

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení cytotoxicity vybraných sulfonamidů

Bc. Lucie Voborníková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Voborníková**
Osobní číslo: **C16467**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení cytotoxicity vybraných sulfonamidů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- 1) Seznamte se s literárními údaji na téma sulfonamidy - struktura, rozdělení, zástupci, mechanismy antimikrobiálního působení a jejich praktické použití
- 2) Seznamte se s literárními údaji o toxicitě sulfonamidů se zaměřením na in vitro cytotoxicitu.

Experimentální část:

- 1) Stanovte cytotoxicitu vybraných sulfonamidů vůči buněčné linii Jurkat a A549. Ke stanovení cytotoxicity použijte test vylučování trypanové modři a test cytotoxicity v reálném čase pomocí systému xCELLigence.
- 2) Zhodnoťte všechny získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v dostupné recentní literatuře.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Karel Královec, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: 18. prosince 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Bc. Lucie Voborníková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu této diplomové práce, RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování práce. Dále bych ráda poděkovala paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za její trpělivost, přátelský přístup a podporu při práci v buněčné laboratoři. Velký dík patří mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá studiem cytotoxicity osmi vybraných nově syntetizovaných sulfonamidů, které by mohly být do budoucna použitelné jako antibakteriální látky. Pro testování cytotoxického účinku sulfonamidů byly použity dvě různé metody. První metodou byl test vylučování trypanové modři, s jehož pomocí byla stanovena viabilita a proliferace u buněčné linie Jurkat. Druhou použitou metodou byla analýza buněk v reálném čase pomocí systému xCELLigence RTCA SP, kdy byl na základě měření změn impedance stanovován buněčný index u buněčné linie A549.

Všechny testované sulfonamidy vykazovaly určitou míru cytotoxicity. Jako nejvíce toxické se ukázaly sulfonamidy SA9 a SA10, u kterých docházelo s jejich vzrůstající koncentrací k úplné inhibici buněčné proliferace. Sulfonamidy označené jako SA5, SA6, SA7, SA8, SA11 a SA12 vykazovaly při nejvyšší testované koncentraci pouze mírný antiproliferační účinek na obě buněčné linie, a tudíž se jeví jako perspektivní sloučeniny pro další studium.

KLÍČOVÁ SLOVA

sulfonamidy, cytotoxicita, test vylučování trypanové modři, xCELLigence, A549, Jurkat

ANNOTATION

This thesis deals with the study of cytotoxicity of eight selected new synthesized sulfonamides, which could be used in the future as antibacterial agents. To test the cytotoxic effect of sulfonamides were used two different methods. The first method was trypan blue exclusion assay, which established viability and proliferation at Jurkat cell line. The second method was the real-time cell analysis using the xCELLigence RTCA SP system, where the cell index on cell line A549 was determined based on impedance changes.

All tested sulphonamides exhibit some degree of cytotoxicity. The most toxic were the sulphonamides SA9 and SA10, which are increasing their concentration to completely inhibit cell proliferation. Sulphonamides designated as SA5, SA6, SA7, SA8, SA11 and SA12 exhibited only a mild antiproliferative effect at both cell lines at the highest test concentration and therefore proved promising compounds for further study.

KEYWORDS

sulphonamides, cytotoxicity, trypan blue exclusion assay, xCELLigence, A549, Jurkat

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	15
2 TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 HISTORIE ANTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK	16
2.2 SULFONAMIDY	17
2.2.1 Klasifikace sulfonamidů	19
2.2.1.1 Klasické sulfonamidy	19
2.2.1.2 Sulfonamidy s protrahovaným účinkem	19
2.2.1.3 Sulfonamidy s potencovaným antimikrobním účinkem	19
2.2.2 Antimikrobiální aktivita sulfonamidů.....	20
2.2.3 Antifungální aktivita sulfonamidů	22
2.3 SULFONAMIDOVÁ LÉČIVA	22
2.3.1 Sulfonylarylaminy.....	24
2.3.2 Sulfonamidy bez arylaminové skupiny.....	25
2.3.2.1 Sulfonylureázy	25
2.3.2.2 Inhibitory karbonické anhydrázy	26
2.3.2.3 Thiazidy	27
2.3.2.4 Kličková diuretika.....	28
2.3.2.5 COX-2 inhibitory	30
2.3.2.6 Proteázové inhibitory	31
2.3.3 Sulfonamidová léčiva se sulfonamidovou skupinou.....	33
2.3.3.1 Antiarytmika	33
2.3.3.2 Antiepileptika.....	35
2.3.3.3 Antiuratika	38
2.3.3.4 Agonisté 5-HT receptorů	39
2.3.4 <i>In vitro</i> cytotoxicita sulfonamidů.....	42
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	44
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	44
3.2.1 Příprava médií	46
3.2.2 Příprava koncentrační řady sulfonamidů	47
3.3 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE	47
3.3.1 Pasážování a počítání buněk	48

3.3.1.1	Pasážování buněčné linie A549	48
3.3.1.2	Pasážování buněčné linie Jurkat	48
3.4	STANOVENÍ PROLIFERACE A VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TESTU VYLUČOVÁNÍ TRYPANOVÉ MODŘI	49
3.4.1	Postup.....	50
3.5	ANALÝZA PROLIFERACE BUNĚK POMOCÍ SYSTÉMU xCELLIGENCE RTCA SP	51
3.5.1	Postup.....	53
3.6	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	54
4	VÝSLEDKY	55
4.1	STANOVENÍ PROLIFERACE A VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TRYPANOVÉ MODŘI.....	55
4.1.1	Sulfonamid SA5.....	56
4.1.2	Sulfonamid SA6.....	58
4.1.3	Sulfonamid SA7.....	59
4.1.4	Sulfonamid SA8.....	61
4.1.5	Sulfonamid SA9.....	62
4.1.6	Sulfonamid SA10.....	64
4.1.7	Sulfonamid SA11.....	65
4.1.8	Sulfonamid SA12.....	67
4.2	STANOVENÍ CYTOTOXICITY SULFONAMIDŮ SYSTÉMEM xCELLIGENCE RTCA SP	68
4.2.1	Sulfonamid SA5.....	68
4.2.2	Sulfonamid SA6.....	69
4.2.3	Sulfonamid SA7.....	70
4.2.4	Sulfonamid SA8.....	70
4.2.5	Sulfonamid SA9.....	71
4.2.6	Sulfonamid SA10.....	72
4.2.7	Sulfonamid SA11.....	72
4.2.8	Sulfonamid SA12.....	73
5	DISKUZE.....	74
6	ZÁVĚR.....	81
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Struktura sulfanilamidu	17
Obrázek 2 – Porovnání struktury p-aminobenzoové kyseliny a sulfonamidu	20
Obrázek 3 – Inhibice syntézy folátu sulfonamidy a trimetoprimem	21
Obrázek 4 – Rozdělení sulfonamidových léčiv dle chemické struktury	23
Obrázek 5 – Strukturní rozdíl u tříd sulfonamidových léků	23
Obrázek 6 – Místa působení diuretik sulfonamidového typu	30
Obrázek 7 – Struktura HIV-proteázy v komplexu s inhibítozem.....	32
Obrázek 8 – Chemická struktura trypanové modře.	49
Obrázek 9 – Bürkerova komůrka: (A) mřížka komůrky, (B) pohled ze strany	51
Obrázek 10 – Komponenty systému xCELLigence RTCA SP	52
Obrázek 11 – Průběh RTCA analýzy	53
Obrázek 12 – Test vylučování trypanové modři.....	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Přehled testovaných sulfonamidů.	45
Tabulka 2 – Ředění zásobních roztoků sulfonamidů pro test s trypanovou modří.....	47
Tabulka 3 – Ředění zásobních roztoků sulfonamidů pro systém xCELLigence RTCA.	47

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA5.....	57
Graf 2 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA5	57
Graf 3 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA6.....	58
Graf 4 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA6.	59
Graf 5 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA7.....	60
Graf 6 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA7	60
Graf 7 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA8.....	61
Graf 8 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA8	62
Graf 9 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA9.....	63
Graf 10 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA9	63
Graf 11 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA10.....	64
Graf 12 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA10	65
Graf 13 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA11.....	66
Graf 14 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu S11	66

Graf 15 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA12.....	67
Graf 16 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA12	68
Graf 17 – Vliv sulfonamidu SA5 na buněčnou linii A549	69
Graf 18 – Vliv sulfonamidu SA6 na buněčnou linii A549.	69
Graf 19 – Vliv sulfonamidu SA7 na buněčnou linii A549	70
Graf 20 – Vliv sulfonamidu SA8 na buněčnou linii A549	71
Graf 21 – Vliv sulfonamidu SA9 na buněčnou linii A549	71
Graf 22 – Vliv sulfonamidu SA10 na buněčnou linii A549	72
Graf 23 – Vliv sulfonamidu SA11 na buněčnou linii A549	73
Graf 24 – Vliv sulfonamidu SA12 na buněčnou linii A549	73

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5-HT	5-hydroxytryptamin
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (z angl. „Acquired immune deficiency syndrome“)
Ag ⁺	Stříbrný kation
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
CA	Karbonická anhydráza
Ca ²⁺	Vápenatý kation
cDNA	Komplementární DNA
CGRP	Peptid příbuzný kalcitoninu (z angl. „Calcitonin gene-related peptid“)
CI	Buněčný index (z angl. „Cell index“)
Cl ⁻	Chlorový anion
COX	Cyklooxygenáza
CO ₂	Oxid uhličitý
Co ²⁺	Kobaltnatý kation
Cu ²⁺	Měďnatý kation
DBS	Fosfátový pufr (z angl. „Dulbecco's phosphate-buffered saline“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTMP	Deoxythymidin monofosfát
dUMP	Deoxyuridin monofosfát
ECACC	Evropská sbírka buněčných kultur (z angl. „European Collection of Cell Cultures“)
FBS	Fetální bovinní sérum (z angl. „Fetal bovine serum“)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. „Food and Drug Administration“)
GABA	Kyselina γ-aminomáselná
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina

HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „Human immunodeficiency virus“)
HIV-PR	HIV-proteáza
Ig	Imunoglobulin
K ⁺	Draselný kation
MEM	Minimální esenciální médium (z angl. „Minimal essential medium“)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
Ni ²⁺	Nikelnatý kation
NSAIDs	Nesteroidní protizánětlivé léky (z angl. „Nonsteroidal antiinflammatory drugs“)
OAT	Transportér organických aniontů (z angl. „Organic anion transporter“)
PABA	p-aminobenzoová kyselina
PBS	Fosfátový pufr (z angl. „Phosphate-buffered saline“)
Pd ²⁺	Paladnatý kation
Pt ²⁺	Platnatý kation
RPMI	Roswell park memorial institute
RTCA	Analýza buněk v reálném čase (z angl. „Real-time cell analyzing“)
SUR 1	Sulfonylureázový receptor 1 (z angl. Sulfonylurea receptor 1“)
TxA ₂	Tromboxan A ₂
URAT 1	Urátový transportér-1 (z angl. „Urate transporter-1“)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. „World health organization“)
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl)-S-((fenylamino)karbonyl)-2H-tetrazolium hydroxid
Zn ²⁺	Zinečnatý kation

ÚVOD

Bakterie jsou nedílnou součástí našeho života i života na Zemi. V lidském těle vytvářejí přirozenou mikroflóru, v přírodě jsou důležitou složkou mnoha ekosystémů. Existují miliony bakterií, podrobně popsáno je ale pouze několik tisíc druhů. Z medicínského hlediska jsou však důležité jen ty, které jsou schopné kolonizovat lidské tělo, ať již fyziologicky či patologicky. Pokud dojde k oslabení organismu, například vlivem stresu nebo onemocnění, mohou bakterie snáze prostupovat do těla a způsobit infekci. Bakteriální infekce jsou stále větším problémem, protože stoupá počet bakteriálních kmenů rezistentních na dosud používaná antibiotika. Stoupá proto tlak na vývoj nových chemických sloučenin s antibakteriálními vlastnostmi.

Sulfonamidy jsou deriváty kyseliny p-aminosulfonové a jejich společným strukturním základem je sulfanilamid. Pro své významné antibakteriální účinky jsou používány k léčbě bakteriálních infekcí. Jejich bakteriostatický účinek spočívá v kompetitivní inhibici syntézy kyseliny dihydrolistové, ze které si mikroorganismy vytvářejí kyselinu listovou. Ta je důležitým kofaktorem v syntéze purinů (Padberg, 2015). Kromě svého antibakteriálního účinku mají sulfonamidy protinádorovou aktivitu. Nejvýraznější protinádorový účinek je u sulfonamidů a jejich derivátů, které inhibují enzym karbonickou anhydrázu. Své využití nacházejí některé sulfonamidy také jako diuretika, inhibitory cyklooxygenáz, antiepileptika, antiarytmika nebo antimykotika.

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovit potenciální cytotoxické účinky osmi nově syntetizovaných sulfonamidů, které by mohly být do budoucna použity jako nové antibakteriální látky. Teoretická část práce měla za cíl seznámit se s literárními údaji o sulfonamidech, jejich struktuře, rozdělení, mechanismu antimikrobiálního působení, zástupcích, jejich praktickém použití a toxicitě. Cílem experimentální části bylo stanovit cytotoxicitu syntetizovaných sulfonamidů pomocí testu vylučování trypanové modři a systému xCELLigence RTCA SP.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie antibakteriálních látek

Účinek antibakteriálních látek byl známý již ve starém Egyptě, kde byly používány při procesu mumifikace. Ve středověku byl používán plesnivý chléb k léčbě hnisavých ran (Stone a Darlingtonová, 2003). První vědecké objevy přišly až o několik století později. Bylo tomu v 70. letech 19. století, kdy Louis Pasteur poprvé pozoroval inhibici růstu jednoho mikroorganismu pod vlivem jiného. Ve stejném období byly pozorovány také antibiotické účinky u některých plísní rodu *Penicillium*. V 90. letech 19. století pak byly objeveny antibakteriální účinky i u jiných druhů mikroorganismů, například rod *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Escherichia coli* (Aminov, 2010).

Jeden z nejvýznamnějších milníků v historii antibakteriálních látek je však spojován se jménem skotského lékaře Alexandra Fleminga, který roku 1928 objevil účinek plísně *Penicillium notatum*. Ta svou specifickou substancí, později pojmenovanou jako penicilin, způsobovala inhibici stafylokoků. Během 2. světové války se pak podařilo dvojici Howard W. Florey a Ernst Chain tuto substanci vyizolovat v dostatečném množství a vytvořit z ní čistý penicilin, který byl využíván k léčbě celé řady onemocnění (Heatley, 1984).

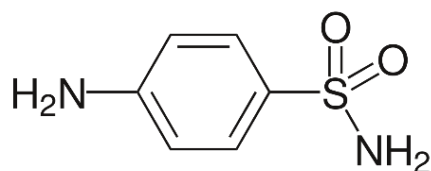
Mezi antibakteriální látky se vedle antibiotik řadí také chemoterapeutika, tedy látky vyrobené syntetickou cestou. Chemoterapeutika byla objevena a použita zhruba ve stejném období jako antibiotika, tedy začátkem 20. století. Za zakladatele chemoterapie je považován německý lékař Paul Ehrlich, který jako první objevil a úspěšně použil lék proti syfilidě, Salvarsan (Aminov, 2017). Ve 30. letech 20. století byla v Německu hojně syntetizována nová azobarviva, u kterých se předpokládaly antibakteriální účinky. V roce 1932 bylo syntetizováno červené barvivo, Prontosil rubrum. Nicméně bylo zjištěno, že tento sulfonamid na bakterie *in vitro* nepůsobí. O to větší překvapení bylo, když o pár let později G. J. Paul Domagk objevil, že je prontosil *in vivo* účinný proti infekcím vyvolaným mimo jiné i hemolytickými streptokoky. Během prováděných zkoušek se následně zjistilo, že *in vivo* má antibakteriální účinek pouze samotný sulfonamid tzv. Prontosil album, tedy bezbarvá substance. Zmíněný účinek je možný díky konverzi prontosilu na sulfanilamid, který je jeho aktivní látkou (Greenwood, 2010). Sulfanilamid se poté stal strukturním základem celé této skupiny léčiv a obměnami jeho molekuly se podařilo připravit celou řadu nových a daleko účinnějších léčiv. Protože však po jejich aplikaci došlo k rychlému rozvoji zkřížených rezistencí, přistoupilo se na podávání sulfonamidů v kombinaci s tzv. diaminopyrimidiny.

Postupně pak přicházely další objevy ze skupiny nitrofuranových chemoterapeutik, nalidixová kyselina a další.

Výroba a používání antibakteriálních látek prudce vzrostla po skončení 2. světové války, kdy byly objeveny další látky. V posledních letech se ale začínáme potýkat s čím dál častějším problémem rezistence mikroorganismů na používaná antibiotika a chemoterapeutika. Je proto nutný vývoj nových účinných látek.

2.2 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou antibakteriální chemoterapeutika, která tvoří z hlediska své struktury jednu z nejuzavřenějších a nejjednodušších skupin léčiv. Konkrétně se jedná o deriváty kyseliny p-aminosulfonové a jejich společným strukturním základem je sulfanilamid (viz Obr. 1). Ve své struktuře obsahují sulfonamidovou skupinu $-\text{SO}_2-\text{NH}_2$. Všechny sulfonamidy mají benzenové jádro, liší se mezi sebou postranními řetězci. Na jádro jsou buď připojené různé radikály přes amidoskupinu (SO_2NHR), nebo může dojít k různým substitucím aminoskupiny ($-\text{NH}_2$). Díky těmto změnám vznikají sloučeniny s odlišnými fyzikálními, chemickými, antibakteriálními a farmakologickými vlastnostmi (Katzung, 2006).



Obrázek 1 – Struktura sulfanilamidu (Muntingh, 2011).

Obecně se jedná o bílé, krystalické látky slabě kyselé povahy, s nahořklou chutí. Ve vodě jsou obvykle málo rozpustné. Jejich ionizovaná forma je ve vodě rozpustná, neionizovaná forma je rozpustná v tucích. Liposolubilita je významná pro transport přes buněčné membrány, rozpustnost ve vodě pak pro transport krví a tělními tekutinami. Rozpustnost sulfonamidů je závislá především na pH okolí (Trejbalová a Trejbal, 1988). V kyselém prostředí snadno krystalizují, což může vést až k blokádě ledvinných tubulů (Hynie, 2003). Většina sulfonamidů je připravována ve formě sodných solí, které mají středně dobrou rozpustnost a jsou používány pro intravenózní aplikaci.

K tomu, aby byly sulfonamidy plně účinné, je nutná přítomnost benzenového jádra ve struktuře. Dále je důležité, aby byla zachována p-poloha. Aromatická aminoskupina může být nahrazena azo-, azid- nebo nitro- skupinou. Sulfonamidová skupina může být nahrazena

pouze nejbližší podobnou -COOH skupinou, a to jen v případě nahrazení pouze jednoho H, aby byla zachována kyselost (Wenke et al., 1990).

Sulfonamidy se většinou podávají perorálně a velmi rychle se vstřebávají ze žaludku a tenkého střeva do krevního oběhu a z něj do tkání a tělesných tekutin (např. mozkomíšní mok, placenta, mléčná žláza). Část absorbovaných sulfonamidů se váže na proteiny krevní plazmy a část zůstává volná (Katzung, 2006). Sulfonamidy, vázané na bílkoviny, nemají antibakteriální účinek. Předpokládá se, že na bílkovinu vázaný sulfonamid má úlohu jakési zásobárny, ze které se sulfonamid postupně uvolňuje. To je důvod, proč některé sulfonamidy zůstávají v krvi déle (Melichar, 1987). V játrech jsou sulfonamidy metabolizovány především acetylací nebo oxidací. Kromě toho mohou být konjugované s kyselinou glukuronovou a sulfátem (Katzung, 2006). Acetylované sulfonamidy jsou méně rozpustné a toxičtější, glukuronoidy a sulfáty jsou zase lépe rozpustné než volné sulfonamidy. Z toho důvodu se nedoporučuje současně se sulfonamidy podávat kyselina octová nebo preparáty, které ji uvolňují (např. kyselina acetylsalicylová). Vznikalo by větší množství neaktivní acetylované formy sulfonamidů, a tím by vzrostlo i riziko vzniku krystalů sulfonamidu v ledvinách nebo močových cestách (Melichar, 1987). Rozpustné sulfonamidy se vylučují hlavně glomerulární filtrací do moči, v menší míře jsou vylučované žlučí, slzami nebo mlékem. Nevýhodou používání sulfonamidů pro terapeutické účely je jejich menší účinnost v porovnání s antibiotiky a pomalejší nástup účinku, který přichází až po určitém období latence (Třebalová a Třebal, 1988).

Terapie sulfonamidy je spojená s výskytem častých nežádoucích účinků. Některé z nich mohou být pro svou závažnost důvodem přerušení terapie. Typické jsou alergické reakce, nejčastěji v podobě kopřivky nebo fotosenzitivity, které se objevují zhruba 5 až 10 dní po zahájení léčby sulfonamidy. Jak již bylo zmíněno, acetylované sulfonamidy jsou méně rozpustné. Při nízkém příjmu tekutin může dojít k precipitaci léčiva v moči a vzniku krystalů sulfonamidu v ledvinách s jejich následným poškozením (Martínková et al., 2007). U pacientů s geneticky podmíněným deficitem enzymu glukózo-6-fosfát dehydrogenázy vzniká hemolytická anémie (Květina et al., 2000). Sulfonamidy se nesmí podávat gravidním ani kojícím ženám, protože nejsou bezpečné pro novorozence, kteří mají nevyzrálý enzymatický systém. Sulfonamidy mohou u novorozenců vytěsnit bilirubin z jeho vazby na plazmatické bílkoviny a zvýšit tak riziko vzniku jádrového ikteru (Kester et al., 2012).

2.2.1 Klasifikace sulfonamidů

Sulfonamidy lze rozdělit podle spektra a doby účinnosti do tří skupin: klasické sulfonamidy, sulfonamidy s protrahovaným účinkem a sulfonamidy s potencovaným antimikrobním účinkem.

2.2.1.1 Klasické sulfonamidy

Do této skupiny se řadí velké množství sulfonamidů, například sulfanilamid, sulfathiazol, sulfamethoxazol či kyselina sulfoxylová. Obecně mají kratší působnost, než sulfonamidy ze zmíněných dalších dvou skupin. Jejich poločas vyloučení se pohybuje v rozmezí od 5 do 12 hodin (Květina et al., 2000).

2.2.1.2 Sulfonamidy s protrahovaným účinkem

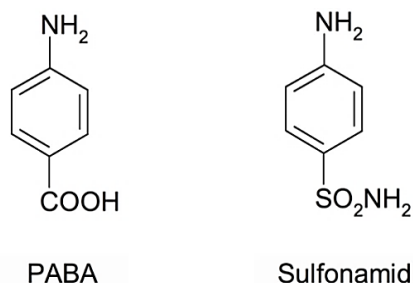
Tyto látky mají delší působnost než klasické sulfonamidy a obvykle stačí nižší dávka. Při perorální aplikaci je to jen jednou denně. Po perorálním podání jsou rychle absorbovány a distribuovány, nicméně mají prodloužený eliminační poločas a poměrně dlouho setrvávají v séru (rozmezí 24 až 48 hodin). Pomalé vylučování ledvinami je ovlivněno jejich vysokou vazbou na bílkoviny. Váží se více jak 85 % (Květina et al., 2000). Mezi tyto sulfonamidy se řadí například sulfadoxin, sulfadimetoxin, sulfamethoxypyridazin či sulfapyrazol.

2.2.1.3 Sulfonamidy s potencovaným antimikrobním účinkem

Patří sem sulfonamidy, které jsou kombinované s diaminopyrimidiny. Používají se pro rozšíření spektra účinnosti (Květina et al., 2000). Tímto způsobem získáme z původně bakteriostatických látek, tj. sulfonamid a diaminopyrimidin, látky baktericidní. Kombinací se umožní snížení dávkování jednotlivých složek, čímž se sníží riziko rozvoje nežádoucích účinků a sníží se i jejich toxicita na organismus pacienta (Trejbalová a Trejbal, 1988). Nejčastěji se používají sulfonamidy v kombinaci trimetoprimem (kotrimoxazol) nebo daiveridinem.

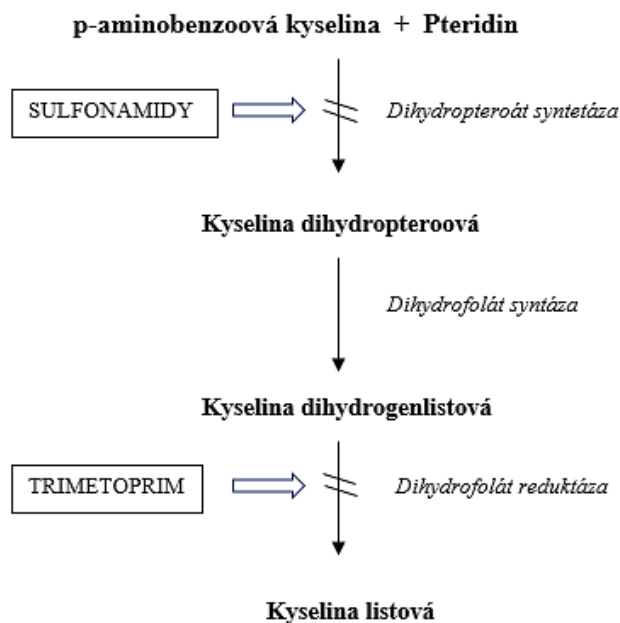
2.2.2 Antimikrobiální aktivita sulfonamidů

Sulfonamidy mají silné bakteriostatické účinky. Jedná se o strukturní analogy kyseliny p-aminobenzoové (PABA), (viz Obr. 2), které jsou schopné ji vytěsnit z vazby mechanismem kompetitivní inhibice.



Obrázek 2 – Porovnání struktury p-aminobenzoové kyseliny a sulfonamidu (upraveno podle Ehinger, 2015).

Kyselina p-aminobenzoová je důležitou látkou pro metabolismus a růst některých bakterií a parazitů (např. kokcidie), kteří ji využívají k syntéze kyseliny listové. Bakterie si syntetizují *de novo* kyselinu dihydrogenlistovou (dihydrofolát) z dihydrogenpterinu, kyseliny p-aminobenzoové a kyseliny glutamové. Tím, že sulfonamidy nahradí PABA v syntéze dihydropteroátu, dojde k inhibici enzymu dihydropteroát syntetázy, který vykonává tuto syntézu. Kyselina dihydrogenlistová je potom redukována na kyselinu listovou pomocí enzymu dihydrofolát reduktázy, který je inhibovaný trimetoprimem (Maddison et al., 2008). Takto vznikají nefunkční analogy znemožňující tvorbu funkčního 4-hydroxyfolátu (kyseliny listové), (viz Obr. 3). Následně dojde k poruchám syntézy purinů, pro něž je kyselina listová nezbytným koenzymem, a následně také poruchám nukleových kyselin. Důsledkem je zamezení dalšího růstu mikroorganismu a poruchy v procesu dělení buněk (Hynie, 2003, Katzung, 2006). Růst mikroorganismu však může být obnoven v případě, že jsou v prostředí s výrazným nadbytkem PABA, např. hnis nebo při podání lokálních anestetik. Antibakteriální účinky mají kromě samotných sulfonamidů také jejich deriváty, které mají ve své molekule iont kovu. Nejvíce studované kovové ionty jsou kobalt, měď, nikl a zinek (Chohan et al., 2012).



Obrázek 3 – Inhibice syntézy folátu sulfonamidy a trimetoprimem (upraveno podle Bockstael a Van Aerschot, 2009).

Mikrobiální spektrum všech používaných sulfonamidů je obecně stejné. Sulfonamidy inhibují jak grampozitivní, tak i gramnegativní bakterie a také některé prvoky jako jsou kokcidie a *Toxoplasma spp.* V případě použití více sulfonamidů najednou se zvětšuje jejich spektrum účinku. V takovém případě jsou účinné na kmeny *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Pasteurella* a *Escherichia coli*. Naopak vysoce rezistentní jsou vůči sulfonamidům kmeny *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Leptospira spp.* a většina chlamydií.

Živočišné buňky a rovněž i některé bakterie jsou vůči sulfonamidům rezistentní. Je to proto, že tyto buňky nemají potřebné enzymy pro syntézu kyseliny listové a nejsou tedy schopné si ji syntetizovat. Jsou plně odkázané na její příjem z exogenních zdrojů (Wenke et al., 1990). Rezistence na sulfonamidy může být jak na chromozomální, tak i na plazmidové úrovni. Vzniklé pozměněné proteiny, snižující afinitu, jsou nejčastějším příkladem vzniklé rezistence. Například u stafylokoků je chromozomálně zprostředkovaná rezistence na sulfonamidy způsobená mutací genů kódujících enzym dihydropteroát syntetázu a rezistence zprostředkovaná plazmidy je zapříčiněna mutací genů, které kódují dihydrofolát reduktázu. Plazmidem zprostředkovaná sulfonamidová rezistence u střevních gramnegativních bakterií je často spojená s odolností na ampicilin a tetracyklin (Boothe, 2016).

Účinek sulfonamidů může být blokován nadbytkem kyseliny p-aminobenzoové. Existují však i jiné látky, které mohou v organismu kyselinu uvolňovat. Tuto vlastnost mají

všechny snadno hydrolyzovatelné deriváty PABA, například anestetika ze skupiny derivátů kyseliny p-aminobenzoové (např. prokain). Je známá celá řada dalších sloučenin, které působí nekompetitivně na aktivitu sulfonamidů. Jedná se například o některé aminokyseliny (např. methionin, serin) dále pak purinové a pyrimidinové báze (Melichar, 1987). Účinnost sulfonamidů může být dále snížena výrazným přebytkem albuminu, autolýzátu tkáně nebo endogenních produktů degradace proteinů.

2.2.3 Antifungální aktivita sulfonamidů

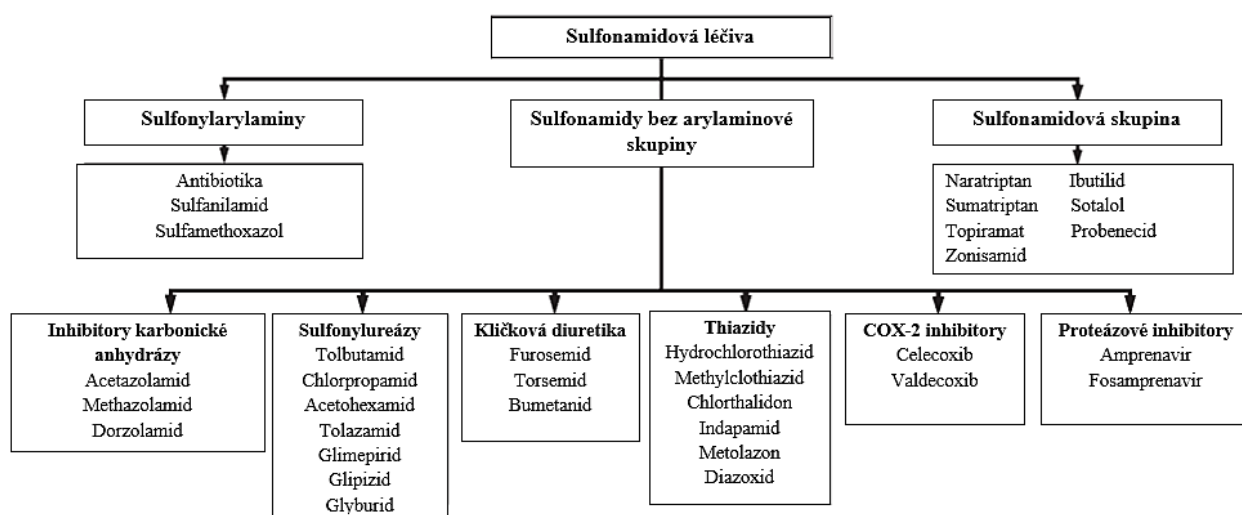
Sulfonamidy jsou používané především pro jejich silné antibakteriální účinky. Nicméně díky jejich antifungálním vlastnostem nacházejí stále větší uplatnění v klinické praxi. V současné době existuje několik sulfonamidových sloučenin, které se používají v rámci prevence výskytu plísňových onemocnění. Avšak stále častěji se setkáváme s rezistencí na tyto sloučeniny. Proto se syntetizují nové aktivní sloučeniny s potenciální antifungální aktivitou. Významné antifungální vlastnosti vykazují Schiffovy báze odvozené od sulfonamidů a jejich komplexů kovů obsahující kobalt (Co^{2+}), měď (Cu^{2+}), nikl (Ni^{2+}), stříbro (Ag^{1+}) a zinek (Zn^{2+}), (Chohan et al., 2012). Některé kovové komplexy sulfonamidů (např. Ag^{1+} a Zn^{2+} -sulfadiazin) se používají při prevenci vzniku bakteriální infekce u popálenin. U stříbrného sulfadiazinu byly navíc pozorované silné antifungální vlastnosti, které z něj dělají klinicky široce používanou sloučeninu pro léčbu popáleninových infekcí (Bellú et al., 2005).

In vitro byl prozatím prokázán významný antifungální účinek proti zástupcům rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*), rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*), *Microscopum canis*, *Fusarium solani* (Chohan et al., 2012), *Saccharomyces cerevisiae* (Bellú et al., 2005) a *Trichosporon asahii* (Krátký et al., 2017).

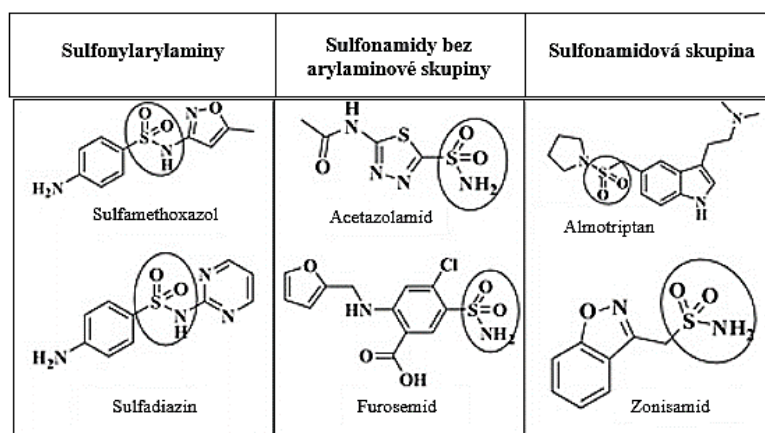
2.3 Sulfonamidová léčiva

Jak již bylo zmíněno, všechny sulfonamidy mají ve své struktuře benzenové jádro, na které je navázaný určitý substituent. Substitucí různých skupin získáváme látky lišící se svými vlastnostmi. Sulfonamidy jsou používané především jako antibiotika při léčbě močových infekcí. Nicméně se nevyužívá pouze jejich antibakteriálních vlastností. Používají se jako diuretika, antidiabetika, antiflogistika, antivirotika (Scozzafava, et al., 2003) a využívá se i jejich antifungální aktivita.

Sulfonamidová léčiva můžeme podle jejich chemické struktury rozdělit do tří různých skupin (viz Obr. 4): sulfonylarylaminy, sulfonamidy bez arylaminové skupiny a sulfonamidová léčiva obsahující sulfonamidovou skupinu (Johnson et al., 2005). Rozdíly ve struktuře jednotlivých skupin jsou zobrazené na obrázku 5. Sulfonylarylaminy jsou sulfonamidy, které mají sulfonamidovou skupinu připojenou přímo k benzenovému kruhu a v poloze N₄ mají nesubstituovanou aminoskupinu (-NH₂). Sulfonamidy bez arylaminové skupiny mají sulfonamidovou skupinu připojenou k benzenovému kruhu nebo jiné cyklické struktuře, ale v poloze N₄ není aminová skupina. V případě sulfonamidových léčiv obsahujících sulfonamidovou skupinu není sulfonamidová část přímo spojena s benzenovým kruhem nebo jinou cyklickou strukturou.



Obrázek 4 – Rozdělení sulfonamidových léčiv dle chemické struktury: COX-2 inhibitory – inhibitory cyklooxygenázy 2 (upraveno podle Johnson et al., 2005).



Obrázek 5 – Strukturní rozdíl u tříd sulfonamidových léků (upraveno podle Ghimire et al., 2013).

2.3.1 Sulfonylarylaminy

Sulfonylarylaminy jsou používány jako sulfonamidová antibiotika, avšak přítomnost arylaminové skupiny je spojena s častými nežádoucími účinky těchto léčiv. Mezi nežádoucí účinky při léčbě sulfonamidy patří nauzea, zvracení, bolest hlavy nebo ospalost (Lochman, 1990). Avšak jen některé z těchto vedlejších účinků jsou zprostředkované specifickou imunitní odpovědí a lze je tak klasifikovat jako skutečné alergické reakce. Právě alergické reakce anafylaktického typu, tedy IgE-zprostředkovaná kopřivka a anafylaxe, jsou poměrně vzácné. Stejně tak jako reakce vyvolané IgG protilátkami (hemolytická anémie). Nejčastějším nežádoucím projevem jsou vyrážky v podobě makulopapulózního až urtikariálního exantému, může se objevit i fotosenzibilizace (Schnyder a Pichler, 2013). Většina kožních projevů má však pouze přechodný charakter a vymizí po vysazení léku. U některých citlivých jedinců může dojít po podání sulfonylarylaminů k rozvoji závažných život ohrožujících reakcí, jako je Stevens-Johnsonův syndrom nebo toxická epidermální nekrolýza (Slatore et al., 2004). Dalším problémem je poměrně vysoký výskyt nežádoucích účinků (vyrážky) u HIV pozitivních pacientů, kterým jsou podávány sulfonamidové léky. Hojně podávaný byl kotrimoxazol, používaný jako prevence a léčba oportunních infekcí u HIV pozitivních. Výskyt vyrážky byl vyšší než u běžné populace (Schnyder a Pichler, 2013).

V minulosti se vedly diskuze o zkřížené reaktivitě mezi sulfonylarylaminy, sulfonamidy bez arylaminové skupiny a léky obsahující sulfonamidovou skupinu. Žádné studie však nepotvrdily, že by mezi těmito skupinami léků docházelo ke zkřížené reaktivitě. Přesto bylo navrženo paradigma, podle kterého budou pacientům, s alergií na sulfonylarylaminy, podávány sulfonamidy bez arylaminové skupiny nebo léky obsahující sulfonamidovou skupinu pouze v případě, že alternativní léčba nebude možná (Johnson et al., 2005).

Nejznámějším sulfonamidovým antibiotikem je kotrimoxazol. Tento sulfonylarylamin je používán při léčbě močových infekcí a infekcí dýchacích cest. Je složený z trimetoprimu a sulfamethoxazolu. Tato kombinace navzájem potencuje účinky obou léčiv, přičemž dochází k ovlivnění hned dvou klíčových enzymů v syntéze kyseliny listové. Konkrétně se jedná o dihydropteroát syntetázu a dihydrofolát reduktázu (Trejbalová a Trejbal, 1988). Sulfamethoxazol inhibuje dihydropteroát syntetázu, která za normálních podmínek (bez přítomnosti sulfonamidů) začleňuje PABA do struktury kyseliny listové. Trimetoprim inhibuje dihydrofolát reduktázu, zodpovědnou za oxidaci při syntéze deoxythymidin monofosfátu (dTMP) z deoxyuridin monofosfátu (dUMP). Takto se zabrání syntéze purinů a pyrimidinů, čímž nedojde k syntéze základních aminokyselin a bílkovin v bakterii (Wormser et al., 1982).

2.3.2 Sulfonamidy bez arylaminové skupiny

V rámci této skupiny dále rozlišujeme 6 podskupin: sulfonylureázy, inhibitory karbonické anhydrázy, kličková diuretika, thiazidy, COX-2 inhibitory a proteázové inhibitory. Funkce, využití a zástupci jednotlivých podskupin jsou uvedeny níže.

2.3.2.1 Sulfonylureázy

Sulfonylureázy byly objeveny v roce 1942, kdy bylo během výzkumů zpozorováno, že některé sulfonamidy navozují hypoglykémii u pokusných zvířat. Jako první byla syntetizována látka karbutamid (1-butyl-3-sulfonylmočovina). Tato sloučenina byla první sulfonylureázou, která se používala pro léčbu diabetes mellitus 2. typu (Zimmerman, 1997). Následně však byla z trhu stáhnuta, protože se po jejím podávání objevily nepříznivé účinky na kostní dřeň. Do 60. let 20. století byly sulfonylureázy dělené do dvou generací. Léky první generace, jako jsou tolbutamid a chlorpropamid, se již v dnešní době nepoužívají. Glimepirid, glipizid a glyburid jsou v současné době užívané sulfonylureázy druhé generace. Všechny léky druhé generace jsou stejně účinné ve snižování koncentrace glukózy v krvi. Liší se mezi sebou v absorpci, metabolismu a v dávkování (Sola et al., 2015).

Hlavním účinkem sulfonylureáz je zvýšení koncentrace inzulínu v plazmě, proto jsou tyto sloučeniny účinné pouze v případě, že β -buňky pankreatu neprodukují dostatek inzulínu. Zvýšení hladiny inzulínu v plazmě je způsobeno dvěma důvody. Za prvé dochází ke stimulaci pankreatických β -buněk, které vylučují více inzulínu a za druhé dochází ke snížení jaterní clearance inzulínu (Ghosh a Collier, 2012). Co se týče samotného mechanismu účinku, sulfonylureázy se vážou na specifický receptor SUR 1, který se nachází na povrchu β – buněk pankreatu (Nagashima et al., 2004). Dochází k zablokování průchodu K^+ iontů přes ATP dependentní kanál. Přenos draselných iontů je zastavený a buněčná membrána je depolarizovaná. Dochází ke ztrátě napětí na povrchu buněčné membrány, které zabraňuje difúzi Ca^{2+} iontů do cytosolu. Zvýšený průtok vápníku do β -buněk způsobuje kontrakci aktin-myozinového komplexu zodpovědného za exocytózu inzulínu, který je vylučovaný ve velké míře (Proks et al., 2002).

Kromě β -buněk pankreatu působí sulfonylureázy i na jiné buňky. Po jejich podávání bylo zaznamenáno zvýšení počtu inzulínových receptorů na povrchu adipocytů, monocytů (Olefsky a Reaven, 1976) a erytrocytů u pacientů s chronickým onemocněním (Sola et al., 2015). V průběhu let byla popsána řada extrapankreatických účinků sulfonylureových léků. Byly zaznamenány přímé účinky na játra a tukovou tkáň, které zřejmě souvisí s antidiabetickým působením sulfonylureáz. V případě jater dochází k inhibici

triacylglycerolové lipázy. Přímý účinek na tukovou tkáň se projevuje inhibicí lipolýzy, se kterou souvisí i inhibice triacylglycerolové lipázy, dále pak dochází ke zvýšenému vychytávání a oxidaci glukózy. U některých pacientů byla pozorovaná aktivace adenylátcyklázy, inhibice adenosin-3', 5'-monofosfátdiesterázy a snížení střevní absorpce glukózy (Seino, 2012). Mezi zaznamenané účinky, které nesouvisejí s antidiabetickou aktivitou, patří zvýšená kontraktilita srdce a inhibice agregace destiček.

Léčba sulfonylureázami je obvykle dobře snášena, avšak u citlivějších jedinců se mohou objevit nežádoucí účinky. Nejběžnějším nežádoucím projevem je hypoglykémie, která se častěji vyskytuje po podávání dlouhodobě působících sulfonylureáz, jako jsou chlorpropamid a glibenklamid (Holstein et al., 2001). Nicméně i ostatní sulfonylureázy mohou způsobit hypoglykémii. Obvykle k ní dojde po nadměrné dávce. Dobrou prevencí vzniku hypoglykémie je zahájení léčby sulfonylureázami při nízkých dávkách, přičemž dávkované množství může být postupně zvyšováno v rozmezí 2 až 4 týdnů. Mezi další časté nežádoucí účinky patří nauzea a kožní reakce. Občas mohou být zaznamenané abnormální hodnoty jaterních testů. Vzácně se může objevit i fotosenzitivita (Sola et al., 2015). Některé studie naznačují, že sulfonylureázy mohou ovlivnit funkci a činnost srdce (Kasznicki a Drzewoski, 2014).

2.3.2.2 Inhibitory karbonické anhydrázy

Karbonické anhydrázy (CA), nebo také anhydrázy kyseliny uhličitě, jsou metaloenzymy, které katalyzují hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanového iontu a protonu, zapojených do mnoha biochemických procesů (Supuran, 2008). Existuje celkem 12 izoform lidské karbonické anhydrázy, přičemž všechny mají ve svém aktivním místě ionty zinku. Pět izoform CA (CA I, CA II, CA III, CA VII a CA XIII) je cytosolických, izoforma CA IV je membránově vázaná, CA VI je sekreční protein, CA VA a CA VB jsou mitochondriální a zbylé tři izofomy enzymu (CA IX, CA XII a CA XIV) jsou transmembránové proteiny (Vaškevičienė et al., 2017). Zmíněné izoformy se nacházejí v různých tkáních a buněčných prostorech, kde se účastní důležitých biologických procesů, jako jsou glukoneogeneze, lipogeneze, resorpce kostí a udržování acidobazické rovnováhy (Mete et al., 2016). Vedle fyziologických dějů se karbonické anhydrázy podílejí na udržování fyziologického pH uvnitř nádorových buněk, které jsou v hypoxickém stavu. Všechny tyto zmíněné procesy jsou potenciálním terapeutickým cílem. Lze využít inhibice nebo aktivace CA při léčbě řady poruch, jako je edém, glaukom, epilepsie, rakovina nebo obezita. Inhibice těchto enzymů je již několik desetiletí klinicky využívána při léčbě systémově působících glaukomů

(Supuran, 2008). Dříve byly inhibitory CA používané jako slabá acidifikující diuretika působící v proximálním tubulu ledvin (viz Obr. 6), kde inhibují reabsorpci bikarbonátů.

Nejvíce používanými CA inhibitory jsou primární sulfonamidy a jejich deriváty, zvláště aromatické a heterocyklické sulfonamidy jsou specifickými a účinnými inhibitory (Mete et al., 2016). Všechny inhibitory na bázi sulfonamidů jsou charakteristické tím, že je sulfonamidová část schopna vázat na Zn^{2+} ionty v aktivním místě CA. Na sulfonamidovou kostru lze navázat substituenty s různou chemickou povahou, a tak ovlivnit vazebnou afinitu a selektivitu ligandu pro izoformy CA. V současné době je stále nejvíce používaným inhibitorem acetazolamid a methazolamid. Pravděpodobně velký potenciál mají sloučeniny, které mají na své benzensulfonamidové části substituovaný halogen. Byl studovaný vliv substituce chloru nebo bromu v meta poloze jak pro afinitu, tak pro selektivitu k CA izoenzymům. Dibromo meta- substituované sloučeniny vykazovaly více jak desetinásobnou selektivitu pro mitochondriální izoenzym CA VB, než zbylých 11 katalyticky aktivních lidských karbonických anhydráz. Tyto sloučeniny by mohly být použity pro další vývoj jako inhibitory tohoto izoenzymu, který je spojený s onemocněním centrálního nervového systému a obezitou (Vaškevičienė et al., 2017).

Častým nežádoucím účinkem léčby inhibitory karbonické anhydrázy je snížené vylučování amoniaku. Protože dochází ke ztrátě bazí, vzniká metabolická acidóza. Ta inhibuje další účinek inhibitorů CA, tudíž jejich diuretické působení během několika dní navzdory dalšímu podávání ustává. Při dlouhodobé léčbě vzniká výrazná ztráta draslíku. Proto je nutná substituce kalia a časté kontroly jeho hladin (Lüllmann et al., 2004).

2.3.2.3 Thiazidy

Thiazidy byly do klinické praxe uvedeny v 50. letech 20. století pro léčbu hypertenze. Tato skupina diuretik byla objevena při hledání silnějších diuretik odvozených ze starších inhibitorů karbonické anhydrázy typu acetazolamidu. Sulfonamidová skupina na jádře zůstala zachována a stejně tak i částečná schopnost inhibovat CA. Pro získání nových vlastností těchto sloučenin byl do blízkosti sulfonamidové skupiny navázán atom chloru (Sinha a Agarwal, 2015; Lüllmann et al., 2004). Přesněji řečeno, jsou thiazidy deriváty benzothiazinu, mezi něž patří hydrochlorothiazid a chlorothiazid. Do této skupiny se dále řadí farmakologicky podobná léčiva označovaná jako thiazidová diuretika a zahrnují metolazon, chlorthalidon a indapamid. Jelikož všechna tato léčiva mají stejný mechanismus působení, jsou pro jednoduchost souhrnně označována jako thiazidy (Sinha a Agarwal, 2015).

Nejdůležitější účinek benzothiazidových derivátů je jejich schopnost inhibovat resorpci sodných a chloridových iontů na počátku distálního kanálku (viz Obr. 6). Inhibice je dána porušením kotransportéru Na^+ a Cl^- iontů, který se nachází na membráně tubulárních buněk. Pravděpodobně dochází k obsazení vazebného místa pro Cl^- na transportním proteinu (Duarte a Cooper-DeHoff, 2014). Po podání vysokých dávek se dostatečně projeví i inhibice karbonické anhydrázy v proximálním tubulu, takže se při současném vylučování hydrogenuhličitanu stává moč alkalickou. Dochází také ke zvýšenému vylučování kalia. To je dáno jednak zvýšenými dávkami thiazidů, inhibující karbonickou anhydrázu, ale také nižšími dávkami sodíku, protože už není dostatek sodíku na výměnu kalia v distální části nefronu (Lüllmann et al., 2004). Zvýšené vylučování sodíku je spojené také s antihypertenzním účinkem. Kromě tohoto účinku navíc thiazidy zvyšují účinek i jiných antihypertenziv a zabráňují rozvoji rezistence vůči adrenergním blokátorům a vazodilatačním přípravkům, které jsou používány při léčbě pacientů s hypertenzí (Shah et al, 1978).

Thiazidy se vstřebávají v gastrointestinálním traktu a silně se vážou na plazmatické bílkoviny, což omezuje jejich filtraci v glomerulu. Aby mohly být dopraveny do místa jejich působení, musí být aktivně secernovány transportérem organických aniontů v proximálním tubulu (Blowey, 2016).

Thiazidová diuretika jsou obvykle dobře snášena. U některých citlivějších jedinců se může objevit slabost, svalové křeče, impotence nebo metabolické změny (Lincová a Farghali, 2007). Závažným nežádoucím účinkem je hypokalemie, která je způsobená ztrátami draslíku ledvinami. Na počátku déletrvající terapie thiazidy může dojít ke zvýšení hladin krevních lipidů, nicméně se toto navýšení během léčby vrátí k fyziologickým hodnotám (Lüllmann et al., 2004). Dále se uvádí pozitivní účinek léčby thiazidovými diuretiky na zdraví kostí. Zvyšuje se denzita kostí a dochází ke snížení rizika zlomenin. Tento ochranný účinek je ale úzce spojený s dávkováním a délkou trvání léčby. Po ukončení terapie tyto účinky vymizí (Caudarella et al., 2015). Všechna thiazidová diuretika snadno prostupují placentou a také se objevují v mateřském mléce, proto se tyto látky nepodávají v těhotenství ani v období laktace (Lüllmann et al., 2004).

2.3.2.4 Kličková diuretika

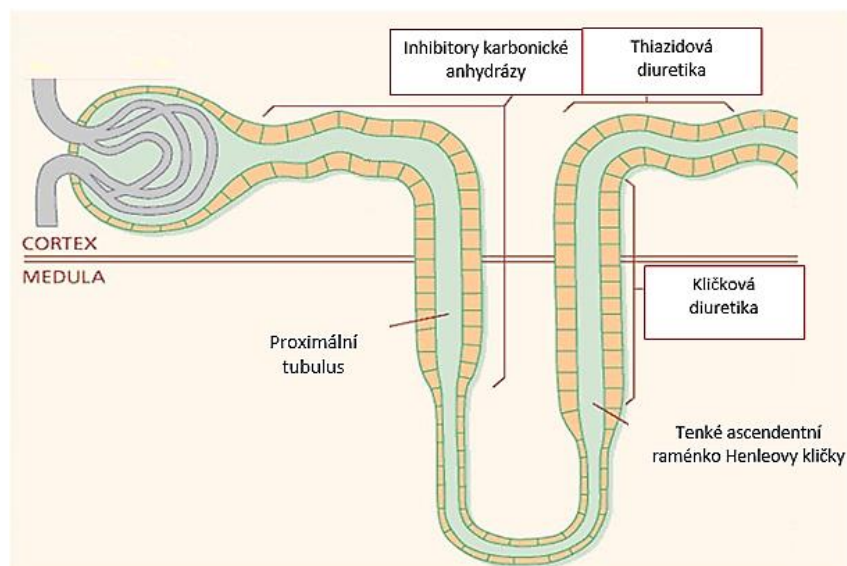
Ve srovnání s inhibitory karbonické anhydrázy a thiazidy se jedná o velmi silná diuretika. Nejvíce užívaným zástupcem této skupiny je furosemid, u kterého lze najít strukturní podobnost s thiazidy. Ostatní kličková diuretika, torsemid a bumetanid, mají odlišnou

strukturu od thiazidů a od furosemidu se liší pouze svými sekundárními vlastnostmi (Lüllmann et al., 2004).

Jejich hlavní účinek spočívá v inhibici $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Cl}^-$ kotransportéru v silné části vzestupného raménka Henleovy kličky (viz Obr. 6). V důsledku toho je blokován transport NaCl z tubulů do intersticia a dochází ke snížení osmotického tlaku (Oh a Han, 2015). Zvýšená exkrece sodíku osmoticky strhává vodu, zvyšuje se diuréza a sekrece H^+ a K^+ iontů v distálním tubulu. Takto může být vyvolána metabolická alkalóza. Zároveň dochází k vylučování Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů (Martínková et al., 2007).

Biologická dostupnost kličkových diuretik je po perorální aplikaci velmi variabilní. U furosemidu se udává rozmezí 10 – 90 % (Oh a Han, 2015). Jeho biologická dostupnost může být zlepšena, pokud je podáván před jídlem. Po perorálním podání se diuretický účinek objevuje do 1 hodiny a přetrvává 6 – 8 hodin. Po intravenózní aplikaci je nástup účinku do 30 minut a setrvává 3 – 6 hodin (Martínková et al., 2007). Furosemid je z velké části vázán na plazmatické bílkoviny a dopravován do proximálního tubulu, kde je sekretován pomocí organických transportérů. Zhruba polovina furosemidu je vylučována v nezměněné formě glomerulární filtrací a druhá část je v ledvinách metabolizována na glukuronid (Oh a Han, 2015). Silný a rychle nastupující diuretický účinek těchto diuretik se využívá především k mobilizaci a vyloučení edémové tekutiny při orgánovém edému. Kličková diuretika působí při edémech, které jsou podmíněné hepatálně, renálně i kardiálně (Lüllmann et al., 2004). Furosemid má navíc vazodilatační účinek, kterým se snižuje předtížení srdce (míra naplnění srdce krví), a proto se používá u akutních stavů jako je městnavá srdeční insuficience, plicní edém, hyperkalcémie nebo hypertonická krize (Lincová a Farghali, 2007).

Nežádoucí účinky kličkových diuretik vychází z jejich účinků. Zahuštění krve zvyšuje její viskozitu, a tím i odpor, který je kladený na proudění krve. To zvyšuje i riziko vzniku trombóz (Lüllmann et al., 2004). U některých jedinců může docházet k narušení rovnováhy elektrolytů. Se změnami elektrolytového složení endolymfy souvisí i vznik dočasné ototoxicity, která byla zaznamenána při podávání vysokých dávek furosemidu (Oh a Han, 2015). Dále byly zaznamenány gastrointerstinální obtíže, exantémy a při dlouhodobé terapii se u některých pacientů objevilo svalové napětí a lýtkové křeče (Lincová a Farghali, 2007).



Obrázek 6 – Místa působení diuretik sulfonamidového typu (upraveno podle Mende, 1990).

2.3.2.5 COX-2 inhibitory

Cyklooxygenáza je enzym zodpovědný za syntézu prostaglandinů a tromboxanů z kyseliny arachidonové. V organismu se vyskytuje ve třech izoformách: cyklooxygenáza 1 (COX-1), cyklooxygenáza 2 (COX-2) a cyklooxygenáza 3 (COX-3), (Lülmann et al., 2004). Izoenzym COX-1 je označován jako konstitutivní, protože je stabilně přítomný v organismu (Sauter et al., 2008). Katalyzuje syntézu prostaglandinů, které zajišťují fyziologické funkce, především zajišťují ochranu žaludeční sliznice a zvyšuje krevní průtok ledvinami. Dále je zapojený do procesu aktivace krevních destiček. COX-1 je důležitý pro syntézu tromboxanu A₂ (TxA₂), produkovaného aktivovanými krevními destičkami. TxA₂ zvyšuje jejich adhezivitu a indukuje vazokonstrikci (Lincová a Farghali, 2007). Izoenzym COX-2 je označován jako indukibilní (Sauter et al., 2008). Jeho koncentrace začne stoupat po působení zánětlivých faktorů (Funk a FitzGerald, 2007). Katalyzuje tvorbu prostaglandinů jako odpověď na zánětlivý stimul. Napomáhá tak rozvoji zánětu, bolesti a zvýšení teploty. Izoenzym COX-3 se nachází v srdci a v centrálním nervovém systému, s největší pravděpodobností v předním hypotalamu. Selektivně je inhibovaný paracetamolem i některými nesteroidními protizánětlivými léky (NSAIDs). Inhibice COX-3 reprezentuje mechanismus analgetického a antipyretického účinku těchto léků. Tento jev byl zatím dokázán jen u laboratorních zvířat (Botting a Ayoub, 2005).

Izoenzymy COX-1 a COX-2 jsou inhibované NSAIDs, včetně aspirinu, ibuprofenu a indomethacinu. Inhibice COX-2 vede k řadě nežádoucích účinků, např. gastrointestinálním vředům nebo renální toxicitě. Proto se hledají nové farmakologické látky, které selektivně

inhibují COX-2. V současné době jsou nejpoužívanější dvě léčiva, a to celecoxib a valdecoxib. Celecoxib je používán v rámci prevence vzniku rakoviny prsu. Léčba celecoxibem, spojená s kardiovaskulárním rizikem a jeho užívání jako chemoprevenčního činidla, je zpochybňována. Je proto potřeba stanovit optimální dávku celecoxibu, která minimalizuje kardiovaskulární riziko a při níž současně zůstane zachován ochranný účinek proti rakovině prsu (Sauter et al., 2008).

Stále zkoumaná je také role zánětu, poháněného COX-2, u Alzheimerovy choroby a karcinomu tlustého střeva. U Alzheimerovy choroby je COX-2 ve větší míře exprimovaný kolem zánětlivých plaků v centrálním nervovém systému a u karcinomu tlustého střeva se extrémně zvyšuje jeho exprese. Bylo prokázáno, že u pacientů užívající NSAIDs je nižší incidience a pomalejší progresse Alzheimerovy choroby a snižuje se rychlost růstu střevních polypů (Brooks, 2000).

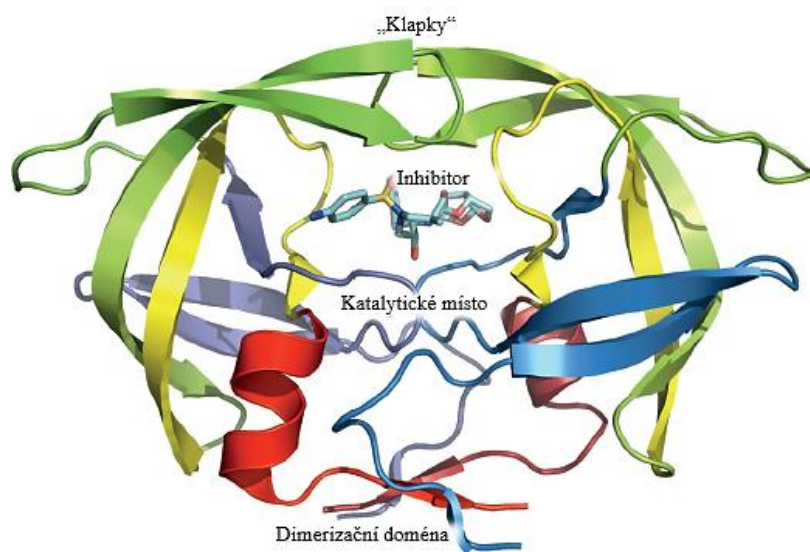
2.3.2.6 Proteázové inhibitory

Požadavky na protivirovou terapii jsou v zásadě totožné jako na látky používané k terapii infekcí vyvolaných bakteriemi, houbami nebo prvoky. Léčivo by mělo selektivně ovlivňovat virus, aniž by poškozovalo metabolismus infikovaných buněk nebo ostatních zdravých buněk hostitelského organismu (Lülmann et al., 2004). Tyto nároky bývají obtížně splnitelné, protože viry nemají vlastní metabolický aparát, a proto pro své rozmnožování potřebují aktivní metabolismus hostitelské buňky. Antivirová léčiva zasahují na různých úrovních virové infekce, od vstupu virionu do buňky, přes replikaci v jádře až k tvorbě nových virionů, které jsou následně vyplaveny do buňky. Byla vyvinuta řada protivirových léčiv, přičemž největší rozvoj přišel až se vznikem celosvětově rozšířené epidemie AIDS. V současné době existuje řada antivirotik, z nichž je většina určena právě pro léčbu infekce HIV a AIDS. Vedle nich jsou využívána antivirotika pro léčbu onemocnění způsobených virem hepatitidy B, chřipky, herpes simplex nebo onemocnění způsobená cytomegalovirem (Scozzafava, 2003).

Proteázové inhibitory jsou léčiva inhibující aktivní místo HIV-proteázy (HIV-PR). Tento enzym je důležitý pro produkci zralého infekčního viru a štěpí syntetizované virové polypeptidy během replikace na strukturní proteiny, které jsou důležité pro sestavení obalu viru a aktivní enzymy. Inhibicí proteázy je zabráněno novým vlnám infekce (Scholar, 2007).

HIV-PR (viz Obr. 7) je dimerická aspartátová proteáza, která je tvořena dvěma identickými, nekovalentně vázanými podjednotkami. Každá tato podjednotka obsahuje 99 aminokyselinových zbytků. Aktivní místo enzymu se nachází na rozhraní dimeru a

obsahuje dva katalytické zbytky kyseliny asparagové. Vazebné místo pro substrát je složené ze dvou ekvivalentních zbytků z každé podjednotky. Na jedné straně je lemované dvěma zbytky kyseliny asparagové a na druhé straně dvojicí antiparalelních β -vlásečkových struktur označovaných „klapky“. Tyto klapky jsou vysoce flexibilní a po vazbě inhibitoru podléhají strukturním změnám (Lv et al., 2015). HIV-PR štěpí některé jinak těžko hydrolyzovatelné peptidové vazby, např. Tyr-Pro a Phe-Pro. Právě této schopnosti se využívá při konstrukci nových proteázových inhibitorů (Scozzafava, 2003).



Obrázek 7 – Struktura HIV-proteázy v komplexu s inhibitorem (upraveno podle Lv et al., 2015).

V současné době existuje 10 inhibitorů HIV-PR schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Patří k nim např. amprenavir, fosamprenavir, nelfinavir, tipranavir, sachinavir, indinavir, atd. (Lv et al., 2015). Vzhledem k nejnižšímu výskytu nežádoucích účinků je nejčastěji používaným inhibitorem proteáz nelfinavir. Každý z těchto inhibitorů je bohužel spojený se specifickými změnami genotypu, které zřejmě přispívají k fenotypové rezistenci viru. Z tohoto důvodu je doporučena kombinovaná terapie alespoň dvou až tří látek současně, aby se zabránilo vzniku rezistence HIV (Scholar, 2007). Vznik zkřížené rezistence mezi jednotlivými látkami této skupiny je komplexní pochod a je předmětem dalších výzkumů.

Většina těchto inhibitorů je při dlouhodobé léčbě doprovázena nežádoucími účinky. Nejčastějšími vedlejšími účinky jsou metabolické syndromy, jako je dyslipidémie, rezistence na inzulín, lipodystrofie nebo lipoatrofie (Fantry, 2003). Dále byla zaznamenána kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění. Mezi méně závažné nežádoucí projevy

patří gastrointestinální potíže s nevolností a průjemy (Lülmann et al., 2004). Podávání inhibitorů HIV-PR bylo také spojeno se zvýšenou spontánní krvácivostí u pacientů s hemofilií typu A a B (Katzung, 2006).

V současné době je snaha optimalizovat chemickou strukturu proteázových inhibitorů, aby byly co nejvíce omezeny nežádoucí účinky. Potencionálním řešením by mohly být scaffoldy, které by tvořily nové „lešení“ inhibitorů HIV-PR (Lv et al., 2015).

2.3.3 Sulfonamidová léčiva se sulfonamidovou skupinou

Jak již bylo uvedeno na začátku kapitoly 2, u sulfonamidových léčiv obsahujících sulfonamidovou skupinu, není sulfonamidová část přímo spojena s benzenovým kruhem nebo jinou cyklickou strukturou. Mezi tato léčiva se řadí látky s rozličným účinkem. Patří sem antiarytmika (např. sotalol, ibutilid), antiepileptika (např. zonisamid, topiramát), antiuratika (např. probenecid) a agonisté 5-hydroxytryptaminových (5-HT) receptorů (např. sumatriptan, naratriptan), které se používají na zmírnění intenzity migrény a klastrových bolestí hlavy (Ghimire et al., 2013). Mechanismus účinku, nežádoucí příznaky a další informace o jednotlivých léčivech jsou uvedeny níže.

2.3.3.1 Antiarytmika

Arytmie vznikají na základě poruchy tvorby vzruchu, poruchy šíření vzruchu nebo jejich kombinací (Lincová a Farghali, 2007). Příčinou vzniku arytmií může být degenerativní onemocnění, místní ischemie nebo nekróza myocytů při infarktu myokardu. Terapie arytmií závisí na typu arytmiie, délce jejího trvání, závažnosti a stavu srdečního svalu. Hlavním cílem léčby je obnovení normálního srdečního rytmu, popřípadě prevence těžších arytmií (Vítovec et al., 2017). Srdeční arytmiie mohou být léčeny buď nefarmakologickými metodami, například elektrickou defibrilací, chirurgickými metodami, nebo antiarytmiky (Martínková et al., 2007). Antiarytmika ovlivňují hemodynamiku a kontraktilitu srdečního svalu. Podle klasifikace Vaughana Williamse existují celkem 4 třídy antiarytmik, která působí různým mechanismem. Zejména na elektrické děje a iontové kanály na membráně srdečních buněk (Frumin et al., 1989). Antiarytmika, která patří mezi sulfonamidová léčiva se sulfonamidovou skupinou, jsou sotalol a ibutilid.

Sotalol

Jedná se o neselektivní β blokátor, který navíc vykazuje antiarytmické vlastnosti III. třídy antiarytmik. Hojně je používán k udržení normálního srdečního rytmu u pacientů s život ohrožujícími ventrikulárními arytmiemi (Gordon a Kittleson, 2008).

Sotalol se neselektivně váže na β 1- a β 2-adrenergní receptory, čímž brání aktivaci receptorů jejich stimulačním ligandem (katecholaminy), (Bertrix et al., 1986). V případě, že se příslušný katecholamin nenaváže na receptor, komplex G-proteinů spojený s tímto receptorem nemůže aktivovat produkci cyklického AMP, který je zodpovědný za aktivaci Ca^{2+} kanálů. Snížení aktivace kalciových kanálů má za následek snížení intracelulárního vápníku. V srdečních buňkách je vápník důležitý pro generování elektrických signálů při kontrakci srdečního svalu (Kassotis et al., 2003). S nižším množstvím vápníku v buňkách dochází ke snížení elektrických signálů potřebných ke kontrakci svalu. Tím se prodlouží čas potřebný pro přirozenou nápravu kontrakce vyvolanou arytmií. Jak již bylo zmíněno, sotalol vykazuje antiarytmické vlastnosti antiarytmik III. třídy. Konkrétně blokuje draselné kanály, čímž dochází k inhibici efluxu K^+ iontů (Dasgupta, 2012). To vede k prodloužení doby pro vytvoření dalšího elektrického signálu v komorových myocytech. Toto prodloužení se v době před vznikem nového signálu potřebného ke kontrakci podílí na úpravě arytmií tím, že se sníží potenciál předčasné nebo abnormální kontrakce komor (Kassotis et al., 2003).

Biologická dostupnost sotalolu je více jak 90 % a jeho plný účinek se projevuje do 2,5 – 4 hodin po perorální aplikaci. V nezměněné formě je vylučován ledvinami a jeho eliminační poločas je zhruba 12 hodin (Jaeggi a Tulzer, 2010). U pacientů s dysfunkcí ledvin vzrůstá jeho plazmatická koncentrace a zvyšuje se riziko toxicity (Darbar, 2013). Dále se vylučuje i do mateřského mléka. Z toho důvodu by matky během užívání sotalolu neměly kojit.

Nežádoucí účinky souvisejí s jeho mechanismem působení. Častým nežádoucím účinkem je únava, bradykardie, bronchospasmus a dyspnoe. Ve vzácných případech může dojít k srdečnímu selhání nebo plicnímu edému (Darbar, 2013). Hlavním problémem terapie sotalolem je výskyt tzv. torsade de pointes neboli polymorfní ventrikulární arytmie. Jedná se o specifický druh abnormálního srdečního rytmu, který může vést k náhlé srdeční smrti. Prodloužení QT intervalu v důsledku podávání sotalolu může zvýšit riziko vzniku tohoto abnormálního srdečního rytmu (Romero a Woosley, 2013). Dle FDA by neměl být sotalol používán u osob se syndromem dlouhého QT intervalu, kardiogenním šokem a astmatem.

Ibutilid

Ibutilid je vysoce účinné antiarytmikum III. třídy. Po chemické stránce se jedná o derivát methansulfonamidu, který má strukturní podobnost se sotalolem. Od sotalolu se liší tím, že přednostně aktivuje pomalé proudění Na^+ iontů do buňky místo aby blokoval proudění K^+ iontů z buňky (Vítovec et al., 2017). Zablokováním kanálu pro K^+ ionty prodlužuje trvání akčního potenciálu u kardiomyocytů a *in vivo* zvyšuje refrakternost srdečních síní a komor (Darbar, 2013). Dále způsobuje zpomalení sinusové frekvence a v závislosti na dávce prodlužuje QT interval. Ibutilid je indikován při akutní fibrilaci síní a arteriálním flutteru. Arteriální flutter je druh srdeční arytmie, jejímž původem je abnormální šíření srdečního vzruchu srdečními předsíněmi. Bez léčby vede tento stav k fibrilaci síní (Issa et al., 2012).

Biologická dostupnost ibutilidu po perorálním podání je poměrně nízká. Pohybuje se mezi 20 – 50 %. Kromě perorální aplikace může být podán také intravenózně. Bud' v nezředěné formě, nebo zředěný ve fyziologickém roztoku jako infúze po dobu 10 minut. Poločas eliminace ibutilidu je variabilní, pohybuje se v rozmezí 2 – 12 hodin (průměrně 6 hodin). Lék je eliminován především oxidačním metabolismem jater s postupnou β -oxidací na osm metabolitů, které lze detekovat v moči (Romero a Woosley, 2013).

Nejvýznamnější nežádoucím účinkem ibutilidu je polymorfní ventrikulární arytmie, která je spojená s prodloužením QT intervalu. Mezi další vedlejší účinky patří bradykardie a hypotenze, u malého počtu pacientů se objevila nauzea a bolesti hlavy (Shukla et al., 2009). Z důvodu možného teratogenního a embryocidního účinku se ibutilid nesmí podávat těhotným a kojícím ženám (Vítovec et al., 2017).

2.3.3.2 Antiepileptika

Antiepileptika, dle starších označení antikonvulziva, jsou léky, které se používají pro snížení rizika výskytu epileptického záchvatu nebo na zastavení jeho průběhu. Patří sem široké spektrum léčiv, která se díky svým dalším účinkům řadí i do jiných lékových skupin. Například v psychiatrii se používají pro léčbu některých psychiatrických poruch, zejména depresí a maniodepresivní psychózy nebo v neurologii při chronické bolesti (Chambers a Schaefer, 2015). Mechanismus účinku se u jednotlivých antiepileptik liší. Obecně lze říci, že pomáhají stabilizovat membrány nervových buněk. V mozku zesilují účinek tzv. tlumivého neurotransmiteru γ -aminomáselné kyseliny (GABA) a naopak inhibují vliv tzv. aktivačního neurotransmiteru glutamátu (Rogawski a Löscher, 2004).

Z hlediska klinického užití antiepileptik je důležité správně zhodnotit typ epilepsie. Jednotlivé druhy záchvatů totiž reagují jen na některá z dostupných antiepileptik.

Z historického hlediska lze antiepileptika rozdělit do tří generací. První generací léků, které jsou nejdéle používané, jsou barbituráty (Lüllmann et al., 2004). Do druhé generace léků patří karbamazepin, kyselina valproová, fenobarbital nebo clonazepam (Martínková et al., 2007). Třetí generaci antiepileptik pak představují lamotrigin, vigabatrin, felbamát či zonisamid a topiramát. Poslední dvě zmíněná léčiva (zonisamid, topiramát) jsou sulfonamidová léčiva obsahující sulfonamidovou skupinu.

Cílem podání antiepileptik je získání rychlé kontroly nad křečemi s minimální nežádoucí reakcí. Z toho důvodu je upřednostňována monoterapie před kombinovanou léčbou (Martínková et al., 2007). Kombinovaná terapie zvyšuje riziko vzniku lékové interakce a pravděpodobně i teratogenní účinky (Chambers a Schaefer, 2015).

Zonisamid

Zonisamid je sulfonamidové antiepileptikum nové generace, které se používá pro terapii pacientů s parciálními záchvaty nebo sekundárně generalizovanými tonicko-klonickými záchvaty. Bylo zjištěno, že je účinný u pacientů, u kterých nezabírají ostatní antikonvulziva. Z chemického hlediska se jedná o 1,2-benzisoxazol-3-methansulfonamid (Leppik, 2004). Přesný mechanismus působení zonisamidu není znám. Předpokládá se však, že blokuje sodíkové a T-kalciové iontové kanály, což vede k potlačení neurální hypersynchronizace. Hypersynchronizace je výrazné zvýšení počtu synchronizovaných, vzájemně spolupracujících neuronů, které je charakteristickým projevem epileptického záchvatu (Fišar et al., 2009). Zonisamid dále potencuje dopaminergní a serotonergní neurotransmisi zvýšením extracelulárních hladin těchto monoaminů (Ueda et al., 2003). Dále může potencovat funkci GABA prostřednictvím interakcí v allosterickém místě vazby nebo ovlivněním transportu GABA (Baulac, 2006).

Vzhledem k tomu, že má zonisamid na svém postranním řetězci sulfamoylovou skupinu, předpokládalo se, že by léčivo mohlo vyvolat své antikonvulzivní účinky podobným způsobem jako k němu příbuzná sloučenina acetazolamid, která inhibuje záchvatovou aktivitu, tj. inhibicí karbonické anhydrázy. Nicméně, když byl zonisamid porovnáván s acetazolamidem *in vivo*, zonisamid měl pouze slabou inhibiční aktivitu CA, vyžadující 100 až 1000krát vyšší dávky než acetazolamid, aby se dosáhlo rovnocenné inhibice. Tudíž inhibice CA byla jako primární mechanismus působení zonisamidu vyloučena (Leppik, 2004).

Jeho biologická dostupnost je velmi vysoká, udává se 95 %, a není ovlivněna jídlem. Po perorálním podání se velmi rychle vstřebává a maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 2 – 5 hodinách po podání (Zaccara a Specchio, 2009). Zonisamid je

metabolizován především jaterním cytochromem P450, částečně pak ledvinami. Má velmi dlouhý eliminační poločas, přibližně 63 hodin, který je delší než u ostatních antiepileptických léků. Může proto trvat 1 – 2 týdny než dojde k dosažení jeho ustálené plazmatické koncentrace po zahájení léčby (Baulac, 2006).

Během užívání zonisamidu se mohou objevit nežádoucí účinky. Nejčastějšími nežádoucími projevy jsou ospalost, závratě a ztráta hmotnosti. Mohou se objevit bolesti břicha, nevolnost nebo kopřivka. Zmíněné nežádoucí účinky během léčby vymizí (Papich, 2016).

Topiramát

Topiramát je antikonvulzivní léčivo, které je indikováno v přídatné terapii i monoterapii záchvatů dospělých a dětí starších 2 let. U dětí je také indikován pro terapii Lennox-Gastautova syndromu (Sommer et al., 2013). Lennox-Gastautův syndrom je jedna z nejzávažnějších dětských epilepsií s počátkem v dětství. Nejčastěji se objevuje mezi druhým a šestým rokem života. Je charakterizován výskytem různých typů epileptických záchvatů, EEG nálezem, psychomotorickým opožděním a behaviorálními poruchami (Ryzí, 2011). Dále se používá jako prevence vzniku migrén. Z chemického hlediska se jedná o monosacharid substituovaný sulfamátem, který vykazuje mírnou schopnost inhibovat CA typu II a IV (Mastík, 2008). Účinky topiramátu na zmíněné izoenzymy CA mohou přispívat k vedlejším účinkům léku (Porter et al., 2012). Proto je nutné u léčeného zajistit zvýšený příjem tekutin, aby se omezilo riziko tvorby ledvinových kamenů. Přesný mechanismus jeho antikonvulzivního působení není znám. Byla prokázána inhibice sodíkových a kalciových kanálů, navíc potencuje aktivitu GABA. Konkrétně zvyšuje frekvenci aktivace GABA_A receptorů a zvyšuje schopnost GABA indukovat vstup chloridových iontů do neuronu (Kuba, 2010). Topiramát také blokuje glutamátové receptory podtypu AMPA (Braga et al., 2009).

Topiramát je po perorálním podání velmi dobře absorbován a maximální plazmatické koncentrace dosahuje po 2 – 4 hodinách (Walker a Sander, 1996). Jeho biologická dostupnost je okolo 80 % a minimálně se váže na plazmatické proteiny, z pouhých 9 – 17 %. Topiramát není rozsáhle metabolizován. Zhruba 70 % je vyloučeno močí v nezměněné podobě a zbylých 30 % je přeměněno hydroxylací, hydrolýzou a glukuronidací v játrech na šest metabolitů (Latini et al., 2008).

Častým nežádoucím účinkem při užívání topiramátu je parestézie, dále nauzea, zvracení, závratě, únava, snížení chuti a pokles na váze. Vzácněji se objevují poruchy koncentrace a paměti. V případě, že se objeví poruchy zraku, jsou indikací k vysazení léku (Mastík, 2008).

V případě užívání topiramátu v těhotenství je zvýšené riziko nízké porodní hmotnosti u novorozenců a poškození plodu. U kojenců, kteří byli *in utero* vystaveni účinkům topiramátu, je vyšší riziko rozštěpu rtu nebo rozštěpu patra (Chambers a Schaefer, 2015).

2.3.3.3 Antiuratika

Antiuratika jsou léčiva sloužící k terapii dny. Dna je závažné revmatické metabolické onemocnění charakterizované zvýšenou hladinou kyseliny močové v krvi. Charakteristický je vznik krystalů kyseliny močové, které se ukládají především v kloubních pouzdrech, šlachách a okolních tkáních (Chen a Schumacher, 2008). Zde vyvolávají lokální, imunitně zprostředkovanou zánětlivou reakci. Následné zánětlivé změny pak mohou vést k degenerativním kloubním změnám (Martínková et al., 2007). Hyperurikémie může být vyvolaná celou řadou faktorů, včetně špatné životosprávy nebo genetických dispozic. Příčinou hyperurikémie může být buď snížené vylučování kyseliny močové ledvinami v důsledku snížené glomerulární filtrace, nebo zvýšená produkce kyseliny močové (Lüllmann et al., 2004). To může být způsobeno například zvýšeným příjmem purinů v potravě, zvýšenou degradací nukleových kyselin či zvýšenou aktivitou fosforibosylpyrofosfát amidotransferázy, klíčového enzymu v syntéze purinů (Grassi a De Angelis, 2012).

Antiuratika se dělí na dvě základní skupiny, a sice na léčiva napomáhající vylučování kyseliny močové, tzv. urikosurika, a na léčiva blokující syntézu kyseliny močové (Martínková et al., 2007). Příkladem léčiva blokující syntézu kyseliny močové je alopurinol, který kompetitivně inhibuje xanthinoxidázu. Tento enzym katalyzuje přeměnu purinů na kyselinu močovou. Léčivem, které napomáhá vylučování kyseliny močové, je probenecid.

Hlavním cílem terapie je předcházet záchvatům dny. To znamená dlouhodobě snížit koncentraci kyseliny močové, a to buď snížením její tvorby, nebo zvýšením jejího vylučování. Potlačí se tak ukládání solí kyseliny močové do kloubů a zabrání se degenerativním kloubním změnám.

Probenecid

Probenecid, neboli kyselina 4-[(dipropylamino) sulfonyl] benzoová, je látka, která inhibuje transportér organických aniontů (OAT) v bazolaterální membráně buněk proximálního tubulu. OAT regeneruje kyselinu močovou z moči a vrací ji do plazmy. Pokud je přítomen probenecid, OAT se s ním přednostně váže, namísto kyseliny močové, a je omezena její reabsorpce (Fromm a Kim, 2011). Probenecid navíc inhibuje urátové transportéry-1

(URAT 1) na apikální membráně proximálního tubulu a dochází rovněž ke snížení její reabsorpce (Perez-Ruiz et al., 2012). V důsledku toho je tedy vylučováno větší množství kyseliny močové močí, a naopak v plazmě se její koncentrace snižuje. Kromě kyseliny močové inhibuje probenecid i renální transport dalších sloučenin, jako jsou kyselina aminohypuronová, kyselina aminosalicyllová, kyselina panthotenová nebo sulfonfylureázy (Silverman et al., 2008).

Kromě jeho primárního použití je někdy podáván jako doplňkové léčivo k penicilinu, popřípadě dalším β -laktamovým antibiotikům. Bylo totiž prokázáno, že probenecid inhibuje tubulární sekreci zmíněných antibiotik a dochází tak ke zvýšení jejich plazmatické koncentrace. Pro různá antibiotika bylo zaznamenáno dvojnásobné až čtyřnásobné navýšení (Shorr, 2007).

Probenecid je dostupný pouze ve formě tablet. Velmi dobře se vstřebává a své maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 4 hodiny po perorální aplikaci. Ze 75 – 95 % je vázán na plazmatické bílkoviny, především na albumin. Probenecid se převážně metabolizuje v játrech na glukuronid a je vylučován ledvinami ve formě monoacylglukuronidu. Malá část je vyloučena v nezměněné formě. Jeho eliminační poločas je v rozmezí 6 – 12 hodin v závislosti na dávce (Perez-Ruiz et al., 2012).

Během užívání probenecidu se mohou vyskytnout nežádoucí účinky. Velmi často se objevuje nevolnost, zvracení, závratě, bolest hlavy a časté močení (Perez-Ruiz et al., 2012). Tyto nežádoucí účinky během léčby většinou mizí, jak se tělo přizpůsobuje léčivému přípravku. U citlivějších jedinců může vzniknout závažná alergická reakce v podobě otoků v místě obličeje a krku nebo potíže s dýcháním (Shorr, 2007).

2.3.3.4 Agonisté 5-HT receptorů

5-HT receptory, nebo též serotoninové receptory, jsou skupinou receptorů spřažených s G – proteinem, které zprostředkovávají excitační a inhibiční neurotransmisý. Nacházejí se v centrálním a periferním nervovém systému. Na základě jejich farmakologického profilu, primárních sekvencí odvozených od cDNA a mechanismu signální transdukce, jsou rozdělovány do 7 tříd (Barnes a Neumaier, 2011). 5-HT receptory modulují uvolňování mnoha neurotransmiterů, jako jsou GABA, glutamát nebo dopamin, a taktéž uvolňování hormonů. Tyto receptory jsou aktivovány serotoninem, který je jejich přirozeným ligandem (Nichols a Nichols, 2008).

Serotonin je bioaktivní látka, která se nachází v krevních destičkách, buňkách gastrointestinálního traktu a v centrálním nervovém systému. Mimo jiné hraje důležitou roli

v patofyziologii migrény. U pacientů s migrénou je porušený metabolismus serotoninu a v případě jeho intravenózního podání dojde ke zmírnění bolesti (Brar a Saadabadi, 2017). Bolest hlavy, hlavní rys migrény, může být způsobena třemi mechanismy: nadměrnou dilatací extrakraniálních a intrakraniálních artérií, aktivací trigeminovaskulárního systému s následným uvolněním vazoaktivních neuropeptidů a agregací krevních destiček uvolňujících serotonin (Lüllmann et al., 2004).

V terapii migrény se rozlišují dvě skupiny léků: profylaktická antimigrenika a akutní antimigrenika. Cílem podávání profylaktických antimigrenik je snížení frekvence a intenzity záchvatů bolesti hlavy. K prevenci migrény se používají látky ze skupiny β -blokátorů (metopronol), blokátorů kalciových kanálů (flunarizin), antiepileptik (valproát) a další (Lincová a Farghali, 2007). V případě akutních záchvatů migrény jsou lékem první volby triptany. Triptany jsou silnými agonisty receptorů 5-HT_{1D} a 5-HT_{1B} a některé se silně váží na 5-HT_{1F} receptory. Prvním syntetizovaným a používaným triptanem byl sumatriptan. Následně vznikly triptany druhé generace. To jsou triptany syntetizované po sumatriptanu, které jsou schopné prostoupit hematoencefalickou bariérou a vykazují lepší farmakokinetické vlastnosti. (Moskowitz a Buzzi, 2010). Mezi triptany patří též sulfonamidová léčiva se sulfonamidovou skupinou sumatriptan a naratriptan.

Sumatriptan

Sumatriptan (3- [2- (dimethylamino) ethyl] –N-methylindol-5-methansulfonamid) je první triptan, který byl syntetizován v polovině 80. let 20. století a byl zaveden pro léčbu migrény a klastrových bolestí hlavy (Moskowitz a Buzzi, 2010). Jedná se o selektivního agonistu serotoninu, který selektivně působí na 5-HT₁ receptory, konkrétně 5-HT_{1D} a 5-HT_{1B}. Primární léčebný účinek sumatriptanu spočívá v inhibici uvolňování peptidu příbuzného kalcitoninu (CGRP), který způsobuje senzibilizaci nociceptivních neuronů trojklaného nervu. Tato inhibice je zřejmě uskutečňována prostřednictvím agonistického působení sumatriptanu na receptory 5-HT₁. Avšak jak agonismus 5-HT_{1D/1B} receptorů inhibuje uvolňování CGRP, není dosud plně pochopeno (Brar a Saadabadi, 2017).

Sumatriptan lze podávat orálně, intranasálně, subkutánně, rektálně a nově je též dostupný ve formě transdermální náplasti. Rektálně podávaný sumatriptan je účinný u akutních migrénových záchvatů a vede k výraznému zmírnění symptomů během dvou hodin. V práškové nosní formě je účinný především u počátečních záchvatů migrény, kdy bylo prokázáno rychlejší zmírnění bolesti v porovnání s perorální aplikací. Subkutánní podání sumatriptanu je považované za nejúčinnější formu u akutních migrénových záchvatů,

nicméně je spojené se zvýšeným výskytem nežádoucích účinků (Napoletano et al., 2014). Po perorálním a subkutánním podání je sumatriptan rychle absorbován. Avšak jeho biologická dostupnost je v případě perorálního podání pouze 14 % v porovnání s podkožním podáním, u kterého je dostupnost téměř 100 %. Sumatriptan je primárně metabolizován jaterní monoaminoxidázou A na kyselinu 2-{5-[(methylsulfamoyl)methyl]indol-3-yl} octovou, která je následně konjugována s kyselinou glukuronovou. Tyto metabolity se vylučují močí a žlučí a pouze 3 % původní dávky sumatriptanu se vylučují v nezměněné formě (Ellfolk a Hultzs, 2015). Poločas eliminace sumatriptanu se pohybuje v rozmezí 1 až 4 hodiny.

Sumatriptan je obvykle dobře snášen, nicméně u citlivějších jedinců může působit mírným sedativním účinkem (ospalost, únava). Dále může způsobit přechodné zvýšení krevního tlaku. Nejčastějším nežádoucím účinkem u subkutánně podávaného sumatriptanu je reakce v místě vpichu injekce (Brar a Saadabadi, 2017). Sumatriptan by neměl být podáván pacientům s výrazně zvýšeným krevním tlakem a s koronární sklerózou (Lüllmann et al., 2004).

Naratriptan

Naratriptan, neboli N-methyl-2-[3-(1-methylpiperidin-4-yl)-1H-indol-5-yl]ethansulfonamid je antimigrenózní lék druhé generace triptanů. Je indikován k terapii akutních záchvatů migrény, včetně silných pulzujících bolestí hlavy, doprovázených nevolností a fotofobií (Lambert, 2005). V současné době se využívá v rámci krátkodobé profylaxe menstruační migrény a migrény asociované s menstruací, kdy se podává 3 až 6 dní v období menstruace (Estemalika a Tepper, 2013). Stejně jako sumatriptan je selektivním agonistou 5-HT_{1D} a 5-HT_{1B} receptorů. Receptory 5-HT_{1B} se vyskytují převážně v intrakraniálních (mozkových a durálních) cévách. Jedním z mechanismů působení naratriptanu je vazba na tyto receptory s následnou kontrakcí intrakraniálních cév, jejichž dilatace a edém přispívají ke vzniku migrény (Donaldson et al., 2002). Naratriptan vykazuje pouze slabou, popřípadě nevykazuje žádnou afinitu k ostatním subtypům serotoninových receptorů, což je důvodem nízkého počtu výskytu nežádoucích účinků (Massiou, 2001). Dalším mechanismem působení naratriptanu je periferní neuronální inhibice s následným potlačením neurogenního zánětu a blokády extravazace substance P, významného mediátoru, který je součástí etiopatogeneze migrény. Naratriptan dále inhibuje aktivitu trojklaného nervu tím, že blokuje trigemino-cervikální přenos, důležitý spouštěč migrenózního záchvatu.

Svémi strukturními i farmakologickými vlastnostmi se podobá sumatriptanu, nicméně naratriptan je lépe absorbovatelný a má vyšší biologickou dostupnost, okolo 74 %.

Většina naratriptanu, zhruba 70 %, se vylučuje močí v nezměněné formě, zbylá část je metabolizována izoenzymy cytochromu P450 na neaktivní metabolity (Lambert, 2005). Naratriptan má v porovnání s ostatními triptany dlouhý eliminační poločas, 5 až 8 hodin, což přispívá k jeho dlouhodobému účinku (Silberstein, 2007).

Naratriptan je mezi triptany nejlépe snášeným léčivem s nejmenším množstvím nežádoucích účinků (Ferrari et al., 2001). Ojedinele se mohou vyskytnout nežádoucí účinky, jako jsou spavost, tlak a tíha na hrudi, parestezie, slabost a závratě. V případě, že se některý z nežádoucích účinků objeví, obvykle brzy odezní (Lambert, 2005).

2.3.4 *In vitro* cytotoxicita sulfonamidů

Sulfonamidy a jejich deriváty mají své nezastupitelné místo mezi léčivy. Své uplatnění nacházejí při léčbě infekcí močového ústrojí, popáleninových stavů nebo v rámci prevence plísňových onemocnění. Kromě významných antibakteriálních a antifungálních vlastností mají sulfonamidy a jejich komplexy i výraznou protinádorovou aktivitu proti různým druhům rakoviny (Suthar et al., 2013). Nejvýznamnější protinádorovou aktivitu vykazují sulfonamidy a jejich deriváty jako inhibitory karbonické anhydrázy. Ghorab et al. (2014) navrhli a syntetizovali nové pyrrolové a pyrrolpyrimidinové deriváty, které nesou biologicky aktivní sulfonamidovou část. U těchto derivátů byl otestován jejich cytotoxický účinek proti buněčné linii rakoviny prsu. Všechny testované sulfonamidy byly účinnější, popřípadě stejně účinné jako doxorubicin, který byl použitý jako pozitivní kontrola. Inhibiční schopnost sulfonamidů byla hodnocena proti lidským cytosolovým izoformám karbonické anhydrázy, hCA I a hCA II, a transmembránovým isoformám hCA IX a hCA XII, které jsou exprimovány v různých typech nádorů. Téměř všechny testované sulfonamidy byly 6 – 8 krát účinnější než acetazolamid, známý inhibitor CA. V další studii se Durgun et al. (2017) zabývali syntézou a charakterizací 4-(2-methylacetamid) benzensulfonamidových derivátů, které by mohly být novým potencionálním protinádorovým léčivem s nízkou toxicitou na nenádorové buňky. U těchto derivátů byla testována jejich antimikrobiální a cytotoxická aktivita. Antimikrobiální aktivita byla testována proti dvěma druhům kvasinek (*Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*), grampozitivním (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) a gramnegativním (*Escherichia coli*, *Escherichia aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) mikroorganismům. Proti kvasinkách nebyla zaznamenána žádná účinnost. Z použitých mikroorganismů byla zaznamenána největší antibakteriální aktivita benzensulfonamidových derivátů v koncentraci 1,2 mg/disk, proti *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Cytotoxicita derivátů byla testována vůči sedmi

bunčným liniím: buňkám lidského adenokarcinomu prsu, karcinomu lidské prostaty, kolorektálního adenokarcinomu, karcinomu děložního čípku a buňkám embryonálních ledvin. Všechny sloučeniny vykazovaly středně velkou nebo velkou cytotoxicitu v rozmezí koncentrací 85 – 124 $\mu\text{g/ml}$ vůči buňkám karcinomu děložního čípku. U ostatních testovaných nádorových linií byl zaznamenán cytotoxický účinek benzensulfonamidových derivátů při koncentracích vyšších než 250 $\mu\text{g/ml}$. Žádný z testovaných derivátů neměl výrazný toxický účinek na nenádorové buňky.

Mirian et al. (2011) syntetizovali nové sulfonamidové deriváty s cílem nalézt nové antibakteriální a protizánětlivé sloučeniny. V této studii byly testovány celkem čtyři druhy sulfonamidových derivátů: 4-acetamido-4-substituovaný fenylbenzensulfonamid, 4-amino-4-substituovaný fenyl-benzensulfonamid, 4-azido-4-substituovaný fenyl-benzensulfonamid a 4-methylsulfamido-4-substituovaný fenyl-benzensulfonamid. U všech sloučenin byla testována jejich cytotoxická aktivita na buněčných liniích karcinomu děložního čípku a adenokarcinomu prsu. Všechny testované sulfonamidy vykazovaly proti buňkám karcinomu děložního čípku cytotoxický účinek v koncentračním rozmezí 100 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ a snížily přežití buněk na méně jak 50 %.

Oblast výzkumu se dále orientuje na komplexy na bázi kovů. Předpokládá se, že tyto komplexy hrají zásadní roli při interakci s určitými cílovými buňkami a mikroorganismy. Centrální kovový iont obsažený v komplexech hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech (Mondeli et al., 2008). Například komplexní sloučeniny cisplatin tvoří základ účinných cytostatik (Dasari a Tchounwou, 2014), nebo nanostříbro má významné baktericidní a fungicidní účinky (Kim et al., 2007). Studium interakcí sulfonamidů s přechodnými kovy je důležitou součástí výzkumu bioanorganické chemie. Kovový komplex vykazuje často lepší vlastnosti a účinnost než samotný kovový ligand. Na základě těchto poznatků byly syntetizovány nové komplexy Ni^{2+} , Pd^{2+} a Pt^{2+} iontů se sulfamethoxazolovým ligandem. U všech těchto komplexů byla *in vitro* testována antibakteriální aktivita a cytotoxicita. Antibakteriální účinek byl testován proti kmenům *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Komplexy Pd^{2+} a Pt^{2+} iontů se sulfamethoxazolovým ligandem vykazovaly při koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ výrazný inhibiční účinek proti všem testovaným bakteriím. Komplex s Ni^{2+} ionty vykazuje pouze velmi malou antibakteriální aktivitu. Cytotoxický účinek těchto komplexů byl testován proti třem nádorovým buněčným liniím: chronické myelogenní leukémii, adenokarcinomu tlustého střeva a karcinomu prsu. Všechny testované komplexy vykazovaly velmi dobrý cytotoxický efekt při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ (Bouchoucha et al., 2018).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- světelný mikroskop Nikon Eclipse E 200 – Nikon, Japonsko
- světelný mikroskop Primo Vert – Carl Zeiss, Německo
- Bürkerova komůrka
- CO₂ inkubátor Memmert INC 108 – Fischer Scientific
- centrifuga Heraeus Labofuge 400 – Thermo Scientific
- topná lázeň SWB-10L-1 – Major Science, Taiwan
- biohazard box třídy II ESCO BSC – ESCO, Singapur
- přístroj xCELLigence RTCA SP – Roche, Švýcarsko
- přístroj CASY TT – Roche, Švýcarsko
- software CASY
- RTCA software 1. 2. 1. 1002
- software GraphPad QuickCalcs – GraphPad Software, USA
- software Microsoft Excel 2010 – Microsoft, USA

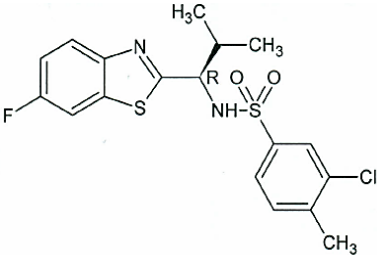
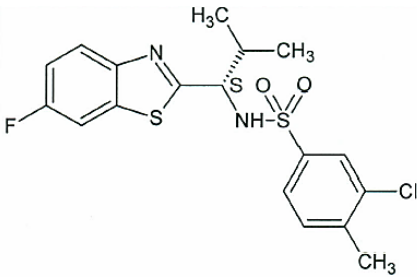
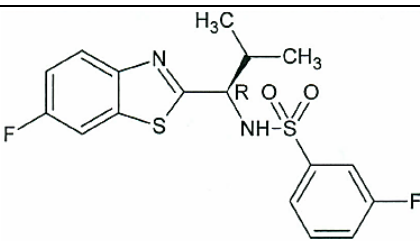
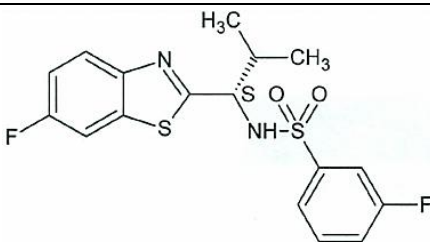
Ostatní pomůcky: automatické pipety, sterilní špičky na pipety, automatický pipetor, sérologické pipety o objemech 5, 10 a 25 ml, centrifugační zkumavky, kultivační nádoby, Pasteurovy pipety, mikrozkušavky Eppendorf, 96-ti jamkové E-destičky, zkumavky CASY.

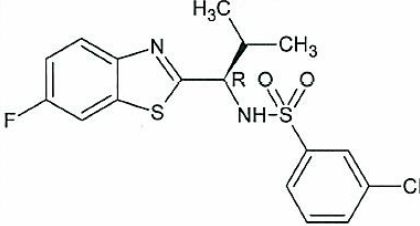
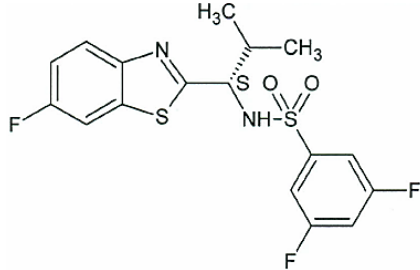
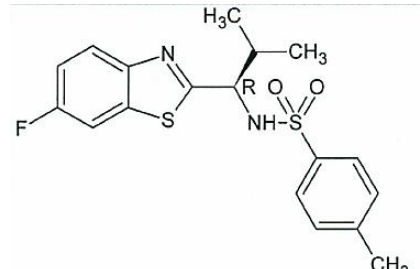
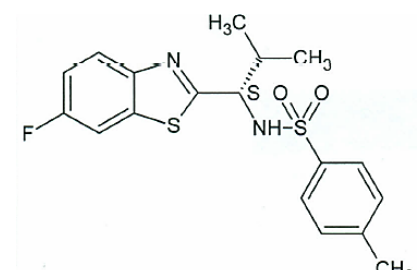
3.2 Použité chemikálie a roztoky

- minimal essential medium (MEM) – Life Technologies, USA
- RPMI 1640 médium – Life Technologies, USA
- fetální bovinní sérum (FBS) – Life Technologies, USA
- antibiotika: penicilin – streptomycin – Life Technologies, USA
- trypsin – Life Technologies, USA
- L-Glutamin – Life Technologies, USA
- pyruvát sodný – Life Technologies, USA
- HEPES – Life Technologies, USA
- neesenciální aminokyseliny – Life Technologies, USA
- dimethylsulfoxid (DMSO) – Carl Roth GmbH, Německo
- ultračistá destilovaná voda – LONZA, Švýcarsko

- fosfátový pufr (DPBS) – Gibco – Invitrogen, USA
- 0,4% trypanová modř – Life Technologies
- 70% ethanol
- testované sulfonamidy 5 – 12 (viz Tab. 1) – Ústav organické chemie a technologie, Univerzita Pardubice
- CASY ton – Roche, Švýcarsko

Tabulka 1 – Přehled testovaných sulfonamidů.

Označení sulfonamidu	Vzorec	Systematický název
SA5	 $C_{18}H_{18}ClFN_2O_2S_2$, M.H. = 412,93	3-chloro-N-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzenesulfonamid
SA6	 $C_{18}H_{18}ClFN_2O_2S_2$, M.H. = 412,93	3-chloro-N-[(1S)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzenesulfonamid
SA7	 $C_{17}H_{16}F_2N_2O_2S_2$, M.H. = 382,45	3-fluoro-N-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzenesulfonamid
SA8	 $C_{17}H_{16}F_2N_2O_2S_2$, M.H. = 382,45	3-fluoro-N-[(1S)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzenesulfonamid

SA9	 $C_{17}H_{16}ClF_2N_2O_2S_2$, M.H. = 398,90	3-chloro-N-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzenesulfonamid
SA10	 $C_{17}H_{15}F_3N_2O_2S_2$, M.H. = 400,44	3,5-difluoro-N-[(1S)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzenesulfonamid
SA11	 $C_{18}H_{19}FN_2O_2S_2$, M.H. = 378,48	N-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzenesulfonamid
SA12	 $C_{18}H_{19}FN_2O_2S_2$, M.H. = 378,48	N-[(1S)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzenesulfonamid

3.2.1 Příprava médií

Kultivační médium pro buněčnou linii A549 bylo připraveno z MEM média, do kterého bylo přidáno 10% FBS, HEPES a pyruvát sodný, oba v objemu 500 μ l na 50 ml roztoku a penicilin – streptomycin v objemu 250 μ l na 50 ml roztoku.

Kultivační médium pro buněčnou linii Jurkat bylo připraveno z RPMI média, do kterého bylo přidáno 10% FBS, pyruvát sodný, L-glutamin, HEPES a neesenciální aminokyseliny, vše v objemu 2 ml na 200 ml roztoku a penicilin – streptomycin v objemu 1 ml na 200 ml roztoku.

Inaktivační médium bylo připraveno z RPMI média a FBS. Pro přípravu 100 ml roztoku bylo použito 80 ml RPMI média a 20 ml FBS.

Roztok PBS byl připraven zředěním koncentrovaného DPBS pomocí ultračisté destilované vody v poměru 1:10.

3.2.2 Příprava koncentrační řady sulfonamidů

Požadované koncentrace sulfonamidů pro stanovení cytotoxicity pomocí testu vylučování trypanové modři a systému xCELLigence RTCA SP byly připraveny ze zásobních roztoků testovaných sulfonamidů o koncentraci 100 000 µg/ml. Zásobní roztoky, použité pro test s trypanovou modří, byly ředěny ultračistou vodou dle tabulky 2. Zásobní roztoky použité pro systém xCELLigence RTCA SP, byly ředěny taktéž ultračistou vodou dle tabulky 3.

Tabulka 2 – Ředění zásobních roztoků sulfonamidů pro test s trypanovou modří.

Výsledná koncentrace (µg/ml)	Objem sulfonamidu	Objem vody (µl)
100	100 µl zásobního roztoku	0
50	50 µl ze zásobního roztoku	50
25	30 µl (z roztoku o c = 50 µg/ml)	30
10	24 µl (z roztoku o c = 25 µg/ml)	30
1	6 µl (z roztoku o c = 10 µg/ml)	54

Tabulka 3 – Ředění zásobních roztoků sulfonamidů pro systém xCELLigence RTCA.

Výsledná koncentrace (µg/ml)	Objem sulfonamidu	Objem vody (µl)	Celkový objem (µl)
100	8 µl (c = 2 000 µg/ml)	392	400
50	100 µl (z roztoku o c = 100 µg/ml)	100	200
25	100 µl (z roztoku o c = 50 µg/ml)	100	200
10	100 µl (z roztoku o c = 25 µg/ml)	150	250
1	10 µl (z roztoku o c = 10 µg/ml)	90	100

3.3 Použité buněčné linie

K hodnocení cytotoxicity syntetizovaných sulfonamidů byla použita buněčná linie A549. Jedná se o adherentní linii epiteliálních buněk lidského adenokarcinomu plic. Buněčná linie A549 byla použita do 20. pasáže. Dále byla použita suspenzní buněčná linie Jurkat, která

představuje lidské lymfoblasty akutní T-buněčné leukémie. Buněčná linie Jurkat byla použita do 19. pasáže. Obě buněčné linie pochází z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC).

3.3.1 Pasážování a počítání buněk

3.3.1.1 Pasážování buněčné linie A549

Pasážování bylo prováděno při konfluenci buněk v rozmezí 70 – 90 %. Konfluence byla zkontrolována pod světelným mikroskopem. Před začátkem práce byly všechny potřebné roztoky (PBS, trypsin, kultivační a inaktivační médium) vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 37°C.

Původní kultivační médium bylo odsáto pomocí automatického pipetoru a do kultivační nádoby napipetovány 3 ml PBS, kterým byly opláchnuty mrtvé buňky. Po odpipetování PBS byly napipetovány 3 ml trypsinu a kultivační nádoba byla umístěna na 9 minut do inkubátoru. Během inkubace byla připravena centrifugační zkumavka se 3 ml inaktivačního média. Po uplynutí inkubační doby byl trypsin s uvolněnými buňkami důkladně resuspendován a celý objem přenesen do připravené centrifugační zkumavky s inaktivačním médiem. Kultivační láhev byla omyta 3 ml PBS, které byly přidány do centrifugační zkumavky se ztrypsinizovanými buňkami. Zkumavka byla stočena v centrifuze při 1500 ot./min po dobu 5 minut. Následně byl supernatant odsát pomocí Pasteurovy pipety a peletka buněk byla resuspendována v 1 ml kultivačního média.

Množství a viabilita buněk byla stanovena pomocí přístroje CASY TT. Do zkumavky CASY, která obsahovala 10 ml CASY ton, bylo napipetováno 100 µl důkladně promíchané buněčné suspenze a proměřeno. Buňky byly nasazeny do nových kultivačních nádob, vyčtvrcovány a inkubovány při 37°C v CO₂ inkubátoru.

3.3.1.2 Pasážování buněčné linie Jurkat

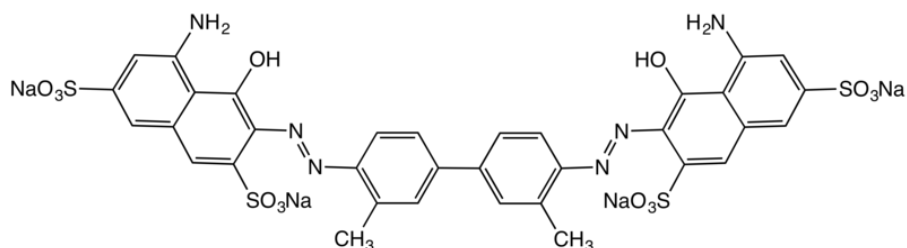
Pasážování bylo prováděno při konfluenci buněk v rozmezí 70 – 90 %. Konfluence byla zkontrolována pod světelným mikroskopem. Před začátkem práce byly všechny potřebné roztoky (PBS a kultivační médium) vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 37°C.

Původní kultivační médium obsahující buňky bylo přepipetováno do připravené centrifugační zkumavky. Původní kultivační nádoba byla opláchnuta 3 ml PBS, který byl odsát a přidán do centrifugační zkumavky. Zkumavka byla stočena při 1500 ot./min po dobu 5 minut. Následně byl pomocí Pasteurovy pipety odsát supernatant do odpadu a peletka buněk byla resuspendována v 1 ml kultivačního média.

Množství a viabilita buněk byly stanoveny pomocí přístroje CASY TT. Do zkumavky CASY, která obsahovala 10 ml CASY ton, bylo napipetováno 100 µl důkladně promíchané buněčné suspenze a proměřeno. Buňky byly nasazeny do nových kultivačních nádob, vyčtvercovány a inkubovány při 37°C v CO₂ inkubátoru.

3.4 Stanovení proliferace a viability buněk pomocí testu vylučování trypanové modři

Viabilita, neboli životaschopnost buněk, je definována jako schopnost buněk množit se a vykazovat metabolickou aktivitu v daných podmínkách. Hlavním hodnotícím kritériem je integrita cytoplazmatické membrány buňky. U živých buněk je membrána neporušená, a tudíž i nepropustná pro malé molekuly s kladným nebo záporným nábojem. V případě porušení cytoplazmatické membrány je tomu naopak (Celis, 2006). Z tohoto důvodu jsou pro tyto testy používána barviva s nízkou molekulovou hmotností, nesoucí kladný nebo záporný náboj. U poškozených nebo mrtvých buněk prostupuje barvivo dovnitř, kde se váže na proteiny a buňka modrá. Nejčastěji se pro hodnocení viability buněk používá kyselé azobarvivo trypanová modř (sodná sůl toluidin-diazo-diamino-naftoldisulfonové kyseliny), (viz Obr. 8).



Obrázek 8 – Chemická struktura trypanové modře (Barahuie, et al., 2014).

Vyhodnocení testu lze provádět manuálně pomocí hemocytometru a světelného mikroskopu. Získáváme tak přesné výsledky, avšak tento postup je časově náročný. Z toho důvodu byla metoda plně automatizována, čímž se výrazně zkrátila doba pro vyhodnocení testu (Louis a Siegel, 2011).

Test vylučování trypanové modře je jednoduchý na provedení, finančně nenáročný a získané výsledky jsou snadno interpretovatelné. Nevýhodou je poměrně silný cytotoxický účinek trypanové modře. Proto by měla být viabilita buněk vyhodnocena co nejrychleji, maximálně do 15 minut po smíchání buněčné suspenze s barvivem (Altman et al., 1993). Touto metodou nelze rozlišit nekrotické buňky od buněk zaniklých v důsledku apoptózy (Louis a Siegel, 2011).

3.4.1 Postup

Viabilita a proliferace byla stanovena u buněčné linie Jurkat po 24 a 48 hodinách po ovlivnění sulfonamidy. Byly testovány koncentrace sulfonamidů v rozmezí 1 – 100 µg/ml (jednotlivé koncentrace byly připraveny podle tabulky 2), přičemž každá koncentrace byla zhotovena v triplicátu. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO, ke kterému byly vztaženy všechny výsledky. Jako pozitivní kontrola byl použit 5% DMSO.

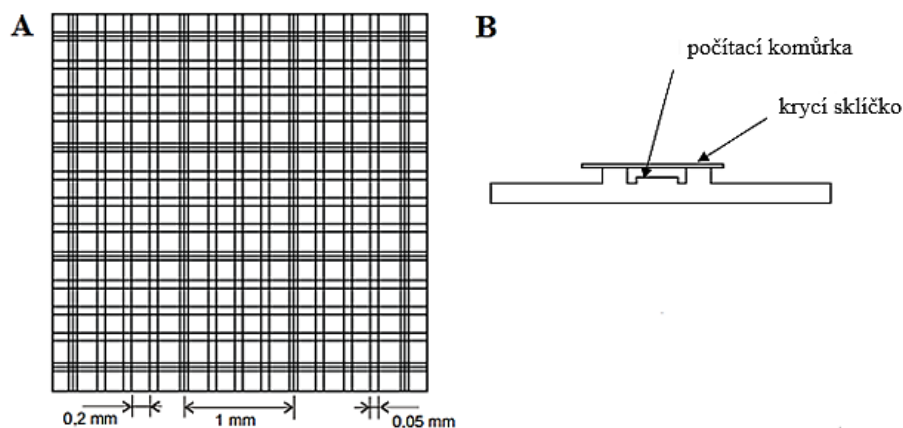
Nejdříve byly buňky pasážovány a spočítány pomocí přístroje CASY TT. Následně bylo do kultivační nádoby pipetováno kultivační médium a suspenze buněk tak, aby byl celkový objem 5 ml. Buňky byly nasazeny v počtu 200 000 buněk na 1 ml. Poté byla připravena koncentrační řada testovaného sulfonamidu a buňky byly ovlivněny jednotlivými koncentracemi sulfonamidu. Testovaný sulfonamid byl pipetován v objemu 5 µl na falkonu. Takto napipetované kultivační nádoby byly vloženy do inkubátoru na 24 hodin.

Následující den byl odebrán 1 ml buněčné suspenze z každé kultivační nádoby. Na čtvereček parafilmu bylo napipetováno 10 µl trypanové modři. Odebraná buněčná suspenze byla důkladně resuspendována, následně z ní bylo odebráno 10 µl a smícháno s trypanovou modří. Do připravené Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 10 µl suspenze a pod mikroskopem (Ph1, 200x) byl v 25 zorných polích komůrky (viz Obr. 9) hodnocen počet živých/mrtvých buněk. Viabilita buněk byla vypočítána podle rovnice 1. Hodnoty viability triplicátů byly následně zprůměrovány a zaneseny do grafů.

$$viabilita [\%] = \frac{\text{počet živých buněk} \cdot 100}{\text{celkový počet buněk}} \quad (1)$$

Kromě viability byla hodnocena i proliferace buněk, která byla vypočítána podle rovnice 2. Hodnoty proliferace triplicátů byly taktéž zprůměrovány a zaneseny do grafů.

$$proliferace = \emptyset \text{ počet živých buněk} \cdot 10\,000 \cdot 2 \quad (2)$$

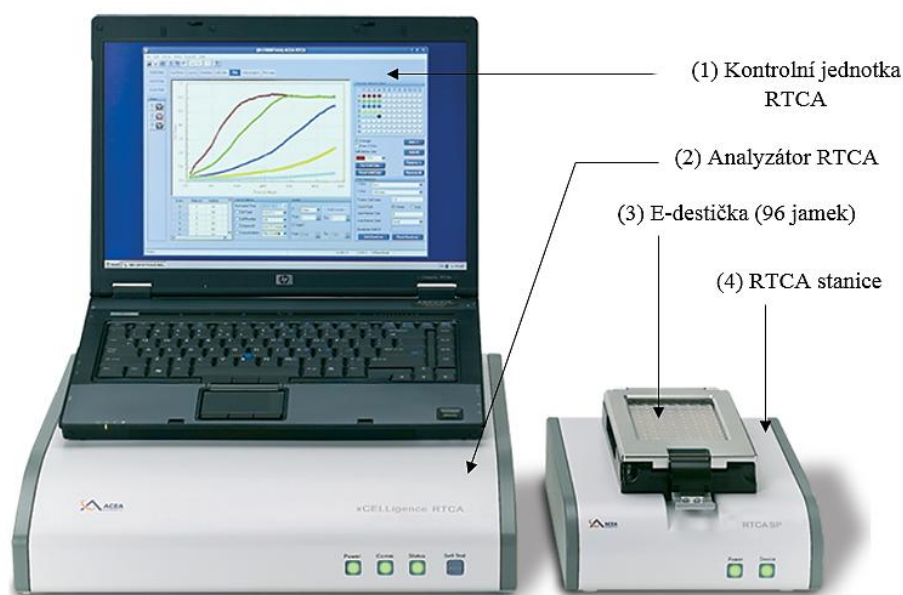


Obrázek 9 – Bürkerova komůrka: (A) mřížka komůrky, (B) pohled ze strany (upraveno podle Caprette, 2006).

3.5 Analýza proliferace buněk pomocí systému xCELLigence RTCA SP

Systém xCELLigence RTCA (Real-time cell analyzer) SP (single plate) je unikátní technologie, která umožňuje sledovat a analyzovat jednotlivé buňky v reálném čase bez nutnosti jakéhokoliv barvení či značení buněk. Pomocí tohoto systému je možné monitorovat celou řadu buněčných procesů, jako jsou adheze, proliferace a diferenciace, viabilita či změny v rámci cytoskeletu buňky. Tento systém je dále hojně využíván při studiu vývoje nových léčiv, v toxikologii, mikrobiologii či virologii (Türker et al., 2017).

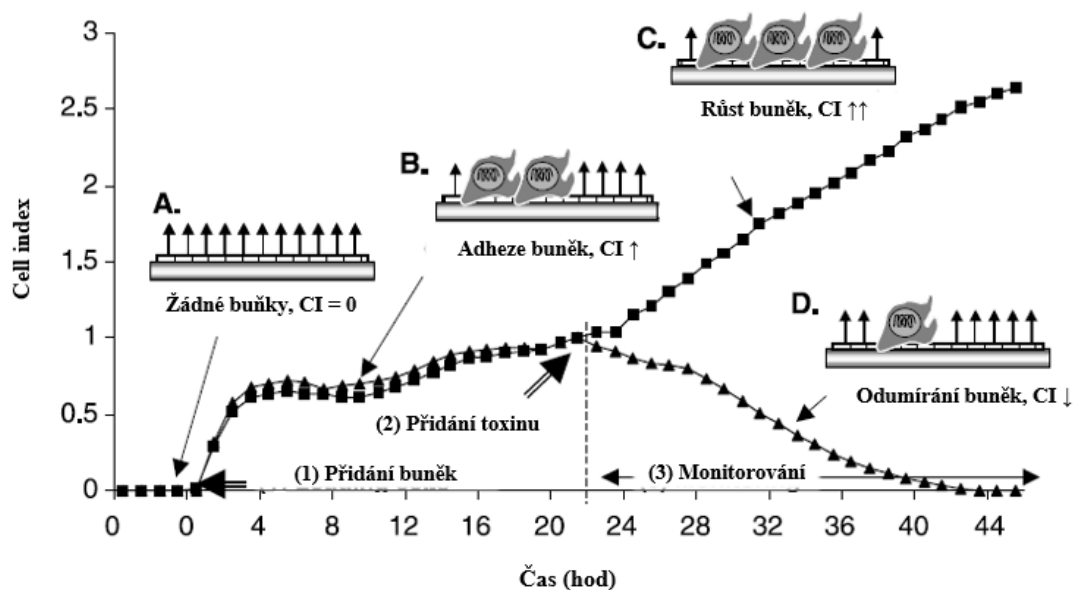
Celý systém je složený ze 4 částí: kontrolní jednotky RTCA, analyzátoru RTCA, RTCA stanice a E-destičky. Kontrolní jednotka RTCA je tvořena přenosným počítačem a replikátorem portů. V počítači je instalovaný operační systém a potřebný software pro vyhodnocení naměřených dat. RTCA analyzátor je elektrický analyzátor, který přenáší signál mezi kontrolní jednotkou a RTCA stanicí. Do RTCA stanice se vkládá E-destička a to celé je umístěné v CO₂ inkubátoru pro zajištění optimálních podmínek pro růst buněk. E-destička je podobná běžně používaným destičkám. Hlavní rozdíl mezi nimi je v tom, že každá jamka této destičky obsahuje na svém dně zlatou mikroelektrodu. Kryt destičky je navržen tak, aby docházelo k co nejmenšímu odpařování tekutiny. Pro zabránění kondenzace se doporučuje používat destičku v teplotním rozmezí 15°C až 40°C s vlhkostí do 98 % (ACEA Bioscience, 2013). Jednotlivé komponenty systému xCELLigence jsou vyobrazené na obrázku 10.



Obrázek 10 – Komponenty systému xCELLigence RTCA SP: (1) Kontrolní jednotka RTCA, (2) Analyzátor RTCA, (3) E-destička, (4) RTCA stanice (upraveno podle Zheng et al., 2013).

Podstatou systému je monitorování buněk přisedlých na dno 96ti jamkové E-destičky. Každá jamka této destičky má na svém dně umístěné zlaté mikroelektrody (Solly et al., 2004). Testované buňky musí být adherentní nebo u nich musí být adheze uměle vyvolaná. Samotná detekce je založená na měření změn impedance, tedy elektrického odporu pro střídavý proud, na dně jamky (Xing et al., 2005). Adherentní buňky fungují jako izolátor na povrchu elektrody a ovlivňují iontové prostředí na rozhraní elektrody a roztoku, čímž se zvyšuje impedance. Čím silněji buňky adherují, nebo čím více je buněk přisedlých na dno jamky, tím je hodnota impedance vyšší. Míra impedance se poté vyjadřuje v bezrozměrných jednotkách, jako tzv. cell index (CI), (Hamidi et al., 2017).

Hlavní výhodou systému xCELLigence RTCA SP je možnost sledovat změny buněčného indexu v reálném čase, a to i po dobu několika dní. Kontinuální monitorování buněk umožňuje sledovat procesy, které není možné zaznamenat pomocí standardních „end-point“ metod. Během růstu buněk je možné k buňkám přidávat chemickou sloučeninu nebo jinou buněčnou suspenzi, která ovlivní následnou proliferaci, morfologii a adhezi zkoumaných buněk (Vondráčková et al., 2010). Průběh RTCA analýzy je zobrazený na obrázku 11.



Obrázek 11 – Průběh RTCA analýzy: (1) Přidání buněk, (2) Přidání toxinu, (3) Automatické monitorování. Průběh detekce buněk: A. Před přidáním buněk je CI nulový; B. Po přidání buněk dochází k nárůstu impedance a CI; C. Proliferace přisedlých buněk je provázená zvyšováním jejich CI; D. Po přidání toxické látky buňky postupně odumírají a dochází k poklesu CI (upraveno podle Xing et al., 2006).

3.5.1 Postup

Nejprve byla provedena pasáž buněčné linie A549 a následně byly buňky spočítány pomocí přístroje CASY TT. Do všech jamek E-destičky bylo pipetováno 100 μ l média a celá destička byla vložena do RTCA stanice umístěné v inkubátoru. V jednotlivých jamkách E-destičky bylo proměřeno pozadí a zkontrolována funkčnost všech elektrod. Následně byla destička vyjmuta z inkubátoru a do jamek bylo napipetováno 90 μ l buněčné suspenze tak, aby připadlo 7 000 buněk na jamku. Takto připravená destička byla vložena zpět do RTCA stanice do inkubátoru. Druhý den byly buňky ovlivněny 10 μ l testovaného sulfonamidu s příslušnou koncentrací 1 – 100 μ g/ml. Každá koncentrace byla zhotovena v tetraplikátu. Do zvolených jamek byl přidán DMSO v objemu 10 μ l, tak aby byly jeho koncentrace v jamce 0,1 % a 5 %. Vliv testovaných sulfonamidů byl monitorován 3 dny a poté byl experiment ukončen. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí RTCA softwaru 1. 2. 1. 1002.

3.6 Statistická analýza

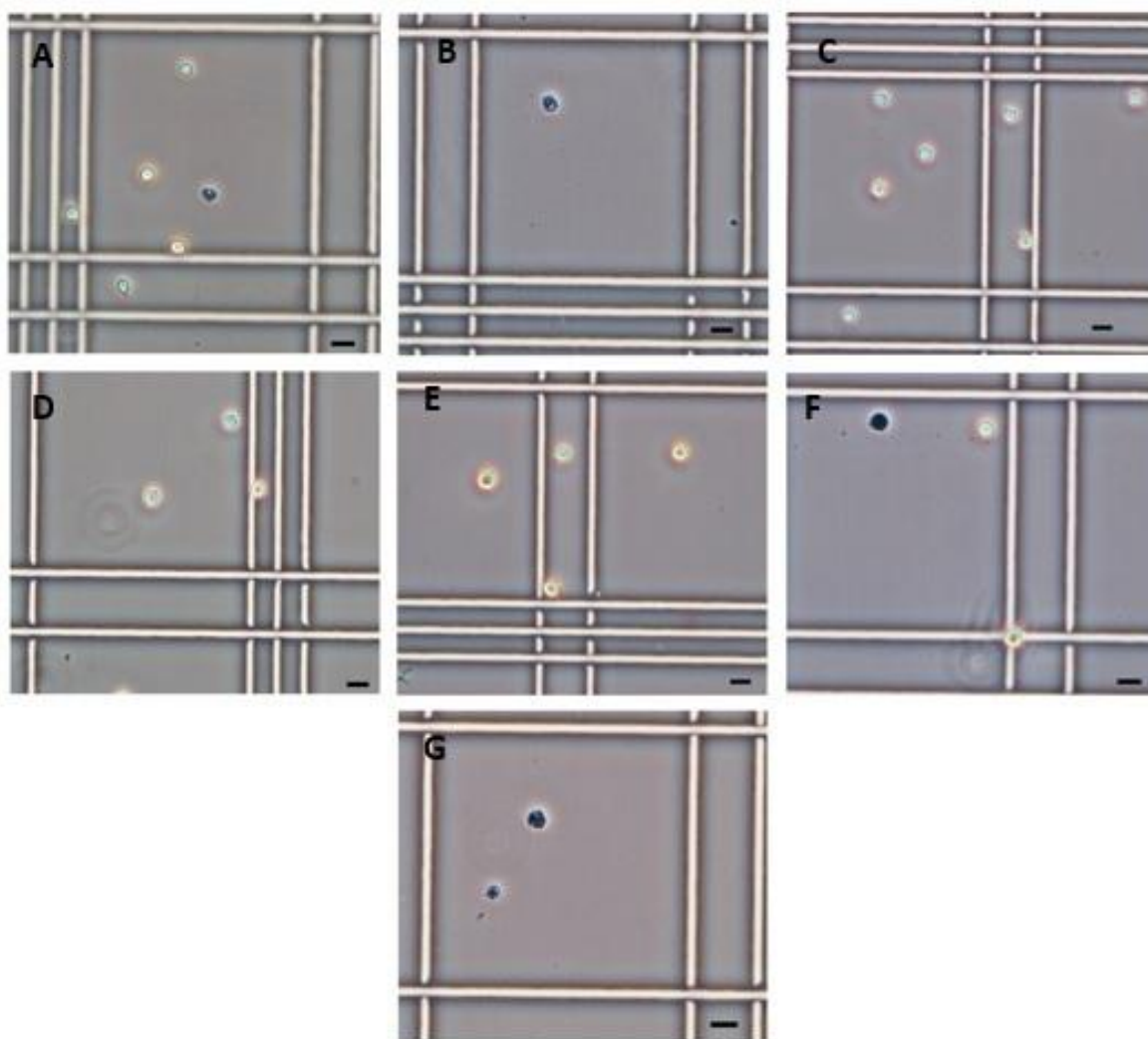
Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) a pomocí softwaru GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty byly provedeny v $n = 3$. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka. Data byla hodnocena jako parametrická. Pro porovnání výsledků byl použit nepárový t-test na hladině významnosti 5 %.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení proliferace a viability buněk pomocí trypanové modři

Pro test vylučování trypanové modři byla použita buněčná linie Jurkat. Tato linie byla ovlivněna jednotlivými sulfonamidy v rozmezí koncentrací 1 – 100 µg/ml, přičemž každá koncentrace byla zhotovena v triplicátu. Pro přesnější porovnání získaných výsledků byly použity dvě kontroly, které byly taktéž zhotoveny v triplicátech. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO, ke kterému byly vztaženy výsledky. Jako pozitivní kontrola byl použit 5% DMSO. Tato koncentrace DMSO je pro buňky smrtelná a nedochází k obnově buněčné proliferace. Počítání buněk bylo prováděno po 24 a 48 hodinové inkubaci. Množství živých (neobarvené) a mrtvých (modré) buněk bylo počítáno ve 25 čtvercích Bürkerovy komůrky. Ze získaných hodnot byla pro každou koncentraci vypočítána průměrná proliferace z množství živých buněk a průměrná viabilita z procentuálního zastoupení živých buněk.

Na obrázku 12 jsou zobrazeny buňky Jurkat poté, co byly ovlivněny jednotlivými koncentracemi testovaných sulfonamidů SA5 a SA6 a následně obarveny 0,4 % trypanovou modří. V jednotlivých částech obrázku je vždy zobrazena část mřížky Bürkerovy komůrky s buňkami. U negativní kontroly – 0,1% DMSO (A) lze pozorovat velké množství živých nepoškozených buněk téměř v každém čtverci mřížky. Ve velmi omezeném množství se zde vyskytují mrtvé buňky. Tato použitá koncentrace nijak neporušuje buněčnou proliferaci. U pozitivní kontroly – 5% DMSO (B) je typický výskyt většího počtu mrtvých buněk. Živé buňky se zde vyskytují pouze zřídka. Při koncentraci 1 µg/ml sulfonamidu SA6 (C) lze pozorovat velké množství živých buněk, zřídka lze nalézt mrtvé buňky. Stav u koncentrace 10 µg/ml sulfonamidu SA6 (D) je téměř srovnatelný s předchozí koncentrací. Převažuje zde velké množství živých buněk nad mrtvými. Při koncentraci 25 µg/ml sulfonamidu SA6 (E) stále převažuje větší množství živých buněk nad mrtvými. Nicméně počet živých buněk je oproti předešlým dvěma koncentracím nižší. U koncentrace 50 µg/ml sulfonamidu SA5 (F) pozvolna stoupá počet mrtvých buněk. Živé buňky jsou přítomny v menším množství. U koncentrace 100 µg/ml sulfonamidu SA6 (G) se projevuje výrazný cytotoxický účinek. Živé buňky se zde vyskytují zřídka, převažují zde poškozené a mrtvé buňky.



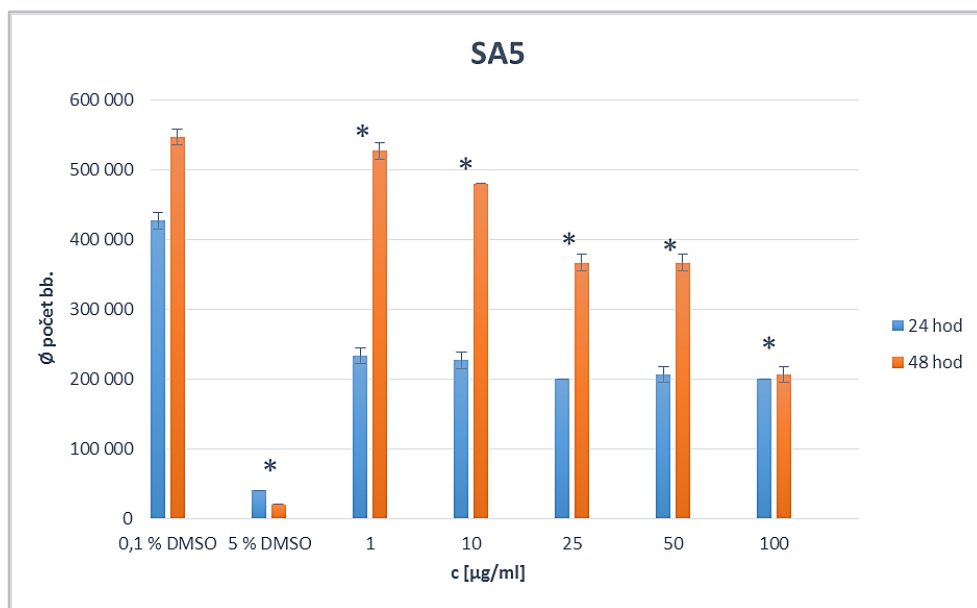
Obrázek 12 – Test vylučování trypanové modři u buněčné linie Jurkat: (A) negativní kontrola – 0,1% DMSO, (B) pozitivní kontrola – 5% DMSO, (C) 1 $\mu\text{g/ml}$ SA6, (D) 10 $\mu\text{g/ml}$ SA6, (E) 25 $\mu\text{g/ml}$ SA6, (F) 50 $\mu\text{g/ml}$ SA5, (G) 100 $\mu\text{g/ml}$ SA6. Použité měřítko představuje velikost 20 μm , foceno ve fázovém kontrastu, zvětšeno 200x.

4.1.1 Sulfonamid SA5

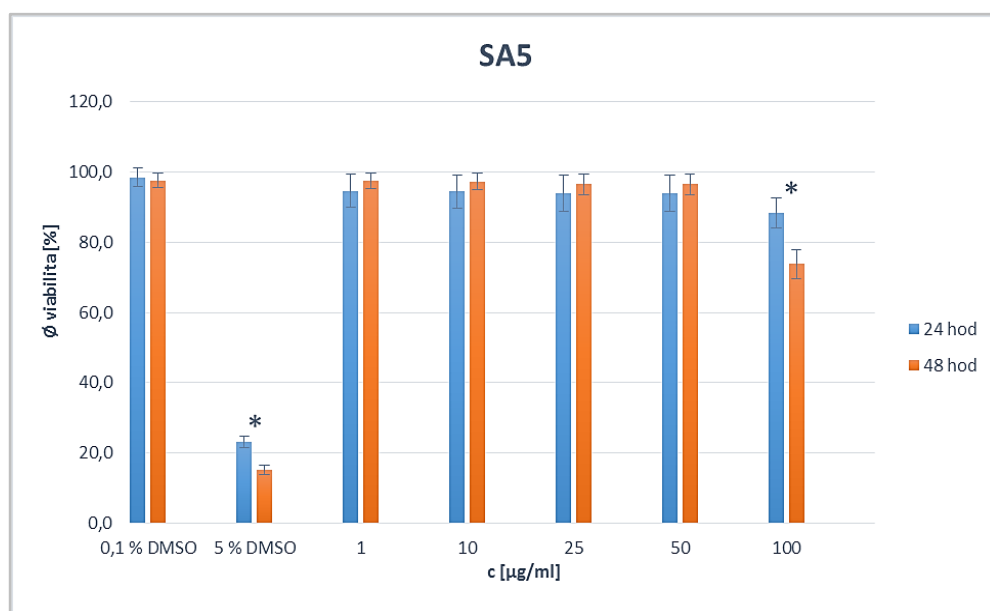
V grafu 1 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA5 na proliferaci buněčné linie Jurkat. Již po 24 hodinách je zde viditelný statisticky významný pokles buněčné proliferace u všech použitých koncentrací testovaného sulfonamidu. Po 48 hodinách došlo k významnému poklesu proliferace u všech testovaných koncentrací, kromě koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$. Výraznější cytotoxický účinek sulfonamidu SA5 je patrný po 48 hodinách u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$, kde došlo k více jak polovičnímu snížení proliferace v porovnání s negativní kontrolou.

V grafu 2 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA5 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita je u koncentrací 1 – 50 $\mu\text{g/ml}$ po 24 i 48 hodinách téměř totožná s negativní kontrolou. U nejvyšší testované koncentrace, 100 $\mu\text{g/ml}$, došlo ke statisticky významnému poklesu viability.

Graf 1 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA5. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 2 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA5. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

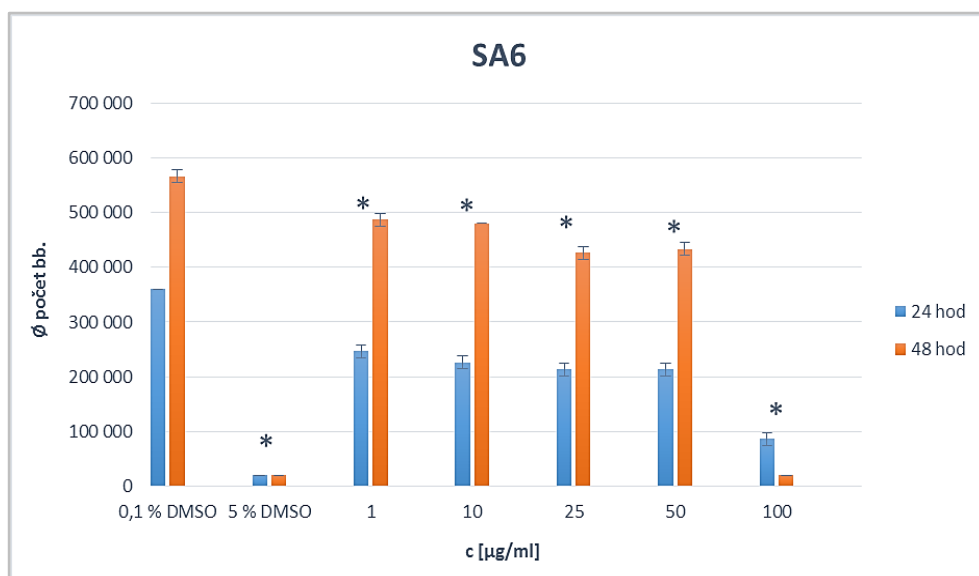


4.1.2 Sulfonamid SA6

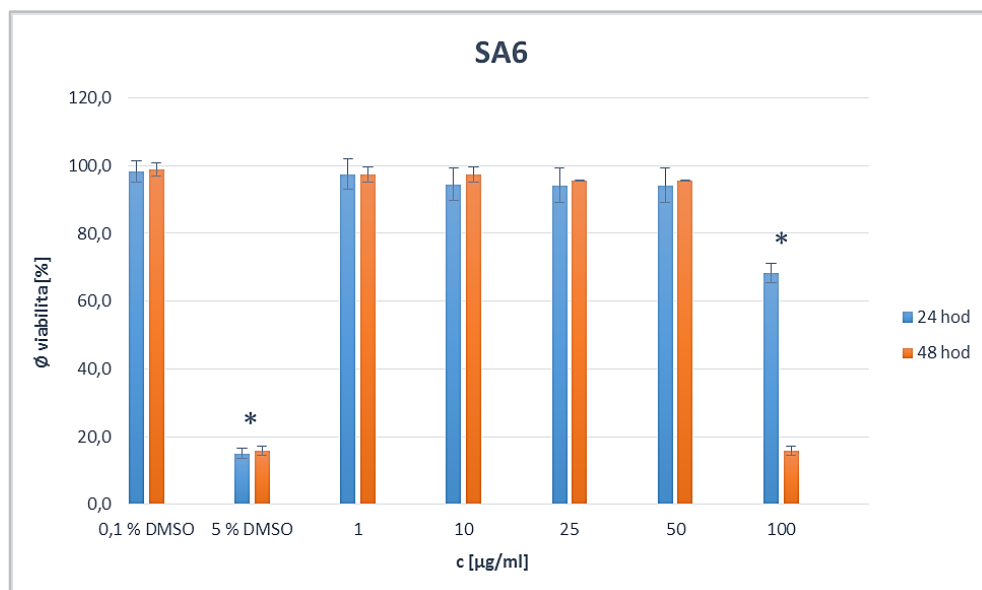
V grafu 3 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA6 na proliferaci buněčné linie Jurkat. U všech testovaných koncentrací došlo ke statisticky významnému poklesu proliferace po 24 i 48 hodinách. Výrazný cytotoxický účinek sulfonamidu SA6 se projevil u koncentrace 100 µg/ml, při které došlo k více jak polovičnímu poklesu buněčné proliferace.

V grafu 4 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA6 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita je u koncentrací 1 – 50 µg/ml po 24 i 48 hodinách téměř totožná s negativní kontrolou. U nejvyšší testované koncentrace, tedy 100 µg/ml, došlo ke statisticky významnému poklesu viability v obou časových intervalech. Výrazný cytotoxický účinek sulfonamidu SA6 je patrný po 48 hodinách u koncentrace 100 µg/ml, kde došlo k více jak polovičnímu poklesu viability oproti kontrole.

Graf 3 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA6. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 4 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA6. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

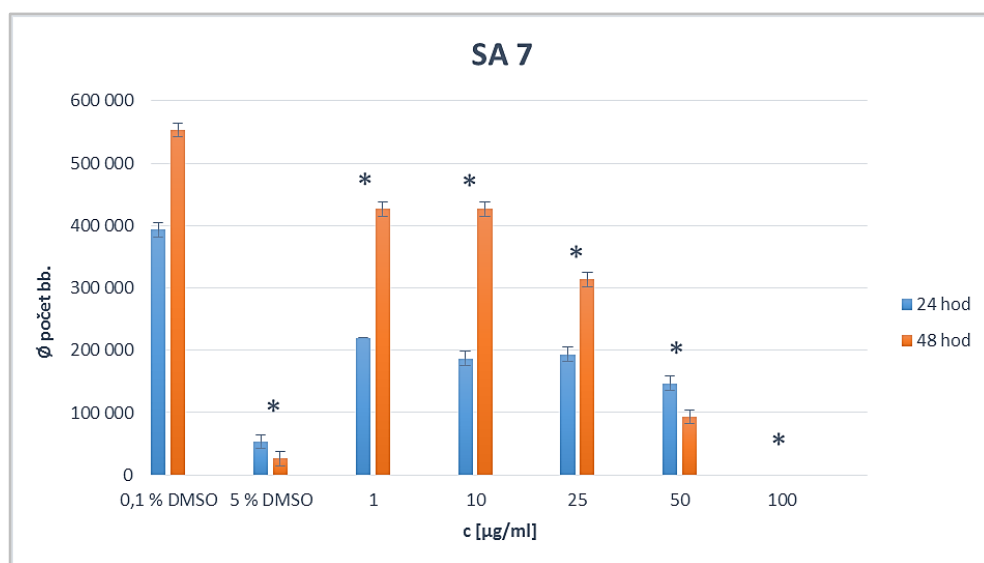


4.1.3 Sulfonamid SA7

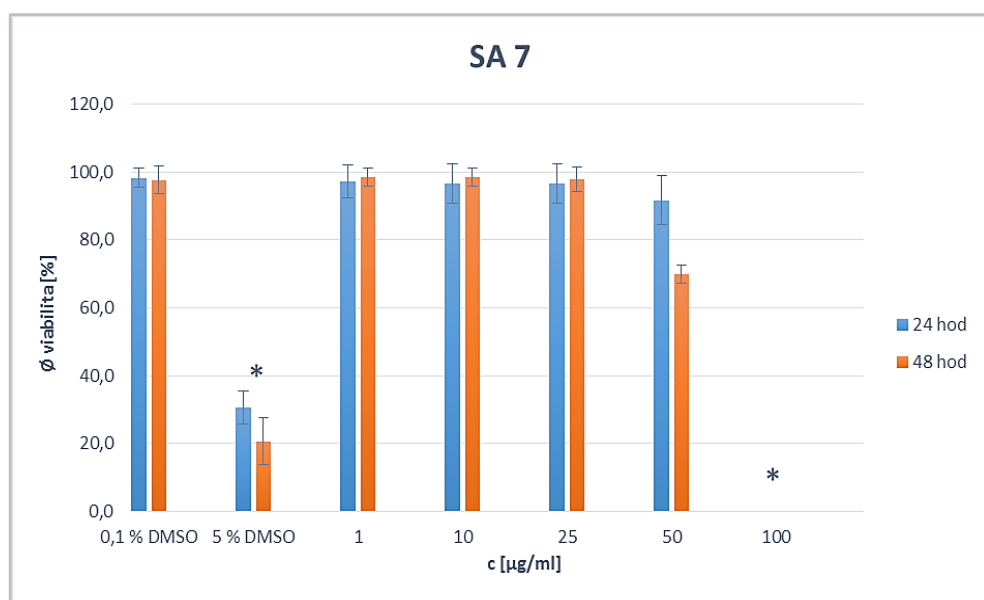
V grafu 5 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA7 na proliferaci buněčné linie Jurkat. V porovnání s negativní kontrolou je zde patrné, že se zvyšující koncentrací sulfonamidu dochází k poklesu proliferace. Po expozici sulfonamidu buňkami Jurkat byl u všech testovaných koncentrací SA7 zaznamenán statisticky významný pokles proliferace po 24 i 48 hodinách. Koncentrace 100 µg/ml byla extrémně cytotoxická již po 24 hodinách.

V grafu 6 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA7 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Po 24 hodinách je zřetelný statisticky významný pokles viability u koncentrace 50 µg/ml. U koncentrace 100 µg/ml je viabilita již po 24 hodinách na nulové hodnotě, což svědčí o silném cytotoxickém efektu.

Graf 5 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA7. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 6 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA7. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

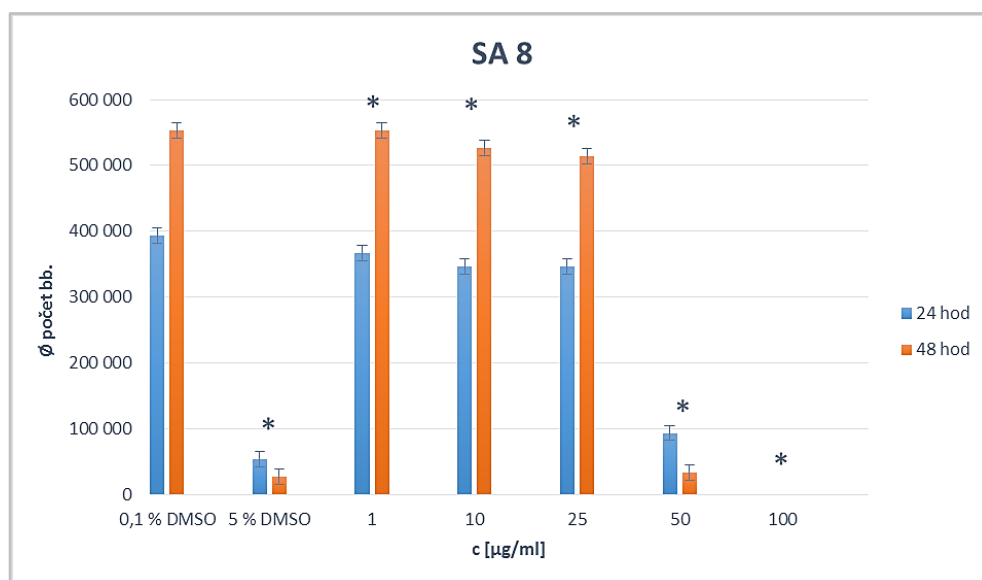


4.1.4 Sulfonamid SA8

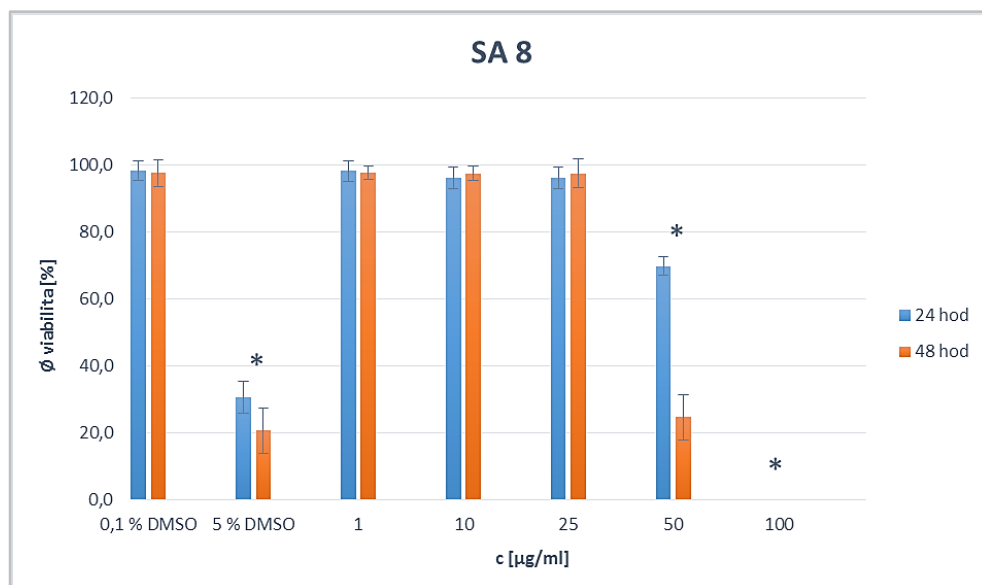
V grafu 7 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA8 na proliferaci buněčné linie Jurkat. Koncentrace 1, 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ jsou téměř shodné s negativní kontrolou jak po 24, tak i po 48 hodinách. Všechny získané hodnoty jsou u těchto koncentrací statisticky významné oproti negativní kontrole. U koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ je po 24 hodinách zaznamenán výrazný pokles buněčné proliferace a u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ je hodnota proliferace již po jednom dni na nulové hodnotě. Při vysokých koncentracích je tedy testovaný sulfonamid SA8 statisticky významně cytotoxický.

V grafu 8 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA8 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita buněčné linie je u koncentrací 1, 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ téměř totožná s kontrolou. Hodnoty viability u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ jsou po 24 i 48 hodinách nižší, v porovnání s negativní kontrolou. Při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ je viabilita na nulové hodnotě. Při vysokých koncentracích 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ je testovaný sulfonamid SA8 cytotoxický a získané hodnoty jsou při těchto koncentracích statisticky odlišné od negativní kontroly.

Graf 7 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA8. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 8 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA8. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

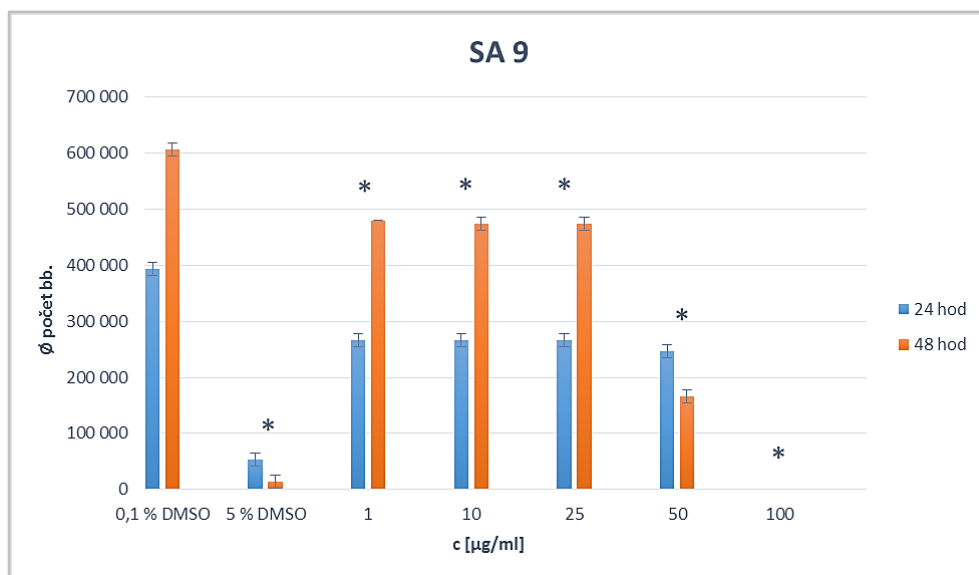


4.1.5 Sulfonamid SA9

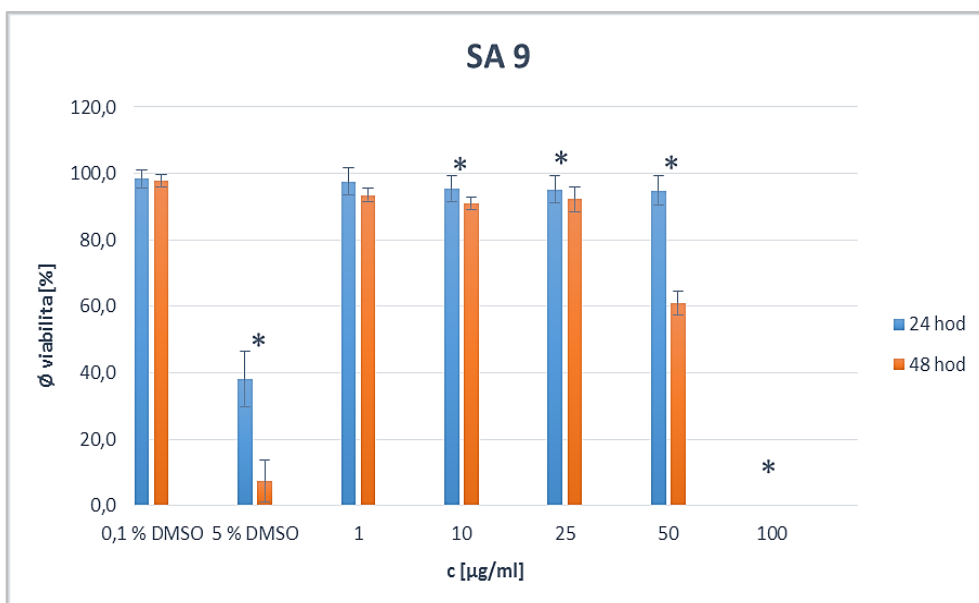
V grafu 9 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA9 na proliferaci buněčné linie Jurkat. U všech testovaných koncentrací je zřetelný statisticky významný pokles hodnot. Výrazný cytotoxický účinek sulfonamidu SA9 je patrný po 48 hodinách u koncentrace 50 µg/ml, kde došlo k více jak polovičnímu poklesu oproti kontrole. Při koncentraci 100 µg/ml je hodnota proliferace nulová. Při této koncentraci je sulfonamid SA9 vysoce toxický.

V grafu 10 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA9 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita je u koncentrací 1, 10, 25 a 50 µg/ml po 24 hodinách téměř totožná s negativní kontrolou. Po 48 hodinách jsou hodnoty u všech testovaných koncentrací, kromě koncentrace 1 µg/ml, statisticky významně snižené oproti negativní kontrole. Výjimkou je koncentrace 100 µg/ml, u které je již po 24 hodinách hodnota viability nulová. Při nejvyšší testované koncentraci je sulfonamid SA9 vysoce cytotoxický.

Graf 9 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA9. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole – 0,1 % DMSO. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 10 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA9. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

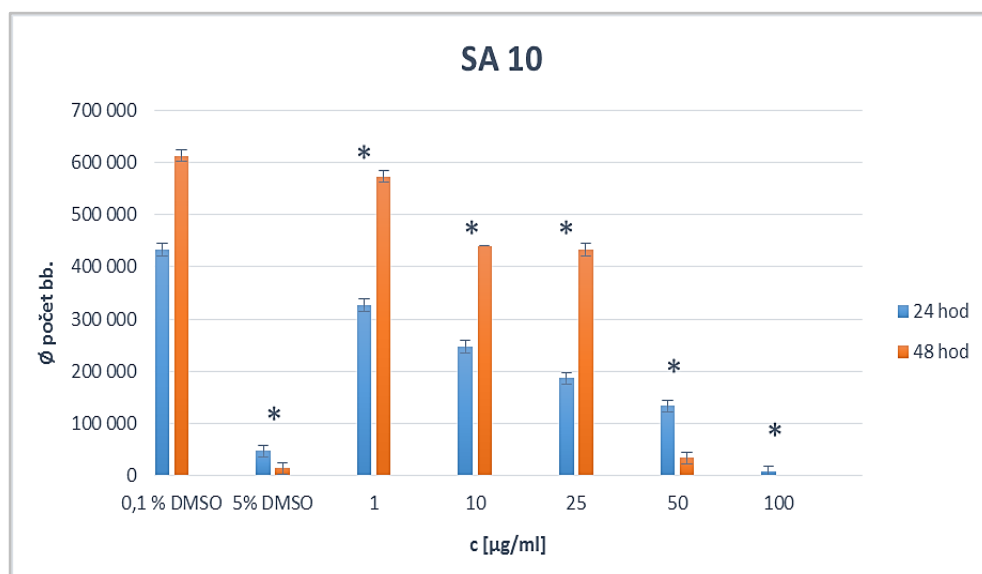


4.1.6 Sulfonamid SA10

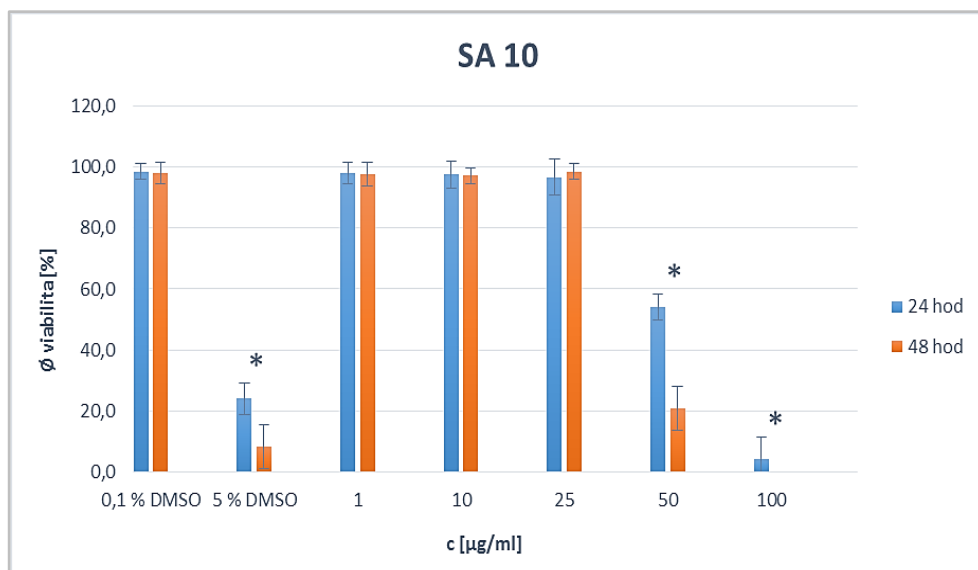
V grafu 11 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA10 na proliferaci buněčné linie Jurkat. Již po 24 hodinách je zde viditelný postupný statisticky významný pokles buněčné proliferace u všech použitých koncentrací testovaného sulfonamidu. Po 48 hodinách jsou hodnoty u všech testovaných koncentrací, kromě koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$, oproti negativní kontrole sníženy a na hladině statistické významnosti. Výrazný cytotoxický účinek sulfonamidu SA10 je patrný po 48 hodinách u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, kde došlo k více jak polovičnímu poklesu oproti negativní kontrole. Při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ je hodnota proliferace nulová. Obě zmíněné koncentrace jsou statisticky významně sníženy oproti negativní kontrole.

V grafu 12 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA10 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita buněčné linie je u koncentrací 1, 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ po 24 i 48 hodinách téměř totožná s kontrolou. U koncentrací 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ došlo po 24 hodinách ke statisticky významnému poklesu hodnot. Po 48 hodinách je u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ více jak poloviční pokles viability a u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ je viabilita nulová. Při vysokých koncentracích, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$, je testovaný sulfonamid SA10 vysoce cytotoxický a získané hodnoty viability jsou při těchto koncentracích statisticky odlišné od negativní kontroly.

Graf 11 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA10. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 12 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA10. Výsledky byly vztaženy k negativní. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

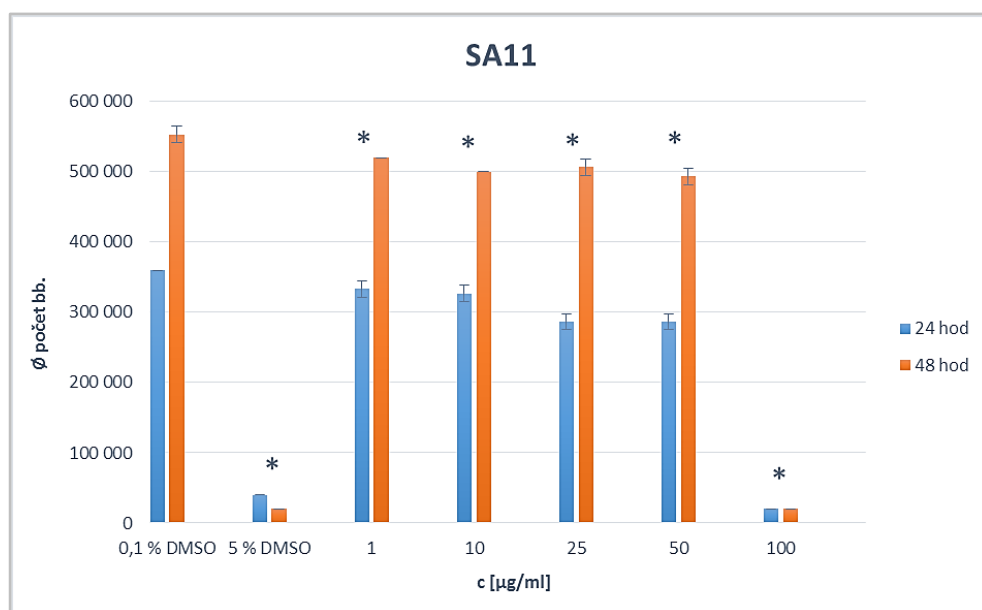


4.1.7 Sulfonamid SA11

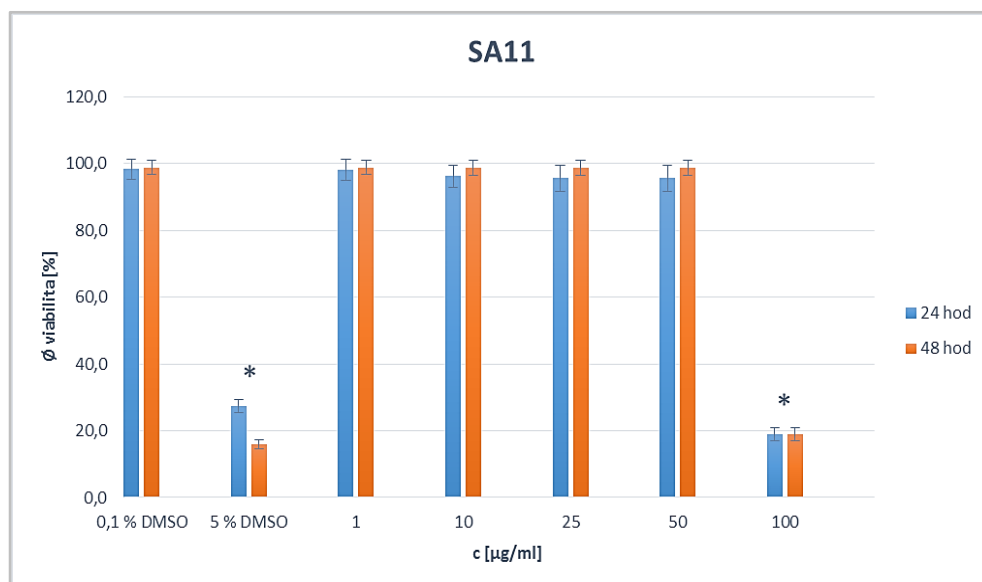
V grafu 13 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA11 na proliferaci buněčné linie Jurkat. U všech použitých koncentrací došlo ke statisticky významnému poklesu buněčné proliferace po 24 i 48 hodinách. Nejvýraznější cytotoxický účinek sulfonamidu SA11 je u koncentrace 100 µg/ml, kde došlo k více jak polovičnímu poklesu proliferace oproti negativní kontrole.

V grafu 14 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA11 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita buněčné linie je u koncentrací 1, 10, 25 a 50 µg/ml po 24 i 48 hodinách téměř totožná s negativní kontrolou. Toxický účinek sulfonamidu SA11 se objevuje až při koncentraci 100 µg/ml, při které došlo k více jak polovičnímu poklesu viability. Viabilita je při koncentraci 100 µg/ml statisticky významně odlišná od kontroly.

Graf 13 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA11. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 14 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu S11. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.

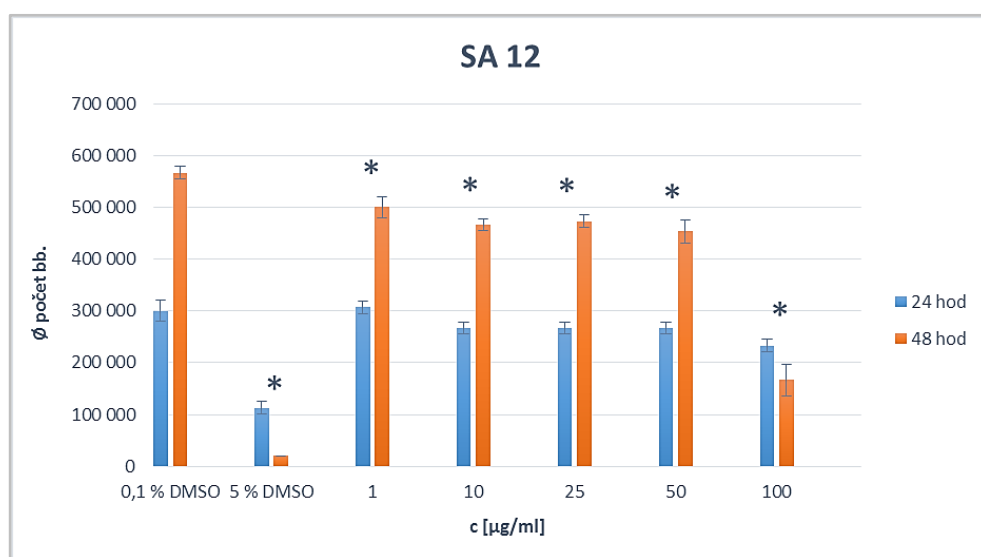


4.1.8 Sulfonamid SA12

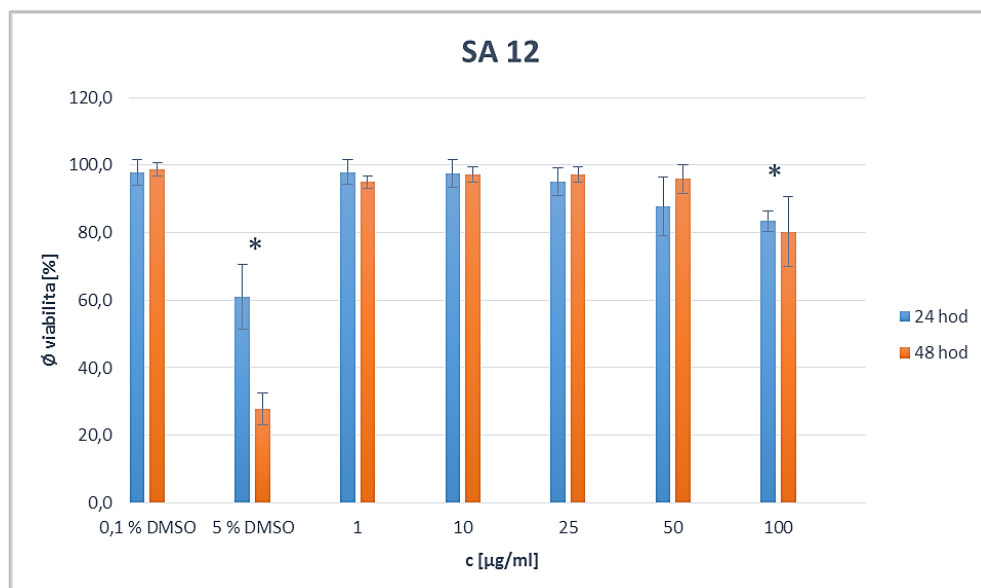
V grafu 15 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA12 na proliferaci buněčné linie Jurkat. Buněčná proliferace je po 24 hodinách u koncentrací 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ téměř totožná s negativní kontrolou. Po 24 hodinách došlo ke statisticky významnému poklesu proliferace pouze u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$. Naopak po 48 hodinách došlo ke statisticky významnému poklesu buněčné proliferace u všech testovaných koncentrací. Nejvýraznější cytotoxický účinek sulfonamidu SA12 je u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$, kde po 48 hodinách došlo k více jak polovičnímu poklesu proliferace oproti negativní kontrole.

V grafu 16 je znázorněn účinek jednotlivých koncentrací sulfonamidu SA12 na viabilitu buněčné linie Jurkat. Viabilita je u koncentrací 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ po 24 i 48 hodinách téměř totožná s negativní kontrolou. K mírnému poklesu viability došlo při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty viability jsou při této koncentraci statisticky odlišné od negativní kontroly.

Graf 15 – Proliferace buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA12. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



Graf 16 – Viabilita buněčné linie Jurkat po působení sulfonamidu SA12. Výsledky byly vztaženy k negativní kontrole. Chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Symbol * u sloupců značí, že uvedená data jsou na hladině významnosti $p \leq 0,05$ odlišná od kontroly.



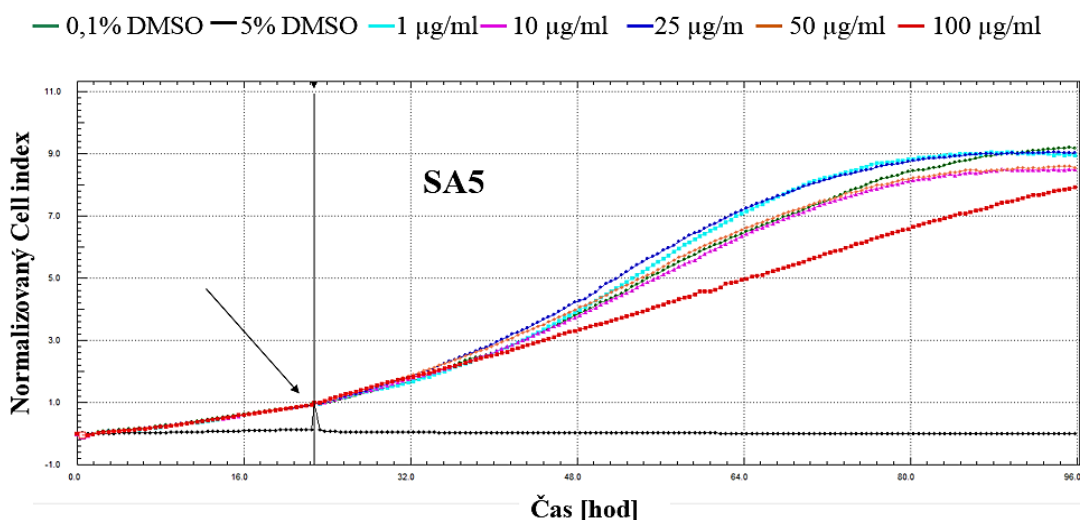
4.2 Stanovení cytotoxicity sulfonamidů systémem xCELLigence RTCA SP

Pro stanovení cytotoxicity a antiproliferační aktivity sulfonamidů byla použita adherentní buněčná linie A549. Použité roztoky testovaných sulfonamidů byly v koncentračním rozmezí 1 – 100 µg/ml. Jako negativní kontrola byl použit 0,1 % DMSO, který v použité koncentraci neovlivňuje buněčnou proliferaci. 0,1% DMSO je ve všech grafech znázorněn zelenou barvou. Jako pozitivní kontrola byl použit 5% DMSO, který v této použité koncentraci zastavuje buněčný růst a dochází k postupnému odumírání buněk. Zástava proliferace a následné odumření buněk se projeví poklesem CI k nulové hodnotě. Křivka pozitivní kontroly je ve všech grafech znázorněna černou barvou.

4.2.1 Sulfonamid SA5

Vliv sulfonamidu SA5 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 17. Křivky koncentrací 1 – 50 µg/ml téměř kopírují křivku proliferace kontrolních buněk po celou dobu měření. U koncentrace 100 µg/ml došlo po ovlivnění sulfonamidem k mírnému poklesu proliferace. Ke konci testu se však i u této koncentrace blíží hodnota CI negativní kontrole.

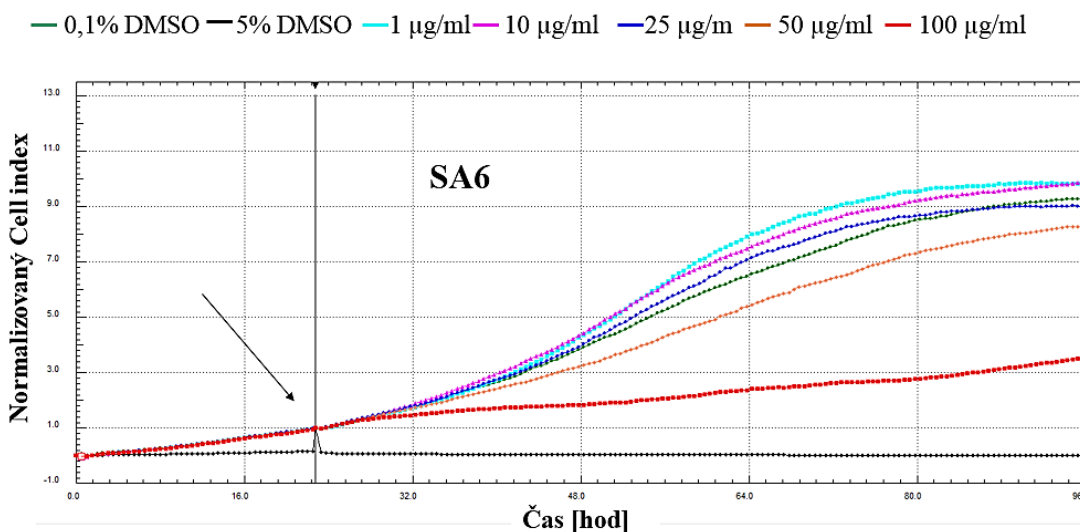
Graf 17 – Vliv sulfonamidu SA5 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.



4.2.2 Sulfonamid SA6

Vliv sulfonamidu SA6 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 18. U koncentrací 1, 10 a 25 µg/ml došlo k nepatrnému nárůstu CI oproti negativní kontrole. Zhruba od 80. hodiny měření už křivky u všech výše zmíněných koncentrací kopírují křivku negativní kontroly. U koncentrace sulfonamidu 50 µg/ml došlo k mírnému zpomalení proliferace, které je charakterizované nižším CI oproti negativní kontrole. Nicméně i zde můžeme říci, že křivka představující koncentraci 50 µg/ml, stále kopíruje křivku negativní kontroly. Krátce po přidání sulfonamidu v koncentraci 100 µg/ml došlo k výraznému poklesu CI. Sulfonamid SA6 způsobuje při nejvyšší testované koncentraci, 100 µg/ml, významnou inhibici buněčné proliferace.

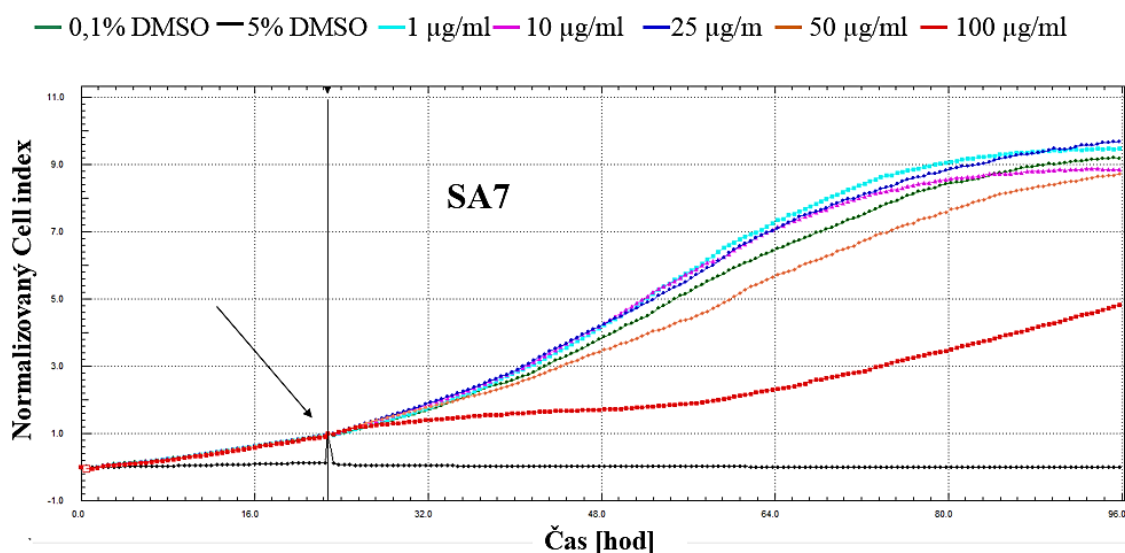
Graf 18 – Vliv sulfonamidu SA6 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.



4.2.3 Sulfonamid SA7

Vliv sulfonamidu SA7 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 19. Křivky u koncentrací 1, 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ téměř kopírují křivku negativní kontroly. Při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ došlo k nepatrnému poklesu CI oproti negativní kontrole. Avšak ke konci měření došlo k mírnému nárůstu CI tak, že křivka představující koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ byla téměř totožná s křivkou negativní kontroly. Téměř okamžitě po přidání sulfonamidu v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ došlo k poklesu CI. Ačkoliv docházelo od 64. hodiny měření k opětovnému růstu buněk, vykazuje sulfonamid SA7 při nejvyšší testované koncentraci výrazný antiproliferační účinek.

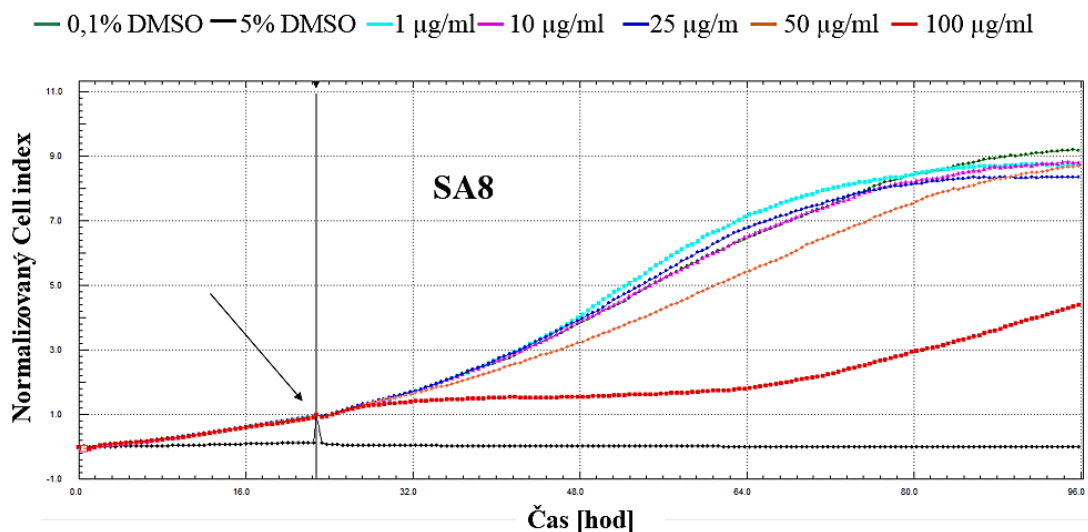
Graf 19 – Vliv sulfonamidu SA7 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.



4.2.4 Sulfonamid SA8

Vliv sulfonamidu SA8 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 20. Po ovlivnění buněk sulfonamidem v koncentracích 1, 10 a 25 $\mu\text{g/ml}$ nedošlo k žádnému poklesu CI a křivky u těchto koncentrací kopírují křivku negativní kontroly. K nepatrnému zpomalení proliferace došlo při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Nicméně od 80. hodiny měření se hodnota CI dostala na hodnotu CI negativní kontroly. Poměrně výrazný pokles CI lze pozorovat u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ krátce po ovlivnění sulfonamidem SA8. V tomto případě buňky pomalu proliferovaly. Ke konci měření došlo k pozvolnému nárůstu CI. Nicméně hodnoty CI zůstaly pod hodnotami CI negativní kontroly. Sulfonamid SA8 má při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ antiproliferační účinek.

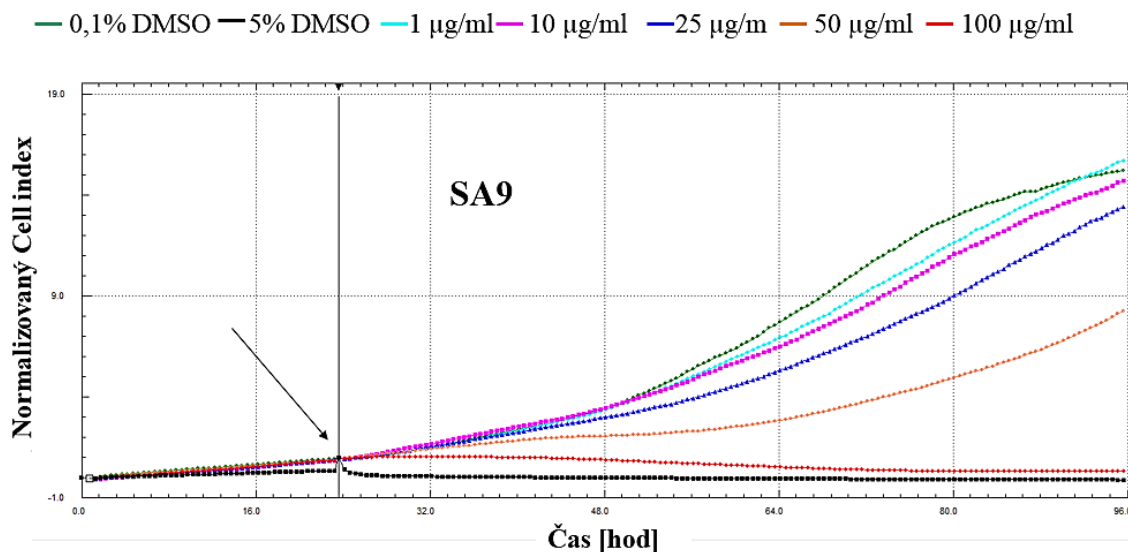
Graf 20 – Vliv sulfonamidu SA8 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.



4.2.5 Sulfonamid SA9

Vliv sulfonamidu SA9 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 21. V tomto případě, je buněčná proliferace závislá na koncentraci sulfonamidu. Se vzrůstající koncentrací sulfonamidu SA9 dochází ke klesání hodnot CI, což odráží postupné zpomalování proliferace. Antiproliferační účinek použitého sulfonamidu se výrazně projevuje při koncentraci 50 µg/ml. Velmi silný cytotoxický účinek vykazuje sulfonamid při koncentraci 100 µg/ml, kdy téměř okamžitě po ovlivnění buněk došlo k úplné inhibici buněčné proliferace. Hodnoty CI se v tomto případě blíží hodnotám pozitivní kontroly, kterou byl 5% DMSO.

Graf 21 – Vliv sulfonamidu SA9 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.

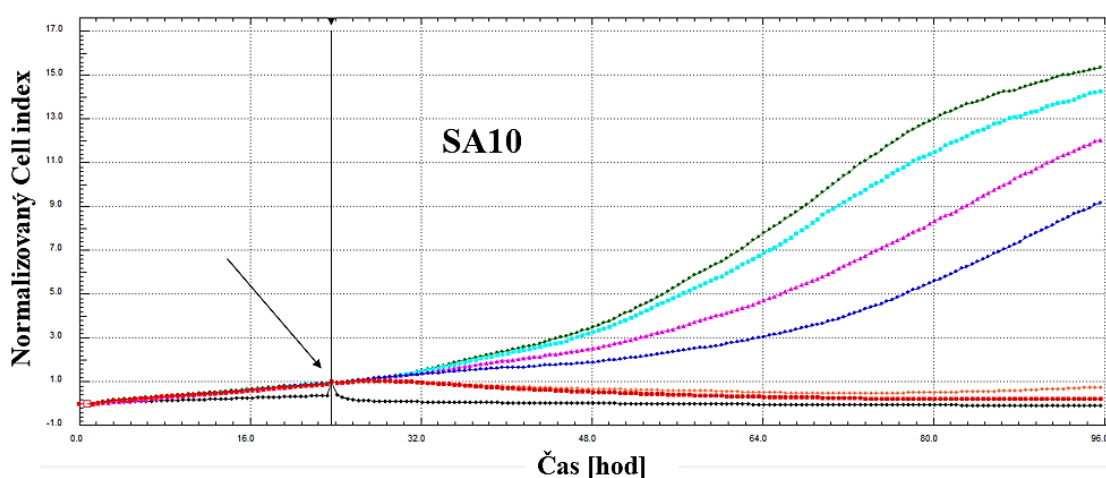


4.2.6 Sulfonamid SA10

Vliv sulfonamidu SA10 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 22. Stejně jako v případě sulfonamidu SA9, je i u sulfonamidu SA10 proliferace buněk závislá na koncentraci. S narůstající koncentrací dochází ke zpomalování růstu buněk. Při nejvyšších použitých koncentracích sulfonamidu 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ se projevuje silný cytotoxický účinek. V těchto dvou případech došlo okamžitě po ovlivnění buněk k zastavení jejich růstu. Křivky koncentrací 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ kopírují od 42. hodiny měření křivku pozitivní kontroly.

Graf 22 – Vliv sulfonamidu SA10 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.

— 0,1% DMSO — 5% DMSO — 1 $\mu\text{g/ml}$ — 10 $\mu\text{g/ml}$ — 25 $\mu\text{g/ml}$ — 50 $\mu\text{g/ml}$ — 100 $\mu\text{g/ml}$

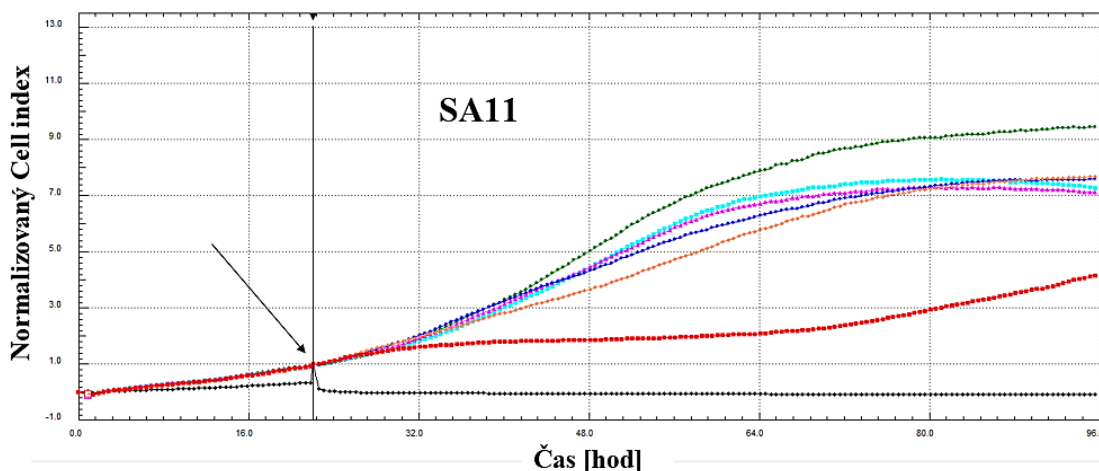


4.2.7 Sulfonamid SA11

Vliv sulfonamidu SA11 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 23. U koncentrací 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ došlo ke zpomalení růstu buněk. U všech těchto koncentrací zůstaly hodnoty CI pod hodnotami kontrolních buněk až do ukončení měření. Antiproliferační účinek sulfonamidu SA11 se výrazně projevil až při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, kdy byla proliferace buněk značně zpomalená.

Graf 23 – Vliv sulfonamidu SA11 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.

— 0,1% DMSO — 5% DMSO — 1 µg/ml — 10 µg/ml — 25 µg/ml — 50 µg/ml — 100 µg/ml

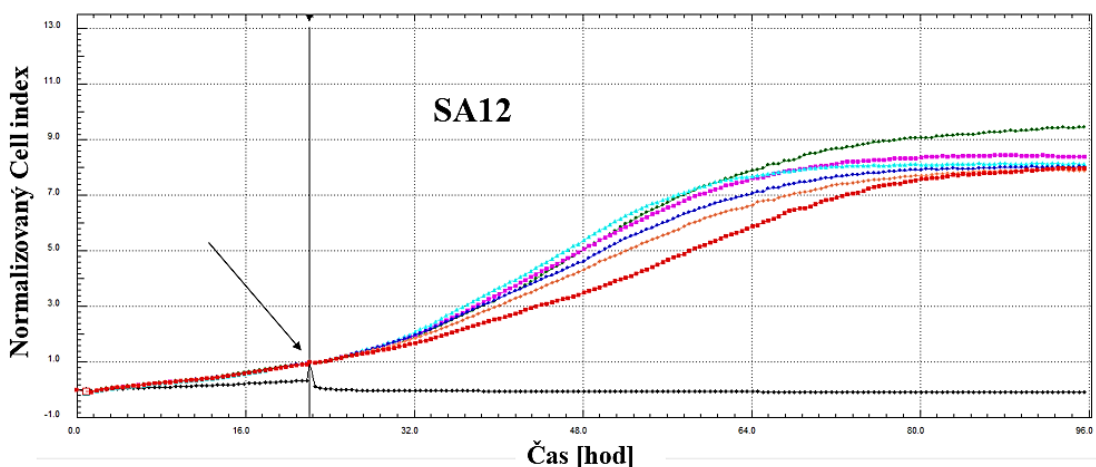


4.2.8 Sulfonamid SA12

Vliv sulfonamidu SA12 na buněčnou linii A549 je zobrazen na grafu 24. U koncentrací 1 – 50 µg/ml jsou hodnoty CI téměř totožné s kontrolními buňkami. Nepatrné zpomalení buněčné proliferace můžeme u těchto koncentrací pozorovat od druhého dne měření. V případě koncentrace 100 µg/ml je hodnota CI oproti negativní kontrole snižena. Ke konci měření se ale proliferace pozvolna zrychluje a hodnota CI se dostává na totožné hodnoty se zbylými použitými koncentracemi. Sulfonamid SA12 tedy nevykazuje žádný výraznější cytotoxický vliv na buněčný růst.

Graf 24 – Vliv sulfonamidu SA12 na buněčnou linii A549. Šipka znázorňuje čas, kdy byly buňky ovlivněny.

— 0,1% DMSO — 5% DMSO — 1 µg/ml — 10 µg/ml — 25 µg/ml — 50 µg/ml — 100 µg/ml



5 DISKUZE

Cílem podávání antibakteriálních látek je zničení původce onemocnění nebo alespoň zastavení jeho růstu, aniž by byl poškozen hostitelský organismus. V posledních desítkách let bylo získáno mnoho různých antibakteriálních látek, proto je dnes možné léčit téměř všechna běžná bakteriální onemocnění. Bohužel časté, někdy až zbytečné, podávání antibiotik vedlo k tomu, že i na dříve účinná antibiotika jsou některé dnešní bakteriální kmeny rezistentní. Typickým příkladem vzniku bakteriální rezistence vůči antibiotikům je Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, neboli MRSA (Tiemersma et al., 2004). Tento kmen způsobuje obtížně léčitelné nosokomiální nákazy a vankomycin, který se používá pro léčbu onemocnění způsobené tímto kmenem, přestává být účinný. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) by se mělo co nejdříve zastavit šíření rezistentních bakteriálních kmenů. Toho lze docílit několika způsoby. Za prvé by měli lékaři předepisovat antibiotika pouze v případě, že je pacient skutečně potřebuje. Dalším důležitým opatřením je střídání druhů antibiotik, aby se bakteriím znemožnilo vybudovat si na konkrétní antibiotikum rezistenci. A pak je tu důsledné dodržování hygienických návyků. Přesto všechno bude ale nutné se zaměřit na výzkum a vývoj nových účinných sloučenin, které by nahradily dosud existující antibiotika.

Výzkum a vývoj nového léčiva je dlouhodobý a finančně nákladný proces, který trvá několik let. Před samotnou klinickou aplikací je nutné provést farmakologické a toxikologické testy dané sloučeniny a předpovědět její terapeutický účinek a toxicitu pro cílový organismus (Starobová et al., 2006). Preklinické studie se nejprve provádějí na *in vitro* modelech (buněčné kultury, tkáně, orgány), kde se sloučenina testuje z hlediska toxicity a farmakologických vlastností. Detailněji se zkoumá mechanismus účinku a vliv dávky na toxicitu a snášenlivost (Součková et al., 2015). Po testech *in vitro* se pak sloučenina testuje *in vivo*. Na *in vivo* modelech se studují a ověřují základní farmakokinetické vlastnosti, vyvíjejí se analytické metody na stanovení dané látky z plazmy nebo moči. Cílem preklinických studií je zhodnocení nové účinné látky z hlediska bezpečnosti, účinnosti a potenciálu pro klinické použití (Mangipudy et al., 2014). Klinický vývoj nového léku probíhá zpravidla ve 4 fázích, z nichž každá je tvořena souborem klinických hodnocení, která na sebe navazují nebo se částečně překrývají.

V této diplomové práci byl testován cytotoxický účinek osmi vybraných nově syntetizovaných sulfonamidů, které byly použity v koncentračním rozmezí 1 – 100 µg/ml. Pro zjištění cytotoxicity byly použity dvě rozdílné nádorové buněčné linie. První byla suspenzní buněčná linie Jurkat, která představuje lidské lymfoblasty akutní T-buněčné leukémie.

Druhou použitou buněčnou linií byla A549, představující adherentní linii epiteliálních buněk lidského adenokarcinomu plic. Jako negativní kontrola byl použit 0,1 % DMSO a pozitivní kontrolou byl 5 % DMSO, který při této koncentraci způsobil zastavení buněčného růstu a odumírání buněk. Pro stanovení cytotoxicity byly použity dvě nezávislé metody, systém xCELLigence RTCA SP a kolorimetrická end-point analýza test vylučování trypanové modři.

První použitou metodou pro zjištění antiproliferačního a cytotoxického účinku osmi vybraných sulfonamidů byl systém xCELLigence RTCA SP, který monitoroval průběh buněčné proliferace v reálném čase. K tomuto testu byla použita buněčná linie A549, u níž byl sledován vliv testované látky po dobu 72 hodin. U prvního testovaného sulfonamidu, s označením SA5, nebyl prokázán žádný cytotoxický účinek. Při koncentracích 1 – 50 µg/ml nebyl nijak ovlivněn růst buněk a výsledky byly totožné s negativní kontrolou. Teprve při koncentraci 100 µg/ml došlo k mírnému zpomalení proliferace. Sulfonamid SA6 taktéž nevykazoval v rozmezí koncentrací 1 – 50 µg/ml žádný výrazný antiproliferační ani cytotoxický účinek. V koncentraci 100 µg/ml způsobil snížení CI, čemuž odpovídá zpomalení buněčného růstu v porovnání s negativní kontrolou.

Analýza sulfonamidů SA7 a SA8 poskytla velmi podobné výsledky. Oba sulfonamidy nevykazovaly při koncentracích 1 – 25 µg/ml žádnou antiproliferační aktivitu a získané křivky byly totožné s křivkou negativní kontroly. Při koncentraci 50 µg/ml došlo v případě obou sulfonamidů k mírnému poklesu hodnoty CI. Avšak ke konci analýzy došlo k pozvolnému zvyšování CI, které odráželo postupné zrychlování buněčného růstu. V okamžiku ukončení testu již buňky proliferovaly stejně jako buňky negativní kontroly. Antiproliferační účinek sulfonamidů SA7 a SA8 při koncentraci 50 µg/ml je pravděpodobně pouze dočasný. Poměrně výrazný pokles CI jsme pozorovali při koncentraci 100 µg/ml krátce po ovlivnění sulfonamidy SA7 a SA8. V obou případech buňky pomalu proliferovaly a až ke konci měření došlo k pozvolnému nárůstu CI. Přesto zůstaly hodnoty CI pod hodnotami CI negativní kontroly.

Vysoká cytotoxicita byla zaznamenána v případě sulfonamidů SA9 a SA10. Cytotoxický účinek obou sulfonamidů byl silně závislý na jejich koncentraci. Postupné zvyšování jejich koncentrace způsobilo klesání rychlosti buněčného růstu. V případě sulfonamidu SA9 došlo k velmi výraznému poklesu CI při koncentraci 50 µg/ml, avšak ke konci analýzy byl zaznamenán pozvolný nárůst CI. Silný antiproliferační účinek sulfonamidu SA9 je tedy zřejmě pouze dočasný. Po přidání SA9 v koncentraci 100 µg/ml došlo téměř okamžitě k inhibici buněčné proliferace. Hodnoty CI se v tomto případě blížily hodnotám pozitivní kontroly, kterým byl 5% DMSO. Sulfonamid SA10 měl velmi silný cytotoxický účinek při

koncentracích 50 a 100 µg/ml. V případě obou těchto koncentrací došlo po přidání sulfonamidu k okamžité inhibici proliferace. Hodnoty CI byly takřka totožné s hodnotou CI pozitivní kontroly. Skutečnost, že je cytotoxický účinek některých sulfonamidů závislý na koncentraci, potvrzují ve studii Swapna et al. (2013), kteří testovali kromě antibakteriálních vlastností také cytotoxicitu sulfonamidomethanů spojených do mono- a bis-heterocyklů na buněčné linii A549. Výrazné snížení viability zaznamenali v rozmezí koncentrací 100 – 200 µg/ml. Naopak více jak 75% životaschopnost buněk byla pozorována, pokud byly sulfonamidy v koncentracích do 12,50 µg/ml.

Dalším námi testovaným sulfonamidem byl sulfonamid SA11, který působil více či méně antiproliferačně ve všech testovaných koncentracích. Při koncentracích 1, 10, 25 a 50 µg/ml došlo k mírnému zpomalení buněčného růstu. Hodnoty CI zůstaly pod hodnotami kontrolních buněk až do ukončení měření. Výrazný antiproliferační účinek SA11 se projevil až při koncentraci 100 µg/ml, kdy byla hodnota CI výrazně nižší v porovnání s CI kontrolních buněk. Posledním testovaným sulfonamidem v této práci byl sulfonamid SA12, který neměl stejně jako sulfonamid SA5 téměř žádný antiproliferační účinek. V případě této látky byly při koncentracích 1 – 50 µg/ml hodnoty CI téměř totožné s kontrolními buňkami. Pouze nepatrné zpomalení buněčné proliferace jsme mohli u těchto koncentrací pozorovat od druhého dne měření. Při koncentraci 100 µg/ml byla hodnota CI oproti negativní kontrole lehce snižena. Ke konci měření se však proliferace pozvolna zrychlovala a hodnota CI se dostávala na totožné hodnoty se zbylými použitými koncentracemi.

Pro nezávislé ověření účinku sulfonamidů na proliferaci a viabilitu buněk Jurkat byl použit test vylučování trypanové modři. Trypanová modř je kyselé azobarvivo, které má schopnost prostupovat do porušených či mrtvých buněk, kde se hromadí v intracelulárním prostoru. Buňky tak získávají typické modré zbarvení. Naopak buňky s nepoškozenou plazmatickou membránou zůstávají bezbarvé. Vyhodnocení bylo prováděno pomocí světelného mikroskopu Nikon Eclipse E 200 (Nikon, Japonsko) po 24 a 48 hodinách po ovlivnění. Sulfonamid SA5 byl po SA12 druhým nejméně toxickým sulfonamidem a měl pouze mírný antiproliferační účinek. Po ovlivnění buněk Jurkat sulfonamidem SA5, byl zaznamenán velmi pozvolný pokles proliferace s rostoucí koncentrací sulfonamidu. Lépe byl tento pokles viditelný po 48 hodinách. Ze získaných dat je patrné, že při koncentraci 100 µg/ml byla zastavena proliferace buněk a jejich počet byl po 24 i 48 hodinách téměř totožný. Viabilita buněk byla při koncentracích 1 – 50 µg/ml srovnatelná s viabilitou kontrolních buněk. K jejímu mírnému poklesu došlo při koncentraci 100 µg/ml po 48 hodinách. Získaná data neodpovídají výsledku z měření pomocí systému xCELLigence, kde sulfonamid SA5 snížil buněčnou proliferaci až

při koncentraci 100 µg/ml. Rozdíl je pravděpodobně způsoben odlišným principem obou testů. Systém xCELLigence měří změny impedance a výsledná CI křivka odráží nejen počet a viabilitu, ale také morfologii buněk. Naopak test s trypanovou modří je vyhodnocován pomocí světelného mikroskopu a drobné změny v morfologii buněk tak nelze zaznamenat.

Sulfonamid SA6 nezpůsobil při koncentracích 1 – 50 µg/ml žádný výraznější pokles buněčné proliferace v porovnání s negativní kontrolou. Viabilita buněk byla u všech těchto koncentrací srovnatelná s negativní kontrolou. Velký pokles proliferace a viability nastal po 48 hodinách při koncentraci 100 µg/ml, kdy se projevil cytotoxický účinek sulfonamidu. Získané výsledky korelují s výsledky z xCELLigence. Dalším testovaným sulfonamidem byl SA7, který neměl v koncentracích 1 – 25 µg/ml výraznější antiproliferační účinek. Při koncentraci 50 µg/ml byla proliferace oproti negativní kontrole snížena více jak o polovinu a v koncentraci 100 µg/ml byl SA7 extrémně cytotoxický již po 24 hodinách. Stejně tak i viabilita byla v případě koncentrací 1 – 25 µg/ml totožná s negativní kontrolou. Zřetelnější pokles viability byl zaznamenán až po 48 hodinách při koncentraci 50 µg/ml. Při koncentraci 100 µg/ml byla buněčná viabilita již po 24 hodinách na nulové hodnotě. Získané výsledky téměř odpovídají výsledkům z xCELLigence. Výjimkou jsou data u koncentrace 100 µg/ml. V tomto případě byl testem s trypanovou modří zjištěn silný cytotoxický efekt, kdy byl růst buněk zcela zastaven. Analýza systémem xCELLigence ale prokázala pouze velmi silný antiproliferační účinek. I přesto začaly buňky od 64. hodiny měření znovu proliferovat.

Testování sulfonamidu SA8 přineslo velmi podobné výsledky jako u sulfonamidu SA7. To je dáno zřejmě tím, že jsou dané sloučeniny izomery. Sulfonamid SA8 nevykazoval v koncentracích 1 – 25 µg/ml výraznější antiproliferační účinek. Při koncentraci 50 µg/ml byla i zde proliferace snížena více jak o polovinu oproti negativní kontrole a v koncentraci 100 µg/ml byl SA8 extrémně cytotoxický již po 24 hodinách. Rovněž viabilita byla při koncentracích 1 – 25 µg/ml totožná s negativní kontrolou. Zřetelný pokles buněčné viability byl zaznamenán až po 48 hodinách při koncentraci 50 µg/ml. Při koncentraci 100 µg/ml byla buněčná viabilita již po 24 hodinách na nulové hodnotě. Také u SA8 výsledky korelují s daty získanými systémem xCELLigence, podobně jako u sulfonamidu SA7. Výjimkou jsou opět výsledky při koncentraci 100 µg/ml, kdy se sulfonamid SA8 v testu s trypanovou modří jeví silně cytotoxický. V případě systému xCELLigence byl však zjištěn pouze silný antiproliferační účinek, navzdory kterému ale buňky od 64. hodiny měření znovu proliferovaly. Jak již bylo zmíněno výše, monitorování buněk systémem xCELLigence nám poskytuje informace i o sebemenší změně v morfologii buněk, kterou světelným mikroskopem nelze zachytit.

U sulfonamidů SA9 a SA10 byla zjištěna cytotoxicita, závislá na koncentraci. Výrazný cytotoxický účinek obou sulfonamidů byl patrný po 48 hodinách u koncentrace 50 µg/ml, kde došlo k více jak polovičnímu poklesu oproti negativní kontrole. Při koncentraci 100 µg/ml byla hodnota proliferace nulová. Stejně tak i viabilita při koncentracích 50 a 100 µg/ml obou sulfonamidů významně klesla. Po 48 hodinách byl zaznamenán u koncentrace 50 µg/ml více jak poloviční pokles viability a u koncentrace 100 µg/ml byla viabilita nulová. Při vysokých koncentracích, 50 a 100 µg/ml, byly testované sulfonamidy SA9 a SA10 vysoce cytotoxické. Závislost cytotoxického účinku obou sulfonamidů na hodnotě koncentrace byla potvrzena i systémem xCELLigence.

V případě sulfonamidu SA11 nebyl růst buněk při koncentracích 1 – 50 µg/ml téměř ovlivněn. Stejně tak i viabilita buněk byla v tomto koncentračním rozmezí srovnatelná s negativní kontrolou. Velmi silný antiproliferační účinek byl zaznamenán až při nejvyšší testované koncentraci 100 µg/ml, kdy byl růst buněk téměř zastaven a pokles buněčné viability byl více jak o polovinu v porovnání s negativní kontrolou. I v tomto případě výsledky testu s trypanovou modří korelují se získanými daty z xCELLigence.

Nejmenší cytotoxicitu vykazoval sulfonamid SA12. Jeho nejvýraznější cytotoxický účinek byl při koncentraci 100 µg/ml, kde došlo po 48 hodinách k více jak polovičnímu poklesu proliferace oproti negativní kontrole. Avšak v porovnání s působením ostatních sulfonamidů ve stejné koncentraci, zde byl pokles proliferace nejmenší. Viabilita buněk byla po působení sulfonamidu SA12 téměř totožná s kontrolou po 24 i 48 hodinách. Pouze nepatrný pokles viability byl zaznamenán při koncentraci 100 µg/ml. Tyto výsledky korelují s daty získanými ze systému xCELLigence. Naše výsledky testování sulfonamidu SA12 se shodují se studií Mondal et al. (2017). Jimi použité deriváty sulfonamidů také nevykazovaly žádnou podstatnou cytotoxicitu při koncentraci 100 µg/ml.

Výsledky této práce se poměrně obtížně porovnávají s výsledky ostatních studií, které se zaměřují na určení cytotoxicity nově syntetizovaných sulfonamidů nebo jejich derivátů. A to zejména z toho důvodu, že se jednotlivé studie liší použitými buněčnými liniemi, zvolenou metodou detekce cytotoxicity a především testovanými sulfonamidy či sulfonamidovými deriváty. Výsledky testu vylučování trypanové modří pro stanovení viability, provedeného v této diplomové práci, vykazují v rámci testovaných sulfonamidů určitou podobnost. U žádného z testovaných sulfonamidů nebyl při koncentracích 1 – 25 µg/ml zaznamenán výraznější vliv na viabilitu buněk. Statisticky významný pokles viability oproti kontrolním buňkám byl zaznamenán až při koncentracích 50 a 100 µg/ml.

Ve studii Marwaha et al. (2014) použili pro stanovení cytotoxicity N-acetylovaných derivátů sulfamethoxazolu a sulfafurazolu proti HeLa buňkám XTT test. Žádný z testovaných derivátů nezpůsobil při koncentraci 50 µg/ml po 24 i 48 hodinách snížení viability buněk o více jak 70 %. Také námi testované sulfonamidy nezpůsobily při koncentracích do 50 µg/ml pokles životaschopnosti buněk o více než 60 %. Výjimkou byly pouze sulfonamidy SA8 a SA10, které při zmíněné koncentraci po 48 hodinách snížily viabilitu na 30 %. V této studii dále zjišťovali antibakteriální účinek N-acetylovaných derivátů vůči chlamydiím. Ukázalo se, že tyto deriváty mají silné baktericidní účinky, což naznačuje, že nezasahují do syntézy folátu jako běžné sulfonamidy, ale působí jiným dosud neznámým mechanismem (Marwaha et al., 2014).

Castelli et al. (2000) zjišťovali, jak se změní antibakteriální a cytotoxický účinek sulfimidazolu, pokud bude podáván s trimetoprimem. Sulfimidazol byl při nejvyšší koncentraci 80 µg/ml pro Vero buňky *in vitro* jen nepatrně toxický, ať byl použitý samostatně nebo ve spojení s trimetoprimem. Navíc, pokud byl podáván s trimetoprimem, došlo k rozšíření jeho antibakteriálního spektra.

Sulfonamidy, které jsou v komplexu s ionty přechodných kovů, mají lepší antimikrobiální a antifungální vlastnosti a vyšší účinnost než samotný kovový ligand. Důležitá je však volba kovového iontu. Důkazem je studie dvojice Chohan a Shad (2012), kteří syntetizovali tři různé benzensulfonamidy, tvořící komplexy s ionty mědi, kobaltu, niklu a zinku. Nejlepší antimikrobiální a antifungální vlastnosti měly komplexy obsahující Zn^{2+} ionty. Jejich hodnoty MIC byly v rozmezí 1.341×10^{-7} až 6.743×10^{-8} M/ml. Naopak největší cytotoxicitu vykazovaly všechny komplexy s ionty mědi. Také ve studiích Diaz et al. (2016) a Bouchoucha et al. (2018) byl potvrzen vliv druhu kovového iontu na vlastnosti celé sloučeniny.

Významné antibakteriální a antifungální vlastnosti vykazují také Schiffovy báze odvozené od sulfonamidů a jejich derivátů, což bylo potvrzeno v několika studiích. Ve studii Krátký et al. (2012) vykazovaly nejlepší antibakteriální účinek Schiffovy báze, odvozené od sulfonamidových derivátů, proti *Mycobacterium kansasii* a *Staphylococcus aureus*, včetně kmene MRSA. Hodnoty IC_{50} při 24 a 48 hodinách byly 15,62 a 31,25 µg/ml v uvedeném pořadí. Antibakteriální a cytotoxická aktivita Schiffových bází odvozených od sulfamethoxazolu a sulfathiazolu byla potvrzena také ve studii Mondal et al. (2015), kde se výrazná cytotoxicita sulfonamidů projevila při nejvyšších koncentracích 800 a 1000 µg/ml. Ačkoliv jsme v naší práci použili jiné rozmezí koncentrací, nacházíme s touto prací podobnost. Námi použité sulfonamidy SA7, SA8, SA9 a SA10 vykazovaly silnou toxicitu

také až při dvou nejvyšších použitých koncentracích 50 a 100 µg/ml. Velmi dobrý antibakteriální a antifungální účinek Schiffových bází byl potvrzen ve studiích Chohan (2008), Chohan et al. (2010), Anacoma et al. (2015) a Mondal et al. (2017).

Sulfonamidy mají kromě své antibakteriální a antifungální aktivity také protinádorový účinek. Nové potenciální protinádorové sulfonamidy testovali ve své studii Lee et al. (2011), kteří hodnotili *in vitro* cytotoxicitu dvaceti B13 sulfonamidů vůči buněčným liniím A549 a HT-29 pomocí MTT testu. B13 sulfonamidy s dlouhými alkylovými řetězci byly 2krát až 3krát účinnější než běžné B13 ceramidové analogy. Ve studii Mirian et al. (2011) testovali účinek feny-benzensulfonamidů, jako nových protinádorových či protizánětlivých sloučenin, na viabilitu buněčných linií HeLa, MDA-MB-468 a MCF-7 pomocí testu redukce tetrazoliové soli MTT. Podobně jako v naší práci i zde bylo prokázáno, že v nízkých koncentracích do 20 µg/ml nemají jimi testované sulfonamidy výraznější vliv na viabilitu buněk. Cytotoxický účinek se projevil až v koncentračním rozmezí 100 – 1000 µg/ml. Také ve studii Al-Khayal et al. (2017) zjišťovali antiproliferační účinek aminobenzensulfonamidu jako nového protinádorového činidla. Systémem xCELLigence RTCA bylo zjištěno snížení buněčné viability na 18 % po 24 hodinách.

6 ZÁVĚR

Pomocí dvou nezávislých metod, testu vylučování trypanové modři a systému xCELLigence RTCA SP, byla testována cytotoxicita osmi vybraných nově syntetizovaných sulfonamidů. Jejich cytotoxický účinek byl testován na buňkách lidského adenokarcinomu plic A549 a lidských lymfoblastech akutní T-buněčné leukémie Jurkat.

Všechny testované sulfonamidy vykazovaly určitou míru cytotoxicity. Jako nejvíce toxické se ukázaly sulfonamidy SA9 a SA10, u kterých docházelo s jejich vzrůstající koncentrací k úplné inhibici buněčné proliferace. Naopak nejméně cytotoxické byly sulfonamidy SA5 a SA12.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ACEA Bioscience, Inc. The xCELLigence System: Discover what you've been missing. Prospekt firmy ACEA Bioscience, Inc. San Diego, 2013, 20 s.

AL-KHAYAL, K., ALAFEEFY, A., VAALI-MOHAMMED, M., MAHMOOD, A., ZUBAIDI, A., AL-OBEED, O., KHAN, Z., ABDULLA, M. and AHMAD R. Novel derivative of aminobenzenesulfonamide (3c) induces apoptosis in colorectal cancer cells through ROS generation and inhibits cell migration. *BMC Cancer*. 2017, **17** (4): 1 – 12.

ALTMAN, S. A., RANDERS, L. and RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology progress*. 1993, **9** (6): 671 – 674.

AMINOV, R. A Brief history of the Antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in mikrobiology*. 2010, 1: 134 – 141.

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical pharmacology*. 2017, 133: 4 – 19.

ANACONA, J. R., NORIEGA, N. and CAMUS, J. Synthesis, characterization and antibacterial activity of a tridentate Schiff base derived from cephalothin and sulfadiazine, and its transition metal complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, 137: 16 – 22.

BARAHUIE, F., HUSSEIN, M. Z., FAKURAZI, S. and ZAINAL, Z. Development of Drug Delivery Systems Based on Layered Hydroxides for Nanomedicine. *International journal of molecular sciences*. 2014, **15** (5): 7750 – 7786.

BARNES, N. M. and NEUMAIER, J. F. Neuronal 5-HT Receptors and SERT. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*. 2011, 34: 1 – 16.

BAULAC, M. Introduction to zonisamide. *Epilepsy research*. 2006, **68** (2): 3 – 9.

BELLÚ, S., HURE, E., TRAPÉ, M., TROSSERO, C., MOLINA, G., DROGO, C., WILLIWAMS, P. A. M., ATRIA, A. M., MUÑOZ ACEVEDO, J. C., ZACCHINO, S. SORTINO, M., CAMPAGNOLI, D. and RIZZOTTO, M. Synthesis, structure and antifungal properties of Co (II)–sulfathiazolate complexes. *Polyhedron*. 2005, **24** (4): 501 – 509.

- BERTRIX, L., TIMOUR-CHAH, Q., LANG, J., LAKHAL, M. and FAUCON, G. Protection against ventricular and atrial fibrillation by sotalol. *Cardiovascular research*. 1986, **20** (5): 358 – 363.
- BLOWEY, D. L. Diuretics in the treatment of hypertension. *Pediatric nephrology*. 2016, **31** (12): 2223 – 2233.
- BOCKSTAEL, K. and Van AERSCHOT, A. Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine*. 2009, **4** (2): 141 – 155.
- BOOTHE, D. M. Sulfonamides and sulfonamide combinations. In: *MSD Manuals* [online]. 2016. [cit. 2017-10-04]. Dostupné z: <http://www.msddvetmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/sulfonamides-and-sulfonamide-combinations>
- BOTTING, R. and AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 2005, **72** (2): 85 – 87.
- BOUCHOUCHA, A., ZAATER, S., BOUACIDA, S., MERAZIG, H. and DJABBAR, S. Synthesis and characterization of new complexes of nickel (II), palladium (II) and platinum (II) with derived sulfonamide ligand: Structure, DFT study, antibacterial and cytotoxicity activities. *Journal of Molecular Structure*. 2018, **5**: 345 – 355.
- BRAGA, M. F., ARONIADOU-ANDERJASKA, V., LI, H. and ROGAWSKI, M. A. Topiramate reduces excitability in the basolateral amygdala by selectively inhibiting GluK1 (GluR5) kainate receptors on interneurons and positively modulating GABA_A receptors on principal neurons. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2009, **330** (2): 558 – 566.
- BRAR, Y. and SAADABADI, A. Sumatriptan. In: StatPearls [online]. Treasure Island, Florida: StatPearls Publishing; 2018. [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470206/>
- BROOKS, P. M. COX-2 inhibitors. *Australian prescriber*. 2000, **23** (2): 30 – 32.
- CAPRETTE, D. R. Using a counting chamber. In: *Experimental biosciences* [online]. 2006. [cit. 2017-12-04]. Dostupné z: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/cellcounting.html>

- CASTELLI, M., MALAGOLI, M., LUPO, L., ROFFIA, S., PAOLUCCI, F., CERMALLI, C., ZANCA, A. and BAGGIO, G. Cytotoxicity and probable mechanism of action of sulphimidazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2000, 46: 541 – 550.
- CAUDARELLA, R., VESCINI, F., RIZZOLI, E. and ULIVIERI, F. M. The effect of thiazides on bone markers, bone mineral density and fractures. *Clinical reviews in bone and mineral metabolism*. 2015, **13** (3): 173 – 184.
- CHAMBERS, CH. and SCHAEFER, CH. Epilepsy and antiepileptic medications. Schaefer, Ch., Peters, Paul W. J. a Miller, Richard K. Miller. *Drugs during pregnancy and lactation: Treatment Options and Risk Assessment*. 3rd edition. Academic press, 2015, s. 918. ISBN 978-0-12-408078-2.
- CHEN, L. X. and SCHUMACHER, H. R. Gout: an evidence-based review. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2008, **14** (5): 55 – 62.
- CHOHAN, Z. H. Metal-based sulfonamides: Their preparation, characterization and in-vitro antibacterial, antifungal & cytotoxic properties. X-ray structure of 4-[(2-hydroxybenzylidene) amino] benzenesulfonamide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2008, **23** (1): 120 – 130.
- CHOHAN, Z. H., SHAD, H. A., YOUSOUFI, M. H. and HADDA, T. B. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, **45** (7): 2893 – 2901.
- CHOHAN, Z. H., SHAD, H. A. and SUPURAN, C. T. Synthesis, characterization and biological studies of sulfonamide Schiff's bases and some of their metal derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2012, **27** (1): 58 – 68.
- CELIS, J. E. *Cell biology: a laboratory handbook*, four-volume set, 3rd edition. Academic press, 2006, s. 2328. ISBN: 978-0-12-164730-8
- DARBAR, D. Standard antiarrhythmic drugs. In: *Cardiac electrophysiology: From cell to bedside*, 6th edition. Elsevier Inc. 2013: 1095 – 1110.
- DASARI, S. and TCHOUMWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014, 5: 364 – 378.

DASGUPTA, A. Challenges in therapeutic drug monitoring of digoxin and other anti-arrhythmic drugs. *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*. Academic press, 2012, s. 468. ISBN 978-0-12-385467-4.

DIAZ, J. R., FERNÁNDEZ, B. M., ECHEVERRÍA, G., BALDONI, H., VULLO, D., SORIA, D. B., SUPURAN, C. T. and CAMÍ, G. E. A substituted sulfonamide and its Co (II), Cu (II), and Zn (II) complexes as potential antifungal agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016, **31** (2): 51 – 62.

DONALDSON, C., BOERS, P. M., HOSKIN, K. L. and LAMBERT, G. A. The role of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the selective inhibitory effect of naratriptan on trigeminovascular neurons. *Neuropharmacology*. 2002, **42** (3): 374 – 385.

DUARTE, J. D. and COOPER-HOFF, R. M. Mechanisms for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2014, **8** (6): 793 – 802.

DURGUN, M., TURKMEN, H., ZENGİN, G., ZENGİN, H., KOYUNSEVER, M. and KOYUNCU, I. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and antimicrobial investigation and evaluation of physicochemical properties of novel 4-(2-methylacetamide) benzenesulfonamide derivatives. *Bioorganic chemistry*. 2017, 70: 163 – 172.

EHINGER, M. Antibiotika med effekt på cellmembranet och nukleinsyrasyntesen. Kompetitiv inhibition. *Magnus Ehingers undervisning: Allt du behöver för A i Biologi, Kemi, Bioteknik, Gymnasiearbete m.m.* [online]. 2015 [cit. 2018-01-05].

ELLFOLK, M. and HULTZSCH, S. Analgesics, antiphlogistics and anesthetics. In: Schaefer, Ch., Peters, Paul W. J. a Miller, Richard K. Miller. *Drugs during pregnancy and lactation: Treatment Options and Risk Assessment*. 3rd edition. Academic press, 2015, kapitola 4.1, s. 653 – 670. ISBN 978-0-12-408078-2.

ESTEMALIKA, E. and TEPPER, S. Preventive treatment in migraine and the new US guidelines. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2013, 9: 709 – 720.

FANTRY, L. E. Protease Inhibitor-associated diabetes mellitus: A potential cause of morbidity and mortality. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2003, **32** (3): 243 – 244.

- FERRARI, M. D., ROON, K. I., LIPTON, R. B. and GOADSBY, P. J. Oral triptans (serotonin 5-HT_(1B/1D) agonists) in acute migraine treatment: a meta-analysis of 53 trials. *Lancet*. 2001, **358** (9294):1668 – 1675.
- FÍŠAR, Z., JIRÁK, R., BOB, P. and PAPEŽOVÁ, H. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. 2. přeprac. a dopl. vyd., Praha: Grada, 2009. 383 s. ISBN 978-80-247-2737-0.
- FROMM, M. F. and KIM, R. B. In vitro and in vivo evidence of the importance of organic anion transporters (OATs) in drug therapy. In: *Drug Transporters, Handbook of experimental pharmacology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, kapitola 2, s. 454. ISBN 978-3-642-14540-7
- FRUMIN, H., KERIN, N. Z. and RUBENFIRE, M. Classification of antiarrhythmic drugs. *Journal of clinical pharmacology*. 1989, **29** (5): 387 – 394.
- FUNK, C. D. and FITZGERALD, G. A. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007, **50** (5): 470 – 479.
- GHIMIRE, S., KYUNG, E., LEE, J. H., KIM, J. W. and KIM, E. An evidence-based approach for providing cautionary recommendations to sulfonamide-allergic patients and determining cross-reactivity among sulfonamide-containing medications. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2013, **38** (3): 196 – 202.
- GHORAB, M. M., CERUSO, M., ALSAID, M. S., NISSAN, Y. M., ARAFA, R. K. and SUPURAN, C. T. Novel sulfonamides bearing pyrrole and pyrrolopyrimidine moieties as carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, cytotoxic activity and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, **87**: 186 – 196.
- GHOSH, S. and COLIER, A. Management of diabetes. In: *Churchill's Pocketbook of Diabetes*, 2nd edition. Churchill Livingstone, 2012, sekce 3, s. 344. ISBN: 9780443100819
- GORDON, S. G. and KITTLESON, M. D. Drugs used in the management of heart disease and cardiac arrhythmias. In: Maddison, J. E. et al. *Small animal clinical pharmacology*, 2nd edition. Elsevier Health Sciences, 2008, kapitola 17, s. 584. ISBN: 978-0-7020-2858-8.
- GRASSI, W. and De ANGELIS, R. Clinical features of gout. *Reumatismo*. 2012, **63** (4): 238 – 245.
- GREENWOOD, D. Sulfonamides. In: Finch, R. G. et al. *Antibiotic and chemotherapy*, 9th edition. Elsevier Saunders, 2010, kapitola 19, s. 337 – 343. ISBN: 978-0-7020-4064-1.

- HAMIDI, H., LILJA, J. and IVASKA, J. Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion. *Bio Protocol*. 2017, **7** (24): e2646.
- HEATLEY, N. G. Alexander Fleming. The man and the myth. *Medical history*. 1984, **28** (4): 453 – 455.
- HOLSTEIN, A., PLASCHKE, A. and EGBERTS, E. H. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2001, **17** (6): 467 – 473.
- HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. 2. vyd. Praha: Triton, 2001. 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
- HYNIE, S. *Speciální farmakologie, díl VII/B, Protiinfekční imunita*. 2. přeprac. vyd., Praha: Karolinum, 2003. 239 s. ISBN 80-246-0657-7.
- ISSA, Z. F. MILLER, J. M. and ZIPES, D. P. Post-infarction sustained monomorphic ventricular tachycardia. In: Issa, Z. F, Miller J. M., Zipes, D. P. *Clinical arrhythmology and electrophysiology: A companion to Braunwald's heart disease*, 2nd edition. Elsevier Saunders, 2012, s. 512 – 561. ISBN: 978-1-4557-1274-8
- JAEGGI, E. and TULZER, G. Pharmacological and interventional fetal cardiovascular treatment. In: Anderson, R. H. et al. *Paediatric cardiology*, 3rd edition. Churchill Livingstone, 2010, kapitola 12, s. 1344. ISBN: 978-0-7020-3064-2.
- JOHNSON, K. K., GREEN, D. L., RIFE, J. P. and LIMON, L. Sulfonamide cross-reactivity: fact or fiction? *The Annals of pharmacotherapy*. 2005, **39** (2): 290 – 301.
- JUHASZ, G., ZSOMBOK, T., JAKAB, B., NEMETH, J., SZOLCSANYI, J. and BAGDY, G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia*. 2005, **25** (3): 179 – 183.
- KASSOTIS, J., SAUBERMAN, R. B., CABO, C., WIT, A. L. and COROMILAS, J. Beta receptor blockade potentiates the antiarrhythmic actions of d-sotalol on reentrant ventricular tachycardia in a canine model of myocardial infarction. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2003, **14** (11): 1233 – 1244.
- KASZNICKI, J. and DRZEWOSKI, J. Heart failure in the diabetic population – pathophysiology, diagnosis and management. *Archives of medical science*. 2014, **10** (3): 546 – 556.

- KATZUNG, B. G. *Základní a klinická farmakologie*. 2. vyd. H & H Vyšehradská, s. r. o. 2006. 1083 s. ISBN 80-7319-056-7.
- KESTER, M., KARPA, K. D. and VRANA, K. E. Treatment of infectious diseases. In: *Elsevier's integrated review pharmacology*, 2nd edition. Elsevier Saunders, 2012, kapitola 4, s. 264. ISBN: 978-0-323-07445-2.
- KIM, J. S., KUK, E., YU, K. N., KIM, J. H., PARK, S. J., LEE, H. J., KIM, S. H., PARK, Y. K., PARK, Y. H., HWANG, C. Y., KIM, Y. K., LEE, Y. S., JEONG, D. H., CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007, **3** (1): 95 – 101.
- KRÁTKÝ, M., VINŠOVÁ, J., VOLKOVÁ, M., BUCHTA, V. TREJTNAR, F. and STOLAŘÍKOVÁ, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, **50**: 433 – 440.
- KRÁTKÝ, M., DZURKOVÁ, M., JANOUŠEK, J., KONEČNÁ, K., TREJTNAR, F., STOLAŘÍKOVÁ, J. and VINŠOVÁ, J. Sulfadiazine salicylaldehyde-based Schiff bases: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Molecules*. 2017, **22** (9): 1573.
- KUBA, R. Antiepileptika a jejich klinické použití v epileptologii. *Praktické lékařství*. 2010, **6** (2): 62 – 66.
- KVĚTINA, J., HERINK, J. a VOPRŠALOVÁ, M. *Základy farmakologie*. 3. díl, Speciální farmakologie trávicího traktu, dělohy, endokrinního systému, zánětu, imunitního systému, nádorového bujení, infekčních onemocnění, vitaminů, kůže. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. 233 s. ISBN 80-7305-391-8.
- LAMBERT, G. A. Preclinical Neuropharmacology of Naratriptan. *CNS Drug reviews*. 2005, **11** (3): 289 – 316.
- LATINI, G., VERROTTI, A., MANCO, R., SCARDAOANE, A., DEL VECCHIO, A. and CHIARELLI, F. Topiramate: Its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008, **8** (1): 10 – 23.
- LEE, S. K., PARK, S. M. and IM, C. Cytotoxicities and Quantitative Structure Activity Relationships of B13 Sulfonamides in HT-29 and A549 Cells. *The Korean Journal of physiology and pharmacology*. 2011, **15** (6): 423 – 429.

- LEPPIK, I. E. Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure*. 2004, 13: 5 – 9.
- LINCOVÁ, D. a FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- LOCHMAN, O. *Nežádoucí účinky antibiotik a hlavní zásady racionální antimikrobiální terapie*. Praha: Avicenum, 1990. 224 s. ISBN 80-201-0049-0.
- LOUIS, K. S. and SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in molecular biology*. 2011, 740: 7 – 12.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K. and WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Překlad 15., zcela přepracovaného vydání. 2. vyd. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1
- LV, Z., CHU, Y. and WANG, Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS*. 2015, **8** (7): 95 – 104.
- MADISSON, J. E., WATSON, A. DAVID. J. and ELLIOT, J. Antibacterial drugs. In: Maddison, J. E. et al. *Small animal clinical pharmacology*, 2nd edition. Elsevier Health Sciences, 2008, kapitola 8, s. 584. ISBN: 978-0-7020-2858-8.
- MANGIPUDY, R., BURKHARDT, J. and KADAMBI, V. J. Use of animals for toxicology testing is necessary to ensure patient safety in pharmaceutical development. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2014, **70** (2): 439 – 441.
- MARTÍNKOVÁ, J., CHLÁDEK, J. MIČUDA, S. and CHLÁDKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007. 371s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- MARWAHA, S., UVELL, H., SALIN, O., LINDGREN, A. E., SILVER, J., ELOFSSON, M. and GYLFE, A. N-Acylated derivatives of Sulfamethoxazole and Sulfafurazole inhibit intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, **58** (5): 2968 - 2971.
- MASSIOU, H. Naratriptan. *Current medical research and opinion*. 2001, **17** (1): 51 – 53.
- MASTÍK, J. Antikonvulziva v terapii bolesti – mechanismy účinku. *Neurologie pro praxi*. 2008, **9** (1): 37 – 41.
- MELICHAR, B. *Chemická léčiva*. 3. přeprac. vyd., Praha: Avicenum, 1987. 934 s.
- MENDE, C. W. Current issues in diuretic therapy. *Hospital practice* (Office ed.). 1990, **25** (1): 15 – 21.

METE, E., COMEZ, B., INCI GUL, H. GULCIN, I. and SUPURAN, C. T. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory activities of new thienyl-substituted pyrazoline benzenesulfonamides. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016, **31** (2): 1 – 5.

MIRIAN, M., ZARGHI, A., SADEGHI, S., TABARAKI, P., TAVALLAEI, M., DARDASS, O. and SADEGHI-ALIABADI, H. Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel sulfonamide derivatives against a few human cancer cells. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2011, **10** (4): 741 – 748.

MONDAL, S., MANDAL, S. M., MONDAL, T. K. and SINHA, C. Structural characterization of new Schiff bases of sulfamethoxazole and sulfathiazole, their antibacterial activity and docking computation with DHPS protein structure. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, 150: 268 – 279.

MONDAL, S., MANDAL, S. M., MONDAL, T. K. and SINHA, C. Spectroscopic characterization, antimicrobial activity, DFT computation and docking studies of sulfonamide Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*. 2017, 1127: 557 – 567.

MONDELI, M., BRUNÉ, V., BORTHAGARAY, G., ELLENA, J., NASCIMENTO, O. R., LEITE, C. Q., BATISTA, A. A. and TORRE, M. H. New Ni(II)-sulfonamide complexes: Synthesis, structural characterization and antibacterial properties. X-ray diffraction of $[\text{Ni}(\text{sulfisoxazole})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ni}(\text{sulfapyridine})_2]$. *Journal of inorganic biochemistry*. 2008, **102** (2): 285 – 292.

MOSKOWITZ, M. A. and BUZZI, M. G. Migraine: general aspects. In: Aminoff, M. J., Boller, F. and Swaab, D. F. *Handbook of Clinical Neurology*. 2010, svazek 97, kapitola 21, s. 825. ISBN: 978-0-444-63849-6.

MUNTINGH, G. L. Do some of the newer COX-2 inhibitors cross-react with sulfonamide antibiotics? *SA orthopaedic journal*. 2011, **10** (1): 73 – 76.

NAPOLETANO, F., LIONETTO, L. and MARTELLETTI, P. Sumatriptan in clinical practice: effectiveness in migraine and the problem of psychiatric comorbidity. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2014, **15** (3): 303 – 305.

NAGASHIMA, K., TAKAHASHI, A., IKEDA, H., HAMASAKI, A., KUWAMURA, N. YAMADA, Y. and SEINO, Y. Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents:

- pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes research and clinical practice*. 2004, **66** (1): S75 – 78.
- NICHOLS, D. E and NICHOLS, C. D. Serotonin receptors. *Chemical reviews*. 2008, **108** (5): 1614 – 1641.
- OH, S. W. and HAN, S. Y. Loop diuretics in clinical practice. *Electrolyte blood press*. 2015, **13** (1): 17 – 21.
- OLEFSKY, J. M. and REAVEN, G. M. Effects of sulfonylurea therapy on insulin binding to mononuclear leukocytes of diabetic patients. *The American journal of medicine*. 1976, **60** (1): 89 – 95.
- PADBERG, S. Anti-infective agents. In: Schaefer, Ch., Peters, Paul W. J. and Miller, Richard K. *Drugs during pregnancy and lactation: Treatment Options and Risk Assessment*. 3rd edition. Academic press, 2015, kapitola 2.6, s. 918. ISBN 978-0-12-408078-2.
- PAPICH, M. G. Zonisamide. In: *Saunders handbook of veterinary drugs*, 4th edition. Elsevier Sanders, 2016, s. 928. ISBN: 9780323244855
- PEREZ-RUIZ, F., HERRERO-BEITES, A. M. and SAENZ de BURUAGA, J. A. Uricosuric therapy of hyperuricemia in Gout. In: Terkeltaub, R. *Gout & Other Crystal Arthropathies*. Elsevier Health Sciences, 2012, část II, kapitola 12, s. 384. ISBN: 978-1-4377-2864-4
- PORTER, R. J. Mechanisms of action of antiseizure drugs. In: Stefan, H., Theodore, W. H. *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, 2012, svazek 108, část II, kapitola 39, s. 608. ISBN: 9780444528995
- PROKS P., REIMANN, F., GREEN, N., GRIBBLE, F. and ASHCROFT, F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2002, **51** (3): 368 – 376.
- ROGAWSKI, M. A. and LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature reviews. Neuroscience*. 2004, **5** (7): 553 – 564.
- ROMERO, K. and WOOSLEY, R. L. Clinical Pharmacology of Antiarrhythmic Drugs. In: Antman, E. *Cardiovascular Therapeutics: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 4th edition. Elsevier Sanders, 2013, část IV, kapitola 18, s. 832. ISBN: 9781455701018
- RYZÍ, M. Současné možnosti terapie Lennox-Gastautova syndromu. *Neurologie pro praxi*. 2011, **12** (1): 43 – 47.

- SAUTER, E., QIN, W., HEWETT, J. E., RUHLEN, R. L., FLYNN, J. T., ROTTINGHAUS, G. and CHEN, Y. C. Celecoxib concentration predicts decrease in prostaglandin E2 concentrations in nipple aspirate fluid from high risk women. *BMC cancer*. 2008, 8: 49.
- SCOZZAFAVA, A., OWA, T. MASTROLORENZO, A. and SUPURAN, C. T. Anticancer and antiviral sulfonamides. *Current medicinal chemistry*. 2003, **10** (11): 925 – 953.
- SCHNYDER, B. and PICHLER, W. J. Allergy to sulfonamides. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2013, **131** (1): 256 – 257.
- SCHOLAR, E. HIV Protease Inhibitors. In: Enna, S. J. and Bylund, D. B. *xPharm: The comprehensive pharmacology reference*. Elsevier Saunders, 2007, s. 1 – 7. ISBN: 9780080552323
- SEINO, S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. *Diabetologia*. 2012, **55** (8): 2096 – 2108.
- SHAH, S., KHATRI, I. and FREIS, E. D. Mechanism of antihypertensive effect of thiazide diuretics. *American heart journal*. 1978, **95** (5): 611 – 8.
- SHORR, R. I. *Drugs for the geriatric patient*, 1st edition. Elsevier Saunders, 2007, s. 1048. ISBN: 9781416002086
- SHUKLA, A. C., McCOWAN, F. and STEVEN, J. Cardiac physiology and pharmacology. In: Coté, Ch. J. et al. *A practice of anesthesia for infants and children*, 4th edition. Elsevier Saunders, 2009, kapitola 16, s. 1192. ISBN: 978-1-4160-3134-5.
- SILBERSTEIN, S. D. Migraine. In: Schapira, Anthony H. V. *Neurology and clinical neuroscience*. Mosby, 2007, kapitola 56, s. 1664. ISBN: 9780323033541
- SILVERMAN, W., LOCOVEI, S. and DAHL, G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2008, **295** (3): C761 – C767.
- SINHA, A. D. and AGARWAL, R. Thiazide diuretics in chronic kidney disease. *Current hypertension reports*. 2015, **17** (3): 13.
- SLATORE, C. G. and TILLES, S. A. Sulfonamide hypersensitivity. *Imunology and allergy clinics of North America*. 2004, **24** (3): 477 – 490.

SOMMER, B. R., MITCHELL, E. L. and WROOLIE, T. E. Topiramate: Effects on cognition in patients with epilepsy, migraine headache and obesity. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2013, **6** (4): 211 – 227.

SOLA, D., ROSSI, L., CARNEVALE SCHIANCA, G. P., MAFFIOLI, P., BIGLIOCCA, M., MELLA, R., CORLIANÓ, F., FRA, G. P., BARTOLI, E. and DEROSA, G. Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Archives of medical science*. 2015, **11** (4): 840 – 848.

SOLLY, K., WANG, X., XU, X., STRULOVICI, B. and ZHENG, W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay and drug development technologies*. 2004, **2** (4): 363 – 372.

SOUČKOVÁ, L., KOSTKOVÁ, H. a DEMLOVÁ, R. Jak se vyvíjí nový lék. *Praktické lékařství*. 2015; **11** (4): 144 – 147.

STAROBOVÁ, O., LANDA, L., NOVÁKOVÁ, J., ŠULCOVÁ, A. Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online]. 2006 [cit. 2018-02-03]. Dostupný z: <http://portal.med.muni.cz/>.

STONE, T. and DARLINGTONOVÁ, G. *Léky, drogy, jedy*. Praha: Academia, 2003. 440 s. ISBN 80-200-1065-3.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews. Drug discovery*. 2008, **7** (2): 168 – 181.

SUTHAR, S. K., BANSAL, S., LOHAN, S., MODAK, V., CHAUDHARY, A. and TIWARI, A. Design and synthesis of novel 4-(4-oxo-2-arylthiazolidin-3-yl)benzenesulfonamides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX over I and II with potential anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, **66**: 372 – 379.

SWAPNA, M., PREMAKUMARI, CH., REDDY, S. N., PADMAJA, A., PADMAVATHI, V., KONDAIAH, P. and KRISHNA, N. S. Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Sulfonamidomethane Linked Heterocycles. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2013, **61** (7): 722 – 730.

TIEMERSMA, E. W., BRONZWAER, S. L., LYYTIKÄINEN, O., DEGENER, J. E., SCHRIJNEMAKERS, P., BRUINSMA, N., MONEN, J., WITTE, W. and GRUNDMAN, H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999 – 2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2004, **10** (9): 1627 – 1634.

- TREJBALOVÁ, M. a TREJBAL, E. *Aktuálne farmakoterapeutiká II: Antibiotiká a chemoterapeutiká*. 1.vyd., Martin: Osveta, 1988. 297 s.
- TÜRKER, Ş. L., ALBENIZ, G., DINÇ, B. and ALBENIZ, I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017, **14** (3): 1866 – 1870.
- UEDA, Y., DOI, T., TOKUMARU, J. and WILLMORE, L. J. Effect of zonisamide on molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins during epileptogenesis in rats with hippocampal seizures. *Molecular brain research*. 2003, **116** (1 – 2): 1 – 6.
- VAŠKEVIČIENĖ, I., PAKETURYTĖ, V., ZUBRIENĖNA, A., KANTMINIENĖ, K. MICKEVIČIUS, V. and MATULIS, D. N-Sulfamoylphenyl- and N-sulfamoylphenyl-N-thiazolyl-b-alanines and their derivatives as inhibitors of human carbonic anhydrases. *Bioorganic chemistry*. 2017, **75**: 16 – 29.
- VÍTOVEC, J., ŠPINAR, J., ŠPINAROVÁ, L. a kolektiv. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. 3. přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, 2017. 237 s. ISBN 978-80-247-4713-2.
- VONDRÁČKOVÁ, L. HORVÁT, V. ŽŮREK, D. O zlatých elektrodách. *Labor Aktuell*. 2010, **1** (10): 18 – 20.
- WALKER, M. C. and SANDER, J. W. A. S. Topiramate: a new antiepileptic drug for refractory epilepsy. *Seizure*. 1996, **5**: 199 – 203.
- WENKE, M., HYNIE, S. and MRÁZ, M. *Farmakologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 2. vyd., Praha: Avicenum, 1990. 946 s. ISBN 80-201-0028-8.
- WORMSER, G. P., KEUSCH, G. T. and HEEL, R. C. Co-trimoxazole (Trimethoprim-sulfamethoxazole): an updated review of its antibacterial activity and clinical efficacy. *Drugs*. 1982, **24** (6): 459 – 518.
- XING, J. Z., ZHU, L., JACKSON, J. A., GABOS, S., SUN, X. J., WANG, X. B. and XU, X. Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. *Chemical research in toxicology*. 2005, **18** (2): 154 – 161.
- XING, J. Z., ZHU, L., GABOS, S. and XIW, L. Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicology in vitro*. 2006, **20**: 995 – 1004.

ZACCARA, G. and SPECCHIO, L. M. Long-term safety and effectiveness of zonisamide in the treatment of epilepsy: a review of the literature. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2009, 5: 249 – 259.

ZHENG, T., KUANG, X., WANG, J. and ZHANG, X. Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of Virological Methods*. 2013, **193** (2): 364 – 370.

ZIMMERMAN, B. R. Sulfonylureas. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1997, **26** (3): 511 – 522.