

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNEJ CHÉMIE



*IN VITRO* ŠTÚDIUM CYTOTOXICITY VYBRANÝCH ANTIMYKOBAKTERIÁLNYCH  
LÁTKOK NA ĽUDSKÝCH PEČEŇOVÝCH BUNKÁCH

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

.....

Miroslava Klimová

## **Pod'akovanie**

Rada by som poďakovala Mgr. Monike Kuchařovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, ochotu, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Pod'akovanie patrí rovnako aj môjmu konzultantovi, Mgr. Pavlovi Bártovi, Ph.D., za jeho čas, ústretovosť a pomoc pri experimentálnej časti práce.

V neposlednom rade ďakujem svojej rodine a priateľom za podporu, ktorú mi venovali po celú dobu štúdia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie

Študentka: Miroslava Klimová

Školiteľ: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Názov diplomovej práce: *In vitro* štúdium cytotoxicity vybraných antimykobakteriálnych látok na ľudských pečenej bunkách

Klinický výskum neustále napreduje, hľadajú sa nové, chýbajúce liečivá, prebieha syntéza účinnejších látok, minimalizujú sa nežiadúce účinky.

Predmetom tejto práce bolo určiť účinok desiatich látok (JZ195, JZ186, MH17, JZ178, MH9, MH18, JZ177, JZ170, JZ172, JZ174) na bunkovú líniu HepG2 a zhodnotiť ich cytotoxický potenciál. Testované látky sú derivátmi pyrazin-2-karboxamidu, syntetizované boli Katedrou organickej a biorganickej chémie, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej a vyvíjané za účelom pôsobenia proti mykobakteriálnym kmeňom. Cytotoxicita bola stanovená *in vitro* komerčne dostupnou kolorimetrickou metódou CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, spočívajúcej v redukcii tetrazoliovanej soli na fialovo sfarbený formazan, priamo odrážajúcej počet životaschopných buniek. Mieru hepatotoxického pôsobenia sme zhodnotili na základe hodnôt  $IC_{50}$  získaných z inhibičných kriviek jednotlivých látok a porovnali s daným liekovým štandardom – amfotericinom B, predstavujúcim negatívnu hepatotoxickú kontrolu a tamoxifenom ako kontrolou pozitívnej hepatotoxicity.

Najvyššia dosiahnutá hodnota  $IC_{50}$  bola u látok JZ177 a MH18  $> 100 \mu\text{M}$ . Na základe výsledkov inhibičných koncentrácií možno zhodnotiť, že všetky látky pôsobia na pečenej bunky toxicky. Z dôvodu precipitácie látok vo vyšších koncentráciách boli hodnoty stanovené len z počiatočných koncentrácií a preto nemožno považovať výsledky za dostatočne presné. K posúdeniu cytotoxického pôsobenia sú potrebné ďalšie štúdie za upravených podmienok, v ktorých by u látok nedochádzalo k precipitácii a ktoré by detailnejšie zhodnotili možnosť ich potencionálneho využitia v klinickej praxi.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Miroslava Klimová

Supervisor: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Title of diploma thesis: *In vitro* cytotoxicity study of selected antimycobacterial substances on human hepatocytes

Clinical research is constantly progressing, new, missing drugs are being searched for, more effective substances are being synthesized, adverse effects are being minimized.

The aim of this thesis was to determine the effect of ten substances (JZ195, JZ186, MH17, JZ178, MH9, MH18, JZ177, JZ170, JZ172, JZ174) in the HepG2 cell line and evaluate their cytotoxic potential. The tested substances were derived from the structure of pyrazine-2-carboxamide and synthesized within the Department of Organic and Bioorganic Chemistry at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University and developed for the purpose of having promising effect on mycobacterial strains. Cytotoxicity was evaluated *in vitro* by CellTiter96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, commercially available colorimetric method based on reduction of the tetrazolium salt to a violet-coloured formazan which directly reflects the number of viable cells. We assessed the hepatotoxic effect using the IC<sub>50</sub> values obtained from the analysis of the inhibition curves and compared acquired data with the chosen drug standard – amphotericin B, representing a negative hepatotoxic control and tamoxifen as a representative of positive hepatotoxicity.

The highest IC<sub>50</sub> range above the value of 100 μM was detected for substance JZ177 and MH18. Based on the results, we can draw a conclusion that each of the tested substances has a toxic effect on liver cells. Due to the precipitation of substances in higher concentrations, these values were determined only in the initial concentrations and therefore, we cannot consider the results to be specific enough. To assess the valid cytotoxic effect, further suitably adjusted studies are needed to qualify the chance of their potential use in a clinical practice more precisely.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická časť.....	9
2.1. <i>In vitro</i> štúdie.....	9
2.2. Cytotoxicita .....	9
2.3. Testy cytotoxicity .....	10
2.3.1. Testy s farbivami .....	10
2.3.2. Kolorimetrické metódy .....	11
2.3.3. Ďalšie metódy.....	13
2.4. Bunkové kultúry .....	15
2.4.1. Príprava a pestovanie bunkových kultúr .....	16
2.4.2. Lína buniek HepG2 .....	16
2.5. Liečivá v terapii mykobakteriálnych infekcií.....	18
2.5.1. Antituberkulotika .....	18
2.5.2. Antileprotika.....	23
2.6. Látky podrobené testovaniu.....	24
2.6.1. Novo syntetizované antimykobakteriálne látky .....	24
2.6.2. Amfotericin B.....	24
2.6.3. Tamoxifen .....	25
3. Cieľ práce.....	27
4. Experimentálna časť .....	28
4.1. Použitý materiál .....	28
4.1.1. Bunková línia HepG2.....	28
4.1.2. Prístrojové vybavenie a pomôcky .....	28
4.1.3. Chemikálie a reagens .....	29
4.1.4. Testované látky .....	29

4.2.	Experimentálne metódy .....	31
4.2.1.	Príprava roztokov testovaných látok .....	31
4.2.2.	Príprava roztokov štandardu .....	31
4.2.3.	Nasadenie bunkovej línie .....	31
4.2.4.	Stanovenie cytotoxicity .....	32
4.2.5.	Spracovanie dát .....	33
5.	Výsledky .....	34
5.1.	Efekt skúmaných látok na HepG2 bunky .....	34
6.	Diskusia.....	39
7.	Záver .....	41
8.	Zoznam skratiek.....	42
9.	Použitá literatúra .....	44

## 1. Úvod

Po registrácii a zavedení liečiv do klinickej praxe sa aj naďalej všetky liečivá sledujú a zhromažďujú sa informácie o ich prípadných nežiadúcich účinkoch. Jedným z častých, závažných nežiadúcich účinkov je poškodenie pečene, ktoré môže mať za následok až jej postupné zlyhávanie (Červený P. 2013, Součková et al. 2015).

Testy cytotoxicity sú rýchlym a dostupným zdrojom informácií v odvetví toxikológie, farmakológie a celkovo v oblasti výskumu. Dostupná je široká škála metód, vďaka ktorým možno predpovedať nepriaznivé účinky a kvantifikovať mieru toxického poškodenia (Aslantürk 2018).

Predmetom diplomovej práce bolo stanovenie cytotoxického účinku desiatich novo syntetizovaných látok a jedného zo štandardov – amfotericinu B. Sledovaným parametrom bola stredná inhibičná koncentrácia  $IC_{50}$ . Štúdia bola uskutočnená v *in vitro* podmienkach, na bunkovej línii HepG2, kolorimetrickou metódou.



## **2. Teoretická časť**

### **2.1. *In vitro* štúdie**

Každé nové perspektívne liečivo musí prejsť skúškami bezpečnosti a účinnosti prostredníctvom postupných štádií vývoja – od základného výskumu, cez klinické skúšanie až po postregistračné sledovanie (Součková et al. 2015).

Testy *in vitro* spadajú do preklinickej fázy testovania liečiv, ktorá spolu s testami *in vivo*, pokiaľ predstavujú úspešný potenciál, predchádzajú samotnému klinickému výskumu. Umožňujú odhaliť toxický účinok sledovaných látok využívajúc časti tkanív, bunecné kultúry, bunecné línie, izolované orgány a frakcie ako mitochondrie, mikrozomy či membrány (Kniewald J et al. 2005).

Okrem štúdia toxicity zahŕňa preklinická fáza testy karcinogenicity a mutagenicity, sledujú sa farmakokinetické a farmakodynamické parametre, ktoré umožňujú preskúmať bezpečnostný profil a predpovedať rizika spojené s užívaním testovanej účinnej látky pred prvým použitím u človeka (Švihovec et al. 2018).

### **2.2. Cytotoxicita**

Cytotoxicita znamená stav poškodenia bunky následkom chemického, fyzikálneho alebo biologického stimulu, dochádza k morfológickým zmenám, indukcii apoptózy - programovanej bunecnej smrti alebo nekrózy, kedy bunky prestávajú rásť a deliť sa z dôvodu narušenej membránovej integrity a následnej lýzy bunky. Sledovanie patologických procesov a zmien v rámci cytotoxických štúdií na orgánovo špecifických bunecných kultúrach je cenným indikátorom potenciálnej toxicity nových bioaktívnych zlúčenín (Askin Celik et al. 2018).

### 2.3. Testy cytotoxicity

K testovaniu cytotoxicity v *in vitro* podmienkach je využitelných niekoľko metód, jednotlivu sa zameriavajú na indukované reverzibilné či ireverzibilné zmeny v bunkách. Svetelnou a elektrónovou mikroskopiou možno hodnotiť narušené morfológické celulórne rysy ako zmeny tvaru, membrán, vakuol, výskyt nefyziologických štruktúrnych znakov.

Dôležitým indikátorom bunecného poškodenia, a určenia bunecnej viability, je zmena membránovej integrity, permeability a metabolickej aktivity, následkom čoho dochádza k úniku iónov, malých molekúl, enzýmov a detekcii biochemických parametrov, ktoré sú hlavnými markermi v *in vitro* toxikológii (Guillouzo A. 1998).

Pre väčšinu testov sú dnes dostupné komerčne vyrábané kity (napr. od spoločností Promega Corporation, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific), ktoré obsahujú potrebné substráty, reagenčný materiál, rozpúšťadlá s podrobne vypracovaným protokolom o praktickom prevedení, napr. CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay pre test s tetrazoliovými soľami), CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay/AlamarBlue<sup>®</sup> na stanovenie redukcie resazurínu, CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay pre kvantifikáciu adenzinotrifosfátu (ATP), The Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase-3/7 Assay na detekciu apoptózy a ďalšie (Riss et al. 2013).

#### 2.3.1. Testy s farbivami

Pridaním farbív do pripravenej bunecnej suspenzie - najčastejšie trypanovej modrej, eozínu a ďalších, možno s využitím Bürkerovej komôrky kvantifikovať životnosť buniek. Princípom je rozdielna permeabilita membrány živých buniek, ktorá je intaktná, farbivo neprepustí a buniek mŕtvych, s porušenou membránou, u ktorých dochádza k nasatiu farbiva a zafarbeniu štruktúr (Strober W. 2015, Pokorná et al. 2009).

Bunecná viabilita sa následne percentuálne zhodnotí podľa pomeru:

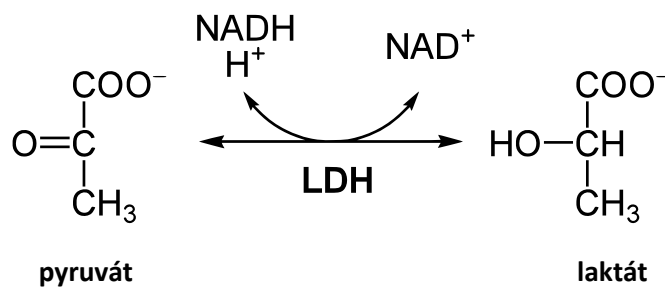
$$\text{Viabilita [\%]} = \frac{\text{počet živých buniek}}{\text{celkový počet buniek}} \quad (1)$$

### 2.3.2. Kolorimetrické metódy

Kolorimetria umožňuje kvantifikovať metabolickú aktivitu buniek spektrofotometricky meraním absorbancie farebného produktu vzniknutého z premeny substrátu za prítomnosti činidiel či enzýmu katalyzujúceho danú reakciu. V *in vitro* štúdiách je najčastejšie využívaný enzým laktátdehydrogenáza (LDH) a tetrazoliové soli povahy kvartérnych amóniových zlúčenín, ktoré redukciou prechádzajú na farebné formazany, napr. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium), XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) a WSTs (vo vode rozpustné tetrazoliové soli) (Aslantürk 2018, Brůčková 2015).

#### LDH test

Laktátdehydrogenáza (LDH) je enzým, ktorý sa uvoľňuje do bunky po jej poškodení, kedy sa membrána stáva permeabilnejšou. Katalyzuje reverzibilnú premenu laktátu na pyruvát, dochádza k redukcii  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}/\text{H}^+$  (obrázok č. 1). Podstatou testu je kvantitatívne stanovenie LDH pri reakcii so žltou tetrazoliovou soľou INT (2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid), ktorá prijíma  $\text{H}/\text{H}^+$  a redukuje sa na červený formazan (Aslantürk 2018, Vinken et al. 2017).



**Obr.1** Reakčná schéma vzájomných oxidačne-redukčných premien laktátu a pyruvátu katalyzovaná LDH.

Prevzaté a upravené z:

[https://www.wikiskripta.eu/w/Laktátdehydrogenáza#/media/Soubor:LDH\\_reaction.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Laktátdehydrogenáza#/media/Soubor:LDH_reaction.svg)

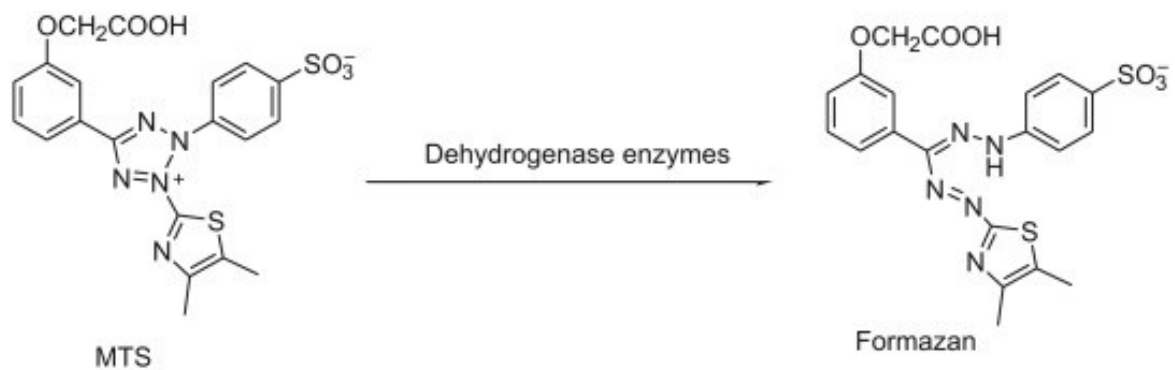
(Anonym 2018).

## Testy s tetrazoliovými soľami

Redukcia tetrazoliových solí je ďalšou kolorimetrickou metódou stanovenia metabolickej aktivity buniek. Jedná sa o enzymatickú premenu pomocou mitochondriálnych NADH-dependentných dehydrogenáz, ktorých aktivita odráža životaschopnosť buniek (Vinken et al. 2017).

Pri použití metódy, obsahujúcej MTT soľ vznikajú nerozpustné fialové kryštáliky formazanu, ktorých rozpustnosť možno modifikovať pridaním vhodného rozpúšťadla, zvyčajne DMSO (dimethylsulfoxid), príp. isopropanolu, dimethylformamidu či kombinácie iných rozpúšťadiel. V prípade soli MTS (obrázok č. 2) vzniká, vďaka aditívnemu reakčnému činidlu (fenazin-ethosulfátu), dobre rozpustný produkt, ktorý nevyžaduje ďalšiu solubilizáciu (Aslantürk 2018, Promega Corporation 2012, Riss et al. 2013).

Formazanový produkt je podstatou pre kvantitatívne vyhodnotenie, jeho intenzita sfarbenia priamo odráža viabilitu buniek, stanovuje sa spektrofotometricky. Mŕtve bunky naopak strácajú redukčnú schopnosť a nedochádza preto k zmene sfarbenia (Kamiloglu 2020).



**Obr. 2** Enzymatická premena tetrazoliovej soli MTS na tmavo zfarbený formazan.

Prevzaté z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128092866000108>

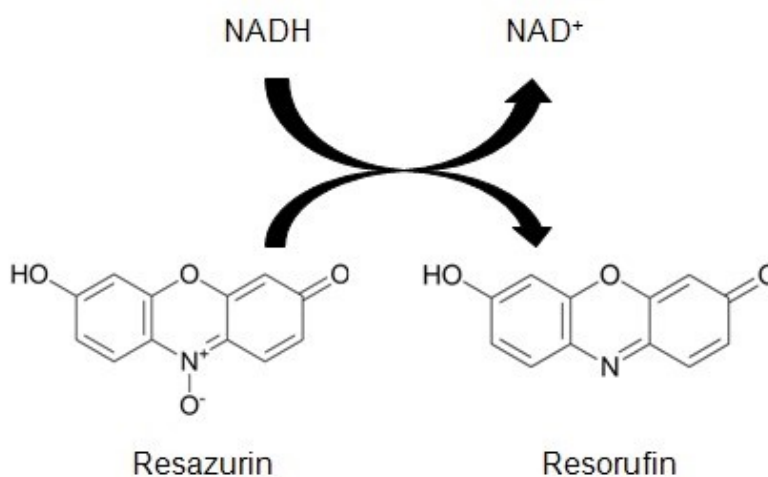
(Kuate et al. 2017).

### 2.3.3. Ďalšie metódy

Pri skúmaní vplyvov testovaných látok sa možno ďalej oprieť o biochemické parametre, ako obsah proteínov, poškodenie a obsah deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), glutathionu, stupeň syntézy ATP, obvykle za využitia fluorescenčných a luminometrických metód (Aslantürk 2018, Guillouzo A. 1998, Kamiloglu et al. 2020, Vinken et al. 2017).

#### Test redukcie resazurinu

Resazurin (7-hydroxy-3-oxo-3H-fenoxazin-10-oxid), tiež nazývaný „AlamarBlue“ je zlúčenina, ktorá podlieha premene na odlišne sfarbený produkt mitochondriálnymi reductázami a diaforázami. Ich funkčnosť je dôležitým znakom metabolickej aktivity buniek. Z pôvodného modrého sfarbenia sa resazurin redukuje na ružovo sfarbený resorufin vykazujúci výraznú fluorescenciu (obrázok č. 3), dochádza k posunu v absorpčnom spektre, sfarbené buncné médium sa následne premeriava fluorometricky alebo pomocou spektrofotometra (Kamiloglu et al. 2020, Tabernilla et al. 2021).

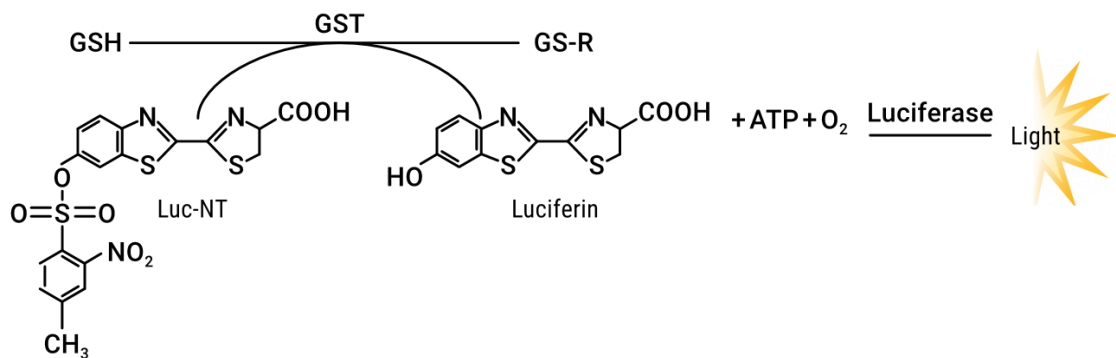


**Obr. 3** Redukcia resazurinu na ružový resorufin NADH-dependentnými mitochondriálnymi enzýmami viabilných buniek.

Prevzaté z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (Riss et al. 2013).

## Stanovenie obsahu glutathionu

Glutathion (GSH) je antioxidant, chráni bunky pred voľnými radikálmi, jeho oxidovanou formou je dimer GSSG s disulfidovým premostením, ktorý sa spätne redukuje na dve molekuly GSH pomocou enzýmu glutathionreduktázy za účasti NADPH. Vzájomný pomer GSH/GSSG slúži ako indikátor oxidačného stresu v bunkách, meria sa fluoromericky či luminometricky za využitia substrátu luciferinu-NT a jeho konverzie na luciferin enzýmom glutathion-S-transferázou (obrázok č. 4). Výstupom je svetelný signál, priamo úmerný množstvu GSH (Anonym 2022, Guillouzo A. 1998, Truman et al. 2013).



**Obr. 4** Mechanizmus luminiscenčnej reakcie stanovenia GSH.

Prevzaté z: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh\\_glo-glutathione-assay/?catNum=V6911](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh_glo-glutathione-assay/?catNum=V6911) (Anonym 2022).

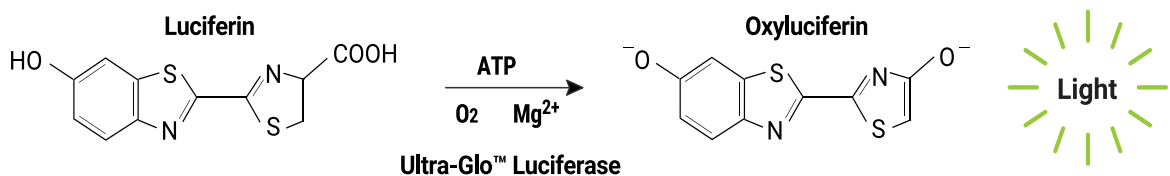
## Kaspázový test

Testom sa skúma aktivita kaspáz (proteolytických enzýmov), aktivovaných v procese apoptózy a slúžiacich pre jej detekciu. Pridaním špecifického substrátu dochádza k fluorescencii, priamo úmernej počtu aktivovaných kaspáz. Alternatívou k testu je luminometrické hodnotenie (Riss et al. 2003).

## Kvantifikácia ATP

ATP je jeden z najdôležitejších faktorov zabezpečujúci energetické procesy v zdravých bunkách. Narušením fyziologického stavu strácajú bunky schopnosť produkovať ATP a dochádza k jeho poklesu (Aslantürk 2018).

Reakciou luciferinu, katalyzovanou enzýmom luciferázou a ATP za prítomnosti  $Mg^{2+}$ , vzniká oxidovaná forma oxyluciferinu a žlto-zelený luminiscenčný signál (obrázok č. 5). Množstvo ATP odráža počet viabilných buniek a je úmerné výslednému svetelnému signálu (Mueller et al. 2004, Tabernilla et al. 2021).



**Obr. 5** Oxidácia luciferinu na oxyluciferin vyžadujúca prítomnosť ATP sprevádzaná priamo merateľným luminiscenčným signálom.

Prevzaté z: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/atp-assays/#::~:~:text=ATP%20assays%20are%20procedures%20that,as%20colorimetric%2C%20fluorescent%20and%20bioluminescent> (Anonym 2022).

## 2.4. Bunkové kultúry

Bunkové kultúry predstavujú významný podklad pre zdroj informácií v biologickom, farmakologickom a toxikologickom výskume. Slúžia ako modely rôznych patologických stavov, diferenciaciou na špecializované typy buniek môžu efektívne nahradiť tkanivá a orgány, uplatňujú sa preto v transplantácii, vo vývoji a testovaní liečiv, produkcii vakcín či v génom inžinierstve (Segeritz et al. 2017, Zeilinger et al. 2016).

Jedná sa o izolované bunky, tkanivá alebo orgány rastlinného/živočíšneho pôvodu, ktoré sú umiestnené do umelých podmienok, média, kde majú stabilné podmienky a prístup potrebných nutrientov pre svoj rast (Anonym 2020).

Prostredie média je vytvárané na základe špecifických nárokov konkrétneho typu kultúr, spravidla obsahuje živiny ako karbohydráty, aminokyseliny, vitamíny, minerály, rastové faktory, sérum s optimalizovaným zložením (v praxi bežne FBS, fetal bovine serum), kontrolované sú aj fyzikálne-chemické vlastnosti, udržuje sa stabilné pH, teplota, podiel vlhkosti, prísun kyslíka a CO<sub>2</sub> (Segeritz et al. 2017).

Proces prípravy a pestovania dnes značne uľahčujú dostupné štandardizované média definovaného obsahu pre vybraný druh buniek, napr. MEM (Minimum Essential Medium), RPMI-1640 pre cicavčie bunky a pod. (Anonym 2020, Gleichmann N. 2020).

#### **2.4.1. Príprava a pestovanie bunkových kultúr**

Primárne kultúry predstavujú prvý stupeň získavania bunkových línií. Izolované bunky sú umiestnené do kultivačnej nádoby s médiom, kde rastú a delia sa (Anonym 2020).

Po tom, ako sa bunky pomnožia a pokryjú zhruba 80% kultivačnej plochy, nastáva fáza pasážovania, ich transfer, vznikajú subkultúry s novým priestorom pre svoj ďalší vývoj. Oddeliť bunky od substrátu možno mechanicky alebo pridaním proteolytických enzýmov (trypsin, kolagenáza), čím sa rozrušia štruktúry a je umožnené vzájomné rozvoľnenie buniek, tzv. enzymatická disociácia. Zhruba tretina buncovej suspenzie je následne premiestnená do kultivačného prostredia a doplnená novým médiom (Anonym 2020, Segeritz et al. 2017).

Získané subkultúry je možné, uchovať pre budúce použitie, a to prostredníctvom kryoprotektívnych činidiel (glycerol, DMSO) v prostredí tekutého dusíku (s teplotou pod -130°C) a v prípade potreby opäť rozmraziť v 37°C vodnom kúpeli (Segeritz et al. 2017).

#### **2.4.2. Línia buniek HepG2**

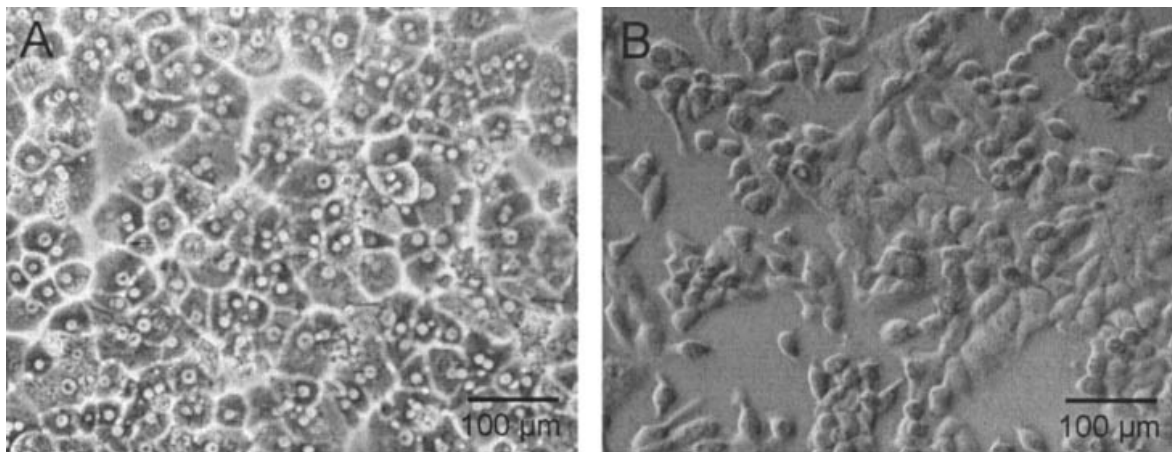
Pečeň, ako hlavný detoxifikačný orgán, je zároveň miestom „first pass“ metabolizmu perorálne podaných liečiv, dochádza tu k biotransformácii a vzniku reaktívnych metabolitov s potenciálnym toxickým pôsobením (Vernetti et al. 2019).

Hepatotoxicita je významným nežiadúcim účinkom väčšiny xenobiotík a práve testy cytotoxicity v *in vitro* podmienkach sú nástrojom ich predikcie pred použitím u zvierat a následne u ľudí (Kammerer et al. 2018).



Štandardným kultivačným modelom sú primárne ľudské hepatocyty (PHH) izolované priamo z pečene alebo resektovaného tkaniva. Lepšou proliferačnou schopnosťou sa vyznačujú HepaRG línie pochádzajúce z nádorových pečeňových buniek infikovaných vírusovou hepatitídou typu C alebo HepG2 bunky, odvodené od hepatómu (Kammerer et al. 2018, Zeilinger et al. 2016).

Pôvod buniek HepG2 pochádza z biopsie pečene 15-ročného chlapca s hepatocelulárnym karcinómom, morfológicky sa jedná o epitelálne bunky s adherentnými vlastnosťami (Web Sigma-Aldrich). Nachádzajú uplatnenie v štúdiách funkčnosti pečene, vo výskume a vývoji nových protinádorových liečiv, experimentálnom testovaní toxicity, výhodou je ich dostupnosť a vysoká schopnosť proliferácie, avšak oproti hepatocytom sa vyznačujú slabšou expresiou cytochrómov P450 (CYP450), čo je predmetom záujmu rekombinantných a iných technológií s cieľom modifikovať a vytvoriť línie tak, aby boli využiteľnejšie v štúdiách metabolizmu účinných látok (Arzumanian et al. 2021, Kammerer et al. 2018).



**Obr. 6** Mikroskopický snímok ľudských primárnych hepatocytov (A) a nádorovej HepG2 línie (B).

Prevzaté z:

[https://www.researchgate.net/publication/10655700\\_Comparison\\_of\\_primary\\_human\\_hepatocytes\\_and\\_hepatoma\\_cell\\_line\\_HEPG2\\_with\\_regard\\_to\\_their\\_biotransformation\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/10655700_Comparison_of_primary_human_hepatocytes_and_hepatoma_cell_line_HEPG2_with_regard_to_their_biotransformation_properties) (Wilkening et al. 2003).

## 2.5. Liečivá v terapii mykobakteriálnych infekcií

Mykobakteriózy, ako vyplýva z názvu, sú infekcie vyvolané baktériami rodu *Mycobacterium*, spôsobujúce klinicky závažné stavy, prevažne na úrovni dýchacieho traktu, mäkkých tkanív a kože (Franco-Paredes et al. 2018, Solovič I. 2018).

Medzi prvé identifikované druhy patrí *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, ktorý spolu s *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. mungi* a *M. pinnepedi* tvorí tzv. *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTC) vyvolávajúci tuberkulózu (TBC). Druhy *M. leprae* a *M. lepromatosis* sú pôvodcami lepry, *M. ulcerans* je príčinou „Buruli“ ulcerácie manifestujúcej sa ako postupne rastúce kožné lézie nekrotizujúceho tkaniva (Franco-Paredes et al. 2018, Llibre et al. 2021).

V súčasnosti sa zaznamenáva nárast infekcií u človeka heterogénnou skupinou patogénov, označovaných ako netuberkulózne mykobaktérie (NTM). Patrí sem široké spektrum mykobaktérií, ktoré sa bežne vyskytujú v prostredí, prípadne u zvierat, najmä *Mycobacterium avium complex*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. xenopi* a ďalšie. Miera patogenity závisí prevažne od imunitného systému jedinca a pridružených komorbidít, klinický obraz je podobný TBC, postihovať môžu aj lymfatické uzliny, kosti, tkanivá urogenitálneho a gastrointestinálneho traktu (Gopaldaswamy et al. 2020, Losse S. 2019, Solovič I. 2018).

### 2.5.1. Antituberkulotika

Tuberkulóza je infekčné ochorenie predstavujúce celosvetový problém. Postihuje najmä pľúca, zriedkavejšie sa vyskytuje mimopulmonálna forma. Najčastejším spôsobom nákazy je prenos z človeka na človeka vzdušnou cestou prostredníctvom kvapôčok (Rajecová E., Solovič I. 2003).

Cieľom liečby je vyliečenie pacienta bez následkov, zachovanie kvality života, zníženie morbidity, zabránenie relapsu a ďalšieho šírenia ochorenia. Dôležité je, brať do úvahy možnosť vzniku liekovej rezistencie a snažiť sa o jej minimalizáciu. Dĺžka terapie predstavuje minimálne 6 mesiacov, jednotlivé antituberkulotické liečivá sa podávajú v kombináciách, v ktorých sa vzájomne kombinuje baktericídny účinok, sterilizačné vlastnosti a protirezistenčná schopnosť (Vašáková et al. 2016).

## **Ethambutol**

Ethambutol (obrázok č. 7), štruktúrne ethylendiamin, je bakteriostatické antituberkulotikum, jeho mechanizmus účinku spočíva v interferencii s biosyntézou arabinogalaktanu, hlavnou zložkou mykobakteriálnej bunkovej steny. Prostredníctvom blokády arabinofurosyltransferázy zabraňuje syntéze látok potrebných pre zachovanie integrity a inhibuje tak rast baktérií (Hartl et al. 2012, PubChem Compound Summary).

Hlavným nežiadúcim účinkom je retrobulbárna neuritída, závažný stav spôsobujúci poškodenie zraku (Vašáková et al. 2016).

## **Izoniazid**

Liečivo isoniazid sa uplatňuje prakticky vo všetkých terapeutických režimoch TBC. Vyznačuje sa bakteriostatickým až baktericídnym účinkom, podmieneným narušením syntézy kyseliny mykolové, zaisťujúcej syntézu bunkovej steny (Hartl et al. 2012).

Chemicky sa jedná sa o hydrazid kyseliny isonikotínovej (obrázok č. 7), hydrazidová skupina je zodpovedná za inhibíciu monoaminoxidáz (MAO), preto môže na danej úrovni dochádzať k liekovým interakciám. Nežiadúco pôsobí na pečeňové bunky, spôsobuje periférnu neuropatiu v dôsledku deficitu vitamínu B<sub>6</sub>, profylakticky sa preto súčasne podáva pyridoxín. Vyšší výskyt nežiadúcich účinkov sa vyskytuje u „pomalých acetylátorov“, keďže podlieha biotransformácii prostredníctvom acetylácie (Hartl et al. 2012, Vašáková et al. 2016).

## **Pyrazinamid**

Baktericídne pôsobiace liečivo pyrazinamid, amid pyrazin-2-karboxylovej kyseliny (obrázok č. 7), sa v tuberkulózne mykobaktérii konvertuje na aktívnu formu (pyrazin-2-karboxylovú kyselinu) a bráni syntéze mastných kyselín potrebných pre jej rast a replikáciu (DrugBank, Hartl et al. 2012).

Limitáciou užívania pyrazinamidu v liečbe TBC je jeho aktivita v prostredí kyslého pH. Z tohto dôvodu je vhodný do iniciálnych fáz infekcie, kým nedôjde k vzplanutiu zápalových procesov, pre ktoré je charakteristické zásadité pH vyšších hodnôt. Prerušenie liečby je v niektorých prípadoch nutné aj pre jeho hepatotoxicitu (Vašáková et al. 2016).

## **Rifampicin**

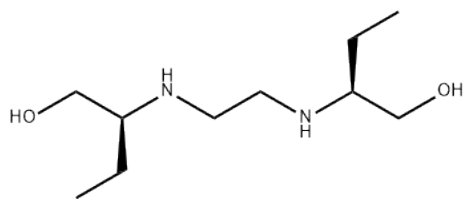
Rifampicin (obrázok č. 7) patrí do skupiny ansamycinových antibiotík. Z chemického hľadiska sa jedná o makrocyclický laktam (Hartl et al. 2012).

Pôsobí baktericídne, inhibíciou DNA-dependentnej RNA-polymerázy bráni syntéze bakteriálnych nukleových kyselín. Aplikuje sa u všetkých foriem TBC, pri liečbe lepry, v dôsledku rezistencie iných kmeňov aj u ťažkých stafylokokových infekcií, legionelózy, nosičstve *Neisseria meningitidis* a *Haemophilus influenzae* typu B.

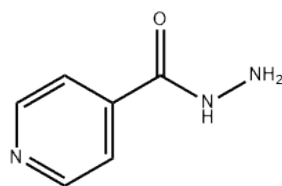
Počas užívania je potrebné sledovať pečenevé testy kvôli riziku vzniku hepatitídy, ako vedľajší účinok možno pozorovať červené sfarbenie moču, spúta a slz, obzvlášť závažným účinkom je porucha krvotvorby (SPC prípravku Benemicin, Vašáková et al. 2016).

## **Streptomycin**

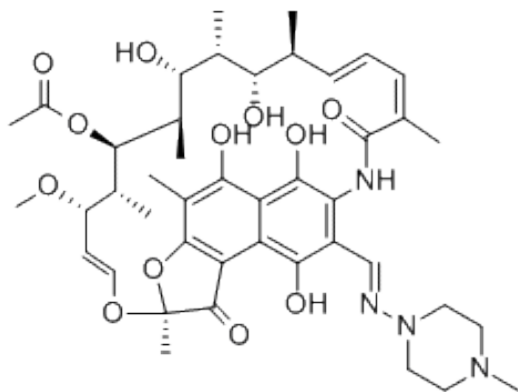
Aminoglykozidové antibiotikum streptomycin (obrázok č. 7) je voľbou v prípade rezistencie na antituberkulotika prvej línie. Mechanizmus baktericídneho účinku spočíva v inhibícii mykobakteriálnej proteosyntézy. Medzi nežiadúce účinky patrí ototoxicita, neurotoxicita a nefrotoxicita (Hartl et al. 2012).



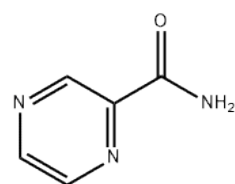
Ethambutol



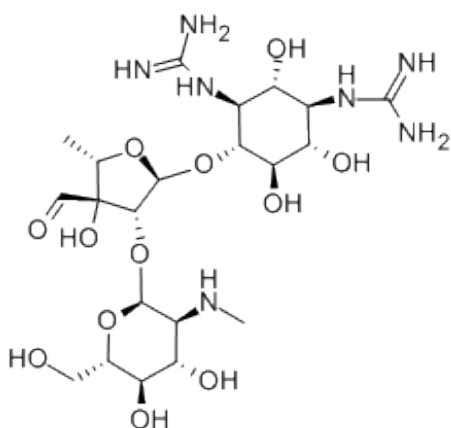
Isoniazid



Rifampicin



Pyrazinamid



Streptomycin

**Obr. 7** Štruktúrne vzorce antituberkulózných liečiv.

Prevzaté z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3324345.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3324345.htm)

[https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_en.aspx?kwd=isoniazid](https://www.chemicalbook.com/ProductList_en.aspx?kwd=isoniazid)

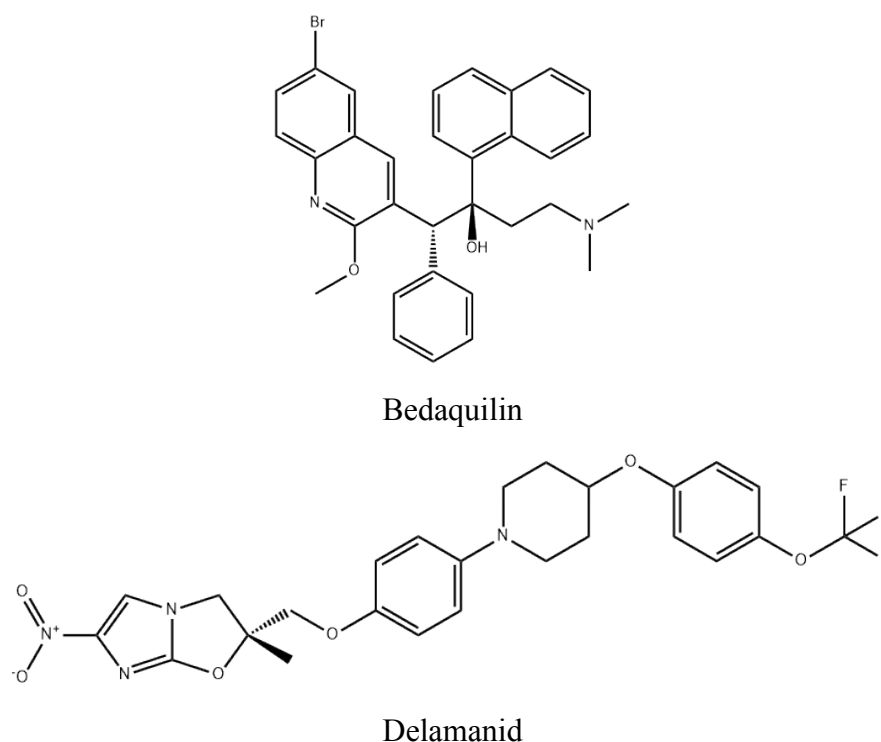
[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7429387.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7429387.htm)

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7474473.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7474473.htm)

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3462887.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3462887.htm)

Stratégia liečby u prvýkrát infikovaných pacientov spočíva v štvorkombinácii liečiv (ethambutol + izoniazid + pyrazinamid + rifampicin) podávaných po dobu 2 mesiacov s následnou pokračovacou 4-mesačnou fázou v dvojkombinácii. U recidivujúcich pacientov sa môže začínať kombináciou až 5. liečiv, počas ďalších mesiacov pokračujúce trojkombinačne. Jednotlivé terapeutické schémy sa vytvárajú s ohľadom na konkrétneho pacienta, jeho stav, recidívy a vytvorené rezistencie. Ak sa TBC klinicky manifestuje do ťažkých foriem, môže byť antituberkulózna liečba doplnená o systémové kortikoidy (prednison, methylprednisolon) a podporné imunostimulancia (levamizol, isoprinosin).

Pri výskyte multirezistencie sa uplatňujú režimy nasledujúce odporúčania Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO, World Health Organization). V rokoch 2012 – 2013 boli schválené dve nové liečivá pre liečbu TBC – bedaquilin a delamanid (obrázok č. 8), nevýhodou je ich vysoká cena a nutnosť pravidelného monitoringu, keďže sa jedná o liečivá predlžujúce QT interval (Solovič I. 2020, Vašáková et al. 2016).



**Obr. 8** Štruktúrne vzorce nových antituberkulotík – bedaquilinu (diarylchinolon) a delamanidu (imidazooxazol).

Prevzaté z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB12473722.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB12473722.htm)

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB82512523.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB82512523.htm)

## 2.5.2. Antileprotika

Lepra, vyvolaná leprotickými kmeňmi mykobaktérií, je dnes prevažne vzácne, no stále sa vyskytujúce chronické, vysoko infekčné ochorenie, postihujúce najmä kožu, slizničnú membránu dýchacích ciest a oči s postupným rozvojom permanentného nervového poškodenia (WHO 2022).

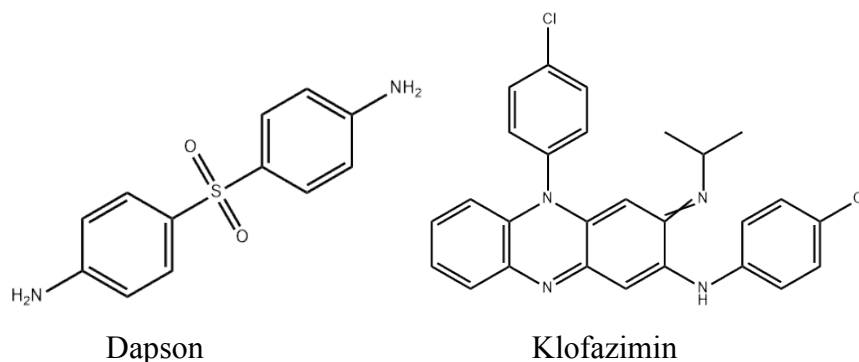
Liečebný režim spočíva, podobne ako u TBC, v kombinovanej terapii troch účinných liečiv – rifampicinu (obrázok č.7), dapsonu a klofaziminu (Cambau E., Williams D. 2019).

### Dapson

Dapson (obrázok č. 9) pôsobí ako inhibítor kyseliny *para*-aminobenzoovej, substrátu pre syntézu kyseliny listovej. Kompetitívne inhibuje enzým dihydropteroátsyntázu baktérií, kľúčový enzým syntézy folátu, čím je narušená tvorba bakteriálnych nukleových kyselín (Cambau E., Williams D. 2019).

### Klofazimin

Antibakteriálny mechanizmus účinku klofaziminu (obrázok č. 9) spočíva pravdepodobne v jeho výraznej lipofilite, väzbou detergentne pôsobiacich lysofosfolipidov rozrúša mykobakteriálnu membránu (Cambau E., Williams D. 2019).



**Obr. 9** Štruktúrne vzorce antileprotík dapsonu a klofaziminu.

Prevzaté z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB0152851.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0152851.htm)

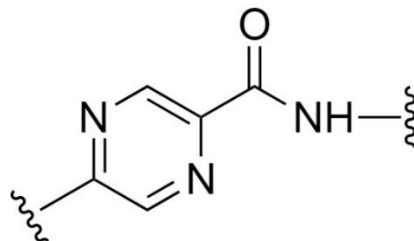
[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6273466.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6273466.htm)

## 2.6. Látky podrobené testovaniu

### 2.6.1. Novo syntetizované antimykobakteriálne látky

Testované látky (označené ako JZ195, JZ186, MH17, JZ178, MH9, MH18, JZ177, JZ170, JZ172 a JZ174) použité v štúdiu boli nasyntetizované katedrou Organickej a biorganickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej, ako potenciálne liečivá s antimykobakteriálnym účinkom.

Všetky vykazujú štruktúrnu podobnosť, základ tvorí pyrazin-2-karboxamid (viď obrázok č. 10), ktorý je ďalej substituovaný lipofilným alkylovým reťazcom, amidovou skupinou či fenylovým zbytkom.



**Obr. 10** Štruktúrny základ molekúl testovaných látok.

### 2.6.2. Amfotericin B

Amfotericin B (obrázok č. 11) je antifungálne liečivo polyénovej skupiny s fungicídnyim účinkom spôsobujúcim smrť hubovej bunky. Základom štruktúry je makrocyclický laktonový kruh, lipofilnú zložku predstavuje konjugovaný uhl'ovodíkový reťazec dvojných väzieb, hydrofilná časť molekuly je tvorená polyhydroxylovaným reťazcom, glykosidicky naviazaným aminocukrom a voľnou karboxylovou skupinou (Hartl et al. 2012).

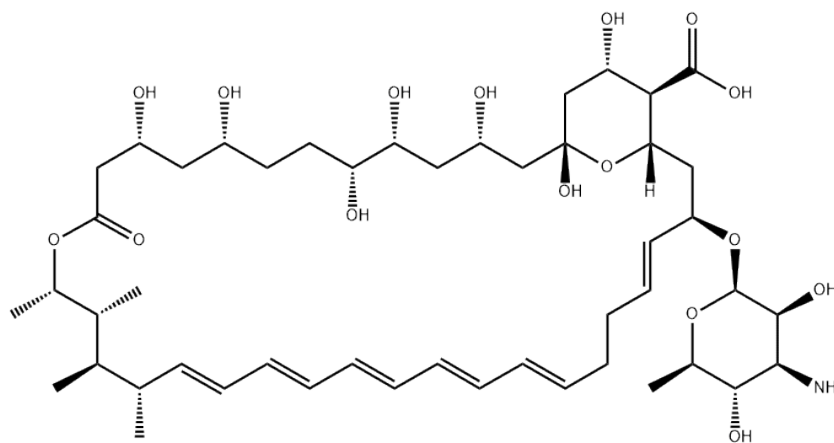
S dostupnosťou iných antimykotík, je prevažne rezervným liečivom pre terapiu komplikovaných infekcií, v prípade jeho voľby je nutné, zohľadniť konkrétnu indikáciu, stav pacienta a vedľajšie účinky (Noor et al. 2022).

Mechanizmus účinku spočíva vo väzbe na ergosterol, základnú zložku plazmatickej membrány húb a vytvorení póru, cez ktorý dochádza k úniku iónov a malých molekúl,



následkom čoho nastáva depolarizácia až smrť bunky, navyše oxidatívne poškodzuje bunku vytváraním voľných radikálov (Hartl et al. 2012, Noor et al. 2022).

Amfotericin B sa nevstrebáva po perorálnom ani intramuskulárnom podaní, aplikuje sa intravenózne v rôznych úpravách (lipozomálne liekové formy, koloidné suspenzie s kyselinou deoxycholovou, sulfátový komplex s cholesterolom), ktoré sú výhodnejšie pre lepší dávkovací profil, cielenejšiu distribúciu a menšiu toxicitu (Hartl et al. 2012, Noor et al. 2022).



**Obr. 11** Štruktúrny vzorec amfotericinu B.

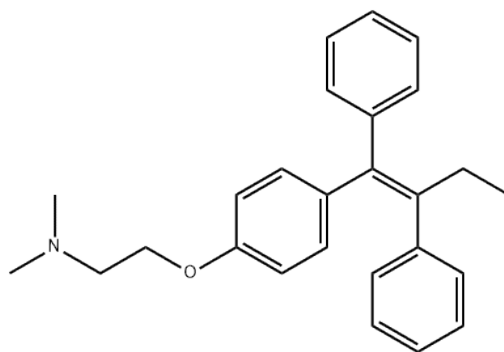
*Prevzaté z:*

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3425912.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3425912.htm)

### 2.6.3. Tamoxifen

Tamoxifen (obrázok č. 12) patrí do skupiny liečiv, selektívne modifikujúcich estrogenové receptory, kde pôsobí buď ako agonista alebo naopak kompetitívnym antagonizmom. Disponuje značným cytotoxickým účinkom, uplatnenie preto nachádza pri cytostatickej liečbe nádorov (prevažne endometria), je liečivom prvej voľby v adjuvantnej terapii karcinómu prsníka a v prevencii jeho vzniku (Anonym).

Ako u väčšiny cytostatík, aj pri terapii tamoxifenom sa vyskytuje rada nežiadúcich účinkov, pôsobiacich prevažne na proliferujúce bunky, gastrointestinálny trakt a reprodukčný systém, pri dlhodobej terapii boli pozorované prípady poškodenia pečene zahŕňajúce jej stukovatenie, steatózu až cirhózu (Anonym, LiverTox 2020).



**Obr. 12** Štruktúrny vzorec tamoxifenu.

Prevzaté z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9438781.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9438781.htm)

### 3. Cieľ práce

- Stanoviť a posúdiť cytotoxické pôsobenie 10. látok v štádiu vývoja na bunečnej línii HepG2 v *in vitro* podmienkach.
- Experimentálne určiť mieru cytotoxicity liečiva amfotericinu B, slúžiaceho ako porovnávací štandard.
- Vzájomne porovnať získané údaje o cytotoxicite spolu so zvolenými liekovými štandardmi.

## 4. Experimentálna časť

### 4.1. Použitý materiál

#### 4.1.1. Bunková línia HepG2

K experimentu boli použité ľudské imortalizované pečňové bunky (Human hepatocellular liver carcinoma cell line, HepG2) od spoločnosti ECACC (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, UK). Bunková línia (pasáž 11-12) bola kultivovaná v 75 cm<sup>2</sup> kultivačných nádobách, v bunkovom médiu DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium) (Sigma-Aldrich, USA) obohatenom o 1 % neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, USA) a 10% fetálneho hovädzieho séra (Sigma-Aldrich, USA).

#### 4.1.2. Prístrojové vybavenie a pomôcky

- Laminárny box: Micrological safety cabinet TOP-SAVE 1,8 (Bioair instruments, Taliansko)
- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Vodný kúpeľ TW 12 (Julabo, Nemecko)
- Centrifúga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Nemecko)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS-1R (OPTIKA Microscopes, Taliansko)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Nemecko)
- Orbitálna trepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Nemecko)
- Doštičkový analyzátor TECAN (Infinite M200, Švajčiarsko)
- Bürkerova komôrka (BRAND, Nemecko)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky, číre (TPP, Švajčiarsko)
- Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus 5-50 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Nemecko)
- Automatická multikanálová pipeta Discovery Comfort 50-300 µl (HTL, Poľsko)
- Sklenené Pasteurove jednorazové pipety (Sigma Aldrich, USA)

- Jednorazové plastové pipety 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Techno Plastic Products - TPP, Švajčiarsko)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Poľsko)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l (Eppendorf, Nemecko)
- Mikroskúmavky Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Nemecko)
- Falkonky 15 ml, 50 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Kultivačné fľaše 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Švajčiarsko)
- Rukavice latexové, nesterilné (VWR, USA)

#### 4.1.3. Chemikálie a reagens

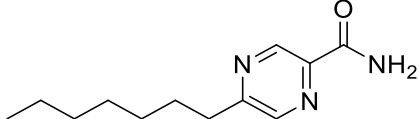
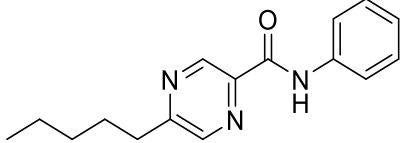
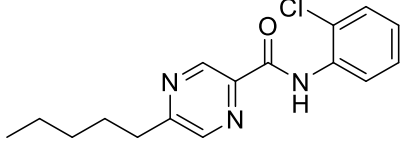
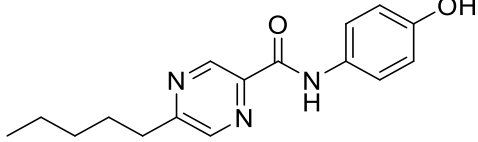
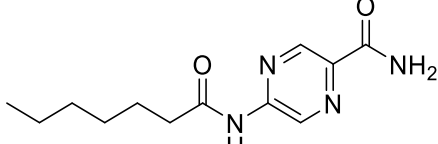
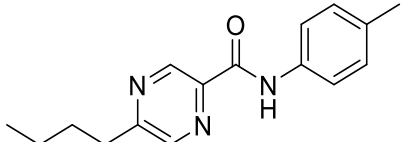
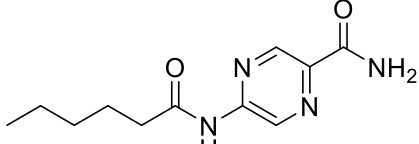
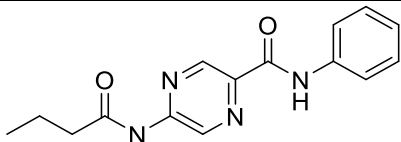
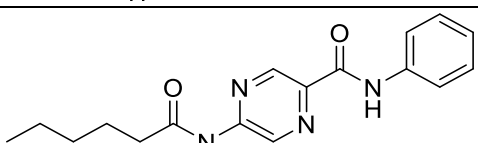
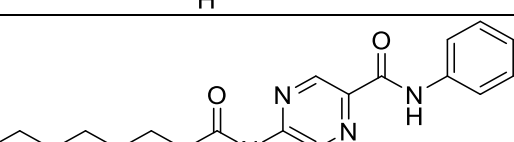
- Fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline; PBS, pH = 7,4) (PENTA, Česká republika)
- MEM (Eaglovo minimálne esenciálne médium) (Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fetal bovine serum (fetálne bovinne sérum) (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin 0,25% (Trypsin-EDTA, ethylendiamintetraoctová kyselina) (SigmaAldrich, USA)
- DMSO (dimethylsulfoxid pre molekulárnu biológiu; > 99,9%) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

#### 4.1.4. Testované látky

Štúdia prebiehala na desiatich novo syntetizovaných látkach s potenciálnou antimykobakteriálnou aktivitou - JZ195, JZ186, MH17, JZ178, MH9, MH18, JZ177, JZ170, JZ172, JZ174 (Katedra organickej a bioorganickej chémie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova). Štruktúry, vrátane chemických názvov jednotlivých látok sú uvedené v tabuľke 1.

Za štandard bolo zvolené liečivo amfotericin B (Sigma-Aldrich, USA) ako negatívna hepatotoxická kontrola (obrázok č. 11) a liečivo tamoxifen (Sigma-Aldrich, USA) predstavujúce pozitívnu kontrolu hepatotoxicity (obrázok č. 12).

**Tab. 1** Zoznam testovaných látok vrátane štruktúrnych vzorcov a chemických názvov.

Testovaná látka	Štruktúrny vzorec	Chemický názov
JZ195		5-heptylpyrazin-2-karboxamid
JZ186		5-pentyl- <i>N</i> -fenylypyrazin-2-karboxamid
MH17		<i>N</i> -(2'-chlorfenyly)-5-pentylpyrazin-2-karboxamid
MH18		<i>N</i> -(4'-hydroxyfenyly)-5-pentylpyrazin-2-karboxamid
JZ178		5-heptanamidopyrazin-2-karboxamid
MH9		5-butyl- <i>N</i> -( <i>p</i> -tolyly)-2-karboxamid
JZ177		5-hexanamidopyrazin-2-karboxamid
JZ170		5-butanamido- <i>N</i> -fenylypyrazin-2-karboxamid
JZ172		5-hexanamido- <i>N</i> -fenylypyrazin-2-karboxamid
JZ174		5-oktanamido- <i>N</i> -fenylypyrazin-2-karboxamid

## 4.2. Experimentálne metódy

### 4.2.1. Príprava roztokov testovaných látok

Ako prvé sme pripravili zásobné roztoky pre každú z testovaných látok. Jednotlivé látky, uvedené v tabuľke 1, sme navážili pomocou analytických váh. Ako rozpúšťadlo bol použitý DMSO z dôvodu zlej rozpustnosti daných látok vo vode, v prípade niektorých ťažšie rozpustných zlúčenín nasledovala ešte ich centrifugácia. Keďže sa DMSO vyznačuje bunecnou toxicitou vo vyšších koncentráciách, držali sme sa hodnoty koncentrácie nepresahujúcej 1%.

Výsledná koncentrácia zásobných roztokov bola 1000  $\mu\text{M}$ , z nich sme postupným riedením vytvorili koncentračnú radu roztokov s koncentraciami 500  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ .

### 4.2.2. Príprava roztokov štandardu

Roztoky porovnávacej látky, amfotericinu B, sme pripravili rovnakým spôsobom a v rovnakej koncentračnej rade ako u testovaných látok (viď kapitola 4.2.1.).

V prípade tamoxifenu sa v príprave postupovalo podobne. V tejto práci bol ako štandard tamoxifenu použitý graf, získaný z výsledkov predchádzajúcej štúdie vypracovanej na Farmaceutickej fakulte, Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

### 4.2.3. Nasadenie bunkovej línie

S bunkami sa manipulovalo v prostredí laminárneho boxu zabezpečujúcim ochranu pred kontamináciou za dodržiavania sterilných podmienok, všetky predmety vkladané do laminárneho boxu prešli dezinfekciou zriedeným liehom, viečka nádob a Pasteurove pipety sa ošetrili miernym žíhaním nad plameňom.

*In vitro* štúdie prebiehali na línii HepG2, ktorej už predchádzalo niekoľkonásobné pasážovanie, inkubovaná bola v kultivačných nádobách o ploche 75  $\text{cm}^2$  umiestnených v inkubátore vytemperovanom na teplotu 37°C a v atmosfére 5%  $\text{CO}_2$ .

Vlastná pasáž spočívala v odobratí starého média z kultivačnej nádoby sterilnou pipetou, prepláchnutí buniek pomocou fosfátového pufru a pokrytím dna prídavkom 3 ml roztoku trypsinu. Takto upravená bunečná línia sa dala opäť inkubovať približne po dobu 2 minút, kým prebehol proces trypsinizácie umožňujúci uvoľnenie buniek od dna kultivačnej nádoby. Po rozvoľnení buniek bol pridaný približne dvojnásobok čerstvého živného média spolu so sérom, ktoré zastavilo ďalší enzymatický účinok trypsinu.

Počet buniek v suspenzii sa stanovil mikroskopicky pomocou Bürkerovej komôrky počítaním v 5x5 štvorcoch.

Z resuspendovaných buniek sme časť odobrali, preniesli do novej kultivačnej nádoby spolu s čerstvým kultivačným médiom a nechali ďalej inkubovať pri teplote 37°C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub>. Bunečnú líniu HepG2 sme nasadzovali na 96-jamkovú doštičku, do každej jamky bolo napipetovaných 10 000 buniek na 100 µl média a doštička bola následne vložená do inkubátoru s teplotou 37°C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodín.

#### **4.2.4. Stanovenie cytotoxicity**

Po inkubácii sme k bunkám napipetovali roztoky testovaných látok v deviatich koncentráciách (1000 µM, 500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM a 1 µM), vždy v triplikátoch. Okrem testovaných látok obsahovali doštičky niekoľko kontrol, takisto v triplikátoch:

- kontrola média – obsahujúca len 100 µl čistého média
- nebunková kontrola – 100 µl média bez buniek + 1 µl testovanej látky
- kontrola 100% viability – k bunkám napipetovaný 1 µl DMSO
- kontrola nulovej viability – k bunkám napipetovaných 10 µl DMSO

Takto pripravené doštičky sa nechali inkubovať pri teplote 37°C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> 24 hodín, po uplynulom čase sa do jamiek napipetovalo činidlo CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (Promega, USA) – tetrazoliová soľ a ponechalo sa v inkubátore za rovnakých podmienok ďalších 90 minút. Totožným postupom sme pripravili aj doštičku štandardu s riedenými roztokmi amfotericinu B.

Nakoniec sa zmerala absorbancia vzniknutého formazanového produktu pri vlnovej dĺžke 490 nm prostredníctvom doštičkového analyzátoru TECAN, priamo odpovedajúca počtu životaschopných buniek (Promega Corporation 2012).



#### 4.2.5. Spracovanie dát

Výstupné hodnoty nameraných absorbancií sme spracovávali v tabuľkovom programe Microsoft Excel 2018, ktorý vypočítal priemer hodnôt nameraných absorbancií triplikátu zhodnej koncentrácie, vrátane nebunečných kontrol. Bol zároveň nástrojom pre výpočet smerodajnej a relatívnej smerodajnej odchýlky vyjadrujúcej mieru presnosti merania.

Z jednotlivých číselných údajov program zhodnotil a určil percentuálnu hodnotu bunečnej viability pre jednotlivé koncentrácie testovaných látok podľa nasledujúceho vzorca:

$$\text{Viabilita [\%]} = \frac{X - Y}{100\% \text{ životnosť}} \times 100 \quad (2)$$

*X vyjadruje priemer hodnôt absorbancií triplikátu testovaných látok v danej koncentrácii, Y je priemernou hodnotou absorbancií triplikátu nebunečných kontrol, 100% životnosť je údaj získaný odčítaním priemeru absorbancií triplikátov média od spriemerovanej hodnoty absorbancií triplikátov kontroly 100% viability.*

Za využitia programu GraphPad Prism 9.4.1. sme dáta z Excelu spracovali a získali inhibičné krivky pre každú z testovaných látok. Prostredníctvom modelu nelineárnej regresie sa stanovili inhibičné koncentrácie IC<sub>50</sub>, parameter vyjadrujúci koncentráciu skúšanej látky, ktorá spôsobí úhyn alebo inhibíciu rastu 50% populácie (Ambrožová J. 2003).

## 5. Výsledky

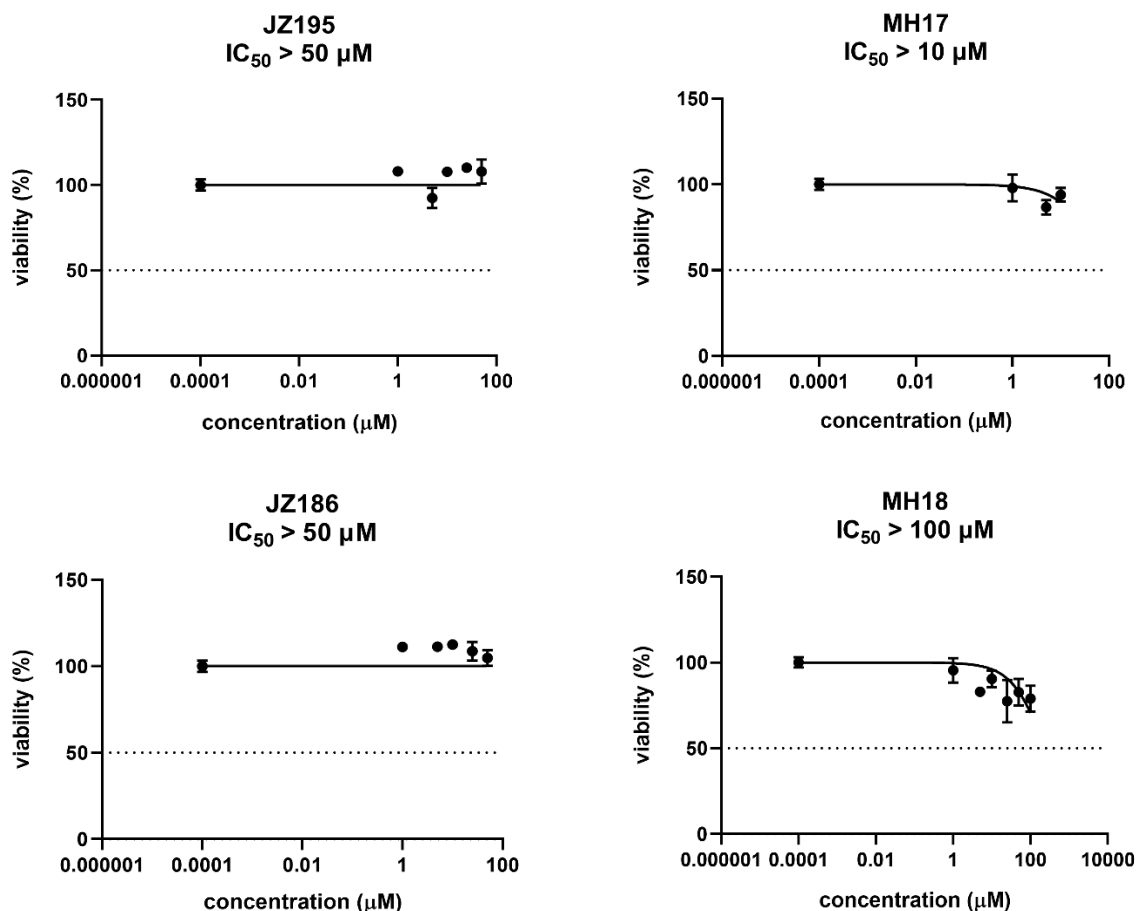
### 5.1. Efekt skúmaných látok na HepG2 bunky

Výstupom spracovaných dát o cytotoxicite získaných metódou CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA) sú grafy zobrazené na obr. 13 – 16 vyjadrujúce závislosť viability HepG2 buniek na koncentrácii konkrétnej látky.

K posúdeniu potenciálneho cytotoxického účinku skúmaných antimykobakteriálnych látok slúžil parameter IC<sub>50</sub> získaný v programe GraphPad Prism 9.4.1. Keďže každá z testovaných látok vykazovala vo vyšších koncentráciách výraznú precipitáciu, nebolo možné, adekvátne určiť hodnoty stredných inhibičných koncentrácií. Výsledné hodnoty odrážajú koncentračné rozmedzie, v ktorom látky ešte neprecipitovali a sú uvedené v tabuľke č. 2

**Tab. 2** Hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných látok, vrátane štandardu, zistené za použitia metódy CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

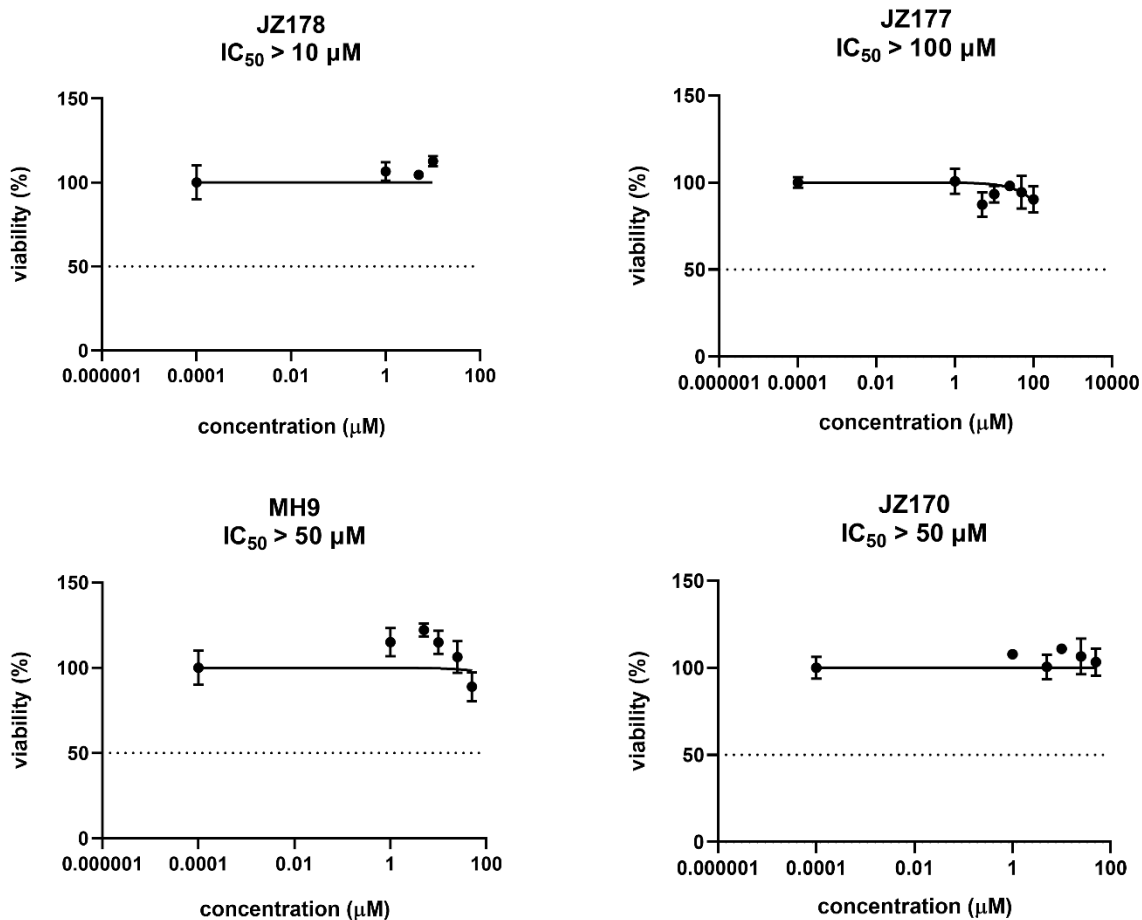
Testovaná látka	Hodnota IC <sub>50</sub> [μM]
JZ195	> 50
JZ186	> 50
MH17	> 10
MH18	> 100
JZ178	> 10
MH9	> 50
JZ177	> 100
JZ170	> 50
JZ172	> 25
JZ174	> 25
Amfotericin B	> 500
Tamoxifen	19,56



**Obr. 13** Cytotoxické pôsobenie látok JZ195, JZ186, MH17 a MH18 na bunkovú líniu HepG2 po 24 hodinovej inkubácii.

Na obr. 13 sú znázornené grafy závislosti viability buniek na rastúcej koncentrácii látok JZ195, JZ186, MH17 a MH18. Bunky boli inkubované 24 hodín s testovanými látkami riedenými v koncentračnom rozmedzí 1 – 1000  $\mu M$ .

Na základe parametru  $IC_{50}$ , látok JZ195 a JZ186  $> 50 \mu M$ , možno zhodnotiť, že dané látky sa vyznačujú značnou toxicitou. O niečo nižšiu toxicitu vykazuje látka MH18 s  $IC_{50} > 100 \mu M$ . Najvyššiu cytotoxicitu má látka MH17,  $IC_{50} > 10 \mu M$ , ktorá spolu s látkou JZ178 (obr. 14) tvorí dvojicu látok, najtoxickejšie pôsobiacich na líniu HepG2 buniek z celého študovaného spektra. Toxicita látok z obr. 13 klesá v poradí: MH17  $>$  JZ195  $\sim$  JZ186  $>$  MH18.

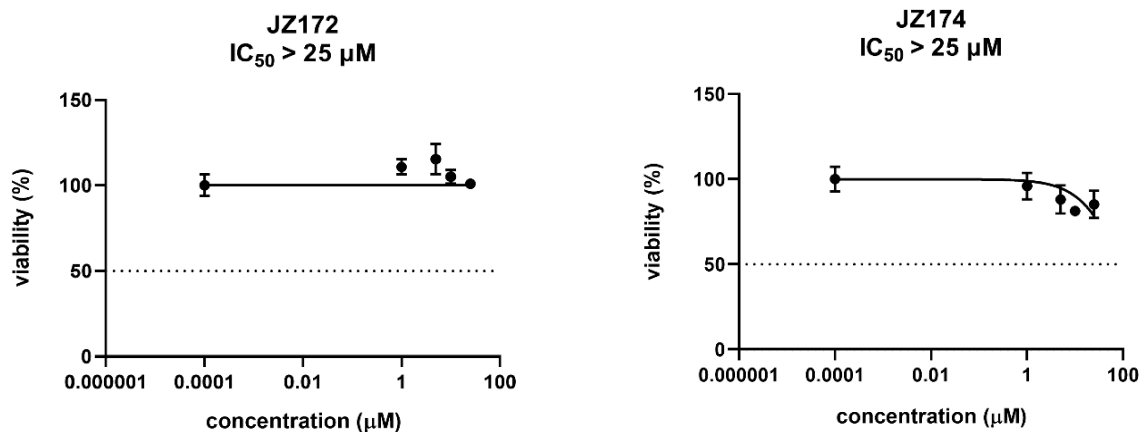


**Obr. 14** Cytotoxické pôsobenie látok JZ178, MH9, JZ177 a JZ170 na bunkovú líniu HepG2 po 24 hodinovej inkubácii.

Na obr. 14 sú znázornené grafy závislosti viability buniek na rastúcej koncentrácii látok JZ178, MH9, JZ177 a JZ170. Bunky boli inkubované 24 hodín s testovanými látkami riedenými v koncentračnom rozmedzí 1 – 1000  $\mu M$ .

Látka JZ178 s  $IC_{50} > 10 \mu M$  sa vyznačuje najsilnejším toxickým účinkom, spolu s látkou MH17, uvedenou v obr. 13.

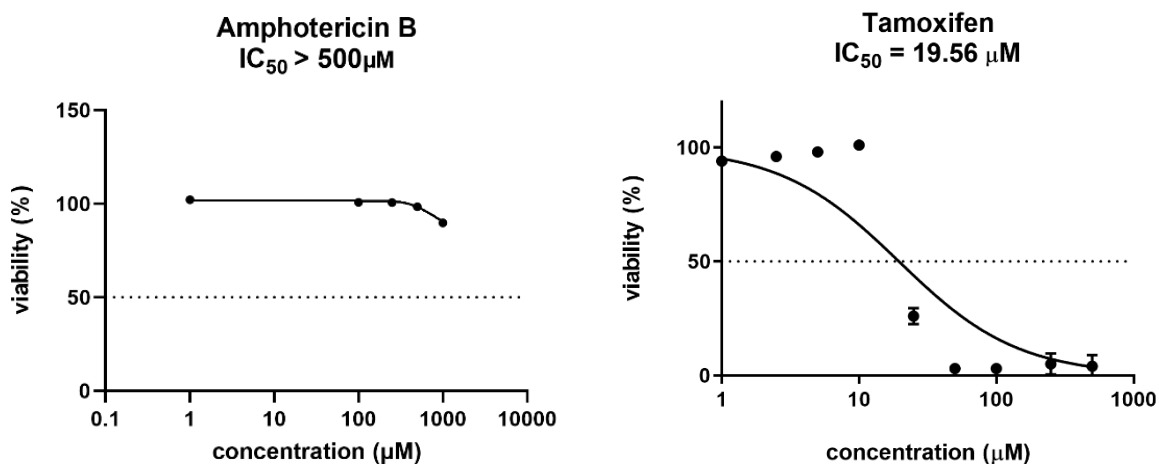
Značnú toxicitu vykazujú aj látky MH9 a JZ170, ich  $IC_{50} > 50 \mu M$ , najnižšiu cytotoxicitu z uvedených látok, má látka JZ177, ktorej  $IC_{50} > 100 \mu M$ . Toxicita látok z obr. 14 klesá v poradí: JZ178 > MH9 ~ JZ170 > JZ177.



**Obr. 15** Cytotoxické pôsobenie látok JZ172 a JZ174 na bunkovú líniu HepG2 po 24 hodinovej inkubácii.

Na obr. 15 sú znázornené grafy závislosti viability buniek na rastúcej koncentrácii látok JZ172 a JZ174. Bunky boli inkubované 24 hodín s testovanými látkami riedenými v koncentračnom rozmedzí 1 – 1000 µM.

Obe látky sa vyznačujú podobnou cytotoxicitou, hodnota IC<sub>50</sub> > 25 µM, na základe čoho ich možno zaradiť ako dvojicu látok s druhým najsilnejším toxickým účinkom.



**Obr. 16** Cytotoxické pôsobenie štandardov liečiv - amfotericinu B a tamoxifenu na bunkovú líniu HepG2 po 24 hodinovej inkubácii.

Obr. 16 znázorňuje graf závislosti viability buniek na rastúcej koncentrácii dvoch liečiv so vzájomne odlišným cytotoxickým účinkom.

V prípade amfotericinu, možno z hodnoty IC<sub>50</sub> > 500 µM dedukovať zanedbateľný cytotoxický potenciál na bunkovú líniu HepG2, s ktorou bol inkubovaný po dobu 24 hodín v koncentračnej rade o rozsahu 1 – 1000 µM. Obecne, je amfotericin liečivom, nepôsobiacim toxicky na pečňové bunky, v experimente bol použitý ako negatívna hepatotoxická kontrola. Tamoxifen, naopak figuruje ako pozitívna kontrola, na bunky pôsobí toxicky, koncentrácia, pri ktorej dochádzalo k 50% inhibícii je 19,56 µM.

## 6. Diskusia

Výskum nových liečiv stále napreduje, hľadajú sa účinné látky nielen pre terapiu vzácnych ochorení, kde zatiaľ liečba nie je dostupná, ale rozširuje sa aj profil bežných skupín liečiv s cieľom nálezu molekuly, ktorá bude javiť lepšiu účinnosť, mať menej nežiadúcich účinkov a interakcií, objavujú sa nové cielené liekové formy s lepšou biodostupnosťou. Na seba nadväzujúce fázy vývoja zabezpečujú, že predtým, ako je liečivo zavedené do praxe, je preukázaná jeho účinnosť a bezpečnosť (Součková et al. 2015).

Táto diplomová práca bola zameraná na testovanie vývojových látok v *in vitro* podmienkach, ktoré sú súčasťou preklinického výskumu. Ten postupne prechádza cez testovanie *in vivo* (na zvieracích modeloch) až ku klinickému skúšaniu na ľudských dobrovoľníkoch. *In vitro* experimenty znižujú počet pokusných zvierat, predchádzajú zbytočným nebezpečným účinkom u človeka, slúžia k preskúmaniu farmakologických vlastností, znášanlivosti, toxicity a veľkosti dávky, ktorá toxicitu ovplyvní (Součková et al. 2015).

Študované látky, pracovne označené ako JZ195, JZ186, MH17, JZ178, MH9, MH18, JZ177, JZ170, JZ172 a JZ174) sú derivátmi pyrazin-2-karboxamidu, vyvinuté boli za účelom pôsobenia proti mykobakteriálnym kmeňom. Veľká časť liečiv dnes stráca svoj terapeutický účinok z dôvodu vzrastajúcej rezistencie, práve preto je dôležitý progres v oblasti výskumu nových účinných látok (Solovič I. 2018).

Modelom našej *in vitro* štúdie boli pečňové bunky HepG2. Až 50% prípadov akútneho zlyhania pečene, je následkom podávania liečiv. Toxicita je väčšinou závislá na dávke, často vzniká kombináciou viacerých liekov. Antituberkulotika sú jednou z hlavných skupín liečiv spôsobujúcich hepatotoxicitu, v terapii sa vzájomne kombinujú, čím sa prehlbuje ich toxický potenciál. Poškodenie pečene sa následne vyskytuje až u tretiny pacientov, práve preto sa venuje pozornosť monitoringu, preklinickým testom a vývoju bezpečnejších liečiv (Červený P. 2013).

Cytotoxicitu sme stanovovali komerčne dostupnou, kolorimetrickou metódou, CellTiter96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay od spoločnosti Promega Corporation, ktorá kvantifikuje počet životaschopných buniek. Test je závislý od prítomnosti činidla, v tomto prípade, MTS pridávaného k bunkám s testovanými látkami. Po spoločnej inkubácii vzniká, pri zachovanej metabolickej aktivity buniek, rozpustný

formazanový produkt, intenzita jeho sfarbenia sa premeriava spektrofotometricky a je priamo úmerná počtu viabilných buniek (Promega Corporation 2012, Riss et al. 2013).

Výhodou MTS metódy je hlavne nekomplikované, rýchle prevedenie a pomerne vysoká spoľahlivosť bez výraznej ekonomickej záťaže. Naopak, nedostatok predstavuje fakt, že absorbancia je výrazne ovplyvnená podmienkami – inkubačnou dobou, typom a počtom buniek, množstvom pridaného činidla, čo môže negatívne ovplyvniť výslednú citlivosť metódy (Aslantürk 2018).

Mieru cytotoxického účinku sme posudzovali na základe parametra  $IC_{50}$ , získaného prostredníctvom nelineárnej regresie. Všetky látky boli testované v koncentračnom rozmedzí 1 – 1000  $\mu\text{M}$ , vrátane amfotericinu B, ktorý na pečňové bunky nepôsobí toxicky a slúžil ako negatívna kontrola. Jeho experimentálne zistená hodnota  $IC_{50}$  bola  $> 500 \mu\text{M}$ , čo danú teóriu potvrdilo. Štandardom pozitívnej hepatotoxicity bol graf pôsobenia tamoxifenu na bunkovú líniu HepG2 s výslednou hodnotou  $IC_{50} = 19,56 \mu\text{M}$ .

Značným problémom v stanovení bola precipitácia látok v bunkovom médiu, kvôli ktorej sme nedokázali určiť výsledné stredné inhibičné koncentrácie s dostatočnou presnosťou. Ich výsledné hodnoty vychádzajú z počiatkových koncentrácií, pri ktorých sme nepozorovali vznik precipitátu.

Ak by sme mali vzájomne porovnať cytotoxické pôsobenie látok, berúc do úvahy len danú časť koncentračných rozmedzí, dvojicou látok s najsilnejším inhibičným účinkom z celej skúšanej škály sú látky JZ178 a MH17 s  $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ . Najväčšiu hodnotu  $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$  dosiahli látky JZ177 a MH18.

Zoradením celého testovaného spektra látok podľa klesajúcej toxicity dostaneme radu: JZ178 ~ MH17 ( $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ )  $>$  JZ172 ~ JZ174 ( $IC_{50} > 25 \mu\text{M}$ )  $>$  JZ195 ~ JZ186 ~ JZ170 ~ MH9 ( $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$ )  $>$  JZ177 ~ MH18 ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

K získaniu dostatočne validných dát je nutné, v štúdiu pokračovať po upravení podmienok natoľko, aby látky pri teste neprecipitovali a neskreslili finálny výsledok. Možnosťou môže byť použitie rozdielnej metódy, vhodného rozpúšťadla, prípadne technologické zvýšenie rozpustnosti.



## 7. Záver

Náplňou práce bolo stanovenie cytotoxicity desiatich antimykobakteriálnych látok v *in vitro* podmienkach s využitím metódy redukcie tetrazoliovej soli (CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). Toxicitu sme určili po 24-hodinovej inkubácii na bunkovej línii HepG2, rovnako u liečiv amfotericinu B a tamoxifenu predstavujúcimi porovnávacími štandardy.

Výsledné hodnoty stredných inhibičných koncentrácií látok sa nám nepodarilo presne stanoviť z dôvodu nedostatočnej rozpustnosti látok v bunkovom médiu. Cytotoxické pôsobenie môžeme porovnávať len v rámci určitého rozmedzia koncentrácií, v ktorých ešte nedochádzalo k precipitácii. Na základe získaných hodnôt a porovnaním s účinkom použitých štandardov možno všetky testované látky, označiť za toxické pre líniu buniek HepG2.

Obecne možno zhodnotiť, že testované látky pôsobia na líniu buniek HepG2 toxicky, ale keďže boli hodnoty  $IC_{50}$  stanovené len z časti koncentrácií, nepredstavujú reprezentatívny toxikologický výsledok.

## 8. Zoznam skratiek

ATP	adenozintrifosfát
CYP450	cytochróm P450
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium
DMSO	dimethylsulfoxid
ECACC	The European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetálne bovinné sérum
GSH	glutathion
HepG2	bunečná línia izolovaná z nádorových buniek pečene
IC <sub>50</sub>	stredná inhibičná koncentrácia
INT	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid
LDH	laktátdehydrogenáza
MAO	monoaminoxidáza
MEM	minimálne esenciálne médium
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> komplex
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup>	nikotínamidadeníninukleotid – oxidovaná forma
NADH/H <sup>+</sup>	nikotínamidadeníninukleotid – redukovaná forma
NADPH	nikotínamidadeníninukleotidfosfát
NTM	netuberkulózne mykobaktérie

PHH	ľudské hepatocyty
TBC	tuberkulóza
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
WSTs	vo vode rozpustné tetrazoliové soli
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

## 9. Použitá literatura

AMBROŽOVÁ J. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. 226 s. ISBN 80-7080-521-8. Kapitola 10.3.: Třídy toxicity látek, s. 197.

Anonym. Amphotericine B. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3425912.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3425912.htm)

Anonym. ATP Assays. In *Promega* [online]. 2022 [cit. 2022-07-09]. Dostupné z:

<https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/atp-assays/#:~:text=ATP%20assays%20are%20procedures%20that,as%20colorimetric%2C%20fluorescent%20and%20bioluminescent>

Anonym. Bedaquiline. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB12473722.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB12473722.htm)

Anonym. CellTiter96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System - Technical Bulletin. In *Promega* [online]. Naposledy upravené 12/2022 [cit. 2022-08-30]. Dostupné z:

<https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-mts/?catNum=G3582#protocols>

Anonym. Clofazimine. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6273466.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6273466.htm)

Anonym. Dapsone. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB0152851.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0152851.htm)

Anonym. Delamanid. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z:

[https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB82512523.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB82512523.htm)

Anonym. Ethambutol. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3324345.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3324345.htm)

Anonym. GSH-Glo™ Glutathione Assay. In *Promega* [online]. 2022 [cit. 2022-07-09]. Dostupné z: [https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh\\_glo-glutathione-assay/?catNum=V6911](https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/gsh_glo-glutathione-assay/?catNum=V6911)

Anonym. HepG2 Cell Line human. In *Sigma-Aldrich* [online]. 2022 [cit. 2022-07-26]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/product/sigma/cb\\_85011430](https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/product/sigma/cb_85011430)

Anonym. Isoniazid. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_en.aspx?kwd=isoniazid](https://www.chemicalbook.com/ProductList_en.aspx?kwd=isoniazid)

Anonym. *Laktátdehydrogenáza* [online]. Naposledy upravené 17.03.2018 [cit. 2022-07-09]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Laktátdehydrogenáza#/media/Soubor:LDH\\_reaction.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/Laktátdehydrogenáza#/media/Soubor:LDH_reaction.svg)

Anonym. Pyrazinamide. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7429387.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7429387.htm)

Anonym. Rifampicin. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7474473.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7474473.htm)

Anonym. Streptomycin. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB3462887.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3462887.htm)

Anonym. Tamoxifen. In *ChemicalBook* [online]. 2022 [cit. 2022-08-30]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9438781.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9438781.htm)

Anonym. *Úvod do živočišných buněčných kultur* [online]. Vytvorené 01.09.2020 [cit. 2022-07-26]. Dostupné na URL: <https://www.baria.cz/blog/uvod-do-zivocisnych-bunecnych-kultur/>

Arzumanian VA et al. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. In *Int J Mol Sci.* [online]. 2021 Dec 4, 22(23):13135 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.3390/ijms222313135. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884942/>

Aslantürk Ö. S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. 2018 [cit. 2022-07-05]. doi: 10.5772/intechopen.71923. Dostupné z: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/57717.pdf>

Askin Celik T et al. Introductory Chapter: Cytotoxicity. In *Cytotoxicity* [online]. London: IntechOpen, 2018 July 25 [cit. 2022-07-05]. doi: 10.5772/intechopen.77244. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/61438>

Brůčková Lenka. STANOVENÍ CYTOTOXICITY LÉČIV IN VITRO (XTT ASSAY) [online]. 2015 [cit. 2022-07-05]. 5 s. Dostupné z: [https://www.upce.cz/sites/default/binary\\_www\\_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/cytotoxocita.pdf](https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/cytotoxocita.pdf)

Cambau E., Williams, D. L. Anti-leprosy drugs: Modes of Action and Mechanisms of Resistance in *Mycobacterium leprae*. In *The International Textbook of Leprosy* [online]. 2019 [cit. 2022-08-23]. 33 s. Dostupné z: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/anti-leprosy-drugs-modes-action-and-mechanisms-resistance-mycobacterium-leprae>

Červený P. Polékové poškození jater. In *Praktické lékárenství* [online]. 2013, 9(3):123-126 [cit. 2022-08-24]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/03/06.pdf>

DrugBank online. DrugBank Summary for DB00339 [online]. 2022 [cit. 2022-08-23]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00339>

Franco-Paredes C et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. In *Clin Microbiol Rev.* [online]. 2018 Nov 14, 32(1):e00069-18 [cit. 2022-08-23]. doi: 10.1128/CMR.00069-18 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6302357/>

Gleichmann N. Which Cell Culture Media Is Right for You? In *Technology Networks* [online]. Naposledy upravené 29.03.2022 [cit. 2022-07-26].

Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/which-cell-culture-media-is-right-for-you-331552>

Gopalaswamy R et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. In *J Biomed Sci.* [online]. 2020 Jun 17, 27(1):74 [cit. 2022-08-23]. doi: 10.1186/s12929-020-00667-6.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7297667/>

Guillouzo A. Liver Cell Models in in Vitro Toxicology. In *Environ Health Perspect* [online]. 1998, 106 Suppl 2: 517-518 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.1289/ehp.98106511.

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9599700/>

HARTL, J et al. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2012. 166 s. ISBN 978-80-246-2129-6.

Kammerer S et al. Human Hepatocyte Systems for *in Vitro* Toxicology Analysis. In *Journal of Cellular Biotechnology* [online]. 2018, vol. 3, no. 2: 85-93 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.3233/JCB-179012. Dostupné z: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-cellular-biotechnology/jcb179012>

Kamiloglu, S et al. Guidelines for cell viability assays. In *Food Frontiers* [online]. 2020, 1: 332– 349 [cit. 2022-07-05]. doi: <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.

Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fft2.44>

Keute V et al. Chapter 10 – Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* [online]. 2017: 271-297 [cit. 2022-08-25].

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128092866000108>

Kniewald J et al. Alternative Models for Toxicity Testing of Xenobiotics. In *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* [online]. 2005, 56(2):195-204 [cit. 2022-06-19].

Dostupné

z:

[https://www.researchgate.net/publication/7774253\\_Alternative\\_models\\_for\\_toxicity\\_testing\\_of\\_xenobiotics](https://www.researchgate.net/publication/7774253_Alternative_models_for_toxicity_testing_of_xenobiotics)

LiverTox. Tamoxifen. In *Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. Naposledy upravené 20.08.2020 [cit. 2022-08-30]. Dostupné z:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548902/#:~:text=\(Review%20of%20hepatotoxicity%20of%20tamoxifen,hepatic%20necrosis%20and%20liver%20cancer\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548902/#:~:text=(Review%20of%20hepatotoxicity%20of%20tamoxifen,hepatic%20necrosis%20and%20liver%20cancer))

Llibre A et al. Host Immune-Metabolic Adaptations Upon Mycobacterial Infections and Associated Co-Morbidities. In *Front Immunol.* [online]. 2021 Sep 23, 12:747387 [cit. 2022-08-23]. doi: 10.3389/fimmu.2021.747387

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8495197/>

Losse S. Netuberkulózní mykobakteriální onemocnění – editorial. Komentár k: Královcová M. et al. Netuberkulózní mykobakteriální onemocnění: review na podkladě kazuistiky. In *Vnitřní lékařství* [online]. 2019, 65(5): 333-336 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2019/05/01.pdf>

Mueller H et al. Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines. In *Journal of Biomolecular Screening* [online]. 2004: 9(6) [cit. 2022-07-05].

Dostupné z: [https://www.slas-discovery.org/article/S2472-6303\(22\)00316-8/pdf](https://www.slas-discovery.org/article/S2472-6303(22)00316-8/pdf)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 14052, Ethambutol [online]. 2022 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethambutol>

Noor A., Preuss V. Ch. Amphotericin B. In *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Naposledy upravené 04.07.2022 [cit. 2022-07-27].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482327/>



Pokorná A et al. Stanovení toxicity binárních směsí pomocí hepatocytů z potkana. In *Chemické listy* [online]. 2009: 103, 575-580 [cit. 2022-06-26].

Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_07\\_575-580.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_575-580.pdf)

Riss et al. CHOOSING THE RIGHT CELL-BASED ASSAY FOR YOUR RESEARCH. In: *CELL NOTES* [online]. 2003, ISSUE 6 [cit. 2022-07-05]. Dostupné z: [https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en\\_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/publications/promega-choosing-cell-based-assay-publication.pdf](https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/publications/promega-choosing-cell-based-assay-publication.pdf)

Riss TL et al. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013. Naposledy upravené: 01.07.2016 [cit. 2022-07-05].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems *In Vitro*. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* [online]. 2017:151–72 [cit. 2022-06-19].

doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128030776000096>

Solovič I. Mykobakteriózy vyvolané netuberkulóznymi mykobaktériami – poznatky pre klinickú prax. In *Dermatológia pre prax* [online]. 2018, 12(1): 26-30 [cit. 2022-08-23].

Dostupné

z:

<https://www.solen.sk/storage/file/article/9dcf9775585848d165717553e2a86c93.pdf>

Solovič I. et al. Štandardný postup pre tuberkulózu pľúc. In *Ministerstvo zdravotníctva SR* [online]. 2020, dátum schválenia: 01.04.2020 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <https://www.health.gov.sk/?Standardne-Postupy-V-Zdravotnictve>

Součková et al. Jak se vyvíjí nový lék. In *Praktické lékárenství* [online]. 2015, 11(4): 144-147 [cit. 2022-08-24].

Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/04/07.pdf>

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Curr Protoc Immunol*. [online]. 2015 Nov 2, 111:A3.B.1-A3.B.3 [cit. 2022-07-05]. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6716531/>

Súhrn charakteristických vlastností lieku BENEMICIN 150mg. In *ADC*. Dátum revízie textu: 06/2020 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/benemicin-150-mg-871716.html>

Švihovec J et al. *Farmakologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2018: 97-98. ISBN 978-80-247-5558-8.

Tabernilla A. et al. In Vitro Liver Toxicity Testing of Chemicals: A Pragmatic Approach. In *Int J Mol Sci*. [online]. 2021 May 10, 22(9): 5038 [cit. 2022-06-19]. doi: 10.3390/ijms22095038.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8126138/>

Truman, A. and Hook, B. Differentiating Changes in Glutathione Levels from Cytotoxic Events Using Multiplexed Assays. In *Promega Corporation* [online]. 2013 [cit. 2022-07-05]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/differentiating-changes-in-glutathione-levels-from-cytotoxic-events/>

Vašáková, M. et al. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. In *Remedia* [online]. 2016, ročník 26, číslo 3, s. 236 – 241 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <file:///C:/Users/User/Desktop/R2016-03-Vasakova-Soucasny-pristup-k-diagnostice.pdf>

Vernetti AL et al. Evolution of Experimental Models of the Liver to Predict Human Drug Hepatotoxicity and Efficacy. In *Clin Liver Dis*. [online]. 2017 Feb, 21(1): 197–214 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.1016/j.cld.2016.08.013.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325638/>

Vinken M, Blaauboer BJ. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. In *Toxicol In Vitro* [online]. 2017 Mar, 39:104-110 [cit. 2022-06-19]. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.004.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5608076/>

Wilkening S et al. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HEPG2 with regard to their biotransformation properties. In *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* [online]. 2003, 31(8): 1035-42 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.1124/dmd.31.8.1035. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/10655700\\_Comparison\\_of\\_primary\\_human\\_hepatocytes\\_and\\_hepatoma\\_cell\\_line\\_HEPG2\\_with\\_regard\\_to\\_their\\_biotransformation\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/10655700_Comparison_of_primary_human_hepatocytes_and_hepatoma_cell_line_HEPG2_with_regard_to_their_biotransformation_properties)

World Health Organization. Leprosy. In *WHO* [online]. 2022 [cit. 2022-08-23].

Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>

Zeilinger K et al. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. In *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016 July 5, 241(15):1684-98 [cit. 2022-07-26]. doi: 10.1177/1535370216657448.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999620/>