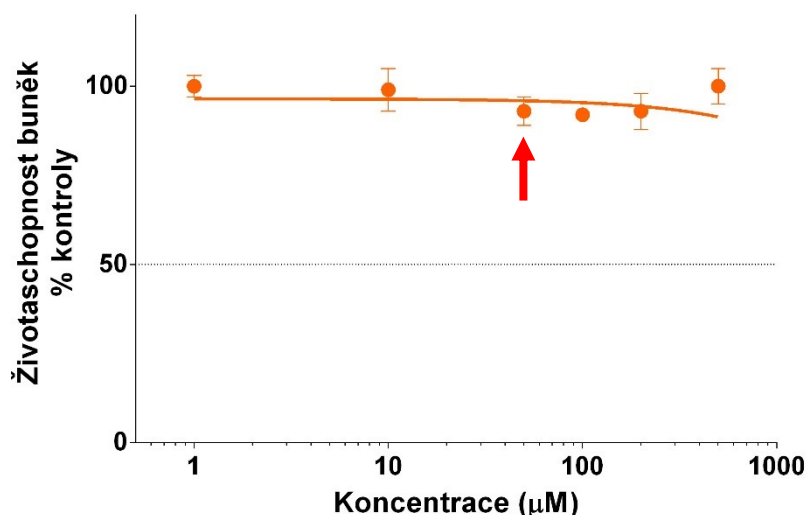
**Obr. 19** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6693. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

### 5.3 Látka 6694

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila statisticky významnou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrace 50  $\mu\text{M}$  vytváří krystalky. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 24 a 25).



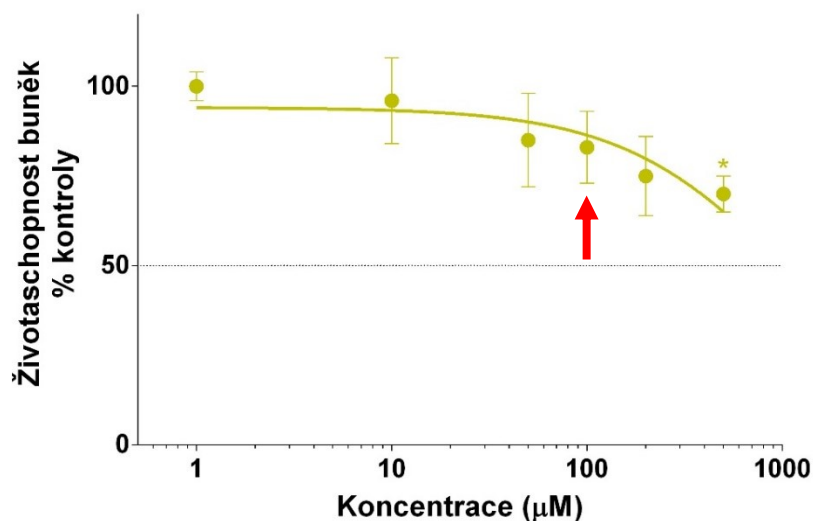
**Obr. 20** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T 6694. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



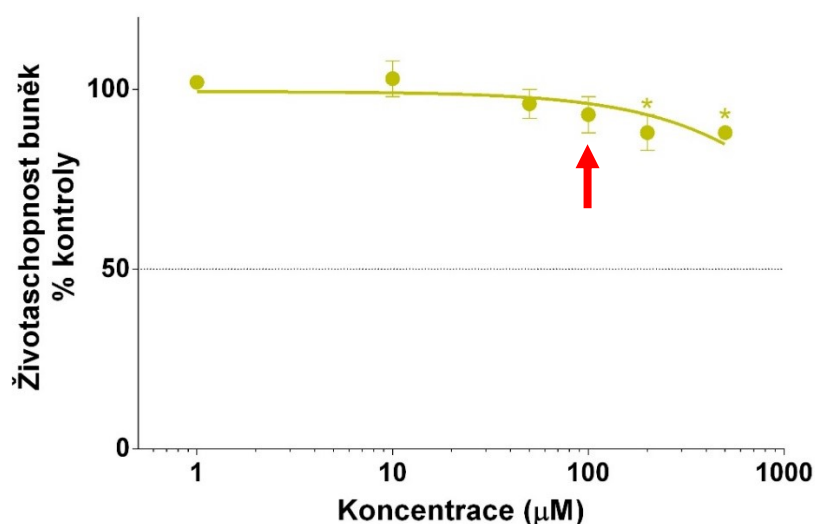
**Obr. 21** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6694. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

## 5.4 Látka 6722

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrace 100 $\mu\text{M}$  vytváří krystalky. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 26 a 27).



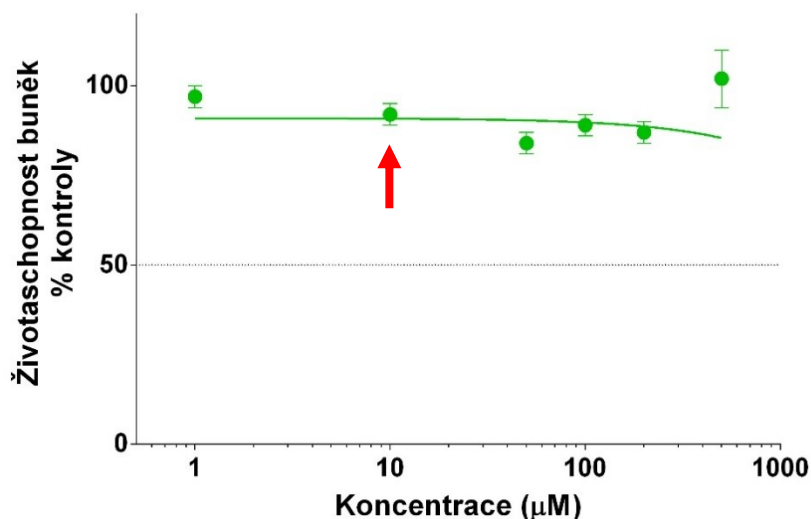
**Obr. 22** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T 6722. Opakování  $n=4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  a \*\*\* $p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kulturačním médiu.



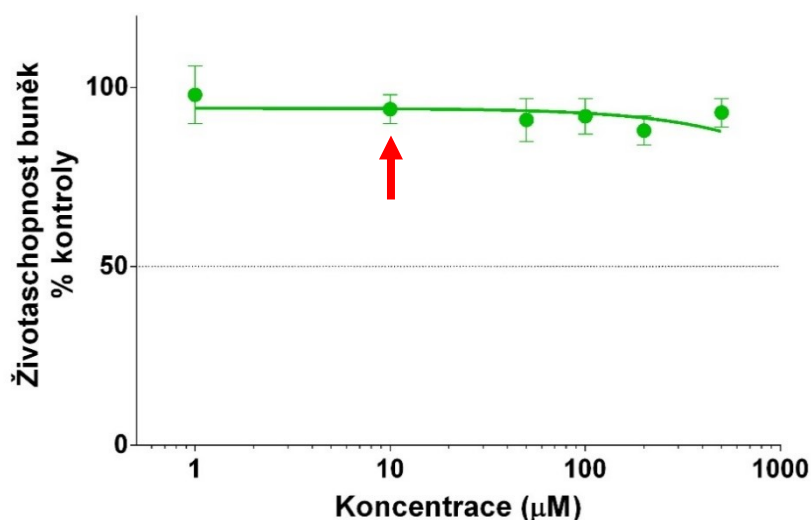
**Obr. 23** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T 6722. Opakování  $n=4$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  a \*\*\* $p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kulturačním médiu.

## 5.5 Látka 6725

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila svou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodném prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a v koncentracích od 10 do 50  $\mu\text{M}$  začíná precipitovat. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 28 a 29).



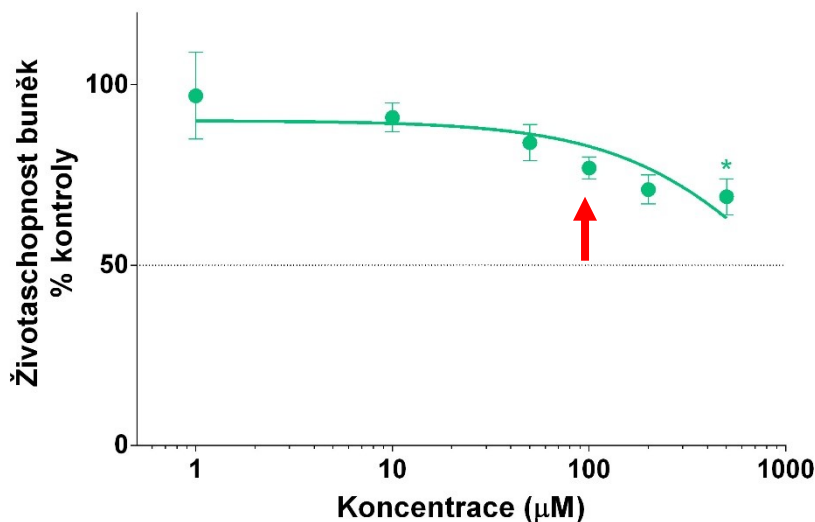
**Obr. 24** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vylučování NR po třídenní inkubaci s hodnotenou látkou T6725. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



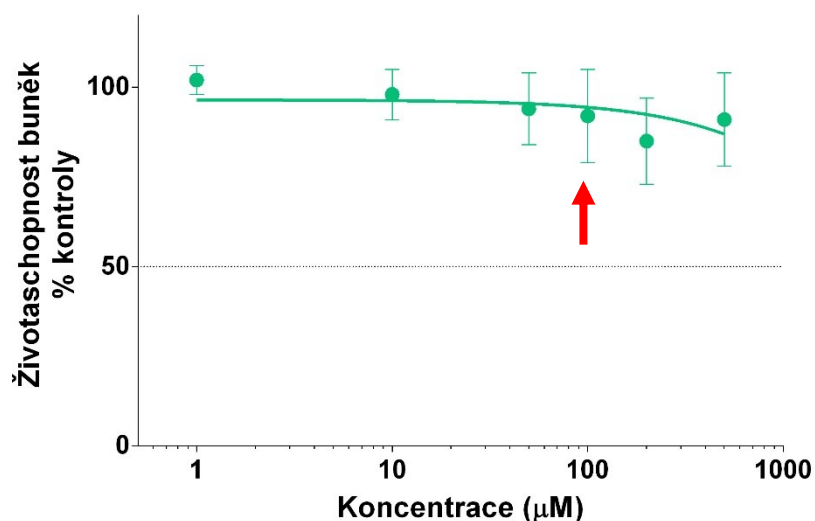
**Obr. 25** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vylučování NR po třídenní inkubaci s hodnotenou látkou T6725. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

## 5.6 Látka 6733

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila svou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodném prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a precipituje již v koncentracích od 100 do 200  $\mu\text{M}$ . Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 30 a 31).



**Obr. 26** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnotenou látkou T6733. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

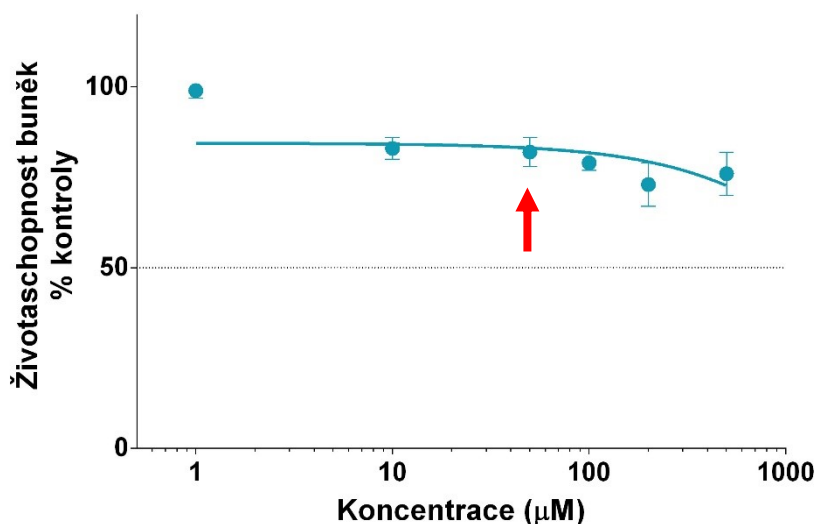


**Obr. 27** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnotenou látkou T6733. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

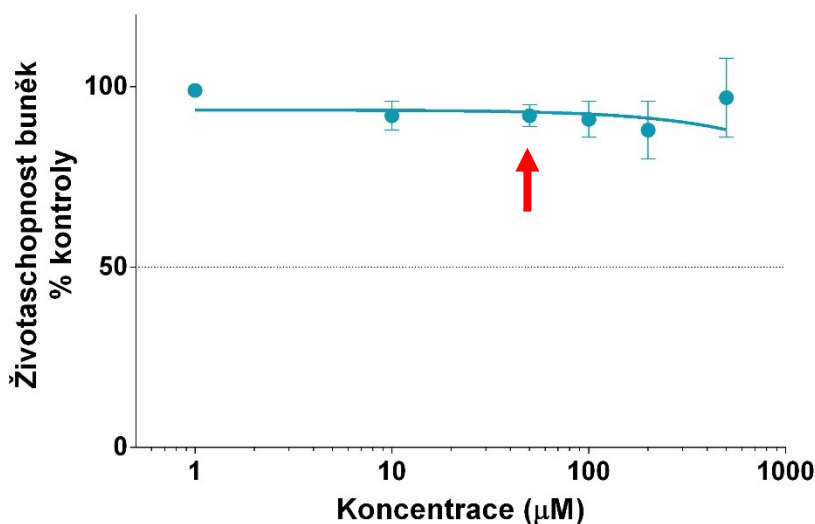


## 5.7 Látka 6734

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila svou toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrace 50  $\mu\text{M}$  vytváří krystalky. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 32 a 33).



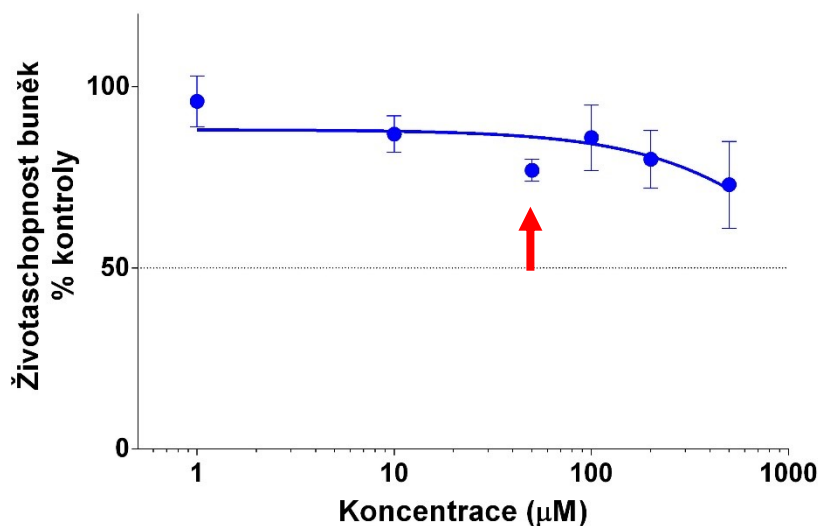
**Obr. 28** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6734. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



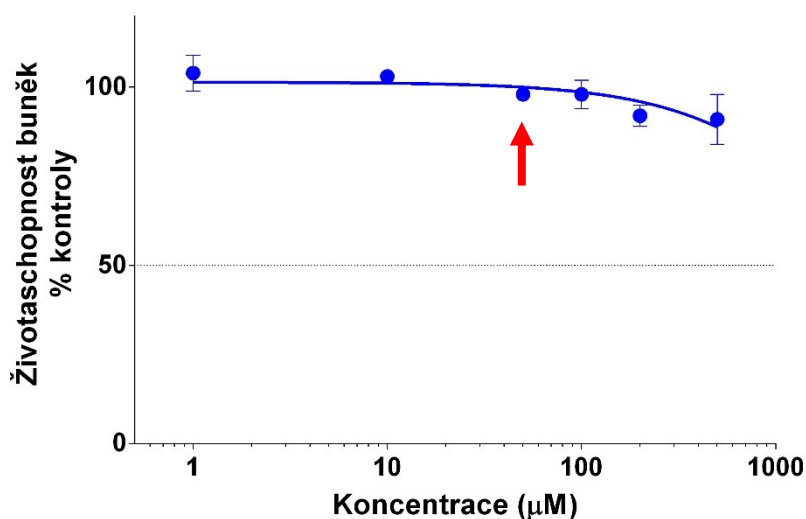
**Obr. 29** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6734. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

## 5.8 Látka 6735

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila toxicitu až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrace 50/100  $\mu\text{M}$  vytváří krystaly. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 34 a 35).



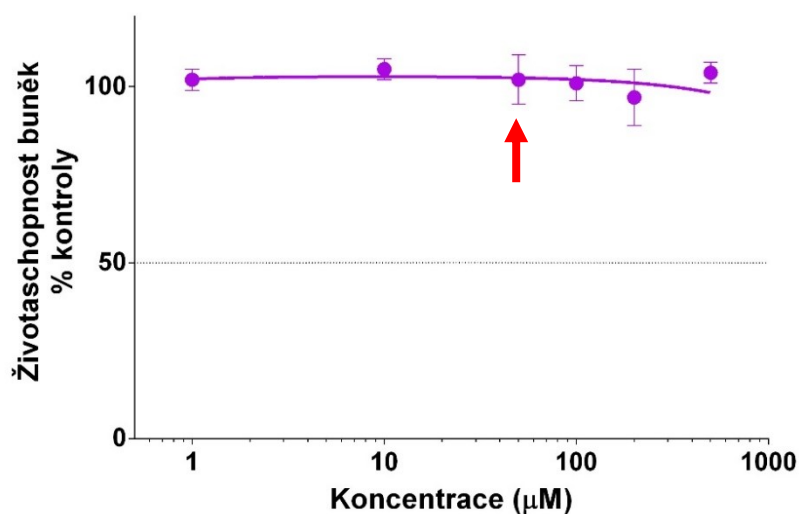
**Obr. 30** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6735. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.



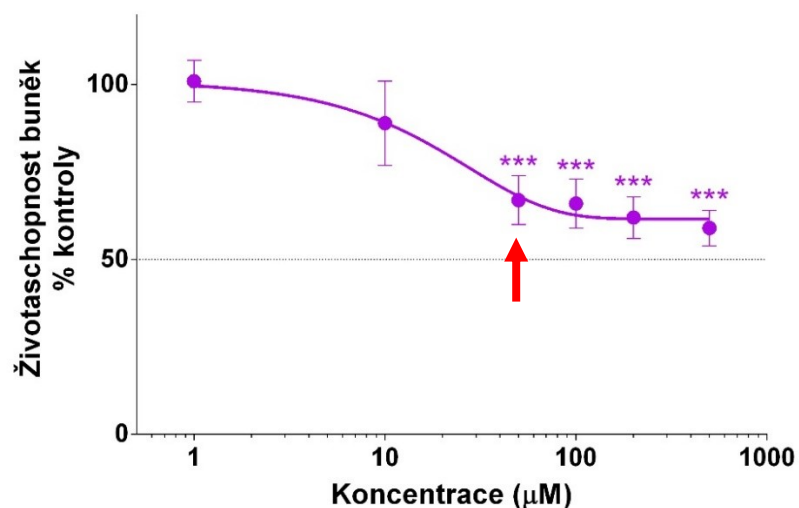
**Obr. 31** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6735. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kultivačním médiu.

## 5.9 Látka 6797

Testované koncentrace byly zvoleny v rozsahu 1-500  $\mu\text{M}$ . Látka neprojevila svou toxicitu u buněčné linie 3T3 až do jejího limitu rozpustnosti ve vodním prostředí, ale u buněčné linie HaCaT došlo ke značnému poklesu viability buněk. Díky mikroskopickým kontrolám v průběhu hodnocení viability buněk bylo zjištěno, že látka je ve vyšších koncentracích nerozpustná a od koncentrace 50  $\mu\text{M}$  vytváří krystalky. Výsledky hodnocení cytotoxicity jsou zobrazeny níže v grafech (Obr. 36 a 37).



**Obr. 32** Grafické znázornění životaschopnosti buněk 3T3 testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6797. Opakování  $n=4$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kulturačním médiu.

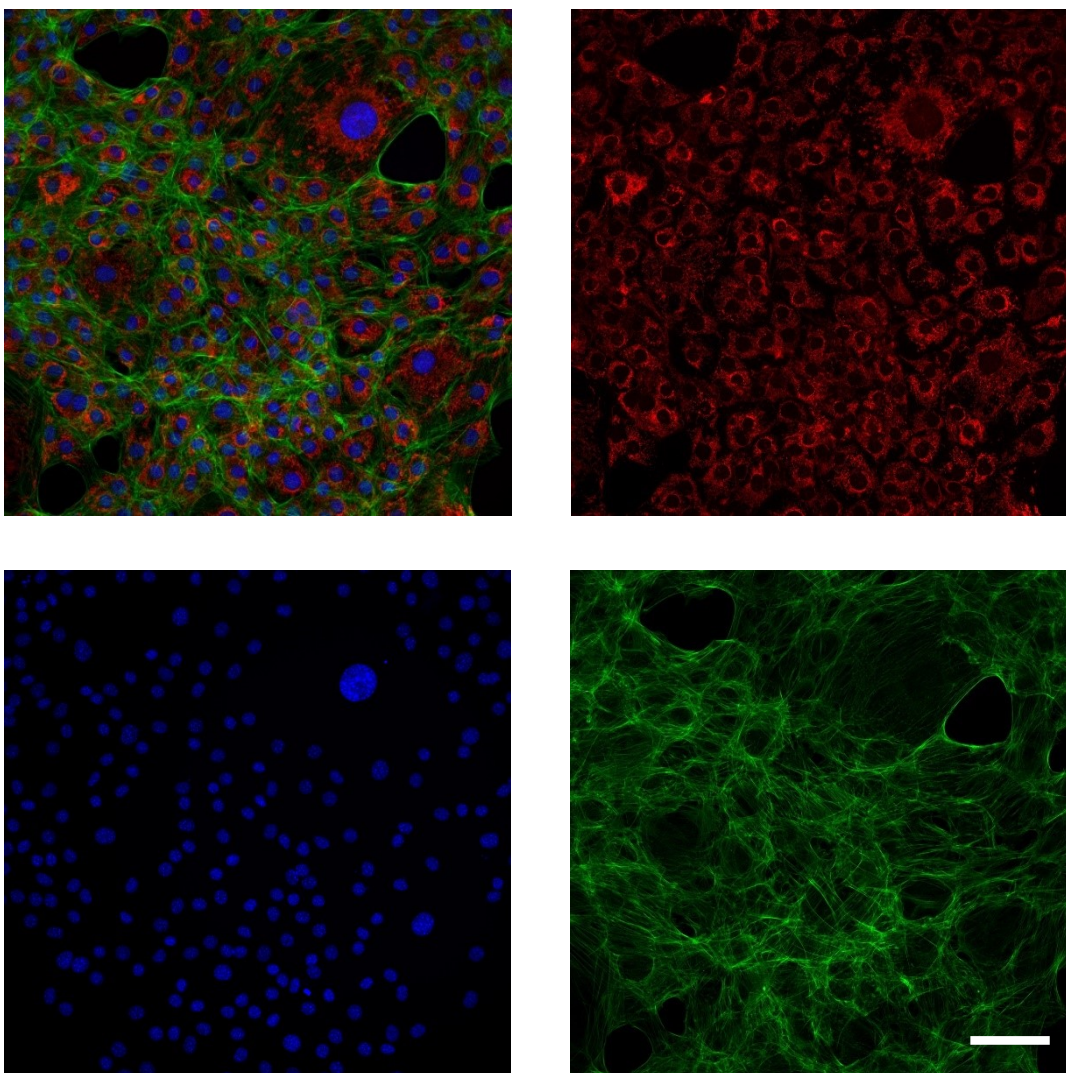


**Obr. 33** Grafické znázornění životaschopnosti buněk HaCaT testovaných na vychytávání NR po třídenní inkubaci s hodnocenou látkou T6797. Opakování  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  a  $***p < 0.001$ . Červená šipka označuje koncentraci, od které byl překročen limit rozpustnosti v kulturačním médiu.

## 5.10 Výsledky fotografické dokumentace

Z předchozích cytotoxicitních experimentů bylo zjištěno, že látky nebyly ve většině případů toxické až do jejich limitu rozpustnosti v kulturačním médiu. Z tohoto zjištění jsme vyvodili použité koncentrace, ve kterých látky byly ještě rozpustné a nevytvářely krystalky. Díky pořízeným snímkům jsme se mohli potvrdit předešle získané výsledky.

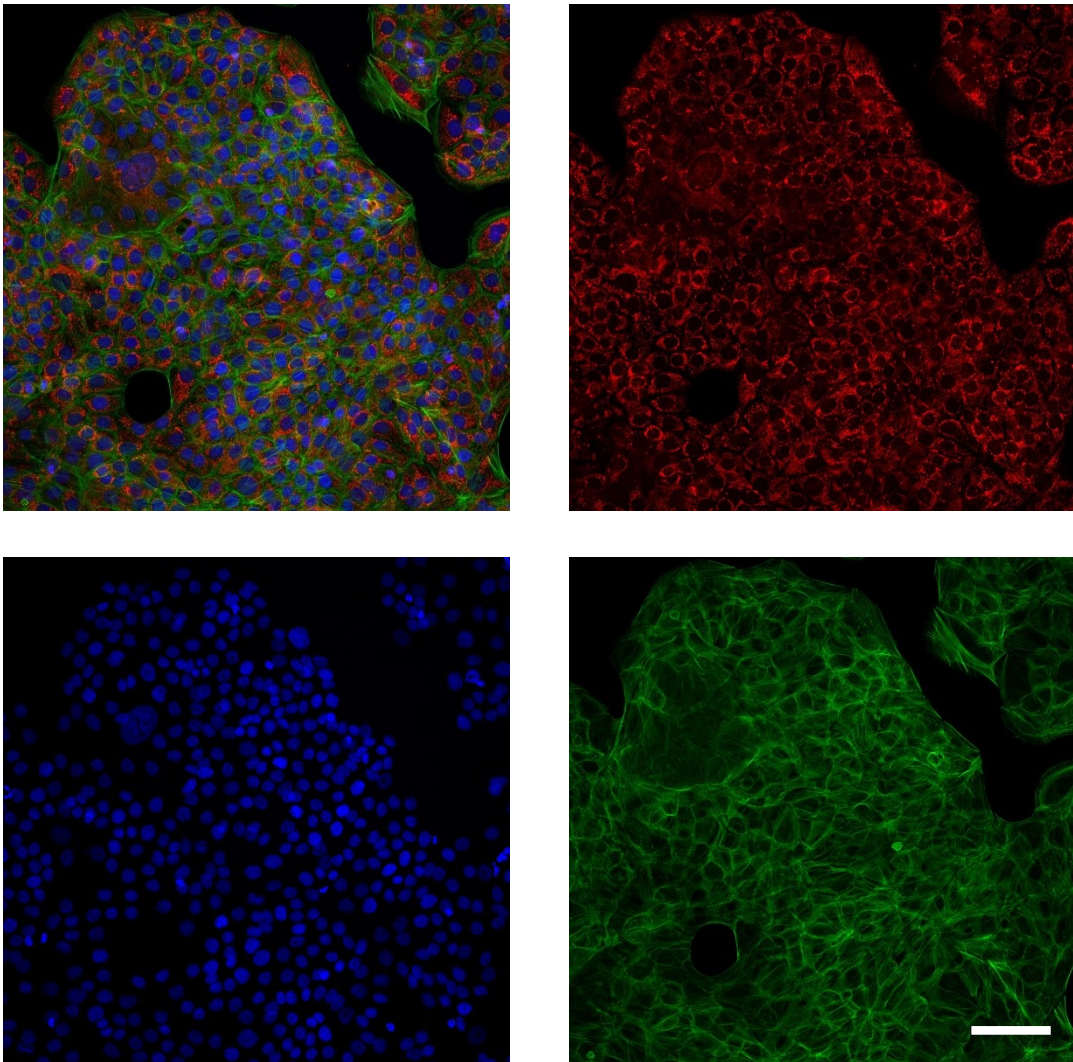
### 5.10.1 Kontrolní vzorek 3T3



**Obr. 34** Výsledné snímky 3T3 buněk kontrolního vzorku po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Měřítka odpovídá 100  $\mu\text{m}$ .

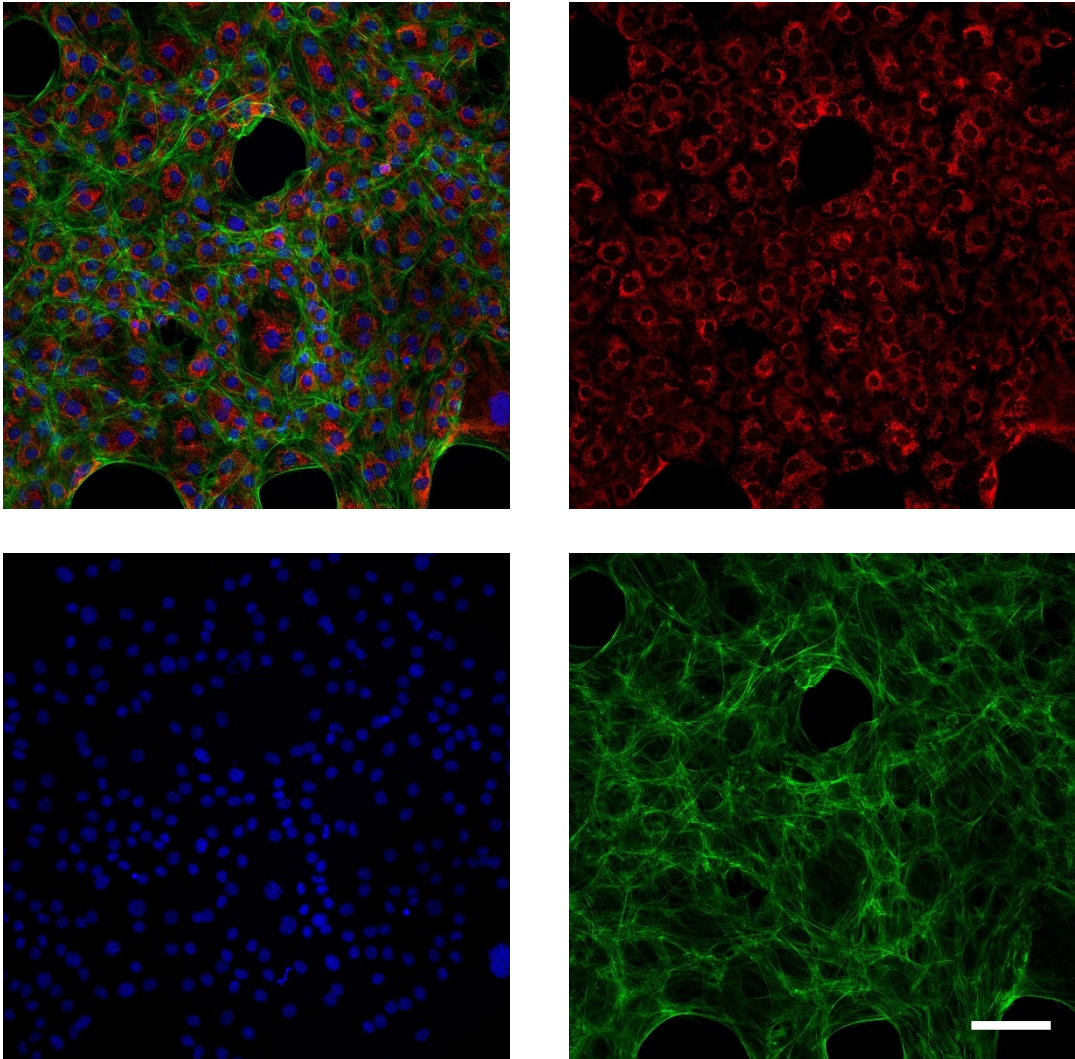


### 5.10.2 Kontrolní vzorek HaCaT



**Obr. 35** Výsledné snímky HaCaT buněk kontrolního vzorku po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořizený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Měřítko odpovídá 100  $\mu\text{m}$ .

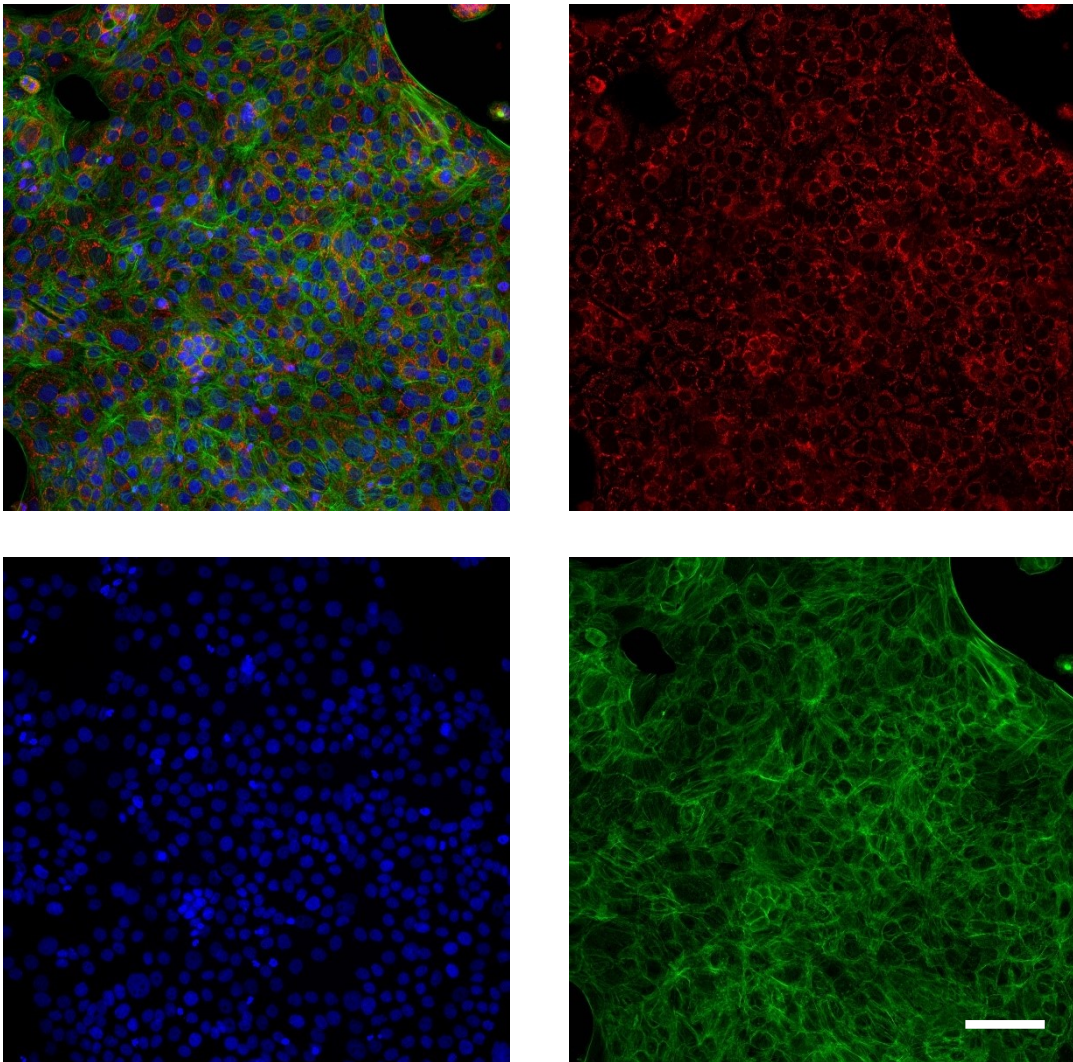
### 5.10.3 T6030 3T3



**Obr. 36** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6030 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítko odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

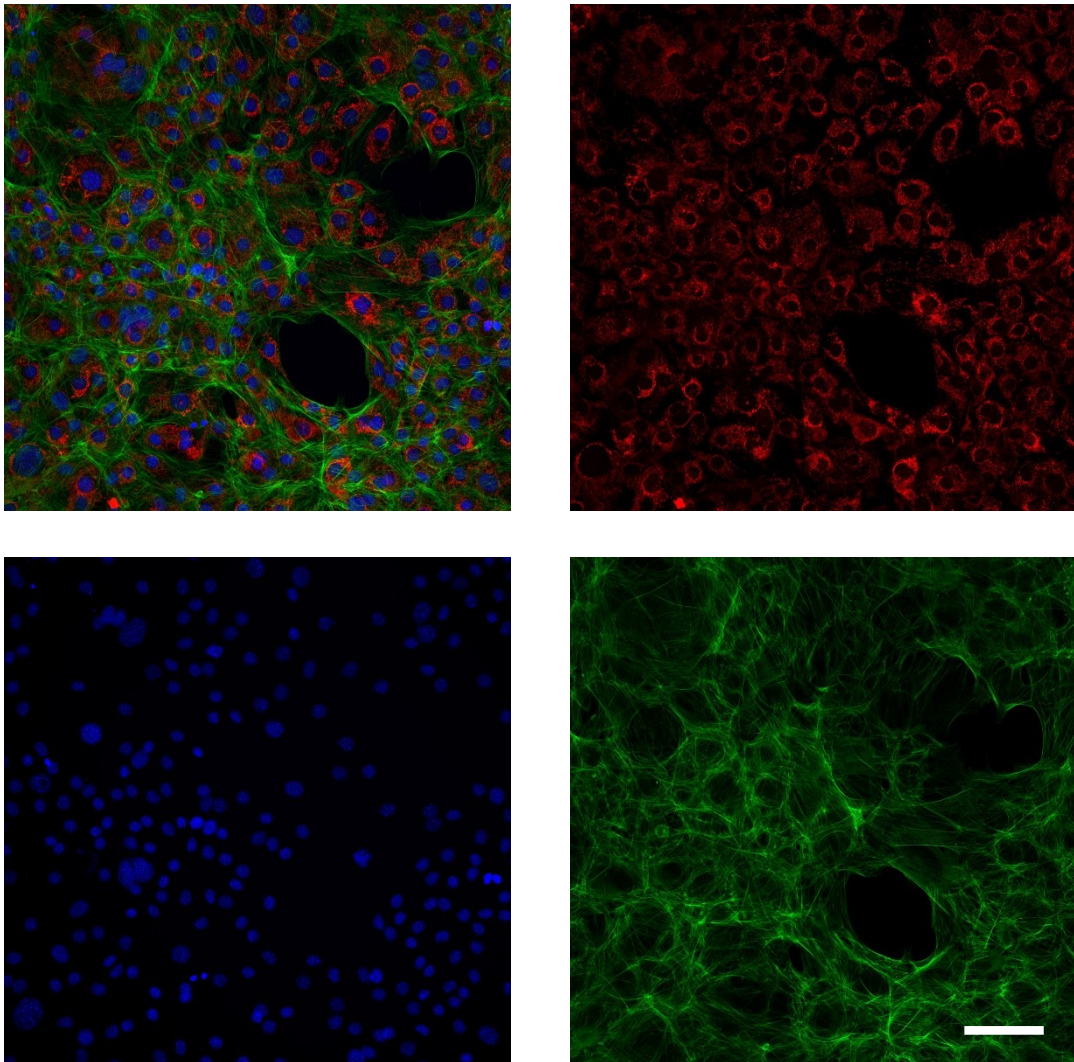


#### 5.10.4 T6030 HaCaT



**Obr. 37** Výsledné snímky HaCat buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6030 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky

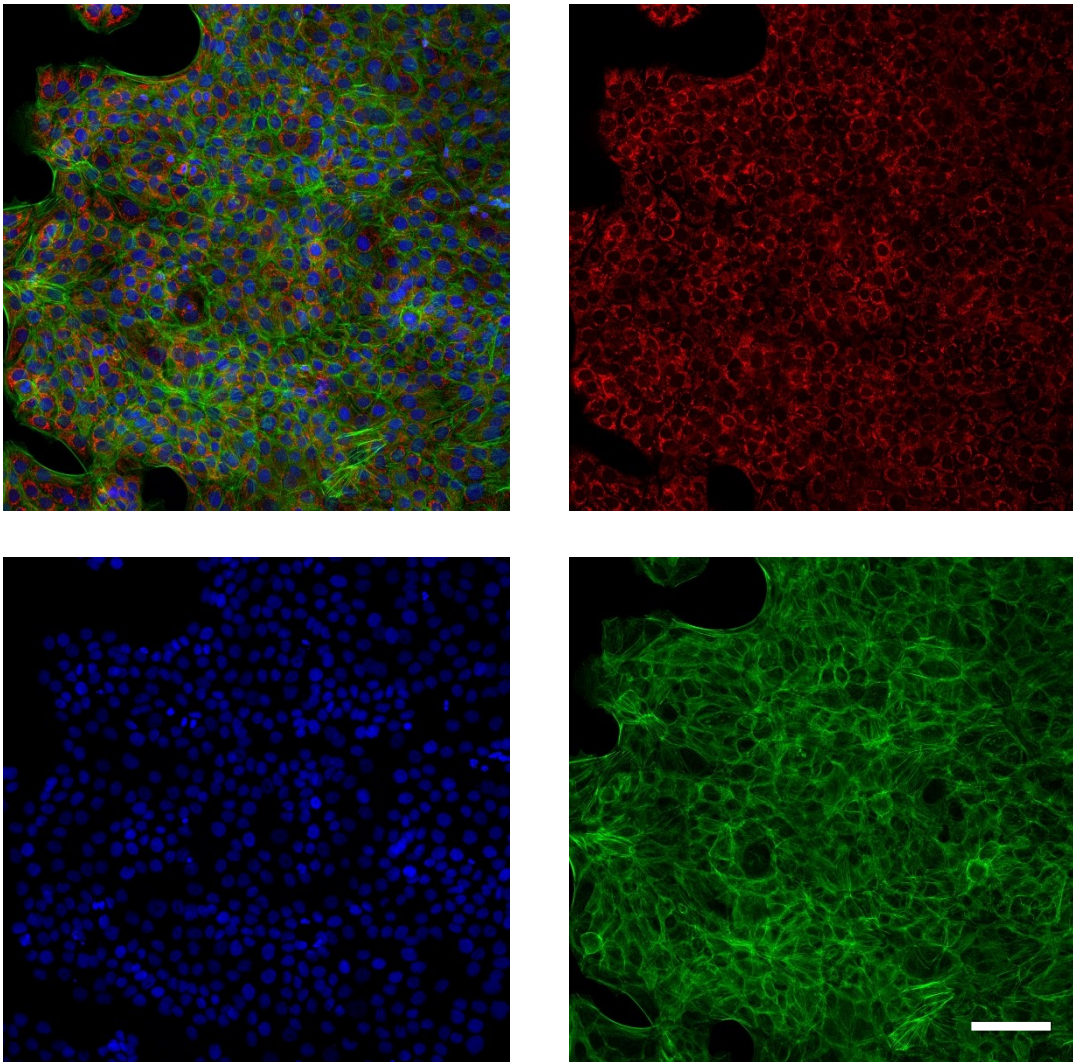
### 5.10.5 T6693 3T3



**Obr. 38** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6693 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky

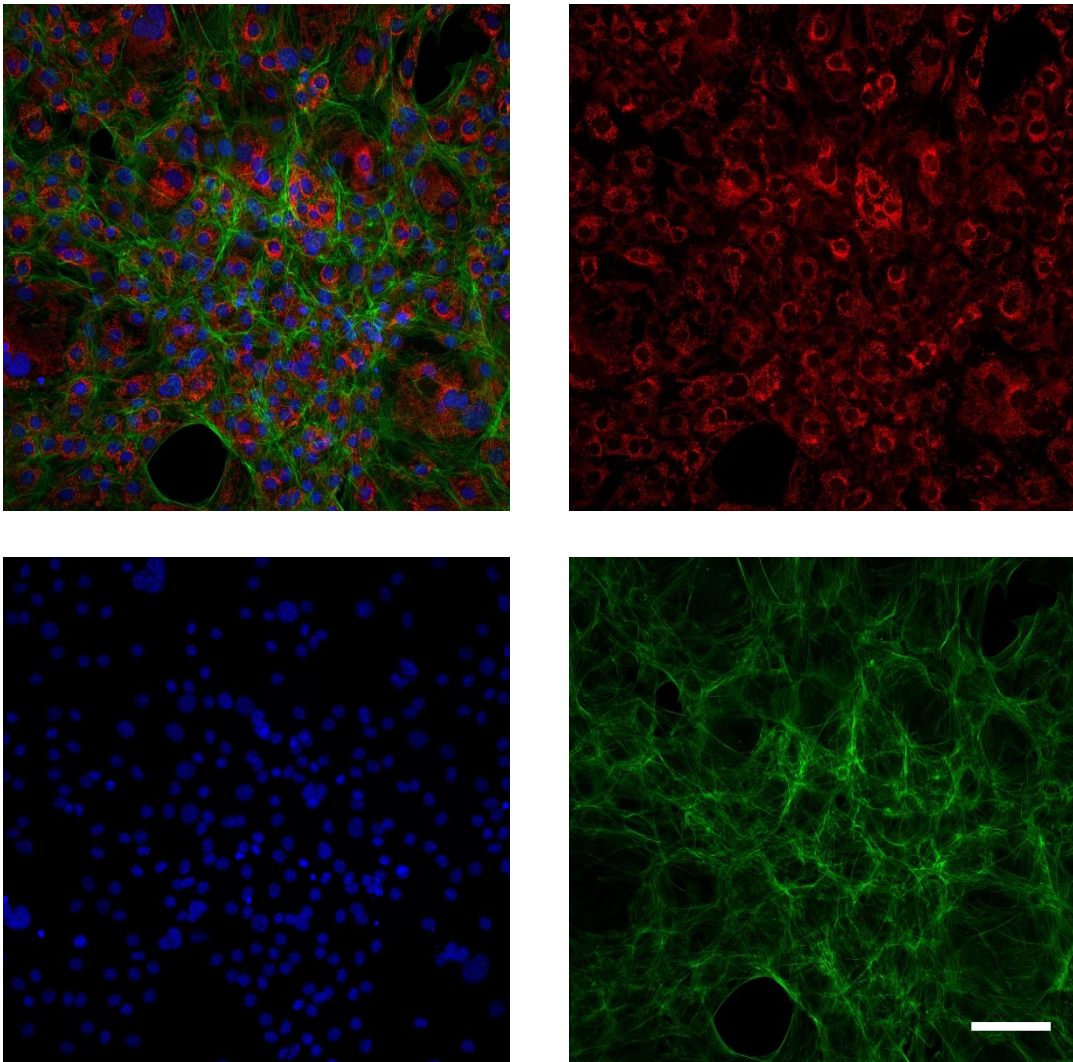


### 5.10.6 T6693 HaCaT



**Obr. 39** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6693 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

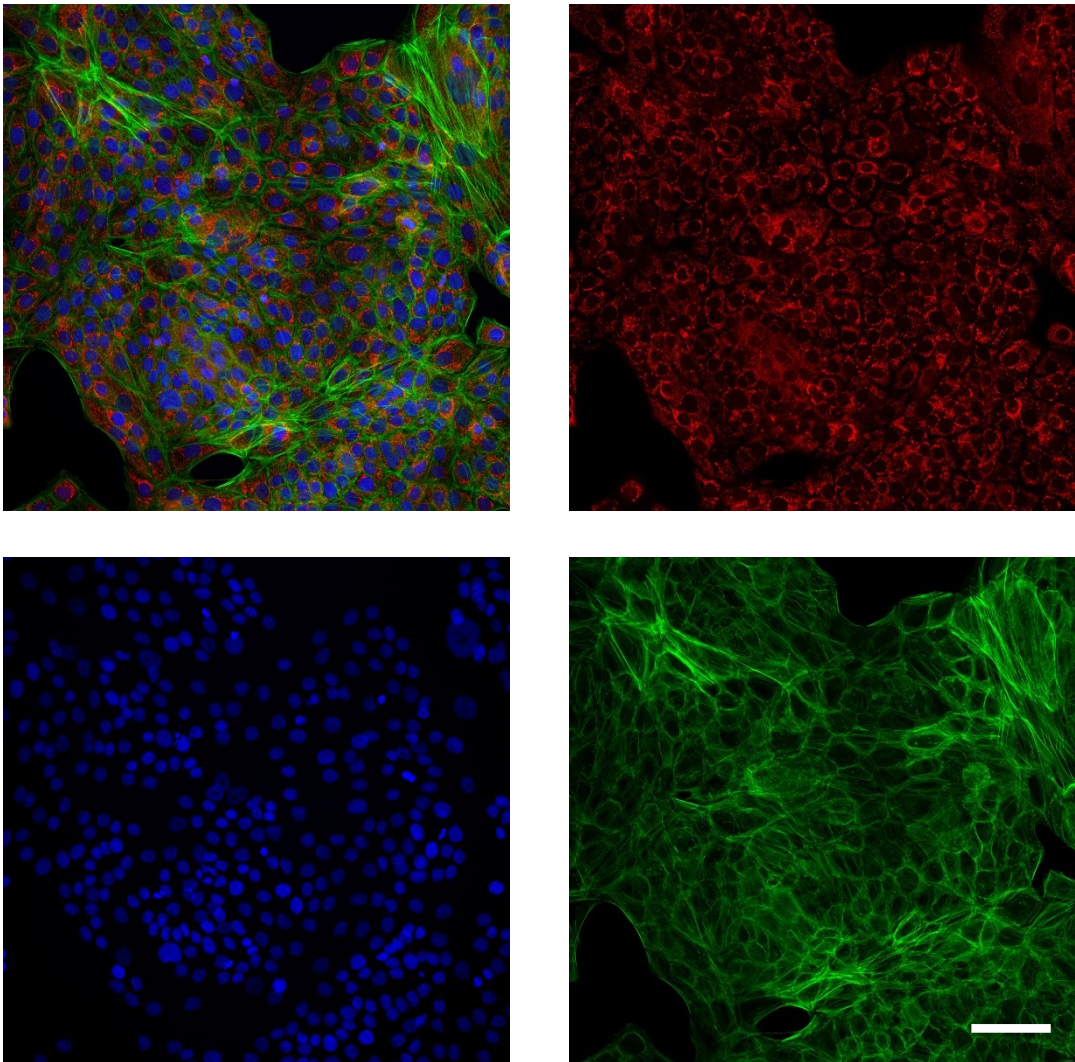
### 5.10.7 T6694 3T3



**Obr. 40** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6694 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

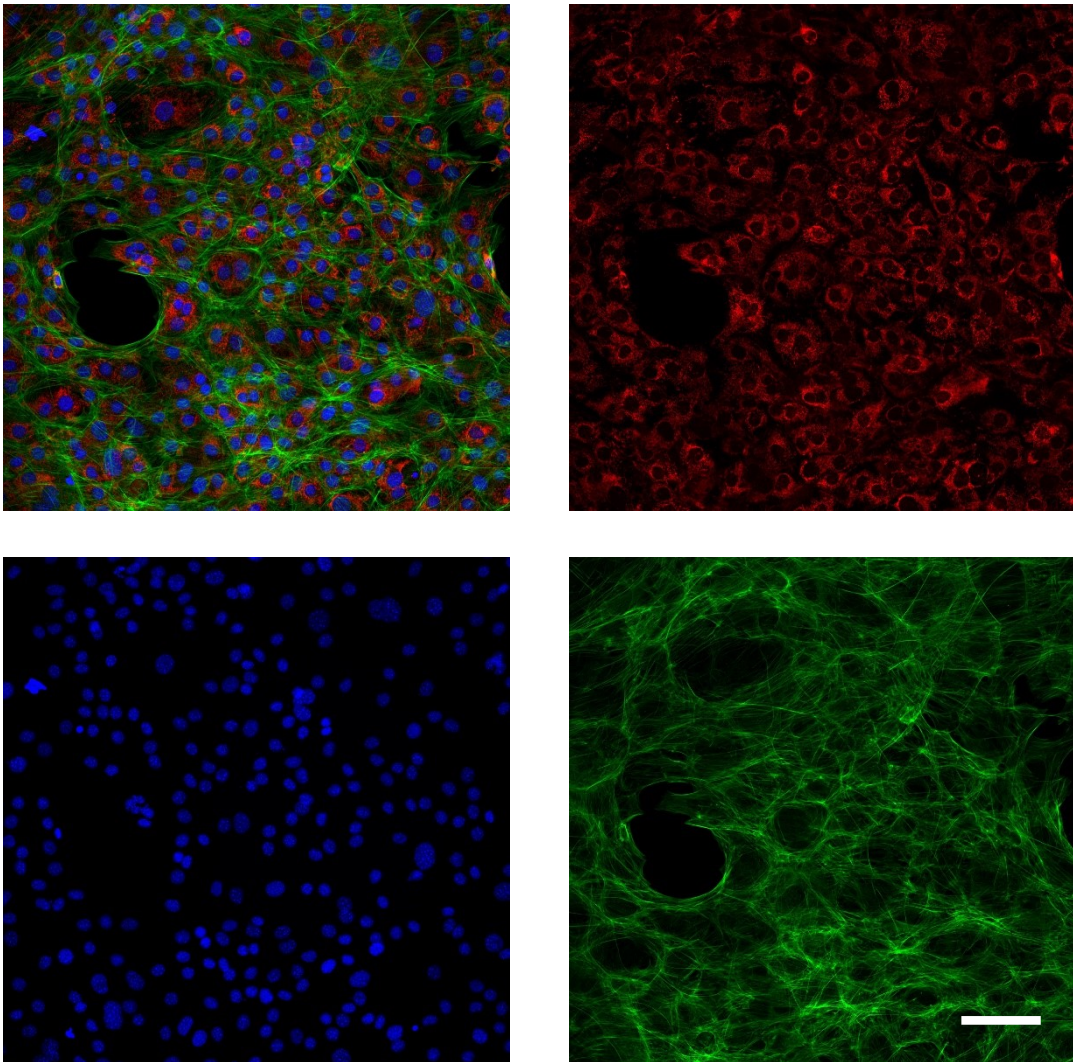


### 5.10.8 T6694 HaCaT



**Obr. 41** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6694 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

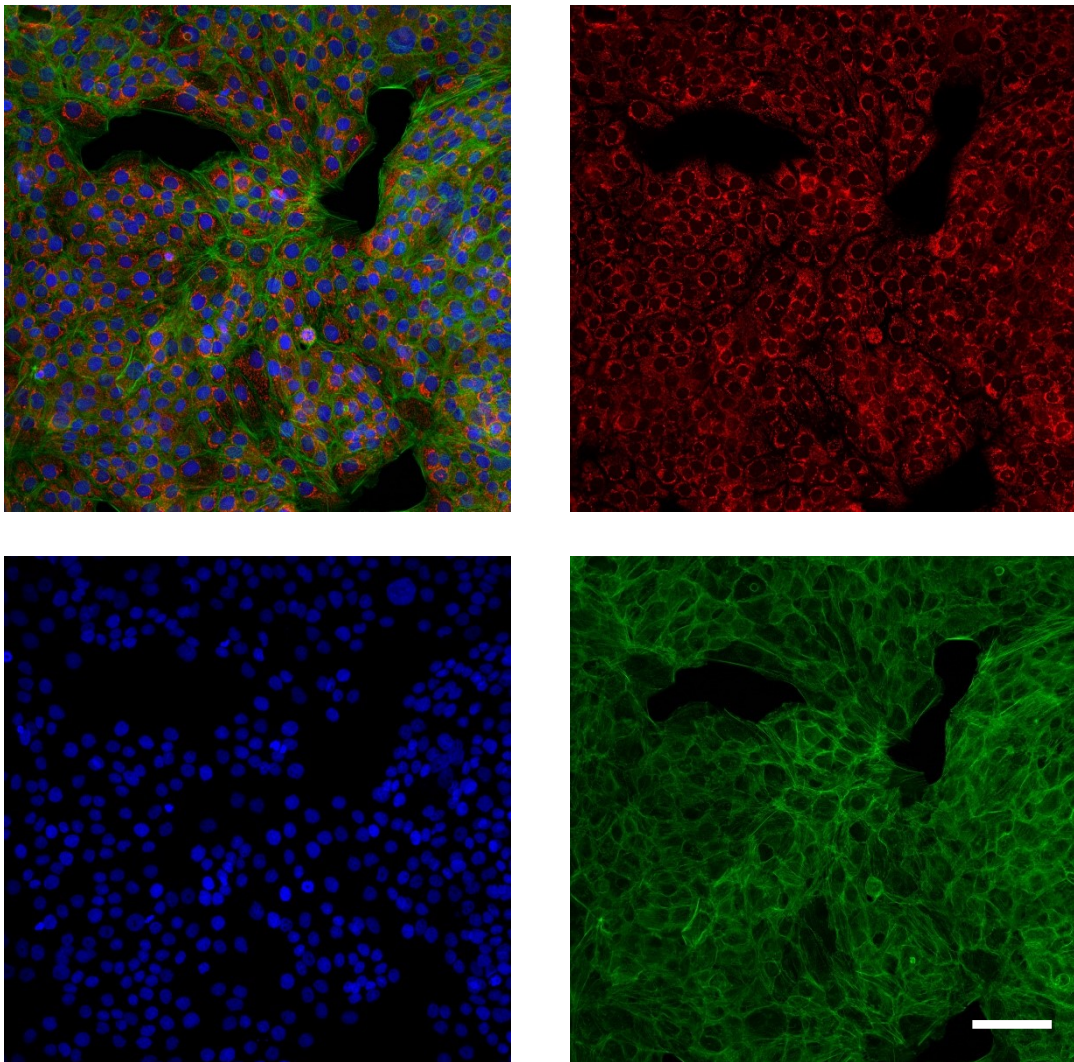
### 5.10.9 T6722 3T3



**Obr. 42** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6722 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

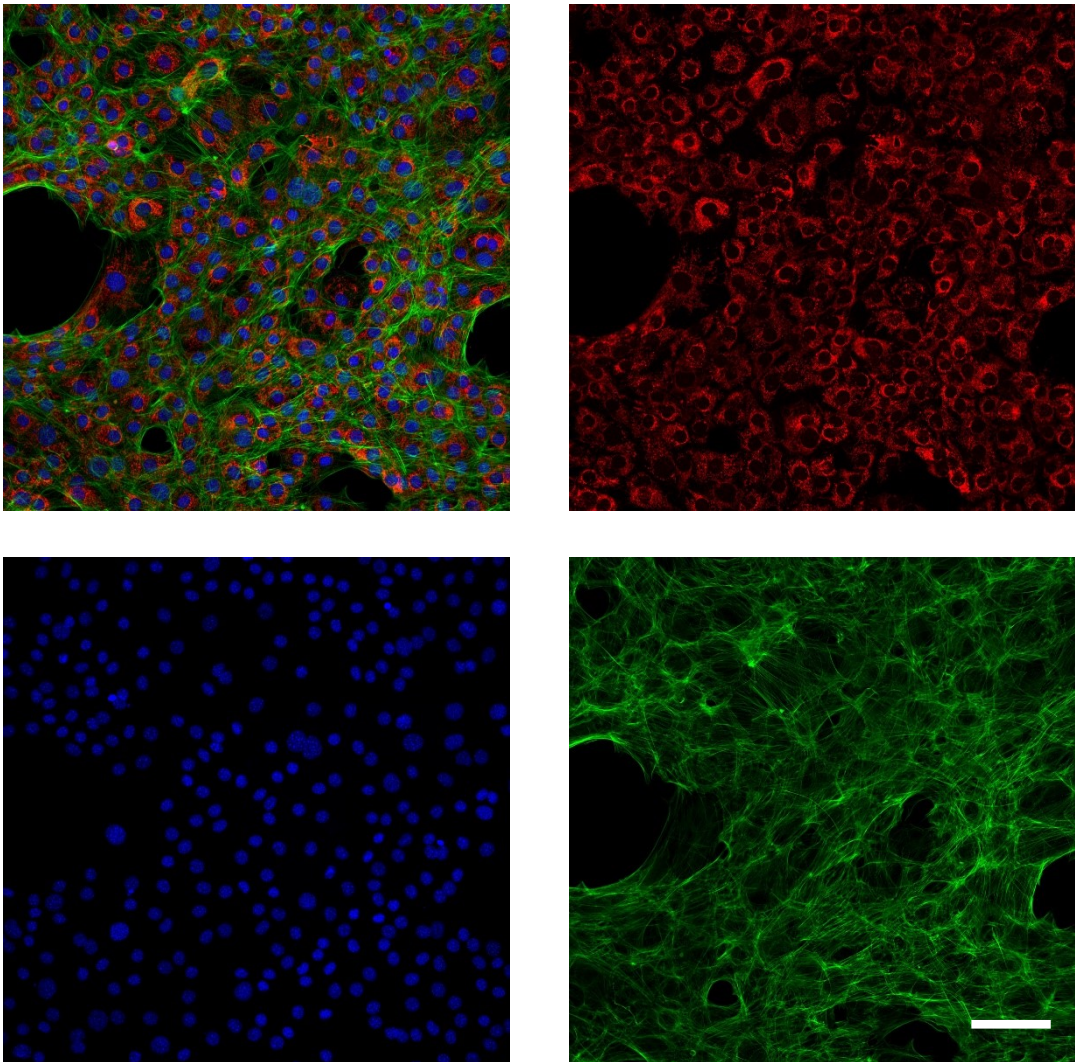


### 5.10.10 T6722 HaCaT



**Obr. 43** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6722 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

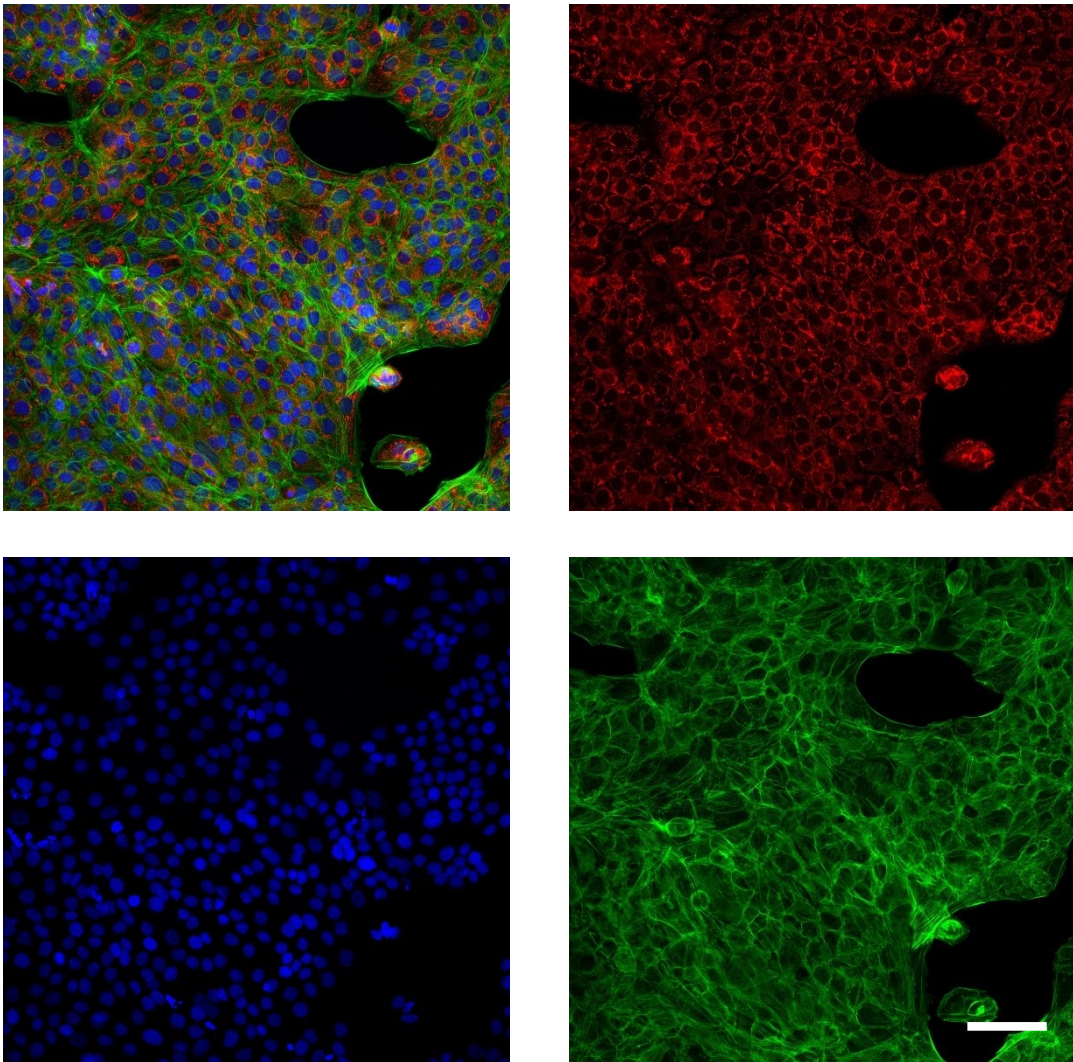
### 5.10.11 T6725 3T3



**Obr. 44** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6725 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

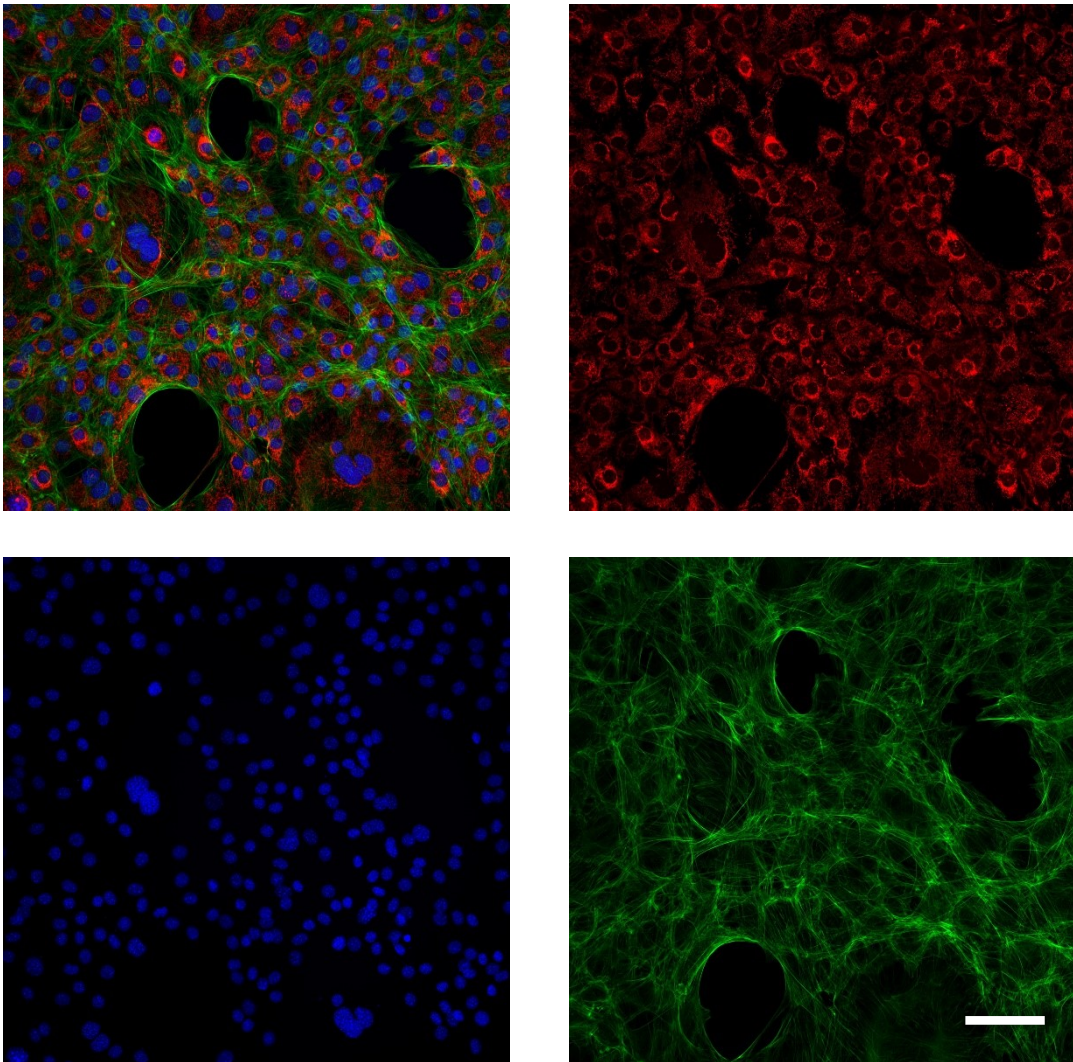


### 5.10.12 T6725 HaCaT



**Obr. 45** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6725 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

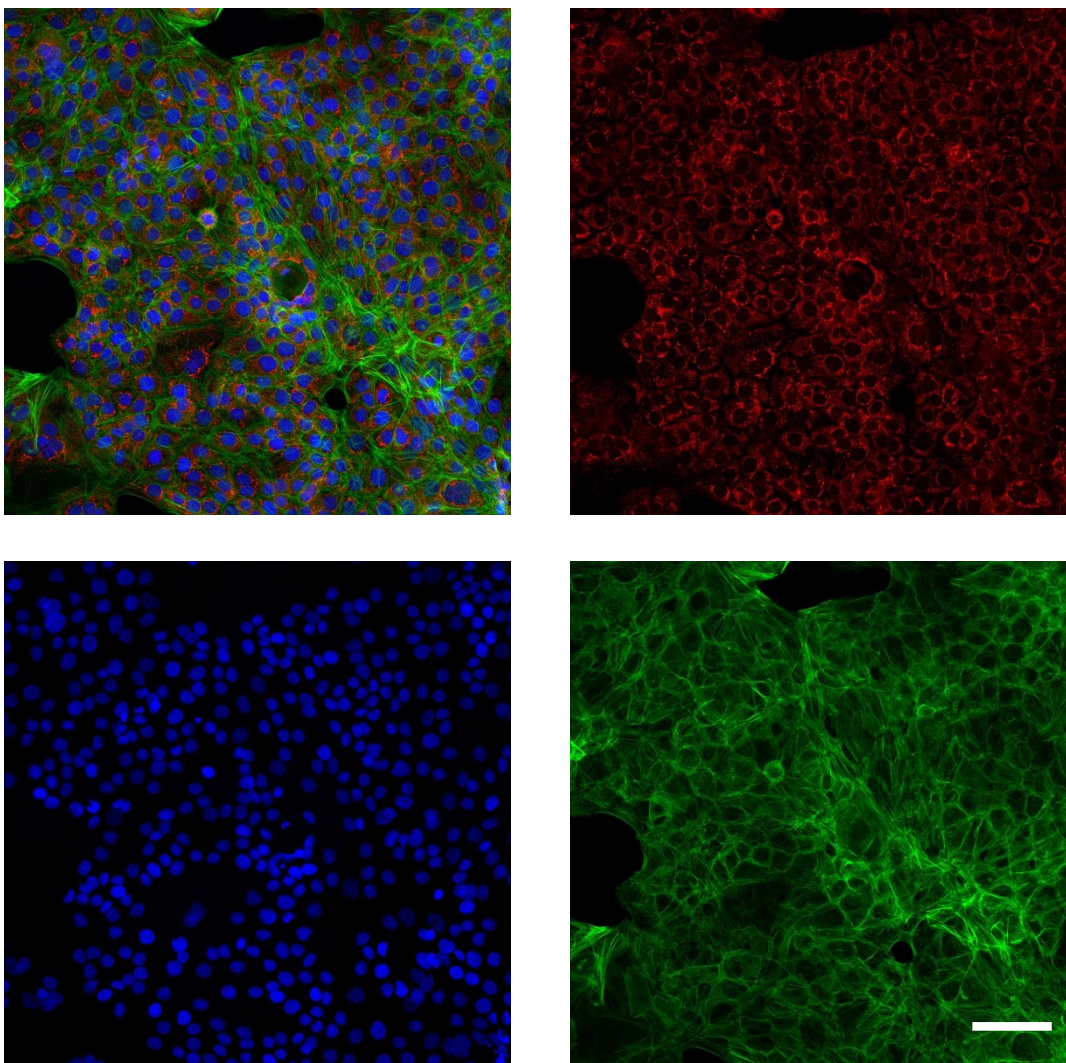
### 5.10.13 T6733 3T3



**Obr. 46** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6733 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

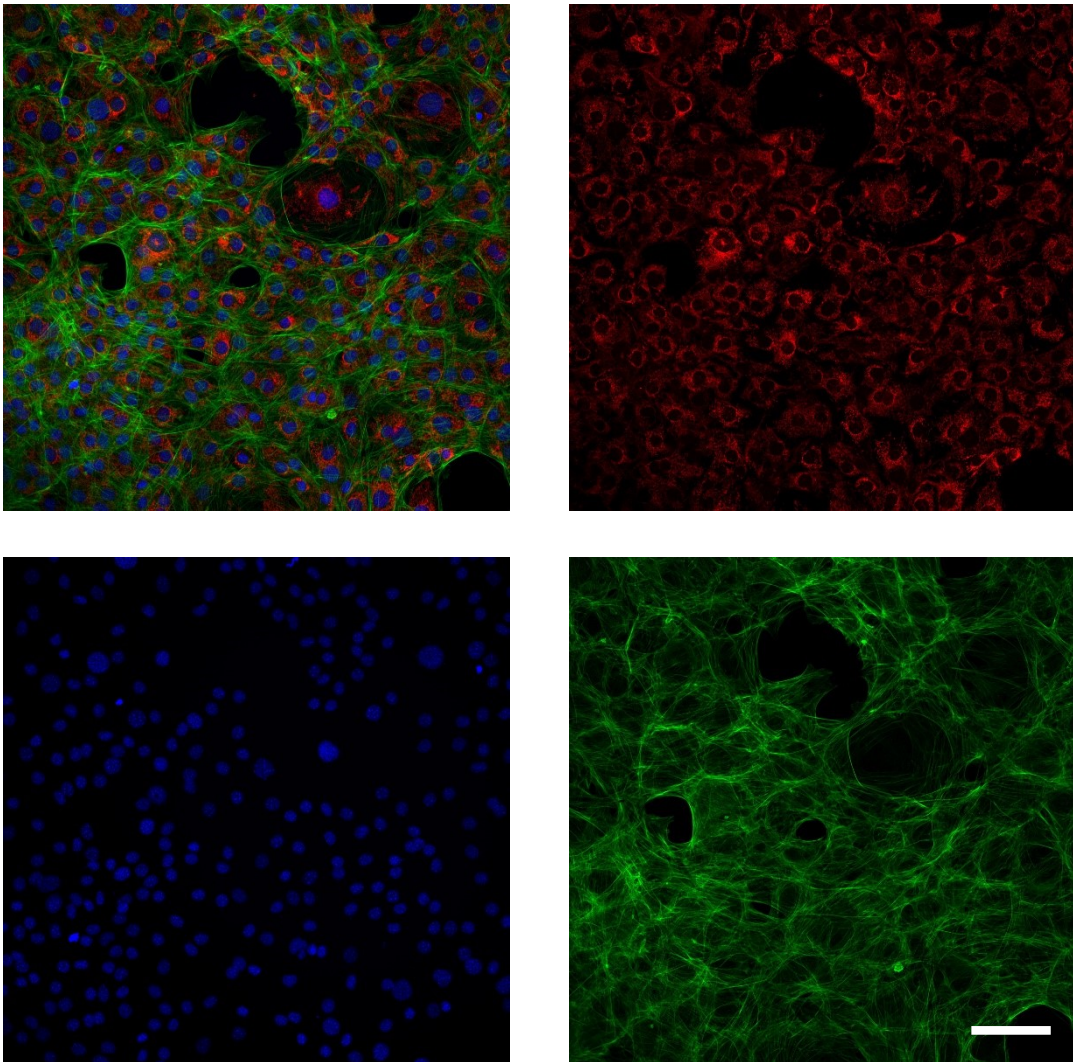


#### 5.10.14 T6733 HaCaT



**Obr. 47** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6733 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

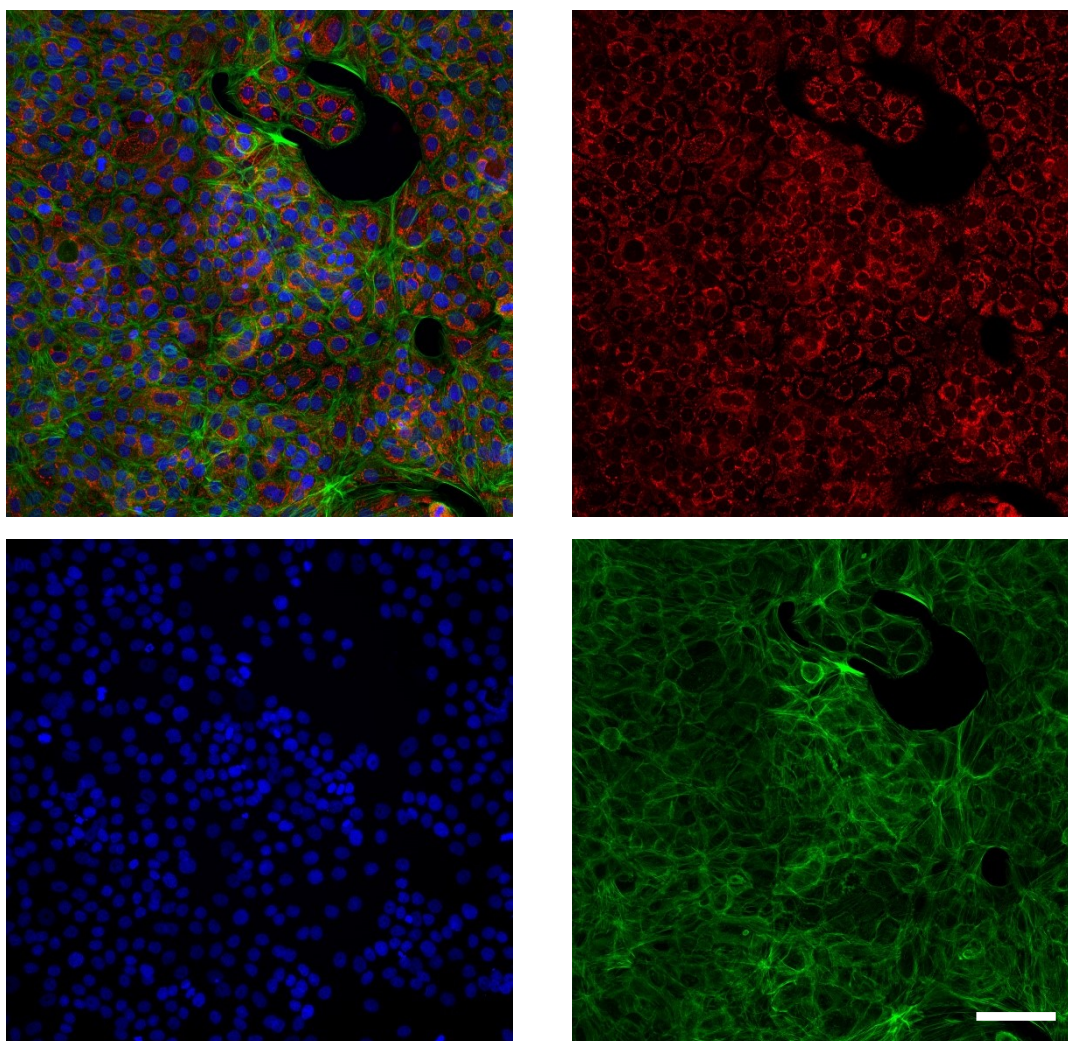
### 5.10.15 T6734 3T3



**Obr. 48** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6734 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

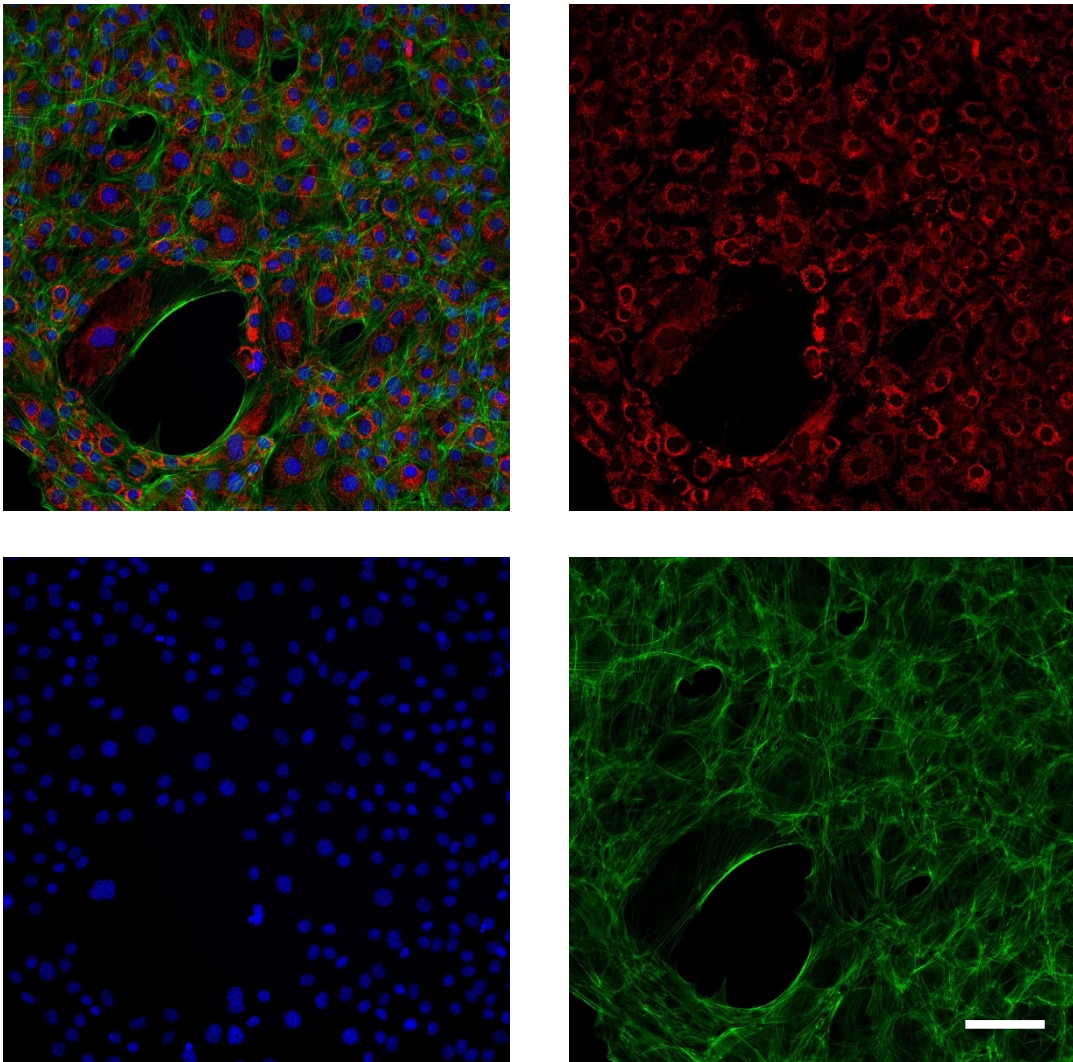


### 5.10.16 T6634 HaCaT



**Obr. 49** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6734 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

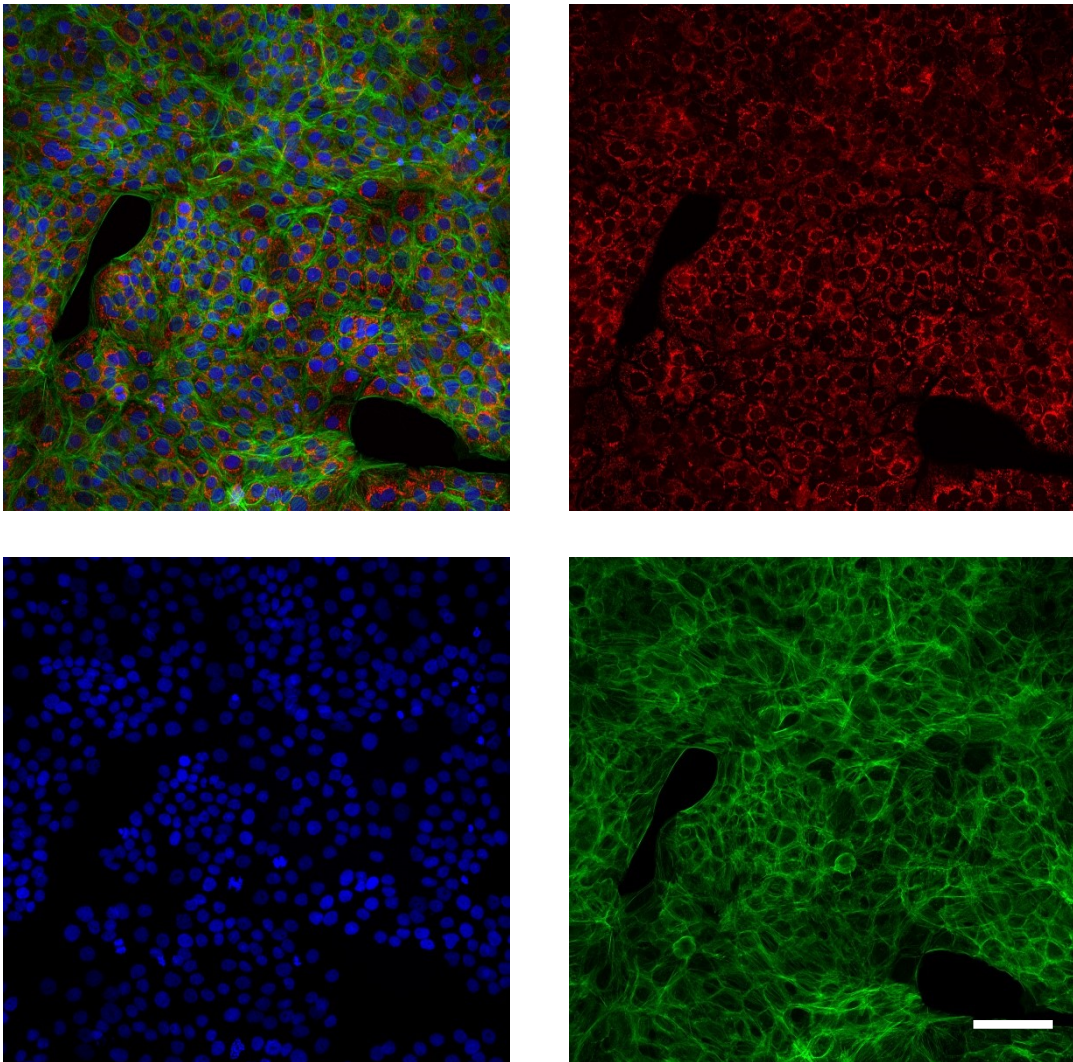
### 5.10.17 T6735 3T3



**Obr. 50** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6735 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

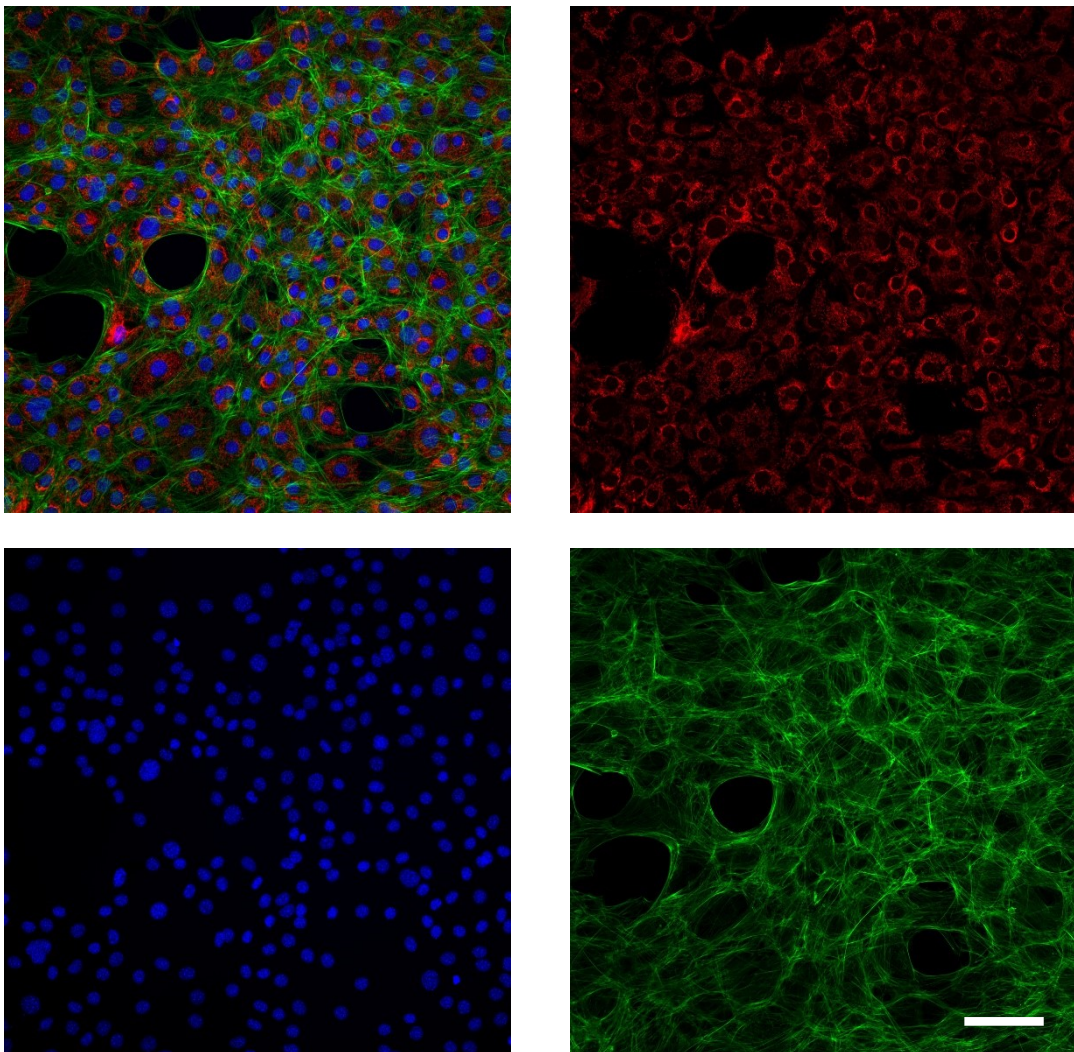


### 5.10.18 T6735 HaCaT



**Obr. 51** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6735 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-50 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

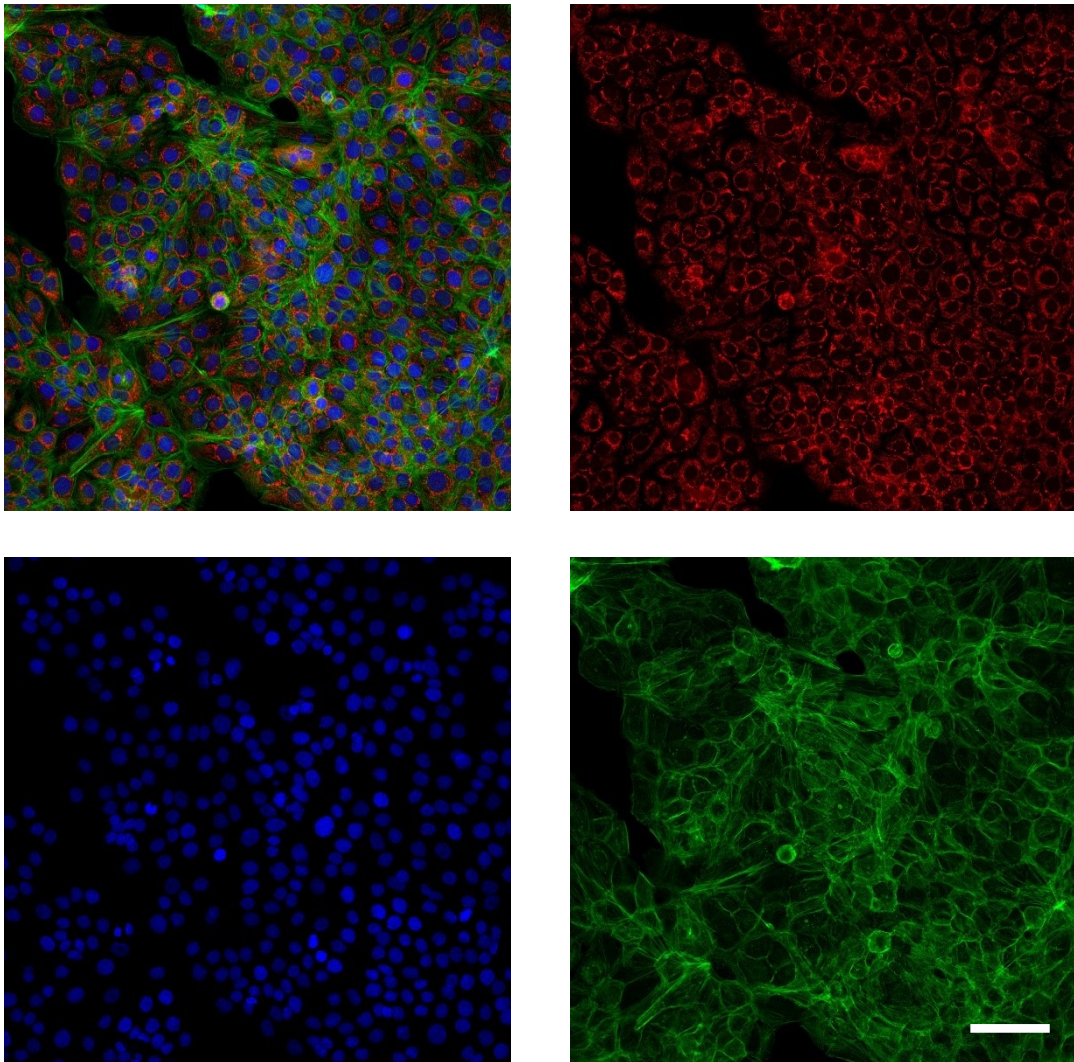
### 5.10.19 T6797 3T3



**Obr. 52** Výsledné snímky 3T3 buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6797 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.



### 5.10.20 T6797 HaCaT



**Obr. 53** Výsledné snímky HaCaT buněk pořízené po inkubaci s testovanou látkou T6797 a po obarvení speciálními fluorescenčními sondami. Vlevo nahoře se jedná o složený snímek po použití všech tří fluorescenčních filtrů pro Cy3, DAPI a FITC. Vpravo nahoře je jedná o snímek pořízený s Cy3 filtrem po obarvení mitochondrií fluorescenční sondou MitoTracker Red CMXRos. Vlevo dole na snímku můžeme vidět obarvená jádra buněk po použití fluorescenční sondy Hoechst 33342 s DAPI filtrem. Na posledním snímku vpravo dole jsou zaznamenána aktinová vlákna obarvená fluorescenční sondou ActinGreen 488 za použití FITC filtru. Použitá koncentrace látky-10 $\mu$ M. Měřítka odpovídá 100  $\mu$ m. Na žádném ze snímků nepozorujeme změny buněčných struktur. Fotografie tedy potvrzují netoxický účinek testované látky.

## 6. ZÁVĚRY

Potenciální antituberkulotika T6030, T6693, T6694, T6722, T6725, T6733, T6734, T6735 a T6797 byly testovány *in vitro* a v námi zvolených experimentálních podmínkách neprojevily ve většině případů cytotoxický účinek až do jejich limitů rozpustnosti ve vodním prostředí. Ve vyšších koncentracích látky precipitovaly ve formě krystalů. Krystalizace se objevovala u koncentrací 10-200  $\mu\text{M}$  v závislosti na dané látce.

Zhotovená fotografická dokumentace, u které byly použity fluorescenční sondy a následně byly fotografie byly pořízeny díky konfokálnímu mikroskopu, neprokázaly žádné změny buněčných struktur, jelikož byly použity nižší koncentrace, při nichž látky ještě nekystalizovaly, a to potvrdilo získané výsledky, že látky neprokázaly žádnou toxicitu až do limitu rozpustnosti ve vodním prostředí.

Některé látky (T6030, T6694, T6722 a T6733) projevily statisticky významné snížení životaschopnosti u vyšších koncentrací přesahující limit rozpustnosti v kultivačním médiu u buněčné linie 3T3. Látka T6693 zde také projevila toxicitu, ale díky vysoké variabilitě u koncentrací přesahující limit rozpustnosti nebyl tento pokles statisticky významný. Naproti tomu u buněčné linie HaCaT se toxické působení látek ve většině případů neprojevilo. Výjimkou byla látka T6797, kde došlo k významnému poklesu viability u koncentrací, kdy látka precipitovala v roztoku. Žádný z uvedených poklesů životaschopnosti však nedosáhl hodnoty  $\text{IC}_{50}$ .

Stanovit typ buněčné smrti nebylo bohužel z technických důvodů možné, a to díky dlouhodobé závadě a nefunkčnosti průtokového cytometru.



## 7. DISKUZE

Díky velkému počtu osob nakažených TB a vzhledem k alarmujícímu nárůstu případů na léky rezistentní TB, zejména MDR-TB je potřeba stále vyvíjet nové látky, které by pomohly rozvoj TB kontrolovat a zastavit její šíření.

Tato práce se věnuje *in vitro* hodnocení cytotoxicity potenciálních AT ze skupiny aromatických nitrolátek. V této práci se jednalo o substituované oxadiazoly. Nejen na Farmaceutické fakultě UK se provádí výzkum nových potenciálních AT, ale i několik dalších výzkumných skupin po celém světě se věnuje této problematice. Na základě několika publikovaných prací zkoumajících oxadiazoly, jako potenciální AT, se Bakal a Gattani (2011) rozhodli vytvořit několik efektivních heterocyklických látek s antimykobakteriální aktivitou pomocí finančně nenáročné syntézy. Výsledkem jejich práce byly 2,5-disubstituované oxadiazoly s přítomností síry v struktuře látky. Jejich nejslibnější látky s MIC<sub>50</sub> od 0,11 do >0,20 μM vykazovaly baktericidní účinek a jejich cytotoxicita se pohybovala v přijatelném rozmezí. Jedna z vytvořených látek dokonce byla stejně účinná jako izoniazid a vykazovala antimykobakteriální aktivitu vůči 25 různým izolátům.

Studie Rane *et al.* (2013) se zabývala 1,3,4-oxadiazoly na bázi 4-nitropyrolu. Vytvořené látky prokázaly slibnou antimykobakteriální aktivitu, a poukázaly tím na fakt, že tento druh potenciálních AT, netoxický k savčím buňkám má velmi dobrý potenciál pro další zkoumání a jejich modifikaci pro získání lepších AT.

Aromatické nitrolátky mají mnoho podob. V publikovaných výsledcích studie Papadopoulou *et al.* (2017) se můžeme dočíst o různých sloučeninách na bázi nitrotriazolu/imidazolu s antimykobakteriální aktivitou. Výsledky této práce potvrzují, že správně vyvinutá molekula amidu na bázi 3-nitro-1,2,4-triazolu vykazuje rovněž antituberkulotický účinek. Bohužel v této studii zkoumané 2-nitroimidazoly či 4-nitroimidazoly tento účinek neprokázaly.

Substituované oxadiazoly a thiazoly jsou zkoumány právě pro své široké spektrum účinků. Cui *et al.* (2012) se ve své studii věnuje fungicidnímu účinku 2,5-disubstituovaných-1,3,4-oxadiazolových derivátů u rostlin. Syntetizované látky

prokázaly i antitumorózní účinek. Různě substituované deriváty oxadiazolů a thiadiazolů s dobrou antibakteriální, antifungální, antivirovou, protizánětlivou, protinádorovou a jinou aktivitou zkoumají i Rezki *et al.* (2015) a Pal *et al.* (2014). Účinek 1,3,4-thiadoxolů přisuzují =N-C-S fragmentu molekuly.

Během posledních 40 let byly vyvinuty pouze dvě látky, které byly schválené pro léčbu TB – bedachilin a delamanid. Obě tyto látky obsahují ve své molekule nitroskupinu. Další látky, které mají tuto skupinu zakomponovanou jsou studovány (Karabanovich *et al.*, 2016).

Na Farmaceutické fakultě UK se výzkumné skupiny zabývají vývojem AT, včetně AT ze skupiny substituovaných tetrazolů. Karabanovich *et al.* (2014) ve své studii uvádí deriváty tetrazolů obsahující dinitrofenylový fragment. Tato studie prokázala, že mnoho sloučenin potřebuje tento fragment molekuly pro svou vysokou antimykobakteriální účinnost.

Všechny látky v této práci studované *in vitro*, obsahují v molekule dinitrofenylový fragment. Němeček *et al.* (2017) v publikované práci uvádí, že změna polohy 3,5-dinitrofenylového fragmentu (tzn. přímý nebo nepřímý kontakt s oxadiazolem) nemá žádný vliv na *in vitro* antimykobakteriální účinnost proti replikujícím se mykobakteriálním kmenům. Dozvídáme se, že antimykobakteriální aktivita záleží na typu obsaženého heterocyklu v molekule. Ve studii syntetizované oxadiazoly měly vyšší aktivitu než tetrazoly. Tvrzení o poloze 3,5-dinitrofenylového fragmentu potvrzují i výsledky dřívějšího testování antimykobakteriální aktivity látek, kterými se zabývá tato diplomová práce, které bylo provedeno na k AT citlivému kmeni *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88, sedmi MDR/XDR kmenech *Mycobacterium tuberculosis*, na netuberkulózním kmenu *M. kansasii* My 235/80 a na klinicky izolovaném kmenu 6509/96, přičemž referenční látkou byl izoniazid. MIC látky T6030 byla 0,03  $\mu\text{M}$  a jejího reverzního analogu T6797 1  $\mu\text{M}$ , přičemž v molekule látky byl obsažen atom síry. Látka neobsahující síru ve své struktuře (T6735) měla MIC 32  $\mu\text{M}$  a její reverzní analog T6797 měl několikrát nižší MIC rovnající se 0,125  $\mu\text{M}$ . MIC ostatních látek, které jsou deriváty látek T6030 a T6797, se pohybuje v rozmezí 0,05  $\mu\text{M}$ -32  $\mu\text{M}$ . Všechny deriváty vykazovaly vyšší aktivitu než současně dostupné AT první řady. Karabanovich *et al.* (2016) v publikaci uvádí, že poloha dvou nitro-skupin má důležitý vliv na aktivitu látek. 3,5-dinitrosubstituované deriváty, které byly studované

v jejich práci, měly vyšší aktivitu než 2,4-dinitrosubstituované deriváty. Co se týče přítomnosti síry v molekule látek testovaných v této práci tak se nedá říct, že by přítomnost síry zvýšila či snížila antimykobakteriální aktivitu. U látky T6030 se zdá, že deriváty od ní odvozené, které pak již síru neobsahovaly, tak mají vyšší MIC. U látky T6797 se to jeví naopak. Vliv síry tedy nejde v tomto případě ohodnotit a vliv na aktivitu potenciálních AT budou mít jiné substituenty přítomné v molekulách.

V literatuře se nachází jen několik publikovaných studií věnujících se aromatickým sloučeninám s antituberkulotickým účinkem a jejich *in vitro* hodnocení cytotoxicity. Rane *et al.* se věnovali syntéze a hodnocení 1,3,4-oxadiazolů na bázi 4-nitropyrrolu, které nevykazovaly žádnou toxicitu vůči savčím buňkám. Postup či výsledky hodnocení cytotoxicity však publikovány nejsou. Bakal a Guttani (2011), kteří se zabývali vývojem 2,5-disubstituovaných oxadiazolů, provedli cytotoxicitní hodnocení na buněčné linii HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells – buňky lidského hepatocelulárního karcinomu) a BHK21 (Baby hamster kidney fibroblasts – fibroblasty ledvin mláďat křečka). Cytotoxicita jejich studovaných látek se nacházela v přijatelném rozmezí. Karabanovich *et al.* (2016) testovali substituované oxadiazoly za použití HuH7 (human hepatocellular carcinoma – buňky lidského hepatocelulárního karcinomu), HaLa (human cervical epitheloid carcinoma – buňky nádoru děložního hrdla), MDCKII-MDR1 (Madin-Derby canine kidney cells permanently expressing human efflux transporter MDR1 – buňky pocházející ze psích ledvin trvale exprimující lidský efluxní transportér MDR1) buněčných linií, byla použita i HepG2 linie a byla prokázána nízká toxicita studovaných látek. Karabanovich *et al.* ve studii z roku 2017 použili MDCK, HepG2 a HuH7 buněčné linie a zjistili, že hodnota IC<sub>50</sub> byla vyšší než 30 μM.

V návaznosti na předchozí výzkum potenciálních AT, byly v rámci této diplomové práce látky syntetizované Ing. G. Karabanovich, Ph.D., Mgr. P. Sychrou a Mgr. J. Němečkem, podrobené cytotoxicitním experimentům na buněčných liniích 3T3 a HaCaT. Koncentrace studovaných látek byla zvolena v rozmezí 1 – 500 μM. Všechny hodnocené látky prokázaly nízkou cytotoxicitu až do limitu rozpustnosti ve vodném prostředí. Některé látky (T6030, T6694, T6722 a T6733) projevíly statisticky významné snížení životaschopnosti u koncentrací přesahující limit rozpustnosti v kultivačním médiu u buněčné linie 3T3. Látka T6693 zde také projevila toxicitu, ale díky vysoké variabilitě u koncentrací přesahující limit rozpustnosti nebyl tento pokles

statisticky významný. Na rozdíl od buněčné linie 3T3, u které byl zaznamenán vyšší toxický účinek, toxické působení látek u buněčné linie HaCaT nebylo ve většině případů zaznamenáno. Výjimku tvořila látka T6797, kde došlo k významnému poklesu viability u koncentrací, kdy látka precipitovala v roztoku. Žádný z uvedených poklesů životaschopnosti však nedosáhl hodnoty  $IC_{50}$  při použitých koncentracích.

Díky nízké cytotoxicitě a vysoké účinnosti vůči mykobakteriím se látky T6030, T6693, T6694, T6722, T6725, T6733, T6734, T6735 a T6797 jeví jako velice nadějní kandidáti pro další preklinické hodnocení potenciálních AT. Velký význam cytotoxického hodnocení je i v poznání, které látky se potřebují ještě optimalizovat, či v jakém směru by se výzkum látek měl ubírat, aby byla vytvořena taková AT, která díky své účinnosti a bezpečnosti nahradí stávající nevyhovující léky. A tím i pomůže dohlížet na globální stav TB a regulovat výskyt tohoto onemocnění.

## 8. LITERATURA

BAKAL, Ravi L. a Surendra G. GATTANI. Identification and development of 2,5-disubstituted oxadiazole as potential candidate for treatment of XDR and MDR tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, **47**, 278-282.

BÁRTŮ, Václava. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína*. 2007, **9(9)**, 372-373.

BÁRTŮ, Václava. Tuberkulóza - infekční choroba v 21. století. *Medicina pro praxi*. 2008, **5(6)**, 245-248.

BEENA a Diwan S. RAWAT. Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview. *Medicinal Research Reviews*. 2013, **33(4)**, 693-764.

BORSARI, Chiara, Stefania FERRARI, Alberto VENTURELLI a Maria Paola COSTI. Target-based approaches for the discovery of new antimycobacterial drugs. *Drug Discovery Today*. 2017, **22(3)**, 576-584.

BRODY, Theodore M., Joseph LARNER a Kenneth P. MINNEMAN. *Brody's human pharmacology: molecular to clinical*. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Mosby, c2005. ISBN 0-323-03286-9.

BUCHTA, Vladimír et al. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 8071845655.

COPPOLA, Mariateresa, Susan J. F. VAN DEN EEDEN, Naoko ROBBINS, et al. Vaccines for Leprosy and Tuberculosis: Opportunities for Shared Research, Development, and Application. *Frontiers in Immunology*. 2018, **9**-.

CUI, Zi-Ning, Yan-Xia SHI, Li ZHANG, Yun LING, Bao-Ju LI, Yoshihiro NISHIDA a Xin-Ling YANG. Synthesis and Fungicidal Activity of Novel 2,5-Disubstituted-1,3,4-oxadiazole Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60(47)**, 11649-11656.

FIELD SK. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment?. *Therapeutic Advances In Chronic Disease* . 2015, **6(4)**, 170-84.

FIELD, Stephen K., Dina FISHER, Julie M. JARAND a Robert L. COWIE. New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2012, **6(5)**, 255-268.

FUJIWARA, Mamoru, Masanori KAWASAKI, Norimitsu HARIGUCHI, Yongge LIU a Makoto MATSUMOTO. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 2018, **108**, 186-194.

GOMEZ PEREZ, M., L. FOURCADE, M.A. MATEESCU a J. PAQUIN. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*. 2017, **535**, 43-46.

GONG, Wenping, Yan LIANG a Xueqiong WU. The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018, 1-96.

GOULOOZE, Sebastiaan C., Adam F. COHEN a Robert RISSMANN. Bedaquiline. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2015, **80**(2), 182-184.

HERFINDAL, Eric T. a D. R. GOURLEY. *Textbook of therapeutics: drug and disease management*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2000. ISBN 0781724147.

CHISHOLM-BURNS, Marie A. *Pharmacotherapy principles & practice*. Third edition. New York: McGraw-Hill Medical, 2013. ISBN 978-0-07-178046-9.

CHO, Y.-S., Y. Han KIM, H. Youn CHOI, Y. Zu KIM, Y. Lag CHO, H. Sook NAM, K.-S. BAE a H.-S. LIM. Pharmacokinetic Modeling and Simulation Analysis of LCB01-0371, A New Oxazolidinone Antibiotic Under Clinical Development. *Clinical Therapeutics*. 2017, **39**(8), e52.

ITTIYAVIRAH, S.P., A. GEORGE, A.M. SANTHOSH, S.T. KURIAN, P. PAPPACHAN a G. JACOB. Studies of cytotoxic potential of aqueous fruit extract of Cucumis melo.Linn in prostate cancer cell lines PC-3 using MTT and neutral red assay. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 2014, **13**(1), 19 – 25.

JADHAVAR PS, VAJA MD, DHAMELIYA TM a CHAKRABORTI AK. Oxazolidinones as Anti-tubercular Agents: Discovery, Development and Future Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*. 2015, **22**(38), 4379-97.

KARABANOVICH, Galina, Jan NĚMEČEK, Lenka VALÁŠKOVÁ, et al. S -substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **126**, 369-383.

KARABANOVICH, Galina, Jaroslav ROH, Tomáš SMUTNÝ, et al. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, **82**, 324-340.

KARABANOVICH, Galina, Júlia ZEMANOVÁ, Tomáš SMUTNÝ, et al. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016, **59**(6), 2362-2380.

KATZUNG, Gerhard. *Basic & clinical pharmacology*. 10th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2007. ISBN 0071451536.

KAUFMANN, Stefan H.E. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. *Seminars in Immunology*. 2013, **25**(2), 172-181.

KODA-KIMBLE, Mary Anne. *Applied therapeutics: the clinical use of drugs*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2005. ISBN 0-7817-4845-3.

KRÁTKÝ, Martin a Jarmila VINŠOVÁ. Pokroky ve vývoji antituberkulotik působící na multilékově resistentní kmeny. *Chemické listy* 2010, 1. 4.

LEWIS JM a SLOAN DJ. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management, Vol 2015, Iss default, Pp 779-791 (2015)*. **2015**, 779-791.

LIA D'AMBROSIO, ROSELLA CENTIS, GIOVANNI SOTGIU, EMANUELE PONTALI, ANTONIO SPANEVELLO a GIOVANNI BATTISTA MIGLIORI. New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Research, Vol 1, Iss 1 (2015)*. 2015, **1**(1).

LV, Kai, Zeyu TAO, Qian LIU, et al. Design, synthesis and antitubercular evaluation of benzothiazinones containing a piperidine moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **151**, 1-8.

MARAIS, Ben J. The global tuberculosis situation and the inexorable rise of drug-resistant disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **102**, 3-9.

MIKUŠOVÁ, Katarína a Sean EKINS. Learning from the past for TB drug discovery in the future. *Drug Discovery Today*. 2017, **22**(3), 534-545.

MOLECULARPROBES. *Hoechst Stains* [online]. 2005 [cit. 2018-05-03].  
Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-assets/LSG/manuals/mp21486.pdf>

MoleculasProbes. *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes* [online]. 2008 [cit. 2018-05-03].  
Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07510.pdf>

MURRAY, John F., Dean E. SCHRAUFNAGEL a Philip C. HOPEWELL. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Annals of the American Thoracic Society*. 2015, **12**(12), 1749-1759.

NGUYEN, T. V. A., T. B. T. CAO, O. W. AKKERMAN, S. TIBERI, D. H. VU a J. W. C. ALFFENAAR. Bedaquiline as part of combination therapy in adults with pulmonary multi-drug resistant tuberculosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2016, **9**(8), 1025-1037.

NGUYEN, Thi Van Anh, Richard M ANTHONY, Anne-Laure BAÑULS, Dinh Hoa VU a Jan-Willem C ALFFENAAR. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2017, (10), 1625-1630.

NIEUWENHUIZEN, Natalie E. a Stefan H. E. KAUFMANN. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette–Guérin. *Frontiers in Immunology*. 2018, **9**, 121.

OLARU ID, VON GROOTE-BIDLINGMAIER F, HEYCKENDORF J, YEW WW, LANGE C a CHANG KC. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *The European Respiratory Journal*. 2015, **45**(4), 1119-31.

PAL, Dilipkumar, DeshDeepak PANDEY, Rohit TRIPATHI a Preety MISHRA. Synthesis, characterization, antimicrobial, and pharmacological evaluation of some 2, 5-disubstituted sulfonyl amino 1,3,4-oxadiazole and 2-amino-disubstituted 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2014, **5**(4), 196.

PAPADOPOULOU, Maria V., William D. BLOOMER a Howard S. ROSENZWEIG. The antitubercular activity of various nitro(triazole/imidazole)-based compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017, **25**(21), 6039-6048.

RANE, Rajesh A., Pavankumar BANGALORE, Sheetal D. BORHADE a Preeti K. KHANDARE. Synthesis and evaluation of novel 4-nitropyrrole-based 1,3,4-oxadiazole derivatives as antimicrobial and anti-tubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, **70**, 49-58.

REZKI, Nadjat, Amjad AL-YAHYAWI, Sanaa BARDAWEEL, Fawzia AL-BLEWI a Mohamed AOUD. Synthesis of Novel 2,5-Disubstituted-1,3,4-thiadiazoles Clubbed 1,2,4-Triazole, 1,3,4-Thiadiazole, 1,3,4-Oxadiazole and/or Schiff Base as Potential Antimicrobial and Antiproliferative Agents. *Molecules*. 2015, **20**(9), 16048-16067.

SACKSTEDER, Katherine A, Marina PROTOPOPOVA, Clifton E BARRY, Koen ANDRIES a Carol A NACY. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiology*. 2012, **7**(7), 823-837.



SCHAECHTER, Moselio., John L. INGRAHAM a Frederick C. NEIDHARDT. *Microbe*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, c2006. ISBN 1555813208.

SINGH, Priya, Rashmi KUMARI a Rup LAL. Bedaquiline: Fallible Hope Against Drug Resistant Tuberculosis. *Indian Journal of Microbiology*. 2017, **57**(4), 371-377.

SLONCZEWSKI, Joan. a John Watkins. FOSTER. *Microbiology: an evolving science*. 2nd ed. New York: W.W. Norton, c2011. ISBN 0393934470.

STALEY, James T. *Microbial life*. 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2007. ISBN 978-0878936854.

SZUMOWSKI JD a LYNCH JB. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Drug Design, Development and Therapy, Vol 2015, Iss default, Pp 677-682 (2015)*. 2015, **2015**(default), 677-682.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes* [online]. 2018 [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R37f110>

TOMIOKA H. Editorial: Current status and perspective on drug targets in tubercle bacilli and drug design of antituberculous agents based on structure-activity relationship. *Current Pharmaceutical Design*. 2014, **20**(27), 4305-6.

TORTORA, Gerard J., Berdell R. FUNKE a Christine L. CASE. *Microbiology: an introduction*. Twelfth edition. Boston: Pearson, 2016. ISBN 0321929152.

ÚZIS. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016, [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: [www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2016](http://www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2016)

VAŠÁKOVÁ, Martina. Tuberkulóza v České republice. Současný stav. Diagnóza, léčba, prevence. *Vnitřní Lekarství / Internal Medicine*. 2013, **59**(4), 284-289.

VOSS, Gerald, Danilo CASIMIRO, Olivier NEYROLLES, Ann WILLIAMS, Stefan H.E. KAUFMANN, Helen MCSHANE, Mark HATHERILL a Helen A FLETCHER. Progress and challenges in TB vaccine development. *F1000Research*. 2018, **7**, 199-.

VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

WAISSER K. [Where does the development of new antituberculosics go? Part 2 - in vitro evaluation]. *Ceska A Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti A Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*. 2014, **63**(1), 13-6.

WALKER, Roger a Cate WHITTLESEA. *Clinical pharmacy and therapeutics*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007. ISBN 0443102856.

WHO, 2017. Global tuberculosis report 2015. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2017. ISBN 978-92-4-156551-6.

WILLEY, Joanne M., Linda. SHERWOOD a Christopher J. WOOLVERTON. *Prescott's microbiology*. Ninth edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2014. ISBN 978-0-07-340240-6.

ZUMLA, Alimuddin, Payam NAHID a Stewart T. COLE. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013, **12**(5), 388-404.