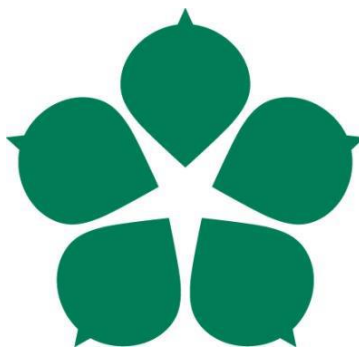


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Potenciální antivirotické účinky derivátů přírodních látek proti viru
klíšťové encefalitidy.

Bakalářská práce

Radomír Vokurka

Školitel: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice 2016

Vokurka, R., 2016: Potenciální antivirotické účinky derivátů přírodních látek proti viru klíšťové encefalidity. [Potential antiviral effects of derivatives of natural compounds against tick-borne encephalitis virus. BSc. Thesis, in Czech.] 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study was focused on potential antiviral effects of adamantane and its derivatives. Using flow cytometer was determined the most suitable concentration of adamantane and its derivatives which was not harmful for cells. The antiviral effect was measured on glioblastoma cells which were infected with tick-borne encephalitis virus. Virus concentration was determined using plaque assay.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 12.12. 2016

.....

Radomír Vokurka

Poděkování

Veliké díky patří mému školiteli RNDr. Jankovi Štěřbovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a všechny velmi užitečné rady, které mi za dobu práce v laboratoři udělil. Dále bych rád poděkoval Martinovi s Pájou, kteří mi vždycky ochotně pomohli, když jsem cokoliv potřeboval a dále pak zbytku laboratoře za vytvoření příjemného a přátelského prostředí. V neposlední řadě bych taky rád poděkoval mojí přítelkyni a rodině za psychickou podporu v průběhu mého studia. Takže ještě jednou, DĚKUJI!

Obsah

Úvod	1
LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
Adamantany	2
Viry	5
Antivirotika	6
Virus klíšťové encefalitidy	8
Antivirová terapie a prevence klíšťové encefalitidy	11
CÍLE PRÁCE	12
ROZTOKY A MÉDIA	13
MATERIÁL A METODY.....	14
Vybrané přírodní látky.....	14
Použité buněčné linie	14
Optimalizace koncentrace přírodních látek	14
Ředící řady látek	15
Počítání živých buněk	15
Průtoková cytometrie	15
Virus klíšťové encefalitidy	16
Infekce virem klíšťové encefalitidy.....	17
Plaková titrace	18
Cytotoxicita studovaných látek	18
Inhibice cytopatického efektu	19
VÝSLEDKY.....	20
Optimalizace koncentrace vybraných přírodních látek.....	20
Replikace viru KE v přítomnosti studovaných látek	24
Cytotoxicita studovaných látek	26
Cytopatický efekt studovaných látek	27
Porovnání výsledků plakové titrace s testem cytotoxicity	30
DISKUZE	33
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36

Úvod

Je tomu již od starověku, kdy se začaly v lékařství využívat nejrůznější přírodní látky. Jejich znalost se od té doby výrazně zvětšila, avšak v dnešní době mají léky na přírodní bázi velkou konkurenci mezi synteticky připravovanými látkami. Léky založené na přírodní bázi mají však obrovskou výhodu. Nejenže mohou působit současně proti bakteriím, virům, ale i plísním, dokonce kvůli složitějším mechanismům jejich působení snižují možnost vzniku rezistentních mutantů (Jonáš, 2014).

I když je v dnešní době většina léčebných metod založena právě na syntetických látkách, mnoho lidí z celého světa stále věří v sílu přírodních látek a pokračují dále touto cestou. V mojí práci se dále budu zabývat využitím vybraných přírodních látek o různých koncentracích při léčbě klíšťové encefalitidy a jejich dopadu na organismus.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Adamantany

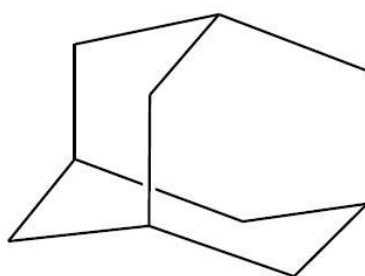
Adamantan (diamantoid), který se dá svým chemickým složením zařadit mezi cykloalkany, byl poprvé izolován jakožto nežádoucí produkt při frakční destilaci hodonínské ropy. Stalo se tak počátkem třicátých let minulého století, kdy byl objeven spolu s dalšími od něj odvozenými sloučeninami, které se téměř ihned těšily využití i v nejrůznějších odvětvích chemického průmyslu. Hodonínská ropa však nebyla jediná, kde byla přítomnost adamantanu potvrzena. Po druhé světové válce byl objeven v americké a francouzské ropě (Wingert, 1992). Tyto látky s vysokým bodem tání představovaly při těžbě komplikaci, protože kondenzovaly v předloze. Z počátku byl tento uhlovodík purifikován ve velmi malém množství opakovanou frakční destilací. V pozdější době byl objeven o něco efektivnější způsob za pomoci extrakční krystalizace s thiomocovinou. Obě zmíněné metody se dočkaly využití pouze na krátkou dobu, za účelem získání dostatečného množství tohoto uhlovodíku, který by byl dostačující k vynalezení nové efektivnější syntetické metodiky. Průměrná koncentrace adamantanu v hodonínské ropě se totiž pohybovala pouze v rozmezí 0,02-0,03%. Za zmínku stojí, že z 66 kg ropné frakce, která se destilovala s vodní parou, bylo získáno pouze 200g adamantanu. Zajímavé na tomto faktu je, že i přes mnohá snažení nejrůznějších vědců se zatím nepodařilo jednoznačně prokázat, jakým způsobem se adamantan do ropy dostal (Vícha a Potáček, 2004). Jedna z teorií nás přivádí na abiotickou cestu vzniku adamantanů. Tato cesta byla potvrzena v roce 1957, kdy se pomocí experimentů zjistilo, že adamantan vzniká přesmykem tricyklického uhlovodíku za přítomnosti kyselého katalyzátoru (Obr. 1) (Schleyer, 1957).



Obrázek 1: Přesmyk tetrahydrodicyklopentadienu na adamantan (Schleyer, 1957).

Adamantan a jeho deriváty můžeme kromě ropy nalézt byt' ve stopovém množství téměř všude okolo nás. O něco hojnější je diamantan a minerály s podobnou strukturou (Vícha a Potáček, 2004).

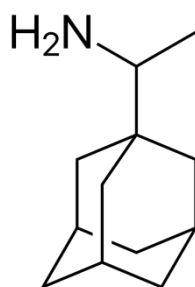
Adamantan (Obr. 2) se svojí strukturou $C_{10}H_{16}$ je znám svojí minimální vazebnou energií, a tak lze pro jeho přípravu používat i přesmyky katalyzované Lewisovými kyselinami. V současné době se uplatnění tohoto cykloalkanu přesunulo především do elektrotechnického průmyslu, kosmetiky, farmacie a nanotechnologií (Vícha a Potáček, 2004).



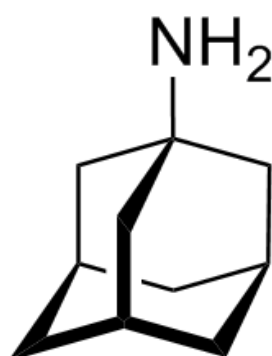
Obrázek 2: Vzorec adamantanu.

V čem vlastně spočívá výhoda používání adamantanu? Jde především o jeho malou velikost, která je cca 10 nm a dále pak o jeho strukturu. V molekule adamantanu neexistuje skoro žádné pnutí, což způsobuje vysokou termickou stabilitu a látka je schopna odolat i oxidačním činidlům jako je například HNO_3 nebo $KMnO_4$. Diamantoidy jsou také známé tím, že jsou až dvěstěpadesátkrát pevnější než titan, ale zato mnohonásobně lehčí. Z tohoto důvodu se diamantoidy využívají i při stavbě raket či letadel. Zajímavější využití zaujímá ve farmacii jako pouzdro při transportu léků a to tak, že do pouzdra se umístí například léčivé látky, které jsou poté dopraveny do buněk (Ramezani, 2007).

Mezi adamantany, které se vyznačují specifickými vlastnostmi využitelnými ve farmacii jsou například rimantadin (1-(1-adamantyl)ethylamin), který se prodává pod názvem Flumadin (Obr. 3) a amantadin (1-aminoadamantan) neboli Symmetrel (Obr. 4).



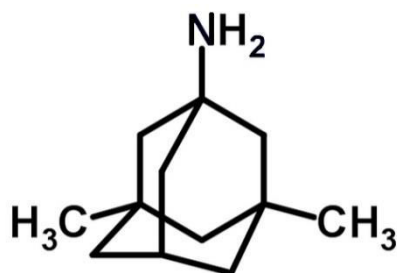
Obrázek 3: Vzorec Flumadinu.



Obrázek 4: Vzorec Symmetrelu.

Flumadin je antivirotikum, bráníci organismus před virem chřipky typu A, zatímco Symmetrel potlačuje projevy parkinsonismu a podává se při snížené hybnosti. Obě látky mají relativně dlouhý poločas rozpadu, což prodlužuje trvání jejich účinku (Mansoori, 2007).

Jak již bylo zmíněno, využití diamantoidů v průmyslu je různorodé a i nadále jsou syntetizovány nové a nové deriváty s podobnými či novými, stále neprozkoumanými účinky. Z významných derivátů adamantanu budu jmenovat zástupce, kteří jsou účinní v boji proti Parkinsonově chorobě – Symmetrel (Obr. 4) a Namenda (Obr.5) (3,5-dimethyl-1-aminoadamantan) (Mirzoyan a kol., 2014).



Obrázek 5: Vzorec Nemenda.

Zabránění replikace nebezpečného viru dengue či zlepšení prokrvování mozku a s ním spjatá léčba demence, za tímto vším stojí právě amantadin a memantin (Koff, 1980).

Viry

Viry jsou velmi malé, infekční organismy nebuněčné povahy, které svojí genetickou informaci uchovávají v podobě DNA nebo RNA. U některých druhů může být genetická informace zabalena v proteinové kapsidě (Emiliani, 1993). Viry řadíme mezi intracelulární parazity. Do této skupiny byly zařazeny pro svojí neschopnost replikovat se mimo hostitelské buňky. Viry využívají buňku především jako zdroj energie, pro replikaci jejich nukleové kyseliny, syntézu proteinů či intermediární metabolismus (Madigan, 2012). Velký skok v pozorování virů přišel roku 1939, kdy byl použit elektronový mikroskop značky Siemens. Do té doby se úspěchem mohl pochlubit například Dimitriev Ivanovski, který roku 1892 objevil virus tabákové mozaiky, což byl do té doby vůbec první popsáný vir (Zaitlin, 1998). Na otázku, jak vlastně viry vznikly, se dlouho hledala odpověď, nakonec se dospělo k názoru, že RNA viry vznikly z uvolněné mRNA a DNA viry z osamocené plazmidu (Schindler, 2014).

Pokud se vir dostane do hostitelské buňky, v podstatě převezme kontrolu nad jejími funkcemi. Tím pádem začne docházet k větší produkci virových proteinů a genetického materiálu namísto tvorby obvyklých produktů. Některé viry mohou přejít do tzv. lysogenní fáze, ve které dokážou bez povšimnutí přečkávat velmi dlouhou dobu. Za vhodných podmínek poté vstoupí do lytické fáze, ve které dochází k již zmíněné produkci virových proteinů a genetického materiálu, následované sestavením nového viru, opuštěním stávající buňky a infikováním dalších buněk (Emiliani, 1993).

Viry jsou vysoce specifické organismy, které se rozlišují v závislosti na jejich genetické informaci. Rozlišujeme jedno- a dvouvláknové DNA viry, jedno- a dvouvláknové RNA viry a dále pak retroviry. Jelikož jsou viry schopné infikovat pouze určitého hostitele, můžeme je na základě tohoto faktu rozdělit na živočišné, rostlinné viry a viry infikující bakterie neboli bakteriofágy (Schindler, 2014).

Byť nebyly dochovány žádné zkamenělé pozůstatky virů, předpokládá se, že viry existovali již mnoho desítek milionů let před lidmi. Viry by teoreticky mohly mít v dřívějších dobách podíl na masovém vymírání živočišných druhů, například dinosaurů (Emiliani, 1993).

Antivirotika

Viry jsou celosvětově rozšířené organizmy, které představují nejčastější příčinu onemocnění a smrti u lidí. Byla to právě antivirotika, která se ukázala jako nejefektivnější při léčbě a zpomalování šíření infekčních virů. Nicméně stále existuje mnoho virů, proti kterým ještě nebylo vynalezeno to pravé antivirotikum – plně funkční, bez nežádoucích účinků. Vědci po celém světě se také musejí potýkat s problémem samovolného vývoje rezistentních mutantů, kteří komplikují jejich práci při léčení pacientů (Gong, 2013).

Viry a nemoci s nimi spojené byli ještě před šedesáti lety velmi špatně léčitelné. Nicméně díky velkému pokroku v oblasti vědy jsou vyráběna neustále nová, dokonalejší antivirotika a způsoby léčby různých virových onemocnění. Tento pokrok jednoznačně zlepšil kvalitu života a péče o pacienty v různých částech světa. Na druhou stranu se vždy objeví nějaký nový kmen daného viru, nebo si na danou léčbu vytvoří virus po čase imunitu, a tak se kromě virů v průběhu času stále mění i metodika jejich léčby (Kinchington, 2000).

Na rozdíl od antibiotik, antivirotika daný patogen nezničí, jen inhibují jeho růst a replikaci. Významný milník v boji proti zákeřným virům přišel s objevem tzv. methisazonu. Methisazon zaznamenal velký úspěch v boji proti epidemii neštovic roku 1963 v Čennaj. Kromě neštovic je dalším typickým virovým onemocněním chřipka. Právě k boji proti chřipce byl použit amantadin (Obr. 4) a jemu podobný rimantadin. Amantadin je tricyklický amin, který brání průniku viru přes buněčnou membránu a tím zabraňuje uvolnění jeho nukleové kyseliny. Kromě léčby chřipky se využívá i k léčbě Parkinsonovy choroby (Kinchington, 2000).

Velkou skupinou antivirotik jsou retrovirová antivirotika, která zpomalují šíření viru organismem a prodlužují tak život pacienta s HIV. Do této významné skupiny patří látky jako zidovudin, sanquinavir, stavudin, tenofovir a adefovir (Hampl, 2002).

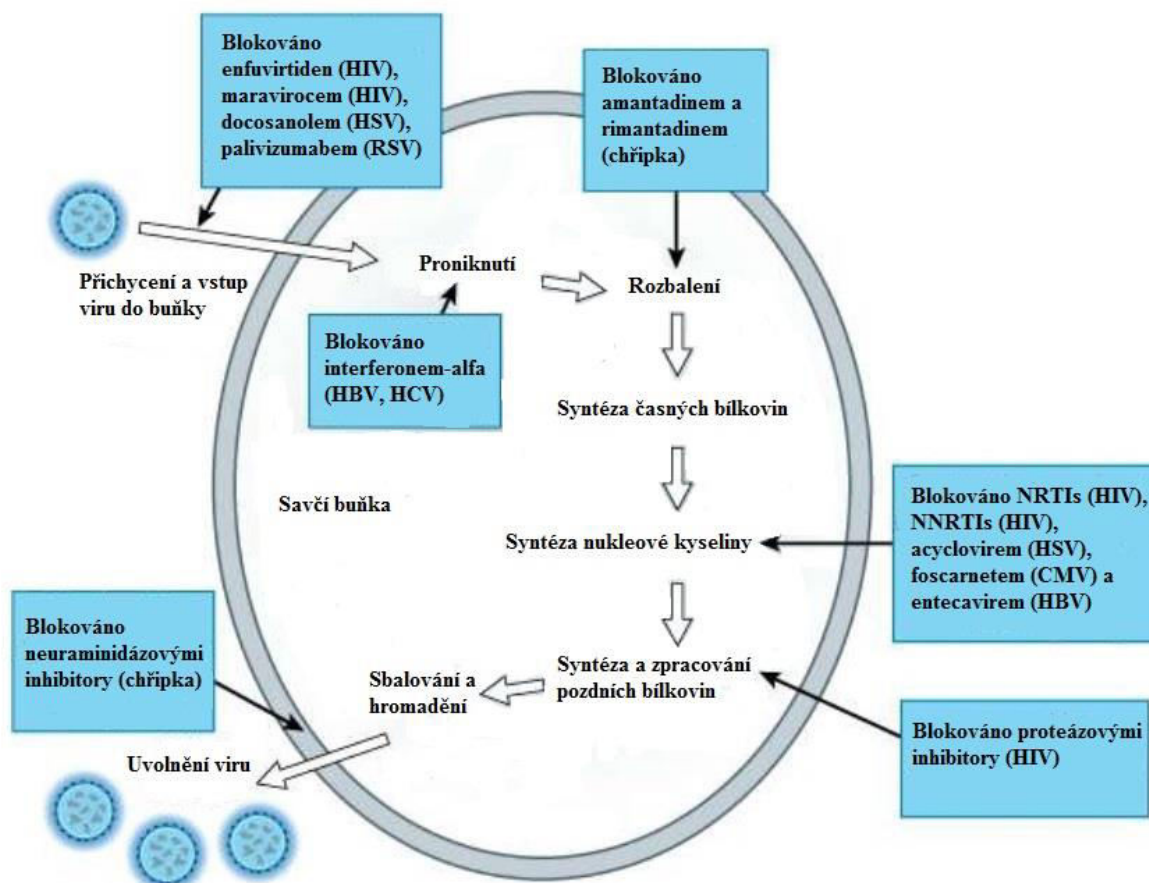
Zidovudin řadíme do antivirotik, které inhibují množení retrovirů a slouží tak k snížení počtu virionů HIV v těle, čímž napomáhá imunitnímu systému hostitele (Volberding, 1990). Využívá se také v těhotenství, kdy se podává nemocné matce, aby se vir HIV nepřenesl i na nenarozené miminko (Cooper, 1996). Sanquinavir je peptid, který potlačuje aktivní centrum virové proteázy a tím negativně ovlivňuje zrání virů. Stavudin působí v buňce na syntézu DNA viru HIV reverzní transkriptázou. Mezi nejefektivnější léčivé látky, které působí proti HIV, řadíme tenofovir a adefovir. Tyto dvě látky jsou známé jako přímé inhibitory reverzní transkriptázy, tudíž účinkují okamžitě a nepotřebují žádnou předchozí aktivaci. Mezi ostatní antivirotika řadíme například interferony α , β a γ nebo také ribavirin působící na DNA i RNA viry (Hampl, 2002).

Dalším způsobem boje proti virům je imunoterapie a chemoterapie. Imunoterapii rozdělujeme na aktivní a pasivní. Aktivní se využívá pro léčbu rakoviny nebo chronických infekcí, podáváním nádorových antigenů či samotných nádorových vakcín, které byly vytvořeny z nádorových buněk. Významným objevem je pasivní imunoterapie založená na podávání aktivovaných bílých krvinek nebo hotových protilátek (Waldmann, 2003). Právě pomocí pasivní imunoterapie byla vytvořena vakcína proti neštovicím, ale také například dětské obrně. Chemoterapie spočívá ve vpravování chemických látek do těla a dále úspěšně zabraňuje virům se množit a šířit po organismu (Hampl, 2002).

Rozšiřování virů závisí na schopnosti přichycení a průchodu virionů dovnitř hostitelské buňky. Některé látky samotné přichycení a následné vniknutí do buňky negativně ovlivňují (Taylor, 2012). Na tomto principu fungují bazické deriváty adamantanu, například již zmíněný amantadin. Deriváty adamantanu proto slouží k ochraně organismu před škodlivým virem tak jeho léčení. Nicméně jednotlivé deriváty mohou být účinné jen proti konkrétnímu virovému kmeni. Například amantadin neúčinkuje proti chřipce typu B, ale je velmi účinný při léčbě chřipky typu A (Hampl, 2002).

Velkou skupinu antivirotik představují látky, které inhibují syntézu nukleových kyselin viru. Hovoříme o nejrůznějších strukturních modifikacích nukleových bazí a hlavně nukleosidových bazí, které mohou mít pozměněnou i cukernou složku. Ke strukturním modifikacím dochází po začlenění modifikovaného nukleosidu do DNA

(popř. RNA) viru, což znemožní replikaci a tím pádem šíření viru (Hampel, 2002). Šíření viru v buňce je znázorněno níže (Obr. 6).



Obrázek 6: Koloběh viru v buňce (Katzung, 2009).

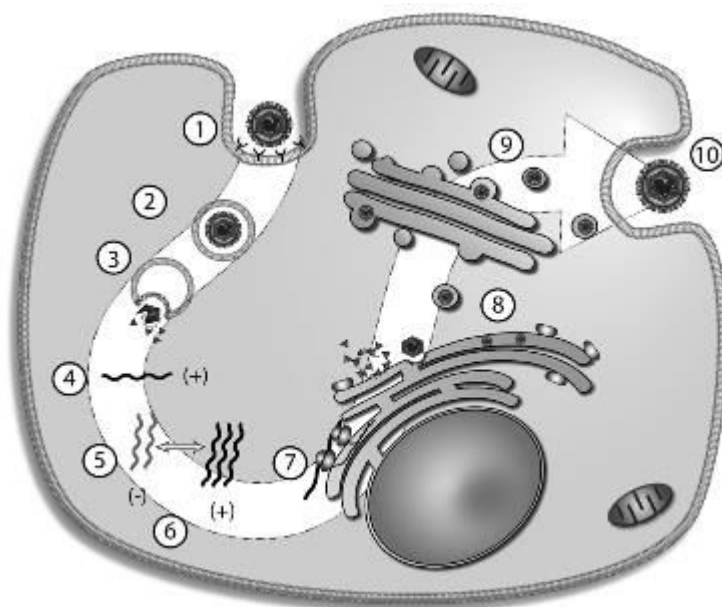
Virus klíšťové encefalidity

První lékařská zpráva o onemocnění tehdy ještě neznámým virem přišla roku 1931 z Rakouska. Od té doby začal zájem o výzkum tohoto viru stoupat. Velký úspěch byl zaznamenán v letech 1935-1937, kdy byl ve východní části Sovětském svazu popsán vůbec první kmen klíšťové encefalidity, jehož velikost se pohybuje okolo 50 nm (Bárdoš, 1965).

Tento vir byl zařazen mezi tzv. flaviviry, což je skupina do které spadá například virus dengue či virus žluté zimnice. Hlavními přenašeči těchto virů a nemocí s nimi spojenými jsou komáři a klíšťata. Virus klíšťové encefalidity (VKE) způsobuje závažné

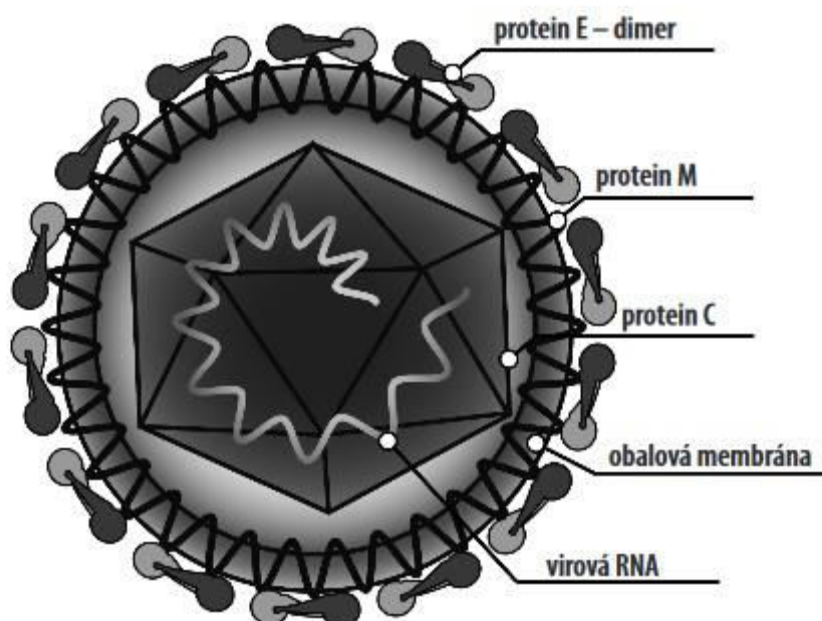
poškození centrální nervové soustavy, které může vyvrcholit až smrtí postiženého jedince. U VKE se můžeme setkat celkem se třemi odlišnými genotypy. Jde o evropský, dálnovýchodní a sibiřský subtyp (Bogovic, 2015). Při detailnějším rozboru můžeme tyto 3 subtypy rozdělit na další kmeny se značnými rozdíly ve virulenci. Příkladem toho jsou kmeny evropského subtypu, kam řadíme například kmen Neudoerfl anebo Hypr, který je mnohem virulentnější (Růžek, 2015).

Celý proces infekce buňky virem KE (Obr. 7) je zahájen ihned po nasednutí virionu na receptor. Receptory pro tyto viriony jsou umístěny na povrchu buňky a jejich navázání napomáhá protein E (Obr. 8) (Mansfield, 2009). Dále nastává endocytóza, která je spuštěna právě po nasednutí viru na receptor, a tak je možné vstřebání viru z vnějšího prostředí do buňky (Růžek, 2015).



Obrázek 7: Schéma replikace viru klíšťové encefalitidy v hostitelské buňce. (1) Vazba virové částice na receptor na povrchu hostitelské buňky; (2) receptorem zprostředkovaná endocytóza virové částice; (3) fúze virového obalu s membránou endozomu a uvolnění nukleokapsidy viru do cytoplazmy; (4) uvolnění virového genomu do cytoplazmy; (5 a 6) replikace virového genomu přes dvouřetězcový intermediát; (7) translace virové genetické informace do podoby polyproteinu; (8) v endoplazmatickém retikulu probíhá sestavování nových virových částic; (9) maturace virových částic v Golgiho komplexu; (10) uvolnění maturovaného viru do extracelulárního prostoru (grafika Patrik Kilian), (Růžek, 2015).

Zvýšení kyselosti uvnitř endozomu způsobuje konformační změny virového obalového glykoproteinu E. Tyto změny vyvolají splynutí buněčných membrán a vypuštění nukleokapsidy viru do buněčné cytoplasmy, kde je rozložena a tím pádem dochází k uvolnění virové RNA. Ta pak slouží jako templát pro syntézu nového virového polyproteinu. Je tomu tak z důvodu pozitivní polaritativy tohoto RNA viru. Konečným produktem této syntézy jsou nestrukturní i jednotlivé strukturní virové proteiny, které vznikly při štěpení polyproteinu (Mansfield, 2009).



Obrázek 8: Schéma stavby virionu viru klíšťové encefalidity (Růžek, 2015).

Komplementární vlákno s negativní polaritou je syntetizováno z pozitivní virové RNA za pomoci jednoho z nestrukturních proteinů. Toto negativní vlákno pak slouží pro vytvoření dalších virových kopií genomu a k jejich zařazení do právě vznikajících virových částic. Zrání viru klíšťové encefalidity může probíhat cestou *cis* a nebo *trans*. V prvním případě budou v průběhu zrání viriony kompletovány přímo v cytoplazmě. Až poté budou cestovat k membráně buňky, kde vypučí a získají tak svůj obal. Nakažená buňka pak má oddělené ribozomy od fragmentovaného endoplazmatického retikula. V druhém případě se při maturaci virové částice shlukují v měchýřcích endoplazmatického retikula. Odtud se dostanou až do Golgiho aparátu a dále pak k buněčné membráně odvozené z ER pomocí transportních váčků. K uvolnění virionu do extracelulárního prostoru dochází po fúzi buněčné membrány s membránou váčku. V takovémto případě se vyskytuje

u hostitele tzv. hypertrofované endoplazmatické retikulum. Bylo zjištěno, že u obratlovců se setkáváme s typem *trans*, zatímco v klíšťecích buňkách probíhá maturace typ *cis* (Růžek, 2015; Rajčáni 1937).

Antivirová terapie a prevence klíšťové encefalitidy

V dnešní době zatím neexistuje žádná stoprocentně efektivní léčebná terapie vůči viru KE. Zatím nejúčinnější metodou prevence se zdá být aktivní vakcína, která je vyrobena z formaldehydem inaktivovaného viru (Heinz, 2007). Čím dál častěji se můžeme mezi lidmi setkat s používáním nejrůznějších repelentů. Ty jsou však i v kombinaci s vhodným oblečením, jako jsou například dlouhé kalhoty a vysoká obuv, účinné jen z dvaceti procent (Vázquez, 2008).

Důležitá věc, na kterou je zapotřebí nezapomínat je, že naše imunita vykazuje dvojí roli – protektivní a patologickou, mezi kterými neexistuje jednoznačná hranice. Na jedné straně stojí imunosupresivní reakce, která sice zmírňuje imunopatologickou reakci v centrální nervové soustavě, ale na druhou stranu způsobuje oslabení našeho imunitního systému. U jedince s oslabeným imunitním systémem může dojít až k poškození tkáně mozku, konkrétně k napadení neurálních buněk virem. Tím pádem není možné spoléhat při terapii pouze na používání imunomodulačních látek. Mohlo by se totiž stát, že imunomodulace potlačí nejen patologickou reakci, ale i samotnou protektivní reakci, což by způsobilo enormní množení viru a následně poškození celé CNS. Prvním krokem k úspěšné terapii proti klíšťové encefalitidě by tedy mělo být věnování pozornosti inhibici množení viru, nejlépe za pomoci antivirotik a následného přidání imunomodulační látky, která by vedla k inhibici imunopatologické reakce (Růžek, 2015).

CÍLE PRÁCE

- Optimalizace vhodné koncentrace pro vybrané přírodní látky, konkrétně pro adamantan, 1-adamantan karboxylovou kyselinu, 2-adamantylamin hydrochlorid, 1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid a memantin hydrochlorid, která by nepoškozovala samotné buňky
- Infekce buněk, které byly ošetřeny vybranými přírodními látkami v odlišných časových intervalech
- Provedení plakové titrace mnou odebraných vzorků
- Zjištění titru viru u infikovaných buněk, které byly v různých intervalech ošetřeny vybranými přírodními látkami

ROZTOKY A MÉDIA

2 x L-15 MÉDIUM: 2x L-15 médium (Biowest), 2% směs antibiotik (amfotericin B 0,25 µg/ml; penicilin G 100 units/ml; streptomycin 100 µg/ml; Biowest), 6% prekolostrální sérum (Biowest).

KULTIVAČNÍ MÉDIUM PRO BUNĚČNOU LINII PS (Leibovitz's L-15 Medium): L-15 médium, 1% směs antibiotik (Biowest), 3% prekolostrální sérum.

KULTIVAČNÍ MÉDIUM PRO BUNĚČNOU LINII GLIOBLASTŮ (Iscove's Modified Duplecco's Medium, IMDM): IMDM médium, 10% fetální hovězí sérum, 1% glutamin a 1% směs antibiotik (Biowest).

FYZIOLOGICKÝ ROZTOK: 9 g NaCl na 1 l destilované vody.

PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS): 0,2 g KCl, 8 g NaCl; 2,68g Na₂HPO₄·7H₂O; 0,24g KH₂PO₄; doplněno do 1 l destilovanou vodou.

NAFTALENOVÁ ČERNĚ: 1g naftalenové černě; 13,6 g octanu sodného; 60 ml ledové kyseliny octové; doplněno do 1 l destilovanou vodou.

MTT: 5mg MTT (Sigma-Aldrich) rozpuštěno v 1 ml PBS.

TRYPANOVÁ MODŘ: C₃₄H₂₄N₆NA₄O₁₄S₄, 0,5 % roztok trypanové modři.

CARBOXYMETHYL CELLULOSE (CMC): 3% roztok karboxymethylcelulózy.

TRYPsinIZAČNÍ SMĚS: 0,02% trypsin + 0,02% EDTA v PBS (Biowest).

PROPIDIUM IODID (PI): Roztok propidium jodidu připravený pro přímé použití (Bio-Rad).

MATERIÁL A METODY

Vybrané přírodní látky

Mnou zkoumané přírodní látky byly adamantan a jeho deriváty, které mi byly dodány panem prof. RNDr. Janem Třískou, CSc, konkrétně 1-adamantan karboxylová kyselina, popř. komerčně dostupné deriváty, 1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid, amantadin hydrochlorid a memantin hydrochlorid. Všechny tyto látky byly dodány v podobě prášku, který byl smíchán se 100% DMSO. Tak byl připraven zásobní roztok o koncentraci 20 mg/ml. Z tohoto roztoku byl přidáním média a přefiltrováním vytvořen další zásobní roztok, nyní však o koncentraci 100 µg/ml v 0,5% DMSO.

Použité buněčné linie

V průběhu pokusů byly použity dvě různé buněčné linie. První linie označovaná jako PS (porcine kidney stable) kultivovaná v L-15mediu (Leibovitz's L-15 Medium; L-15) a druhá linie kultivovaná v IMDM mediu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM), která je neurálního původu a je známá jako glioblastomová linie (U373). S oběma kulturami bylo po celou dobu zacházeno asepticky v boxu s laminárním prouděním, kde také probíhala dvakrát do týdne jejich pasáž.

Optimalizace koncentrace přírodních látek

Na začátku práce bylo zapotřebí zjistit nejvýše tolerované koncentrace námi vybraných přírodních látek. Do 24-jamkových panelů bylo přidáno 0,5 ml suspenze PS buněk v L-15 mediu na jamku. Buněčná suspenze byla koncentrována na 4×10^5 buněk/ml. Takto připravené panely byly vloženy na 4 hodiny do termoboxu o teplotě 37 °C. Po uplynutí daného času bylo všechno médium opatrně odebráno a nahrazeno stejným objemem nového média společně s různými koncentracemi adamantanu a jeho derivátů. Panely byly uloženy zpátky do termoboxu při konstantní teplotě 37 °C a ponechány zde 4

dny. Jako kontrolní vzorek sloužilo L-15 medium s 0,1% obsahem DMSO.

Ředící řady látek

Ředící řady pro adamantan a jeho deriváty začínala na nejvyšší možné koncentraci 500 ng/ml v 0,0025% DMSO. Za pomoci dvojkové ředící řady byly vytvořeny i koncentrace 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml a 15,625 ng/ml, u kterých se koncentrace DMSO neměnila.

Počítání živých buněk

Po 4 dnech byly jamky opatrně zbaveny veškerého média a promyty 0,5 ml PBS. V dalším kroku bylo odebráno PBS, které bylo vyměněno za 50 μ l trypsinu. Panel s trypsinem byl vrácen na dobu pěti minut do termoboxu. Následně byl obsah jamek rozsuspendován ve 300 μ l L-15 média. Z rozsuspendovaného roztoku bylo odebráno 20 μ l buněk, které byly smíchány se stejným objemem trypanové modři. Vzniklý roztok s obarvenými buňkami byl napipetován do Bürkerovy komůrky a spočítán počet buněk pod mikroskopem. Pro ověření důvěryhodnosti dosažených výsledků počítáním buněk pod mikroskopem byl zvolen přístroj CountessTM Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Postup počítání zde byl podobný, suspenze buněk se však nenanášela na Bürkerovu komůrku, ale na speciální sklíčko určené pro tento přístroj. Výhodou Cell Counteru bylo i procentuální určení přežívání buněk.

Průtoková cytometrie

Po počítání buněk pomocí mikroskopu a pomocí Cell Counteru byla ověřena přesnost jejich výsledků i pomocí průtokového cytometru. Koncentrace derivátů adamantanu i DMSO byla stejná jako v předchozím případě.

Při pokusu byly nasazeny buňky na 24-jamkový panel a do každé jamky bylo přidáno 0,5 ml buněčné suspenze. Pro tento pokus byla použita koncentrace 10^5 buněk/ml buněk,

kteřá je vhodnější pro použití s buněčným cytometrem. Po přidání suspense byl panel přesunut na 4 hodiny do boxu, kde byl uchováván při konstantní teplotě 37 °C, aby buňky mohly adherovat na dno jamky. Po 4 hodinách bylo medium z jamek odebráno a nahrazeno 0,5 ml nového media, které obsahovalo námi zkoumanou přírodní látku o známé koncentraci. Vzorky se zpracovávaly v triplikátech a jako kontrola posloužilo nařeďené IMDM medium s DMSO o koncentraci 0,0025 % a čisté IMDM medium. Za 4 dny bylo medium opět odebráno, buňky byly promyty 0,5 ml 1% BOFES (bovine fetal serum, Sigma-Aldrich) v PBS a nakonec po promytí bylo přidáno 50 µl trypsinu, který uvolnil buňky ze dna jamek. Poslední fáze příprav obsahovala rozsuspendování buněk v 0,5 ml 1% BOFES v PBS a uložení zkumavek, určených pro práci na cytometru, do ledu. Pomocí průtokové cytometrie byly zjištěny počty živých a mrtvých buněk v jednotlivých vzorcích. K samotnému měření byl použit průtokový cytometr BD FACS Canto™ II (BD Biosciences). Nejprve však bylo zapotřebí nastavit lasery a zrcadla uvnitř cytometru na správnou hodnotu přímého rozptylu, granularity jednotlivých buněk a fluorescence. Dále bylo nutno nastavit v programu BD Diva hodnoty napětí pro různé parametry (FSC = 160; SSC = 330). Jako kontrastní látka byl použit propidium jodid (PI; Bio Rad). PI bylo použito z důvodu nutnosti rozlišení mrtvých a živých buněk. Napětí bylo proto nastaveno na PE-Texas = 430. Jako první byl měřen kontrolní vzorek bez přidaného PI. Každý další měřený vzorek obsahoval 1 kapku PI. Pro pokračování v dalších pokusech byly vybrány pouze nejvyšší buňkami tolerované koncentrace.

Virus klíšťové encefalidity

Za účelem infikování buněčných kultur byl použit kmen KE Neudoerfl. Vir byl uchováván v mrazícím boxu při teplotě -80 °C. K manipulaci s ním docházelo pouze v laboratoři s 2. úrovní biologické bezpečnosti BSL2 (Biosafety Level 2) a to jen v prostoru k tomu určenému boxu s laminárním prouděním, který zde byl umístěn.

Infekce virem klíšťové encefalitidy

První den byly připraveny 24-jamkové panely, které byly rozděleny do třech skupin. První skupina představovala přidání námi vybrané přírodní látky k buňkám v jamkách den před infekcí. Druhá skupina byla jejich opakem, tedy přidání přírodní látky k buňkám až po jednom dni infekce a třetí skupina představovala buňky, ke kterým byla v jednom dni přidána studovaná látka současně s infekcí. K infikování buněk virem KE byl použit kmen Neudoerfl v dávce 1 MOI (multiplicity of infection). Do každé jamky v panelech všech skupin bylo přidáno 300 μ l buněčné suspenze o koncentraci 3×10^5 buněk/ml a následně byly vzorky uloženy do inkubátoru s teplotou 37 °C a 0,5% obsahem CO₂. Zde byly ponechány do druhého dne. Kontrolu představovaly jamky, které obsahovaly L-15 médium s 0,1% DMSO. Druhého dne bylo médium z panelů první skupiny opatrně odebráno a nahrazeno 500 μ l přírodní látky o koncentraci 500 ng/ml a panel byl navrácen zpátky do inkubátoru na 1 den. U druhé a třetí skupiny bylo také vše odebráno a namísto toho přidáno 200 μ l virové suspenze. Po přidání infekce byly panely další 2 hodiny inkubovány v boxu při teplotě 37 °C s přívodem 0,5% CO₂. Po dvou hodinách byly buňky promyty 200 μ l sterilního PBS, které bylo následně po krátké době odebráno. Další postup byl následující. K druhé skupině bylo po promytí přidáno 500 μ l čistého L-15 media a ke třetí skupině 500 μ l roztoků přírodních látek. Druhého dne bylo u druhé skupiny vyměněno médium za přírodní látku o objemu 500 μ l. První skupiny byla infikovaná stejným způsobem jako zbývající 2 skupiny předchozího dne. Po infekci, dvouhodinové inkubaci a promytí bylo k první skupině přidáno 500 μ l přírodní látky a vše bylo uloženo na 4 dny do inkubátoru s teplotou 37 °C a 0,5% CO₂.

Za 4 dny byly vzorky odebrány. Odebíralo se zvlášť médium a zvlášť buňky. Jako první bylo odebráno médium do mikrozkuvek na ledu, ze kterého byly přesunuty do -80°C mrazícího boxu. Zbylé buňky v jamkách byly promyty 500 μ l PBS, které se poté odebralo. Po promytí bylo přidáno 50 μ l trypsinu ke každé jamce, aby se buňky snáze uvolnili od dna. Následovalo rozsuspendování v 300 μ l L-15 media, přesunutí do nových mikrozkuvek, centrifugování v chlazené centrifuze (Hermle Labortechnik GmbH typ Z326 K) při 4 °C na 500 RCF (relative centrifugal field, relativní centrifugační zrychlení) po dobu 7 minut. Médium bylo odebráno a zkuvky s buňkami byly uloženy do -80 °C mrazícího boxu.

Plaková titrace

Pomocí této metody se zjišťuje množství virionů v daném vzorku. Celkový počet virových částic se určuje v tzv. PFU (plaque forming unit) neboli v plakovitých jednotkách přepočítaných na 1 ml. Při plakové titraci byla použita buněčná linie PS.

Při ředění bylo použito medium L-15, které pomohlo k naředění jednotlivých vzorků, desítkovou řadou, do šesti jamek 24-jamkového panelu. Dalším krokem po naředění bylo přidání 300 μ l buněčné suspenze o koncentraci 3×10^5 buněk/ml a to do každé jamky v panelu. Panely byly následně umístěny do CO₂ boxu (teplota 37 °C a 0,5% CO₂) a to na 4 hodiny, aby mohly buňky adherovat na povrch jamek. Po uplynutí 4 hodin bylo do každé jamky přidáno 400 μ l karboxymethylcelulózy s L-15 médiem o dvojnásobné koncentraci a to v poměru 1:1. Po tomto kroku byly panely přeneseny zpátky do CO₂ boxu, kde se inkubovaly 5 dní za stejných podmínek. Po pěti dnech byly jamky promyty fyziologickým roztokem a poté 45 minut barveny naftalenovou černí. Čern zviditelnila neinfikované buňky a zároveň zvýraznila samotné plaky. Plaky jsou místa, kde byly buňky napadeny a usmrceny virem. Po 45 minutách barvení byly panely opláchnuty destilovanou vodou a uloženy na filtrační papír do druhého dne. Druhý den byly panely již suché a mohly se spočítat plaky, podle kterých se vypočítal počet jednotlivých virionů v dané jamce.

Cytotoxicita studovaných látek

MTT assay jsou kolorimetrické testy, které nám pomáhají určit metabolickou aktivitu buněk pro kvantifikaci přežívání buněk. Na začátku pokusu byla vytvořena suspenze buněk o koncentraci 7000 buněk na jamku a dvojková ředící řada vybraných přírodních látek v triplicátech o dvojnásobné koncentraci. Počínaje koncentrací 1000 ng/ml a konečnou koncentrací 8,8 ng/ml. Dále byly připraveny kontroly v triplicátech. První kontrola se skládala z buněk a IMDM media, druhá z buněk, IMDM media a 0,5 % DMSO, třetí kontrola obsahovala buňky, IMDM medium a 50% DMSO, poslední kontrola se skládala už jen z čistého IMDM media. Suspenze buněk s kontrolami byla rozdělena po 200 μ l/jamku 96-jamkového panelu a zanechána alespoň 4 hodiny v CO₂ inkubátoru, aby buňky adherovaly k povrchu jamky. Po čtyřech hodinách bylo z každé jamky (kromě kontrol) odebráno 100 μ l buněčné suspenze, která byla nahrazena 100 μ l přírodních látek o dvojnásobné koncentraci. Takto připravené vzorky na destičce byly uschovány po 4 dny

v CO₂ boxu. Po uplynutí této doby bylo ke každé jamce přidáno 10 µl MTT a celá destička byla poté opět vrácena do boxu, tentokrát však na 2 hodiny. Po oněch dvou hodinách byla destička vzata a opatrně z ní bylo odebráno všechno zbývající medium. Nakonec se ke každé jamce přidalo 100 µl 100% DMSO a pak již následovalo pouze měření při 570 nm na čtečce destiček (Synergy H1™ Hybrid Multi-Mode Microplate Reader; Biotek).

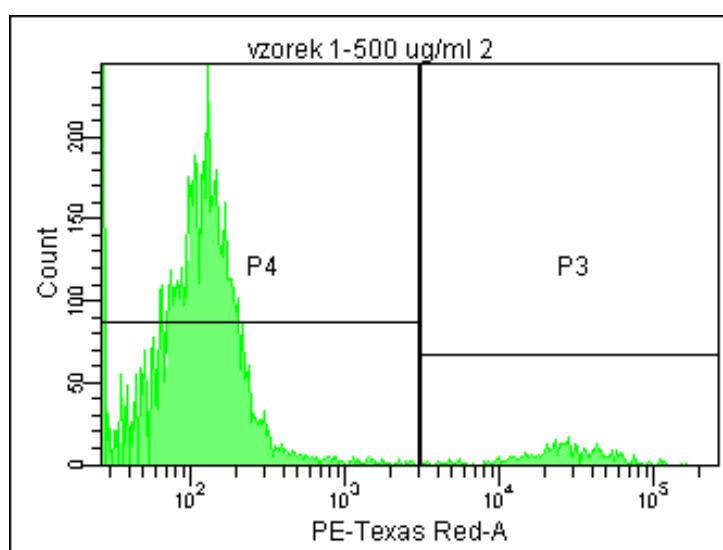
Inhibice cytopatického efektu

Test začínal obdobně jako předchozí, kde nebyla provedena infekce. Opět byla připravena suspenze buněk o koncentraci 7000 buněk na jamku a dvojková ředící řada o stejné koncentraci. Na rozdíl od předchozího pokusu, se zde pracovalo se třemi variantami infekce. První varianta byla vybraná přírodní látka, která byla přidána k buněčné suspenzi před infekcí. Druhá byla látka přidána v době infekce a v posledním případě byla látka přidána až po samotné infekci. U všech třech variant bylo první den přidáno ke každé jamce 96-jamkového panelu 100 µl dvojnásobně koncentrované suspenze buněk (10000 buněk na jamku). K variantě přírodní látka před infekcí, bylo navíc přidáno ještě 100 µl vybrané přírodní látky o dvojnásobné koncentraci (dvojková ředící řada od 500 ng/ml do 3,9ng/ml). Ke zbylým dvou variantám bylo přidáno 100 µl media a 100 µl buněk o dvojnásobné koncentraci. Takto připravené panely byly umístěny do CO₂ boxu. Den poté byla provedena infekce buněk v panelech a dvě hodiny po infekci bylo provedeno promytí pomocí 50 µl PBS. Po promytí bylo k první variantě přidáno 100 µl media s 100 µl dvakrát koncentrovanější přírodní látky. K druhé variantě bylo přidáno to samé a ke třetí a poslední pouze 200 µl media. Po tomto kroku byly vzorky navraceny zpátky do CO₂ boxu. Třetí den bylo u panelů s třetí variantou infekce odsáto všechno medium z jamky a nahrazeno 100 µl nového media se 100 µl dvojnásobně koncentrované látky. Po tomto kroku byly panely navraceny do boxu, kde byly zanechány další 4 dny. Po čtyřech dnech bylo ke všem jamkám přidáno 10 µl MTT. Po dvou hodinách od přidání MTT bylo nutné odsát z jamek 100 µl starého media a nahradit jej 100 µl DMSO. Do tomto kroku následovalo již pouze měření výsledků na čtečce destiček při 570 nm (Synergy H1™ Hybrid Multi-Mode Microplate Reader; Biotek).

VÝSLEDKY

Optimalizace koncentrace vybraných přírodních látek

Při pokusu o určení vhodné koncentrace vybraných přírodních látek byla zjištěna vysoká variabilita ve výsledcích jak z Bürkerovy komůrky, tak z Cell counteru a to i mezi jednotlivými triplikáty. Vzorky byly tedy ještě jednou přeměřeny pomocí průtokového cytometru viz. Tab. I-VI a souhrn výsledků v Tabulce VII. Ukázka výsledků z průtokového cytometru, při určování zastoupení živých a mrtvých buněk je zobrazena na Obrázku 9.



Obrázek 9: Ukázka jednoparametrového histogramu, zobrazujícího počet živých/mrtvých buněk.

Tabulka I: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání adamantanu, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

adamantan [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	96,30	3,70
250	99,07	0,93
125	99,53	0,47
62,5	99,70	0,30
31,25	99,70	0,30
16,625	99,80	0,20
kontrola	99,22	0,78

Tabulka II: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání 1-adamantan karboxylové kyseliny, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

1-adamantan karboxylová kyselina [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	93,97	6,03
250	97,63	2,37
125	98,23	1,77
62,5	98,17	1,83
31,25	98,40	1,60
16,625	98,30	1,70
kontrola	97,45	2,55

Tabulka III: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání 2-adamantylamin hydrochloridu, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

2-adamantylamin hydrochlorid [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	97,67	2,33
250	99,03	0,97
125	99,03	0,97
62,5	98,67	1,33
31,25	98,73	1,27
16,625	98,70	1,30
kontrola	98,64	1,36

Tabulka IV: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání 1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochloridu, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	98,40	1,60
250	99,33	0,67
125	99,13	0,87
62,5	99,03	0,97
31,25	99,00	1,00
16,625	98,33	1,67
kontrola	98,87	1,13

Tabulka V: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání amantadinu, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

amantadin hydrochlorid [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	95,67	4,33
250	98,70	1,30
125	98,97	1,03
62,5	98,93	1,07
31,25	99,20	0,80
16,625	99,17	0,83
kontrola	98,44	1,56

Tabulka VI: Porovnání procentuálního podílu živých a mrtvých buněk po přidání memantinu, určené pomocí průtokového cytometru. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

memantin hydrochlorid [ng/ml]	živé buňky [%]	mrtvé buňky [%]
500	97,07	2,97
250	98,80	1,20
125	98,70	1,30
62,5	98,80	1,20
31,25	99,30	0,70
16,625	98,40	1,60
kontrola	98,51	1,49

Tabulka VII: Přežívání buněk po přidání vybraných přírodních látek, určené pomocí průtokového cytometru, zaznamenáno v procentech. Kontrola představuje IMDM medium obsahující 0,0025 % DMSO. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látka	koncentrace přírodních látek [ng/ml]						
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	kontrola
adamantan	96,30 %	99,07 %	99,53 %	99,70 %	99,70 %	99,80 %	99,22 %
1-adamantan karboxylová kyselina	93,97 %	97,63 %	98,23 %	98,17 %	98,40 %	98,30 %	97,45 %
2-adamantylamin hydrochlorid	97,67 %	99,03 %	99,03 %	98,67 %	98,73 %	98,70 %	98,64 %
1-(1- adamantyl)ethylamin hydrochlorid	98,40 %	99,33 %	99,13 %	99,03 %	99,00 %	98,33 %	98,87 %
amantadin hydrochlorid	95,67 %	98,70 %	98,97 %	98,93 %	99,20 %	99,17 %	98,44 %
memantin hydrochlorid	97,07 %	98,80 %	98,70 %	98,80 %	99,30 %	98,40 %	98,51 %

Z výše uvedených tabulek byly určeny nejvyšší možné koncentrace, se kterými se poté dále pracovalo. Pro všechny látky byla zvolena koncentrace 500 ng/ml, kromě 1-adamantan karboxylové kyseliny kde byla za vhodnou uznána koncentrace 250 ng/ml. Z hodnot pro kontroly můžeme také vyčíst, že použitá koncentrace DMSO nemá na buňky glioblastů vliv a tím pádem může být v dalších pokusech použita.

Replikace viru KE v přítomnosti studovaných látek

Infikování glioblastomové linie probíhalo ve 24 jamkovém panelu, kam byly buňky nasazeny v koncentraci 3×10^5 a den až dva poté byl přidán vir klíšťové encefalitidy kmene Neudoerfl v dávce 1 MOI a přírodní látky podle Tabulky VIII. Stejně jako všechny ostatní pokusy v této práci, i tento byl uskutečněn v triplicátech a výsledky byly poté zprůměrovány.

Po odebrání vzorků přišla na řadu plaková titrace, pro kterou bylo použito zamražené medium odebrané v předchozím pokusu. Dopočítané výsledky udávaly koncentraci virionových částí v PFU/ml. Práce s viry probíhala podle třech různých variant, které jsou

znázorněny v Tabulce VIII a samotné výsledky v porovnání s 0,1% DMSO kontrolou jsou k nahlédnutí v Tabulce IX a X.

Tabulka VIII: Ukázka variant infekce.

varianta	I	II	III
	p. látka před infekcí	p. látka po infekci	látka + infekce

Tabulka IX: Titr viru v PFU/ml u vybraných přírodních látek v různých variantách infekce. Koncentrace látek je 500ng/ml, pouze u 1-adamantan karboxylové kyseliny je koncentrace 250 ng/ml. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látky / varianty	I	II	III
adamantan	$1,66 \times 10^5$	$1,23 \times 10^6$	$9,84 \times 10^5$
1-adamantan karboxylová kyselina	$4,21 \times 10^5$	$1,34 \times 10^6$	$8,81 \times 10^5$
2-adamantylamin hydrochlorid	$4,56 \times 10^5$	$2,19 \times 10^6$	$9,68 \times 10^5$
1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid	$5,76 \times 10^5$	$1,34 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$
amantadin hydrochlorid	$2,99 \times 10^5$	$1,46 \times 10^6$	$9,28 \times 10^5$
memantin hydrochlorid	$1,86 \times 10^5$	$1,45 \times 10^6$	$9,37 \times 10^5$
kontrola s 0,1% DMSO	$1,69 \times 10^6$	$1,36 \times 10^6$	$8,20 \times 10^5$

Tabulka X: Titr viru v PFU/ml u vybraných přírodních látek v různých variantách infekce, zobrazeno procentuálně v poměru ke kontrole. Koncentrace látek je 500ng/ml, pouze u 1-adamantan karboxylové kyseliny je koncentrace 250 ng/ml. Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látky / varianty	I	II	III
adamantan	98 %	90 %	120 %
1-adamantan karboxylová kyselina	248 %	99 %	108 %
2-adamantylamin hydrochlorid	269 %	160 %	118 %
2-adamantylamin hydrochlorid	340 %	98 %	151 %
amantadin hydrochlorid	176 %	107 %	113 %
memantin hydrochlorid	110 %	107 %	114 %
kontrola s 0,1% DMSO	100 %	100 %	100 %

Jak z Tabulky IX a X vyplývá, žádná z uvedených přírodních látek nemá ve studovaných koncentracích výraznou inhibiční aktivitu proti viru klíšťové encefalidity.

V některých případech jako tomu bylo při variantě I u látek 1-adamantan karboxylová kyselina, 2-adamantylamin hydrochlorid a zejména pak u 2-adamantylamin hydrochlorid, je tomu spíše naopak.

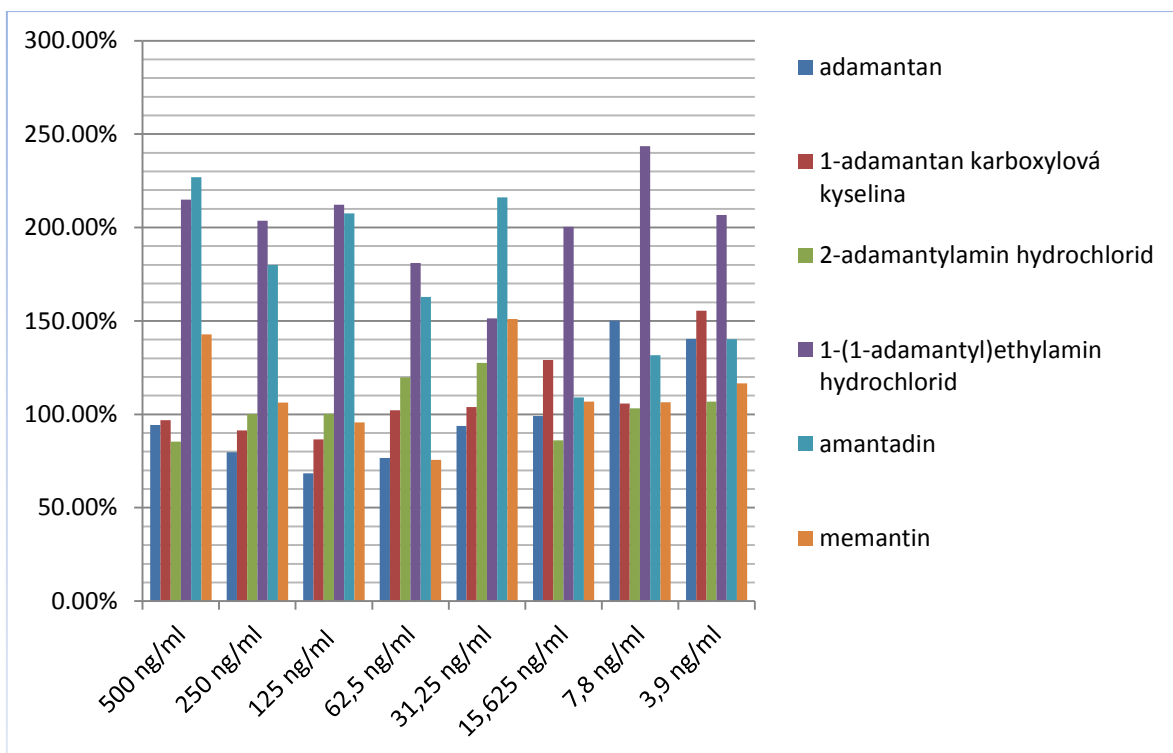
Cytotoxicita studovaných látek

Test cytotoxicity byl proveden za účelem ověření výsledků z průtokového cytometru. Výsledky byly převedeny na procenta přeživších buněk vůči kontrole.

Tabulka XI: Přežívání buněk ošetřených vybranými přírodními látkami, určeno testem cytotoxicity. Uvedeny jsou průměrné hodnoty. Výsledky byly převedeny na procenta přeživších buněk vůči kontrole.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]							
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8	3,9
adamantan	94,32 %	79,80 %	68,39 %	76,71 %	93,80 %	99,02 %	150,20 %	140,33 %
1-adamantan karboxylová kyselina	96,79 %	91,39 %	86,57 %	102,24 %	103,90 %	129,15 %	105,82 %	155,48 %
2-adamantylamin hydrochlorid	85,37 %	100,17 %	100,29 %	119,79 %	127,60 %	86,12 %	103,21 %	106,83 %
1-(1- adamantyl)ethyla min hydrochlorid	214,99 %	203,69 %	212,23 %	181,07 %	151,34 %	200,42 %	243,55 %	206,78 %
amantadin hydrochlorid	226,97 %	179,90 %	207,54 %	162,81 %	216,08 %	109,05 %	131,57 %	140,28 %
memantin hydrochlorid	142,71 %	106,20 %	95,73 %	75,54 %	151,09 %	106,78 %	106,53 %	116,58 %

Výše uvedená Tabulka XI byla pro lepší přehlednost převedena do grafu na Obrázku 10.



Obrázek 10: Přežívání buněk uváděné v procentech u různých přírodních látek v odlišných koncentracích

Z Obrázku 10 můžeme odečíst přežívání buněk po přidání jednotlivých přírodních látek v jejich různých koncentracích. Z výsledku je však patrné, že některé látky spíše podporují množení buněčných kultur rakovinového původu, jedná se hlavně o 1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid a amantadin.

Cytopatický efekt studovaných látek

Test zjišťující cytopatický efekt s přidaným virem Neudoerfl byl proveden za účelem ověření výsledků z plakové titrace. Pokus byl proveden ve třech variantách. Varianta I značila přidání přírodní látky den před infekcí (Tab. XII), variantou II byla označena skupina vzorků ošetřených v ten samý den jak přírodní látkou tak virem (Tab. XIII). Poslední varianta číslo III představovala přidání přírodní látky den po infekci virem (Tab. XIV). Výsledky byly převedeny na procenta přeživších buněk vůči kontrole.

Tabulka XII: Přežívání buněk ošetřených vybranými přírodními látkami a infikovaných virem (varianta I). Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]							
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8	3,9
adamantan	76,51 %	79,45 %	89,54 %	98,90 %	108,62 %	57,43 %	82,39 %	84,59 %
1-adamantan karboxylová kyselina	20,00 %	37,25 %	65,32 %	74,13 %	76,33 %	53,03 %	42,39 %	107,06 %
2-adamantylamin hydrochlorid	17,43 %	25,14 %	13,03 %	29,36 %	50,83 %	44,04 %	33,58 %	51,38 %
1-(1- adamantyl)ethylami n hydrochlorid	3,12 %	14,13 %	26,05 %	65,14 %	89,36 %	69,36 %	76,70 %	71,93 %
amantadin hydrochlorid	22,20 %	27,34 %	31,56 %	37,06 %	53,21 %	70,46 %	91,74 %	78,35 %
memantin hydrochlorid	0,55 %	0,55 %	17,98 %	42,75 %	55,60 %	34,31 %	48,62 %	68,07 %

Tabulka XIII: Přežívání buněk ošetřených vybranými přírodními látkami a infikovaných virem (varianta II). Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]							
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8	3,9
adamantan	68,65 %	53,33 %	107,94%	94,13 %	63,65 %	62,46 %	57,30 %	72,86 %
1-adamantan karboxylová kyselina	23,65 %	18,41 %	33,33 %	62,86 %	58,25 %	28,17 %	43,49 %	62,86 %
2-adamantylamin hydrochlorid	13,02 %	3,49 %	14,92 %	30,32 %	27,62 %	30,32 %	35,08 %	60,48 %
1-(1- adamantyl)ethylami n hydrochlorid	0,00 %	0,00 %	33,81 %	76,51 %	108,41%	82,06 %	59,52 %	76,98 %
amantadin hydrochlorid	10,48 %	28,41 %	25,71 %	38,41 %	73,02 %	85,24 %	91,90 %	81,59 %
memantin hydrochlorid	0,00 %	0,00 %	21,11 %	34,60 %	93,02 %	64,76 %	68,41 %	131,59 %

Tabulka XIV: Přežívání buněk ošetřených vybranými přírodními látkami a infikovaných virem (varianta III). Uvedeny jsou průměrné hodnoty.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]							
	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8	3,9
adamantan	83,75 %	93,67 %	131,41 %	117,66 %	77,66 %	133,13 %	158,83 %	88,44 %
1-adamantan karboxylová kyselina	57,97 %	54,84 %	99,53 %	74,22 %	97,34 %	41,56 %	129,06 %	86,09 %
2-adamantylamin hydrochlorid	41,25 %	39,22 %	48,28 %	55,00 %	69,53 %	72,11 %	120,16 %	89,22 %
1-(1- adamantyl)ethylami n hydrochlorid	11,41 %	29,06 %	90,00 %	107,50 %	129,69 %	114,53 %	126,41 %	115,23 %
amantadin hydrochlorid	22,50 %	26,64 %	35,00 %	54,06 %	79,37 %	71,41 %	79,37 %	85,70 %
memantin hydrochlorid	0,00 %	1,09 %	26,87 %	52,81 %	67,42 %	75,94 %	57,34 %	81,56 %

Z Tabulek XII, XIII, XIV je patrné, že cytopatický efekt je inhibován a tedy poškozování buněk následkem infekce je inhibováno při nižších koncentracích studovaných látek. Pro první variantu se nejnižší cytopatický efekt objevil u adamantanu v koncentraci 31,25 ng/ml, zatímco u varianty II byl prokázán u memantinu v koncentraci 3,9 ng/ml. U poslední varianty se nejlépe osvědčil opět adamantan, tentokrát však s koncentrací 15,625 ng/ml.

Porovnání výsledků plakové titrace s testem cytotoxicity

Pro větší názornost uvádím porovnání výsledků z plakové titrace a měření cytopatického efektu u koncentrací studovaných látek, pro které byly provedené oba typy měření. Toto porovnání je uvedeno v Tabulkách XV-XVII.

Tabulka XV: Porovnání výsledků plakové titrace s testem cytopatického efektu ve variantě, kde byla přidána studovaná přírodní látka den před infekcí (**Varianta I**). Uvedeny jsou průměrné hodnoty dvou nejvyšších použitých koncentrací.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]				
	plaková titrace			cytopatický efekt	
	500	250		500	250
adamantan	98 %	-		76,51 %	-
1-adamantan karboxylová kyselina	-	248 %		-	37,20 %
2-adamantylamin hydrochlorid	269 %	-		17,43 %	-
1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid	340 %	-		3,12 %	-
amantadin hydrochlorid	176 %	-		22,20 %	-
memantin hydrochlorid	110 %	-		0,55 %	-

Tabulka XVI: Porovnání výsledků plakové titrace s testem cytopatického efektu ve variantě, kde byla přidána studovaná přírodní látka den po infekci (**varianta II**). Uvedeny jsou průměrné hodnoty dvou nejvyšších použitých koncentrací.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]				
	plaková titrace			cytopatický efekt	
	500	250		500	250
adamantan	90 %	-		68,65 %	-
1-adamantan karboxylová kyselina	-	99 %		-	18,41 %
2-adamantylamin hydrochlorid	160 %	-		13,02 %	-
1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid	98 %	-		0,00 %	-
amantadin hydrochlorid	107 %	-		10,48 %	-
memantin hydrochlorid	107 %	-		0,00 %	-

Tabulka XVII: Porovnání výsledků plakové titrace s testem cytopatického efektu ve variantě, kde byla přidána studovaná přírodní látka ve stejný den co infekce (**varianta III**). Uvedeny jsou průměrné hodnoty dvou nejvyšších použitých koncentrací.

přírodní látky	koncentrace přírodních látek [ng/ml]				
	plaková titrace			cytopatický efekt	
	500	250		500	250
adamantan	120 %	-		83,75 %	-
1-adamantan karboxylová kyselina	-	108 %		-	54,84 %
2-adamantylamin hydrochlorid	118 %	-		41,25 %	-
1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid	151 %	-		11,41 %	-
amantadin hydrochlorid	113 %	-		22,50 %	-
memantin hydrochlorid	114 %	-		0,00 %	-

V Tabulkách XV, XVI a XVII je vidět znatelný rozdíl mezi výsledky dvou různých metod, sloužících ke sledování inhibičního efektu studovaných látek na replikaci viru KE. Zatímco u plakové titrace výsledky ukazují, že replikace viru nebyla výrazněji ovlivněna, respektive inhibována, u testu cytopatického efektu vidíme, že přežívání buněk infikovaných virem je výrazně sníženo. V souhrnu tedy tyto výsledky naznačují, že v těchto vysokých koncentracích studované látky neovlivňují replikaci viru KE a nedokáží zabránit poškození buněk následkem infekce.

DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na zjištění potenciálních antivirotických účinků adamantanu a jeho derivátů proti viru klíšťové encefalitidy kmene Neudoerfl. Pokusy byly prováděny na glioblastomové buněčné linii, která byla vybrána z důvodu cílení klíšťové encefalitidy na neurální buňky a dále pak kvůli jejich citlivosti vůči vybranému viru. Doposud byl adamantan a některé jeho deriváty použity při léčbě virových onemocnění jako je například chřipka typu A nebo virus Dengue, který stejně jako TBEV patří do skupiny Flavivirů (Koff, 1980).

Pokusy začaly určováním nejvyšší vhodné koncentrace vybraných přírodních látek a DMSO, ve kterém byly látky rozpouštěny. Tento krok byl důležitý pro budoucí pokusy, aby při určování výsledků nedocházelo k chybám z důvodu odumírání buněk způsobené nevhodnou koncentrací vybraných přírodních látek či jejich rozpouštědla. Pokus byl prováděn na průtokovém cytometru, kde se ukázalo, že nejvyšší možná koncentrace pro adamantan, 2-adamantylamin hydrochlorid, 1-(1-adamantyl)ethylamin hydrochlorid, amantadin a memantin hydrochlorid byla 500 ng/ml a koncentrace DMSO 0,1%. Jiného výsledku se dočkala pouze 1-adamantan karboxylová kyselina, u které byla zjištěna nejvyšší možná koncentrace již u 250 ng/ml a 0,1% DMSO.

Výsledky z průtokového cytometru byly poté porovnány s výsledky z MTT assaye. Ta určovala cytotoxicitu buněk jako tomu bylo i v jiné práci (Zhang, 2015). Na jedné straně čísla, která byla získána z průtokového cytometru dokazovala, že se buňky po přidání přírodních látek udržují stále lehce pod 100% původního počtu. Výsledky získané z testu cytotoxicity naopak spíše ukazují u některých vzorků i více jak 100% navýšení počtu buněk oproti kontrole. Pro ověření správnosti byly pro začátek plakovány vzorky o nejvyšší možné koncentraci studovaných látek, zatímco nejnižší možné koncentrace budou plakování podrobeny později. V jiných pracích byly použity koncentrace memantinu v hodnotách až 204,2 µg/ml. S rimantadinem bylo pracováno v koncentracích až do hodnoty 2077 ng/ml a s amantadinem až do 50 µg/ml (Ganjamali, 2016; Koff, 1980; Fukuda, 1987).

Nejvyšší možné koncentrace zjištěné při pokusech s průtokovým cytometrem byly poté použity u pokusů s infikováním buněk při plakové titraci. Při infikování byly vzorky rozděleny do třech různých variant, které měly za úkol informovat o stavu buněk a infekce v různých časových intervalech od nákazy virem TBEV. První varianta poukazovala na změny, které nastaly po přidání přírodní látky před infekcí, druhá po infekci a třetí

varianta odpovídala přidání přírodní látky nastejno s infekcí. Takto bylo možno sledovat množení a šíření viru v buňkách.

Jak se však ukázalo z výsledků plakové titrace, vybrané přírodní látky ve vysokých koncentracích nijak signifikantně množení viru neinhibují. U některých látek bylo naopak přidanými látkami množení viru urychleno. Bylo tomu tak zejména u třetí varianty vzorků adamantanu a 2-adamantylamin hydrochloridu. Pro ověření tohoto faktu nebyly zatím nalezeny žádné zdroje, které by dospěly k podobným výsledkům. U všech látek při jejich nejvyšší koncentraci nebyl prokázán žádná významný efekt proti viru KE. Při práci s nižšími koncentracemi zatím nebyla provedena plaková titrace, pouze test cytopatického efektu. Tato assay nám ukázala, že vhodnější koncentrace pro námi studované látky by měly být menší, než původně zvolené nejvyšší koncentrace. Po provedení plakové titrace s nižšími koncentracemi studovaných látek se však předpokládá efekt na relevantní úrovni. Po celkovém zhodnocení lze říci, že u vybraných přírodních látek nebyly prokázány žádné antivirotické účinky na zkoumaných neurálních buňkách.

ZÁVĚR

Náplní této práce bylo ověřit, zda u vybraných přírodních látek existuje nějaká antivirotická aktivita vůči virům klíšťové encefalidity. Pokus byl prováděn na PS buňkách a liniích glioblastů s různou koncentrací přidané přírodní látky. Jak se v průběhu práce ukázalo, u vybraných přírodních látek se nepodařilo objevit žádnou antivirotickou aktivitu u sledovaných koncentrací těchto látek, ba naopak některé z látek vykazovaly tendenci podporovat replikaci námi použitého viru z kmene Neudoerf1. V budoucnu bude provedena plaková titrace vybraných přírodních látek o nižší koncentraci, která bude porovnána s testem cytopatického efektu. Pro některé deriváty se očekávají pozitivní výsledky pro nalezení antivirotického účinku těchto studovaných látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BÁRDOŠ, V. O *ekológii arbovirusov v Československu*. 1. vyd. Bratislava: Vydav. Slov. akad. vied, 1965. 198 s.

BOGOVIC, P., F. STRLE. *Tick-borne Encephalitis: A Review of Epidemiology, Clinical Characteristics, and Management*. World Journal of Clinical Cases. 2015, **3**(5), 430-41.

COOPER, E. R., R. P. NUGENT, C. DIAZ, J. PITT, C. HANSON, et al. *After AIDS Clinical Trial 076: The Changing Pattern of Zidovudine Use during Pregnancy, and the Subsequent Reduction in the Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus in a Cohort of Infected Women and Their Infant*. Journal of Infectious Diseases. ISSN 0022-1899.

EMILIANI C. *Extinction and Viruses*. BioSystems. 1993, **31**(2-3), 155-159.

FUKUDA, E. K., L. C. RODRIGUEZ, N. CHOMA, N. KEIGHER, F. DE GRAZIA, W. GARLANG. *Quantitative Determination of Rimantadine in Human Plasma and Urine by GC-MS*. Biomedical & Environmental Mass Spectrometry. 1987, **14**(10), 549-53, ISSN: 0887-6134.

GANJALI, M. R., F. ABOUFAZELI, S. RIAHI, et al. *Memantine Potentiometric Membrane Sensor for Memantine Pharmaceutical Analysis; Computational Investigation*. International Journal of Electrochemical Science. 2016, ISSN: 1452-3981.

GONG, E. Y. *Antiviral Methods and Protocols*. Method in Molecular Biology. 2013, ISBN 9781627034845 1627034846.

HAMPL, F., J. PALEČEK. *Farmakochemie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.

HEINZ, F. X., HOLZMANN, H., ESSL, A. KUNDI, M. FIELD. *Effectiveness of Vaccination Against Tick-borne Encephalitis*. Vaccine. 2007, **25**(43) 7559-7567.

JONÁŠ, J., J. KUCHAR. *Svět přírodních antibiotik. Tajné zbraně rostlin. 88 přírodních zdrojů pro zdravý imunitní systém a prevenci i terapii virových, bakteriálních a plísňových infekcí.* Eminent. 2014, 978-80-7281-479-4.

KATZUNG, B., S. MASTERS, A. TREVOR. *Basic and Clinical Pharmacology, Eleven Edition.* Basic And Clinical Pharmacology. 2009, 1218.

KINCHINGTON, D. *Antiviral Methods and Protocols.* Humana Press. 2000, ISBN 0585235686 9780585235684 9781592592456 1592592457.

KOFF, W. C., J. R. ELM, S. B. HALSTEAD. *Inhibition of Dengue Virus Replication by Amantadine Hydrochloride.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1980, **18**(1), 125-129.

MADIGAN, T., J. M. MARTINKO, D. A. STAHL, D. P. CLARK. *Brock Biology of Microorganisms, 13th Edition.* International Microbiology. 2012, 368-381.

MANSFIELD, K. L., N. JOHNSON, L. P. PHIPPS, J. R. STEPHENSON, A. R. FOOKS a T. SOLOMON. *Tick-borne Encephalitis Virus - a Review of an Emerging Zoonosis.* Journal of General Virology. 2009, **90**(8), 1781-1794.

MANSOORI, G. Ali. *Diamondoid Molecules.* Advances in Chemical Physics. 2007, 136, 207-258.

MIRZOYAN, R. S., T. S. GAN'SHINA, D. V. MASLENNIKOV, et al. *Cerebrovascular and Neuroprotective Effects of Adamantane Derivative.* BioMed Research International. 2014, 2014, 1-8.

RAJČÁNI, J., ČIAMPOR, F. *Lekárska virológia.* 1. vyd. Bratislava: Veda, 2006, 573 s. ISBN 80-224-0911-1.

RAMEZANI, H., G. A. MANSOORI. *Molecular Building Blocks for Nanotechnology: from Diamondoids to Nanoscale Materials and Applications.* New York: Springer, 2007, s. 44-71. ISBN 9780387399379.

RUIJUN, W., M. WENBIN, W. YUMIN, Z. RUIJIAN, H. PUWEIZHONG a L. YULIN. *Inhibition of Glioblastoma Cell Growth in Vitro and in Vivo by Brucine, a Component of Chinese Medicine*. *Oncology Research*. 2014, **22**(5-6), 275-281.

RŮŽEK, D. *Klíšťová encefalitida. 1. vydání*. Praha: Grada Publishing, 2015, 196 s. ISBN 978-80-247-5305-8.

SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada)*. ISBN 978-80-247-4771-2.

SCHLEYER, P. R. *A Simple Preparation of Adamantane*. *Journal of the American Chemical Society*. 1957, ISSN 0002-7863.

TAYLOR, M. P., O. KOBILER, L. W. ENQUIST. *Alphaherpesvirus axon-to-cell Spread Involves Limited Virion Transmission*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(42), 17046-17051.

VAZQUEZ M., C. MUEHLENBEIN, M. CARTTER, E. B. HAYES, S. ERTEL, E. D. SHAPIRO. *Effectiveness of Personal Protective Measures to Prevent Lyme Disease*. *Emerg Infect Dis*. 2008, **14**(2), 210-216.

VÍCHA, R. a M. POTÁČEK. *Kde roste adamantan*. *Chemické Listy*. 2004, 98, 68-74.

VOLBERDING, P. A., S. W. LAGAKOS, M. A. KOCH, et al. *Zidovudine in Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus Infection: A Controlled Trial in Persons with Fewer Than 500 CD4-positive Cells per Cubic Millimeter*. *The New England Journal of Medicine*. 1992, **322**(14), 941-949.

WALDMANN, T. *Immunotherapy: Past, Present and Future*. *Nature Medicine*. 2003, **9**(3), 269-77.

WINGERT, W. S. *G.c.-m.s. Analysis of Diamondoid Hydrocarbons in Smackover Petroleums*. 1992, ISSN 0016-2361.

ZAITLIN, M., A. MAYER. *The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease*. New York. 1998, **23**(4), 105-110.

ZHANG, L., L. YUANYUAN, G. ZHIWEN, W. YUYUE, S. MEI, J. YUN, S. JING, X. XIAOPENG, Z. LIRONG, J. JINGTIN, S. WEIFENG. *Resveratrol Inhibits Enterovirus 71 Replication and Pro-inflammatory Cytokine Secretion in Rhabdosarcoma Cells Through Blocking IKKs/NF- κ B Signaling Pathway*. PLoS ONE. 2015, **10**(2).