

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Vliv anti-parazitických látek na africké trypanosomy

**Vojtěch Fiedler
Jihočeský kraj**

České Budějovice 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Vliv anti-parazitických látek na africké trypanosomy

The impact of Anti-Parasitic drugs on African Trypanosomes

Autor: Vojtěch Fiedler

Škola: Gymnázium, České Budějovice, Česká 64, Česká 142/64,
České Budějovice, 37001

Kraj: Jihočeský kraj

Konzultant: Mgr. Michaela Kunzová

České Budějovice 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích dne 8. 3. 2024.....

Vojtěch Fiedler

Poděkování

Mé největší poděkování patří mé školitelce Mgr. Michaele Kunzové za veškeré praktické dovednosti a znalosti nejen z oboru molekulární biologie, jež mi předala během několikaleté spolupráce. Velice si vážím jejího času, ochoty a podpory. Děkuji též za přátelský přístup a cenné rady v průběhu celého psaní mé Středoškolské odborné činnosti.

Děkuji rovněž vedoucí laboratoře Funkční biologie protist doc. RNDr. Aleně Panicucci Zíkové, Ph.D. za umožnění realizace tohoto projektu s využitím prostředků laboratoře a za veškeré odborné rady, které mi poskytla. Zároveň děkuji všem současným i bývalým členům laboratoře za přátelskou atmosféru, vstřícnost a ochotu kdykoli pomoci.

Speciální poděkování pak směřuji Mgr. Michaele Husové a Mgr. Miroslavě Bromové za psychickou podporu na pracovišti a neustálé zlepšování nálady.

Velké díky patří také mým středoškolským učitelkám biologie paní RNDr. Pavle Kodříkové a paní Mgr. et Mgr. Lucii Špičkové za inspiraci a motivaci ke studiu přírodních věd.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu a pochopení. Zvláštní poděkování patří mému bratrovi Lukášovi, který pro mě vždy byl inspirací v oblasti přírodních věd.

Anotace

Africké trypanosomy jsou krevní parazité způsobující závažná onemocnění. Cílem této práce byla analýza cytotoxického účinku specifických látek na parazity *Trypanosoma brucei* a *Trypanosoma evansi*. Mezi testované látky jsme zahrnuli bedaquilin, epicatechin, catechin, proguanil a venturicidin A, což jsou látky, které ovlivňují mitochondriální funkce parazita. Inhibiční koncentrace (IC₅₀) těchto látek jsme stanovili pomocí resazurinového testu (tzv. alamar blue assay). Nejnižší hodnota IC₅₀ byla změřena u venturicidinu A, který je tudíž vysoce potentní vůči trypanosomám, a naopak nejvyšší hodnoty IC₅₀ vykazovaly skupiny catechinů. U látek bedaquilin a venturicidin A jsme dále testovali jejich vliv na předpokládané cíle v buňce, konkrétně na mitochondriální ATP syntázu. Jelikož tento enzymatický komplex přímo ovlivňuje hladinu mitochondriálního membránového potenciálu v buňce parazita, rozhodli jsme se stanovit hladinu membránového potenciálu pomocí fluorescenčních indikátorů (TMRE u živých a Safranin O u permeabilizovaných buněk). Naše výsledky ukazují, že bedaquilin neovlivňoval aktivitu ATP syntázy parazita *Trypanosoma brucei*, zatímco venturicidin A inhiboval její aktivitu při nanomolárních koncentracích. Poznatky této práce mohou být klíčové pro další výzkum mechanismů působení perspektivních látek na trypanosomy a přispět tím k novým a účinnějším léčebným strategiím.

Klíčová slova

Trypanosoma; cytotoxicita; mitochondrie; ATP syntáza; membránový potenciál

Annotation

African trypanosomes are blood parasites that cause serious diseases. The aim of this study was to analyze cytotoxic effect of anti-parasitic drugs on *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma evansi*. The inhibitory agents tested included bedaquiline, epicatechin, catechin, proguanil and venturicidine A. The inhibitory concentrations (IC₅₀) of these compounds were determined by resazurin test (Alamar blue assay). The lowest IC₅₀ was measured for venturicidin A while the highest values were observed for catechins. For the compounds bedaquiline and venturicidin A, we also tested whether they inhibit their proposed cellular target, the mitochondrial ATP synthase complex. Since this enzyme complex directly affects the level of mitochondrial membrane potential in the parasite, we decided to determine it using fluorescent indicators (TMRE in live and Safranin O in permeabilized cells). Our results demonstrate that bedaquiline does not inhibit ATP synthase of the parasite, whereas venturicidine A inhibited the activity of this enzyme at nanomolar concentrations. The results of this work may prove pivotal for future research into the mechanisms of promising drugs on trypanosomes, thus contributing to the development of new and more efficacious therapeutic strategies.

Keywords

Trypanosoma, cytotoxicity, mitochondria, ATP synthase, mitochondrial membrane potential

Obsah

1	ÚVOD	8
1.1	Africké trypanosomy	8
1.1.1	Formy, stádia a rozdíly v metabolismech trypanosom.....	10
1.1.2	Mitochondriální membránový potenciál $\Delta\Psi$, ATP syntáza a její modifikace pro jednotlivá stádia a formy	13
1.2	Analyzované látky	15
1.2.1	Bedaquilin	15
1.2.2	Venturicidin A.....	16
1.2.3	Proguanil	16
1.2.4	Catechiny, epicatechiny	17
2	MATERIÁLY A METODY	18
2.1	Kultivace buněk (linie, média, kultivační podmínky).....	18
2.2	Esej na měření cytotoxického vlivu (Alamar blue assay)	19
2.3	Měření mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi$ pomocí TMRE.....	22
2.4	Měření životnosti buněk s použitím PI	23
2.5	Stanovení $\Delta\Psi$ s využitím Safraninové eseje	24
3	VÝSLEDKY	25
3.1	Resazurinová esej na měření cytotoxického vlivu (Alamar blue assay).....	25
3.1.1	Resazurinová esej – bedaquilin	25
3.1.2	Resazurinová esej – venturicidin A.....	26
3.1.3	Resazurinová esej – proguanil.....	26
3.1.4	Resazurinová esej – catechin (+), catechin ($\pm$), epicatechin (-)	27
3.2	Vliv testovaných látek na $\Delta\Psi$ v souvislosti s životaschopností buněk	29
3.2.1	Měření TMRE a PI s venturicidinem A	30
3.2.2	Měření Safraninové eseje s venturicidinem A	32
3.2.3	Měření TMRE a PI s bedaquilinem.....	34
3.2.4	Měření Safraninové eseje s bedaquilinem.....	36
4	ZÁVĚR A DISKUZE.....	38
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	40
6	INTERNETOVÉ ZDROJE	44
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	45
9	SEZNAM TABULEK.....	47

1 ÚVOD

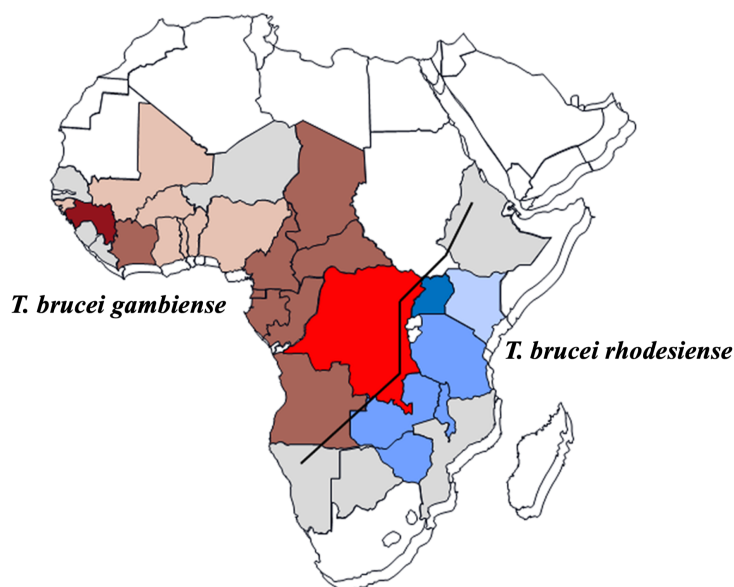
1.1 Africké trypanosomy

Trypanosomy jsou jednobuněčné parazitické organismy z podskupiny *Kinetoplastida* (*Kinetoplastae*) spadající do monofyletické skupiny Euglenozoa. Ta se na základě fylogenomického výzkumu začleňuje do superskupiny *Discoba*, definované před několika málo lety (Burki et al., 2020). Zástupci z podskupiny *Kinetoplastida* se obvykle vyznačují jedním bičíkem a kinetoplastem, což je barvitelná mitochondriální DNA, ve které jsou uloženy geny pro několik mitochondriálních proteinů (Cayla et al., 2019).

Parazité rodu *Trypanosoma* jsou nechvalně známí jako původci těžkých savčích, v některých případech i lidských onemocnění, která jsou bez časně lékařské intervence letální. Hlavním místem výskytu těchto onemocnění jsou převážně tropické a subtropické oblasti Afriky a Jižní Ameriky, které se také vyznačují nižší životní úrovní, a tudíž nedostatkem lékařské prevence a léčby. Trypanosomy se rozdělují na skupinu *Stercoraria*, která zahrnuje trypanosomy vyvíjející se v zadní části trávicího traktu hmyzího vektoru. Patří sem např. *Trypanosoma cruzi* vyskytující se v Jižní Africe. Druhá skupina trypanosom se nazývá *Salivaria*, vyvíjí se v přední části trávicího traktu hmyzího vektoru a čítá poddruhy *Trypanosoma brucei* vyskytující se v Africe (Desquesnes et al., 2013).

Africké trypanosomy ze skupiny *Salivaria* jsou původci onemocnění zvaných africké trypanozomiázy, což jsou buď AAT (Animal African Trypanosomiasis) u hospodářského dobytka, anebo HAT (Human African Trypanosomiasis) u lidí. K přenosu AAT a HAT onemocnění dochází pomocí hmyzu rodu *Glossina* (česky bodalka či moucha tse-tse z řádu *Diptera*), který byl dříve infikován parazitem při pozření infikované krve savce včetně člověka (Kennedy, 2004). Významným zástupcem této skupiny je *Trypanosoma brucei*, která u afrického dobytka vyvolává AAT, také zvanou nagana. Průběh onemocnění se vyznačuje těžkým anemickým stavem, horečkou, letargií, hubnutím a končí smrtí zvířete (The cattle sitte 1. 3. 2025). U člověka poddruhy parazita *Trypanosoma brucei* vyvolávají HAT onemocnění známé jako spavá nemoc. Spavá nemoc má časnou a pozdní fázi průběhu. V časně (hemolymfatické) fázi se parazit rozšiřuje krevním řečištěm a lymfatickým systémem, během čehož se objevují nespecifické projevy například horečka, lymfadenopatie, bolest hlavy atd. V druhé, pozdní (encefalitické) fázi dochází k postupným poruchám psychiky, sensorikomotorických schopností, chování a především spánku. Následně dochází k orgánovému selhání (Kennedy, 2004). V Subsaharské Africe se spavá nemoc vyskytuje ve dvou variantách v závislosti na poddruhu *T. brucei*. První variantu nemoci způsobuje poddruh *Trypanosoma brucei gambiense*. Zahrnuje zhruba 92 % nahlášených případů a projevuje se jako chronická, dlouhotrvající nemoc (WHO 1. 3. 2025). Vykazuje povahu latentní infekce po dobu několika měsíců až let, která přechází v infekci zjevnou ve chvíli rozvinutí parazitární infekce v centrálním nervovém systému. Akutní variantu spavé nemoci pak způsobuje *Trypanosoma brucei rhodesiense*, jež se projeví do několika týdnů po nakažení, kdy dochází k brzkému průniku parazita do centrální nervové soustavy (WHO 1. 3. 2025). Jednotlivé

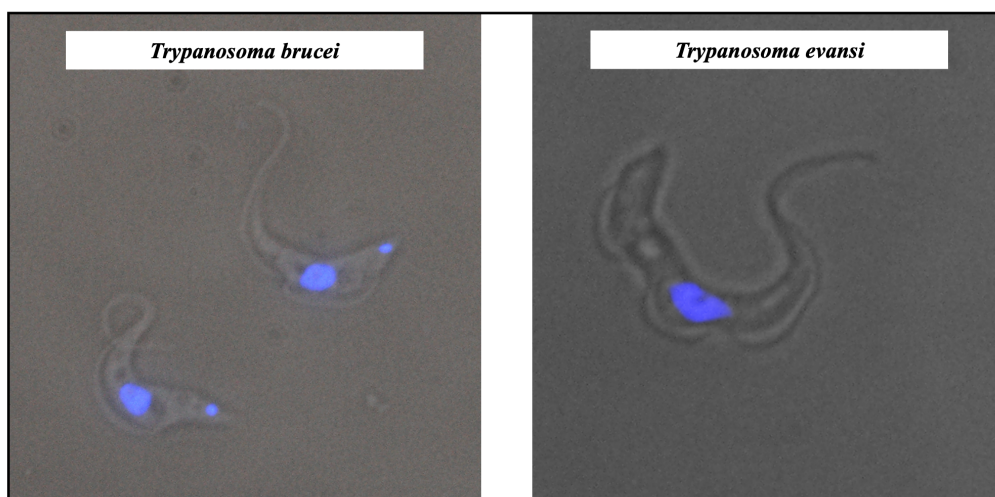
poddruhy *T. brucei* se zároveň odlišují endemickým místem výskytu. *T. b. gambiense* se vyskytuje v západní a centrální části Subsaharské Afriky, zatímco *T. b. rhodesiense* převažuje na jihovýchodě (Obr. 1).



Obrázek 1 Statistika zaznamenaných případů HAT – Afrika 2017 (přeloženo a převzato z Gao et al. 2020)

Při léčbě spavé nemoci se používají léčiva, jako je například Pentamidin či Suramin pro hemolymfatickou fázi či léčiva Eflornithin a Melarsopol užívané pro encefalickou fázi spavé nemoci (Barrett et al., 2011). Další možností je tzv. NECT, tedy kombinace Eflornithinu a Nifurtimoxu nově užívaná pro encefalickou fázi onemocnění (Kummerle et al., 2021).

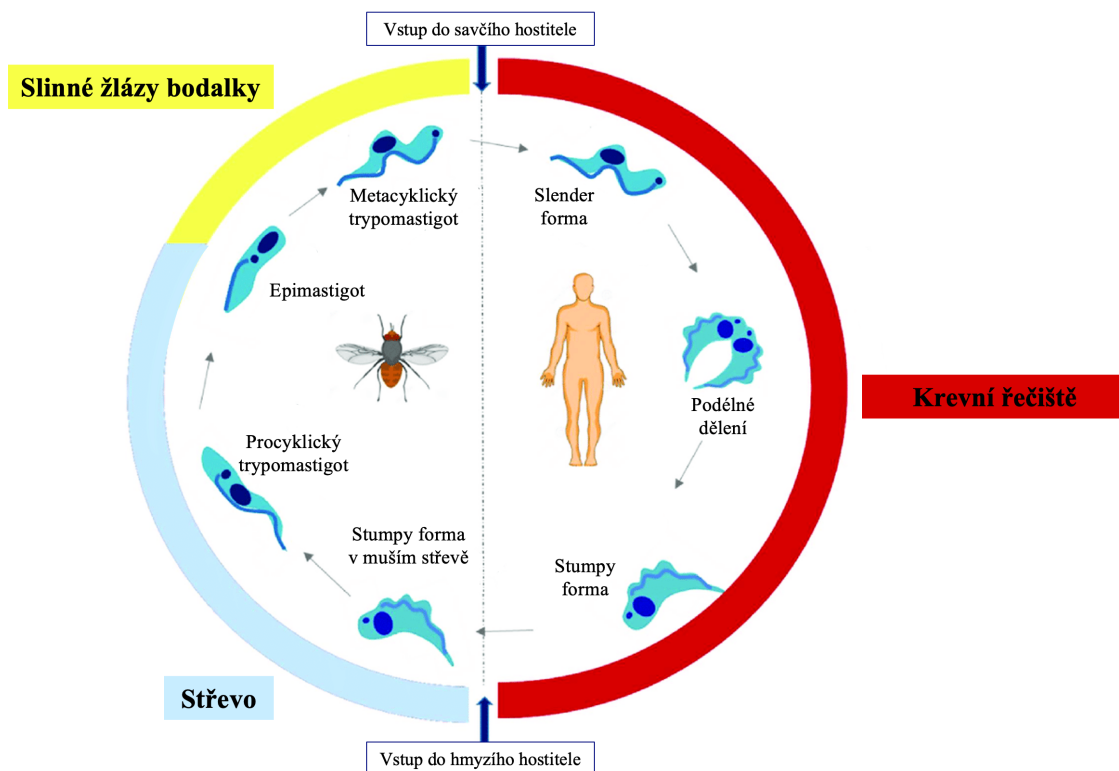
Do skupiny *Salivaria* a mezi africké trypanosomy je řazen i parazit *Trypanosoma evansi*, který se evolučně vyvinul z parazita *Trypanosoma brucei* ztrátou mitochondriální DNA tzv. kinetoplastu (Obr. 2). Přenos tohoto druhu trypanosomy je uskutečněn především mechanicky bodavým hmyzem a není vázán na jednoho specifického přenašeče jako u jiných druhů trypanosom, neboť ve svém životním cyklu neprodělavá vývoj v hmyzím přenašeči (viz další kapitola), a tudíž se rozšířil i mimo africký kontinent. Parazit *Trypanosoma evansi* je původce nemoci Sura u hospodářsky významných zvířat jako jsou například koně, velbloudi, krávy apod. (Desquesnes et al., 2013).



Obrázek 2 Vizuální porovnání DAPI barvení DNA u jednotlivých trypanosom (vlevo signál z jádra a kinetoplastu *T. brucei*; vpravo odlišené jádro *T. evansi* bez kinetoplastu), vizuální porovnání provedeno pomocí Fluorescent microscope (Axioplan 2 imaging Universal microscope, Zeiss, Oberkochen, Německo) s CCD kamerou (Olympus DP73)

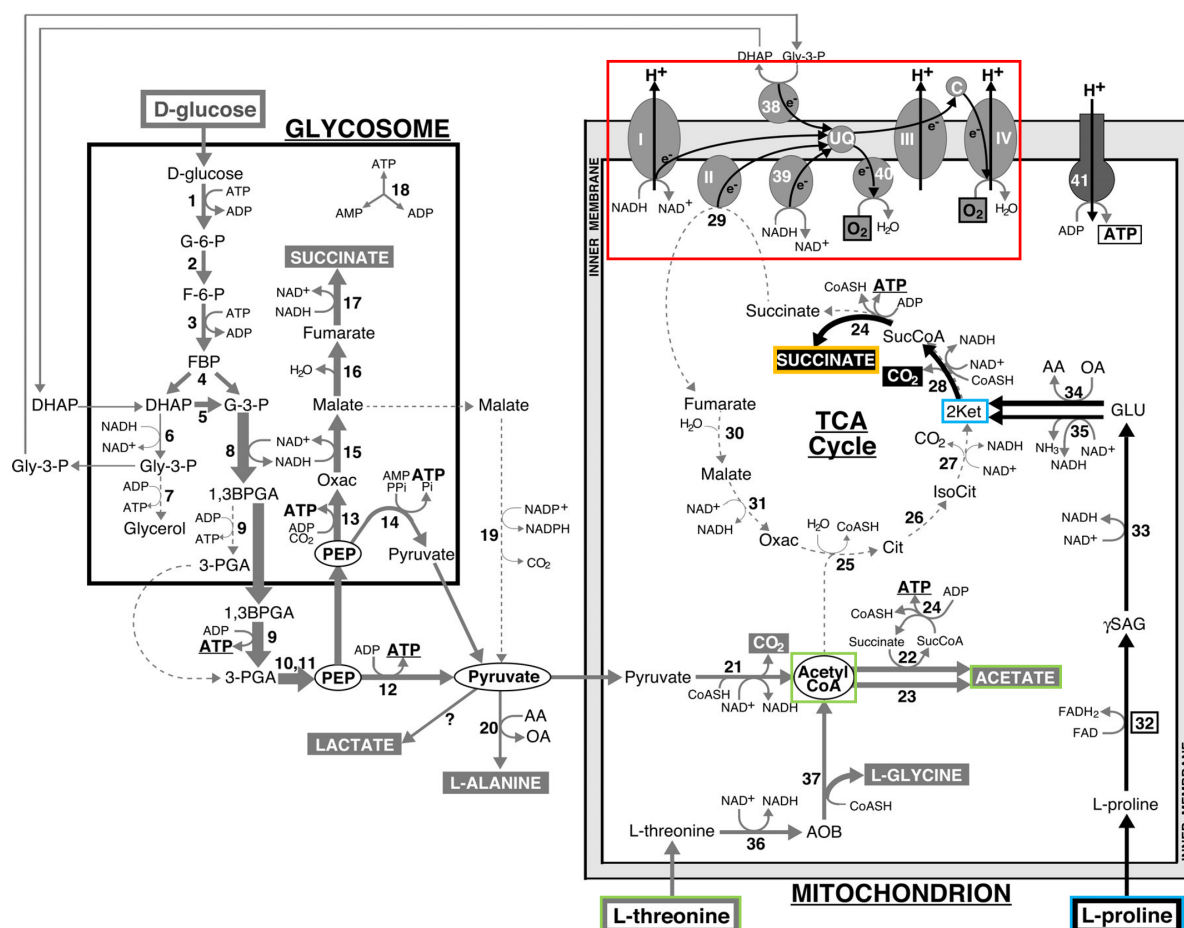
1.1.1 Formy, stádia a rozdíly v metabolismech trypanosom

T. brucei je parazit, který je rozšiřován mezi savčími hostiteli krvesajícím hmyzím přenašečem rodu *Glossina* (Van Den Abbeele et al., 1999). Pro přežití v různorodých prostředích svých hostitelů prochází parazit několika specializovanými životními stádii (Obr. 3). V savčí krvi nebo lymfě se nachází forma označovaná jako krevní stádium (bloodstream form, BF) a zahrnuje dvě životní stádia parazita: delší (slender) formu, která se rapidně dělí, a kratší (stumpy) formu, jež se nedělí a vyčkává na nasátí tse-tse mouchou (Seed & Wenck, 2003). V těchto krevních stádiích parazit pravidelně mění uspořádání povrchových glykoproteinů na své cytoplazmatické membráně, čímž znemožňuje hostitelskému imunitnímu systému provést účinnou imunitní reakci. Střídavé rozpoznávání parazita se projevuje střídáním stavů normálních se stavy typickými pro spavou nemoc (horečka, ospalost, nevolnost...). Pokud se na infikovaném jedinci nakrmí bodalka, parazité společně s krví doputují do hmyzího střeva. Zde dochází k přechodu krevního stádia v muší stádium (procyclic form, PF). Na základě tvaru můžeme ještě toto stádium nazývat trypomastigotem, které se při migraci bodalkou přeměňuje v epimastigota. Tato dvě stádia se od sebe odlišují především různými polohami kinetoplastu v buňce (Matthews 2005). Když epimastigot dosáhne slinných žláz bodalky, kde se přichytí, dojde k finální přeměně v metacyklického trypomastigota, který je opět infekční pro savčího hostitele. Při znovu nakrmení bodalky krví neinfikovaného zvířete dochází k přenosu metacyklického stádia do krevního řečiště. V novém hostiteli poté dochází k diferenciaci do krevního stádia (Matthews 2005). Tím se životní cyklus uzavírá a opakuje se (Obr. 3).



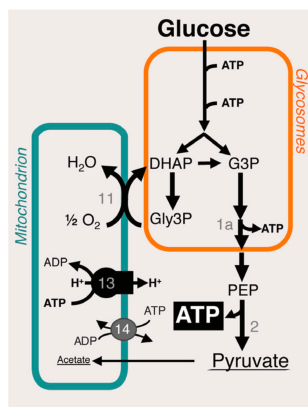
Obrázek 3 Životní cyklus *T. brucei* a změna stádií při přechodech mezi mušimi a savčími hostiteli (převzato a upraveno z Durão et al., 2022)

Metabolismus procyklického stádia je specificky adaptovaný na prostředí střeva a slinných žláz bodalky. Primární odlišností od prostředí savčího hostitele je absence glukózy v hemolymfě hmyzího hostitele. Nemožnost zisku energie ve formě ATP (adenosintrifosfátu) z glykolýzy nahrazuje metabolismus aminokyselin, především threoninu a prolinu. Zatímco je threonin po vstupu do mitochondrie metabolizován na acetylkoenzym A (AcetylCoA) a dál na acetát (Obr. 4 zelené značení), prolin je metabolizován odlišným způsobem a do citrátového cyklu vstupuje až jako α -ketoglutarát (Obr. 4 modré značení). Při metabolických přeměnách těchto aminokyselin, které není potřeba pro účely této práce podrobněji rozvádět, dochází k redukci koenzymů. Redukované koenzymy typu NADH slouží jako zdroj elektronů v dýchacím řetězci pro komplexy I, III a IV (Obr. 4 červené značení), které pumpují protony z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru, zatímco pro komplex II slouží jako zdroj elektronů sukcinát a FADH_2 (Obr. 4 žluté značení), který je jedním z meziproductů Krebsova cyklu (Lamour et al., 2005). Aby byla výnosnost z metabolismu aminokyselin dostatečná pro uživení potřeb buňky, je plocha mitochondrie značně rozšířena a členěna. Procyklické stádium se proto vyznačuje široce rozvětvenou mitochondrií po celé délce buňky s vysokým stupněm členitosti vnitřní membrány mitochondrie, které tvoří útvary nazývané jako kristy. Na nich ochotně probíhá oxidativní fosforylace.



Obrázek 4 Schéma energetického metabolismu procyklického stádia *T. brucei* (převzato z Lamour et al., 2005)

Krevní stádium *T. brucei* vyskytující se v savčí krvi využívá vysokou koncentraci rozpuštěné glukózy v tomto prostředí. BF trypanosomy tudíž využívají glukózu jako primární energetický zdroj. Převážná část ATP je produkována při přeměně glukózy na pyruvát v procesu glykolýzy ve specializovaných organelách zvaných glykozómy a částečně v cytosolu buňky (Obr. 5). Další ATP je pak produkováno v procesu substrátové fosforylace uvnitř mitochondrie pomocí enzymu sukcinyl-CoA-syntetázy (ScoAS) (Taleva et al., 2023). V tomto stádiu je mitochondrie redukována na trubicovitý útvar bez členění na kristy, neboť není potřeba široká plocha pro dýchací řetězec, jenž není u tohoto stádia plně využíván.

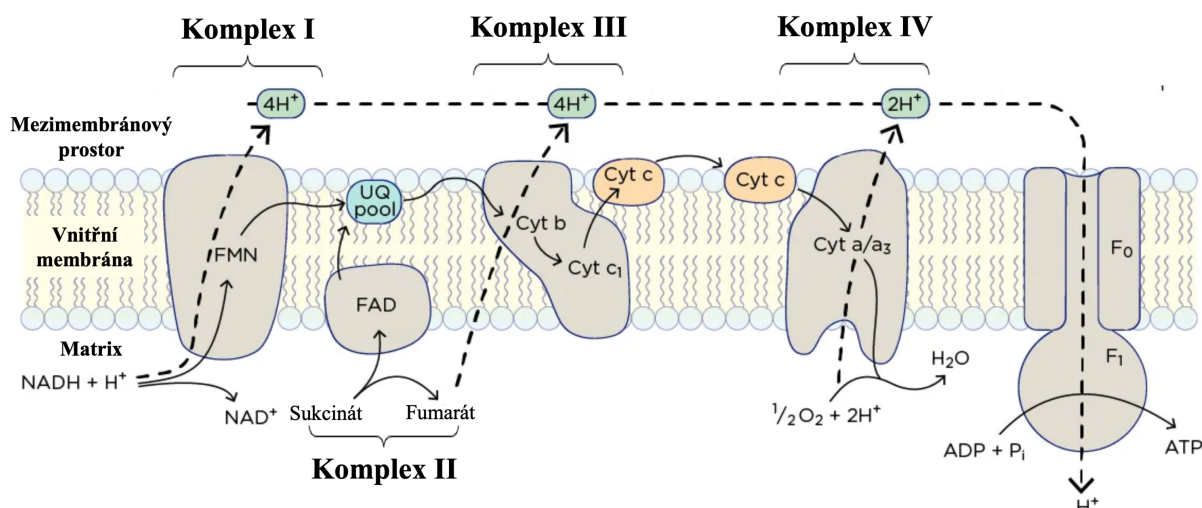


Obrázek 5 Metabolismus krevního stádia *T. brucei* získávající veškeré ATP glykolýzou (převzato Smith et al., 2017)

1.1.2 Mitochondriální membránový potenciál $\Delta\Psi$, ATP syntáza a její modifikace pro jednotlivá stádia a formy

ATP syntáza je jeden z nejvýznamnějších proteinových komplexů prokaryotické i eukaryotické domény, který hraje klíčovou roli v energetickém metabolismu mitochondrie. ATP syntáza se nachází na vnitřní membráně mitochondrie, která odděluje mezimembránový prostor (ohrazen vnější membránou od zbytku buňky) a mitochondriální matrix, tedy vnitřní viskózní prostředí, ve kterém probíhá řada reakcí (například Krebsův cyklus) a kde také nalezneme mitochondriální DNA. ATP syntáza je extrémně efektivní a důležitý enzymatický komplex tvořící ATP. Ve většině organismů funguje pouze ve směru syntézy ATP, ale jako každý enzym, umí i reverzní reakci, a to rozklad ATP za uvolnění energie. U parazita *Trypanosoma brucei* dochází k využití obou těchto aktivit ATP syntázy v rámci životního cyklu.

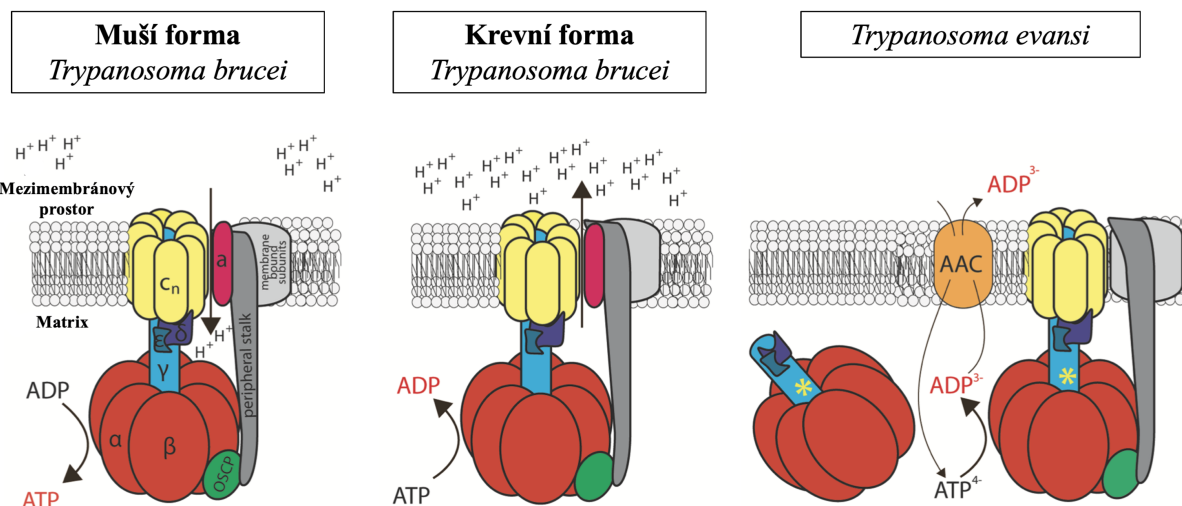
Procyklické stádium *T. brucei* využívá ATP syntázu způsobem typickým pro většinu eukaryotních buněk, což je fosforylace ADP (adenosindifosfát) na ATP (Obr. 6). Energie získaná při transportu elektronů v rámci dýchacího řetězce respiračními komplexy I až IV, je využita k pumpování protonů do mezimembránového prostoru. Vlivem přenosu H^+ dochází ke změně koncentrace protonů na obou stranách mitochondriální membrány. Z tohoto hlediska můžeme mluvit o změně pH, kdy v mezimembránovém prostoru pH klesá a na matrixové straně pH roste. Kromě koncentračního gradientu pozorujeme i vznik elektrického gradientu, napříč mitochondriální membránou. Mezi matrixovou stranou a mezimembránovou stranou mitochondrie lze měřit napětí, které je určeno rozdílem potenciálů mezi jednotlivými stranami polarizované membrány. Rozdíl nazýváme mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\Psi$), který je zcela esenciální pro správnou funkci mitochondrie. V případě jeho výrazného vyrušení dochází k destrukci mitochondrie a smrti buňky. Tento elektrochemický gradient je zodpovědný za vznik tzv. protonmotivní síly. Tato síla je využívána mitochondriální ATP syntázou, která propouští protony zpět do matrix po koncentračním spádu za vytvoření točivé energie, která zapříčiňuje tvorbu ATP z ADP a organického fosfátu (P) (Neupane et al., 2019). ATP syntáza má dvě základní části, a to F_o část, která je zakotvena v mitochondriální membráně a F_1 část, která je nasměrována do matrixu mitochondrie (Obr. 6). Funkce F_o části, která se skládá z a -podjednotky, z kruhu c -podjednotek (tzv. c -ring) a dalších membránových proteinů, je ukotvení ATP syntázy v membráně a interakce s procházejícími protony skrz jasně definovaný průchod mezi podjednotkami a a c . F_1 část obsahuje katalytická místa, ve kterých dochází ke vzniku ATP. Samotná činnost ATP syntázy zahrnuje prostup protonů F_o částí skrze c -ring, který je roztáčen právě díky protonmotivní síle elektrochemického gradientu, tedy průchodem protonů. Toto roztáčení c -ringu, vede k roztočení připojené F_1 části ATP syntázy a následným konformačním změnám podjednotek tvořící globulární část F_1 v matrix. V těchto místech se nachází vazebná místa pro ADP a P, kde dochází ke stlačování těchto dvou molekul a tvorbu ATP. Elektrochemická energie je tudíž přeměněna v práci konanou protony, které prochází skrze ATP syntázu, čímž se práce protonů přemění na mechanickou energii, která je uchována v podobě vysokoenergetických molekul ATP. $\Delta\Psi$ je proto klíčový pro ATP syntázu, která syntetizuje ATP (Whitehouse et al., 2019).



Obrázek 6 Proces oxidativní fosforylace na vnitřní membráně mitochondrie (převzato a upraveno, jackwestin.com). Komplexy dýchacího řetězce tvořící mitochondriální membránový potenciál a ATP syntáza využívající tento potenciál k tvorbě ATP.

U krevního stádia *T. brucei* nacházíme změnu funkce ATP syntázy. Jelikož BF produkuje většinu ATP glykolýzou, není dýchací řetězec plně využíván, a došlo tak k pozbytí některých komplexů dýchacího řetězce (konkrétně komplex III a IV), jejichž funkce je kromě přenosu elektronů také pumpování protonů do mezimembránového prostoru mitochondrie. Protože je pro buňku $\Delta\Psi$ esenciální, došlo u krevního stádia parazita *Trypanosoma brucei* k obrácení ATP syntázy na ATPázu. ATPáza rozkládá ATP získané glykolýzou na ADP a P. Uvolněnou energii využívá k aktivnímu transportu protonů z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru (Obr. 7) a přispívá tak svou hydrolytickou funkcí k tvorbě $\Delta\Psi$ (Schnauffer et al., 2005). Pro tvorbu $\Delta\Psi$ u krevního stádia je kromě ATP syntázy klíčový také přenašeč ADP/ATP carrier (AAC) (Hierro-Yap et al., 2021). Tento přenašeč přes mitochondriální membránu zajišťuje transport ATP^{4-} do mitochondrie, kde následně může být ATPázou hydrolyzováno, zatímco ADP^{3-} přenáší do mezimembránového prostoru mitochondrie, díky čemuž dochází ke zvýšení rozdílu elektrochemického potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, a tedy i zvýšení $\Delta\Psi$ (Dewar et al., 2018).

ATP syntáza u parazita *T. evansi* má redukovanou strukturu, kdy v důsledku pozbytí mitochondriální DNA došlo k absenci *a*-podjednotky a odpojení F_1 části ATP syntázy od F_0 části. ATP syntáza se tudíž nepodílí na tvorbě $\Delta\Psi$, který je udržován pouze výměnou ATP/ADP pomocí AAC (Obr. 7). Z tohoto důvodu je parazit *T. evansi* náchylnější na změny $\Delta\Psi$ (Šubrtová et al., 2015).



Obrázek 7 Modifikace ATP syntáz u muší a krevní formy *Trypanosoma brucei* a u parazita *Trypanosoma evansi* (převzato a upraveno z Šubrtová et al., 2015)

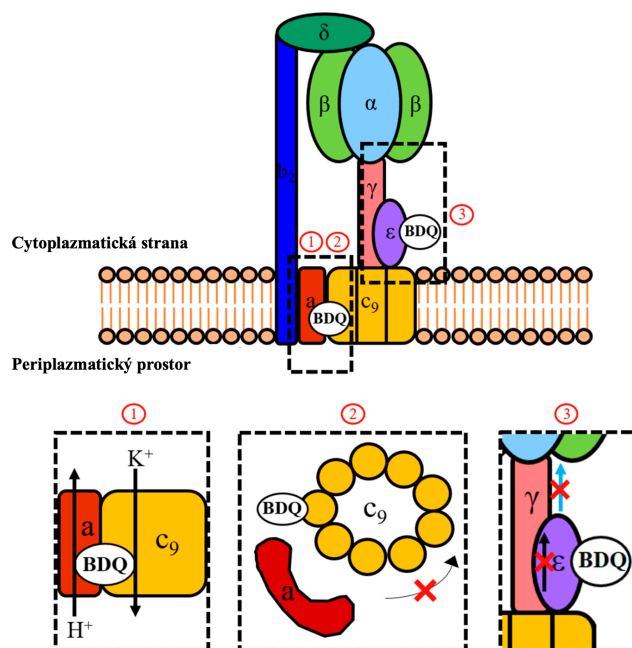
1.2 Analyzované látky

V lékařské praxi jsou v boji proti různým parazitárním onemocněním využívána léčiva s rozmanitými mechanismy účinku. Avšak rostoucí patogenní rezistence vůči těmto léčivům je všudypřítomným globálním problémem. Je proto nutné hledat další léčiva či kombinace léčiv použitelných v boji s parazitárními onemocněními. Jednou z možností řešení je tzv. repurposing léčiv, tedy jejich znovuvyužití pro léčbu jiného onemocnění (Vijayasurya et al., 2024). Pro tento účel byla práce zaměřena na látky, které jsou v praxi již využívány, či intenzivně studovány a cílí na bakterii *Mycobacterium tuberculosis* způsobující tuberkulózu, či *Plasmodium falciparum* způsobující malárii. Studované látky měly společné to, že inhibují mitochondriální ATP syntázu či dýchací řetězec daného parazita. Tyto látky jsme testovali na divokém typu trypanosom a také na geneticky pozměněných kmenech tohoto parazita, které mají odlišné metabolické adaptace. Cílem bylo získat informace o studovaných látkách, zda by se daly využít k inhibici mitochondriálního metabolismu trypanosom, čímž je také eliminovat.

1.2.1 Bedaquilin

Bedaquilin je v lékařské praxi využíván jako účinná látka léčiva Sirturo. Toto léčivo je hojně užíváno při léčbě tuberkulózy, jejímž původcem je prokaryotický patogen *Mycobacterium tuberculosis*. Klinické studie již uvádí řadu výhod tohoto léčiva, jako je například větší podíl pacientů s negativním výsledkem na přítomnost patogenu po léčbě Sirturem, kratší doba léčebného užívání, prokázaný účinek i pro kmeny, které jsou již rezistentní na jiná léčiva a nenastávající cross-rezistence, tedy užití Sirtura bez budování rezistence patogenu vůči jiným látkám (European Medicines Agency, 9. 3. 2025). Účinek bedaquilinu v léčivu Sirturo spočívá v inhibici ATP syntázy, což vede u původce tuberkulózy k narušení schopnosti vyrábět ATP oxidativní fosforylací a následné smrti. Existuje již řada studií popisujících konkrétní mechanismy inhibice. Konkrétně například studie Sarathy et al. (2019) nabízí tři mechanismy působení bedaquilinu na ATP syntázu *Mycobacteria tuberculosis*. Prvním je působení bedaquilinu jako protonoforu, který narušuje elektrochemický gradient přenosem protonů přes vnitřní membránu

mitochondrie (Obr. 8 za 1.). Dalším mechanismem je vazba bedaquilinu do c-ringu, čímž blokuje rotaci ATP syntázy a generování ATP (Obr. 8 za 2.). Třetím představeným mechanismem je navázání bedaquilinu do podjednotky v F_1 části, čímž dojde k zastavení rotace ATP syntázy (Obr. 8 za 3.). U trypanosom není vliv bedaquilinu na ATP syntázu popsán.



Obrázek 8 Schéma působení bedaquilinu na ATP syntázu parazita *Mycobacterium tuberculosis* 1) působení jako ionofor 2) zastavení rotace vazbou na c-ring 3) zastavení rotace vazbou na F_1 část (převzato a přeloženo Sarathy et al., 2019)

1.2.2 Venturicidin A

Dle publikace Hauser et al. (2024) představuje venturicidin A látku vhodnou k výzkumu a vývoji léčiv k léčbě onemocnění, které způsobují trypanosomy. Studie se zabývala účinkem venturicidinu A na trypanosomy a měření cytotoxicity. Ve studii byly změřeny hodnoty IC_{50} pro krevní stádium *Trypanosoma brucei* ($21,49 \pm 1,13$ nM) a stádium *Trypanosoma evansi* (5260 ± 950 nM). Jak z výsledků studie vyplývá, hodnota IC_{50} nutná pro účinnou inhibici krevního stádia *Trypanosoma brucei* byla mnohonásobně nižší než pro účinnou inhibici *T. evansi*. To koresponduje s výsledky studie, kdy bylo prokázáno, že venturicidin A inhibuje ATP syntázu, což vede u krevní formy *T. brucei* ke kolapsu $\Delta\Psi$ podobně jako například oligomycin. Díky rozdílu v IC_{50} hodnotách mezi *T. brucei* a *T. evansi* můžeme dokonce usoudit, že venturicidin A inhibuje přesun protonů přes membránu. Kromě inhibice ATP syntázy venturicidin A způsobuje ztrátu kinetoplastické DNA, jež vede k úmrtí parazitů (Hauser et al., 2024).

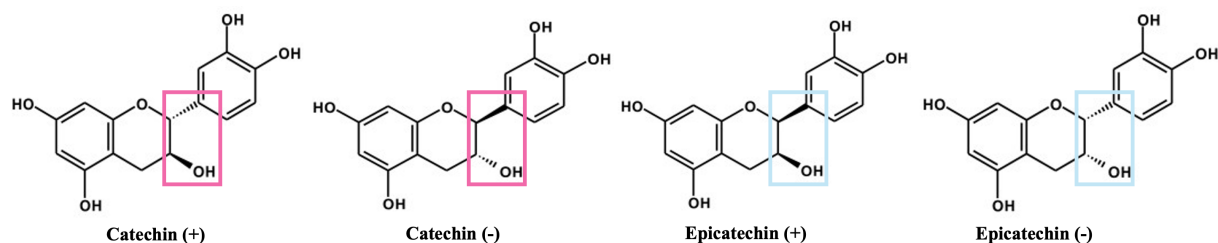
1.2.3 Proguanil

Jedná se o biguanidové léčivo, které se ve společném působení s atovaquonem používá k léčbě malárie prostřednictvím léčiva Malarone, jejímž původcem je zimnička *Plasmodium*. Sám o sobě proguanil nevykazuje inhibiční účinky na ATP syntázu či dýchací řetězec, ale akumulací společně s atovaquonem, který inhibuje komplex III dýchacího řetězce, vytváří toxické

prostředí v mitochondrii parazita (Bridges et al., 2014). Do našeho měření byl zahrnut pro porovnání s látkami, které ovlivňují ATP syntázu.

1.2.4 Catechiny, epicatechiny

Mezi testované látky jsme také zahrnuli známé rostlinné antioxidanty a rostlinné sekundární metabolity flavonoidy, tedy skupinu derivátů flavan-3-olu. Z důvodu přítomnosti dvou stereogenních center (3' uhlík v základní struktuře vázající hydroxylovou skupinu a uhlík vázající catecholový zbytek) v základní struktuře flavonoidů, rozlišujeme 4 diastereoizomery, a to konkrétně catechiny (cis izomery) a epicatechiny (trans izomery) (Obr. 9). Dle studie Acin-Perez et al. (2023) se liší účinnost vazby na ATP syntázu a její inhibice mezi jednotlivými diastereoizomery. Dle tohoto článku blokují tyto chemikálie pouze hydrolytickou aktivitu ATP syntázy, a tudíž by měli ovlivnit krevní stádium *Trypanosomy brucei*. V rámci našeho testování byli použity všechny komerčně dostupné varianty a to: catechin (+), epicatechin (-) a směs catechinu (±).



Obrázek 9 Struktura catechinů (cis uspořádání vyznačeno růžově) a epicatechinů (trans uspořádání vyznačeno modře) (převzato a upraveno z Hurst et al., 2011)

2 MATERIÁLY A METODY

2.1 Kultivace buněk (linie, média, kultivační podmínky)

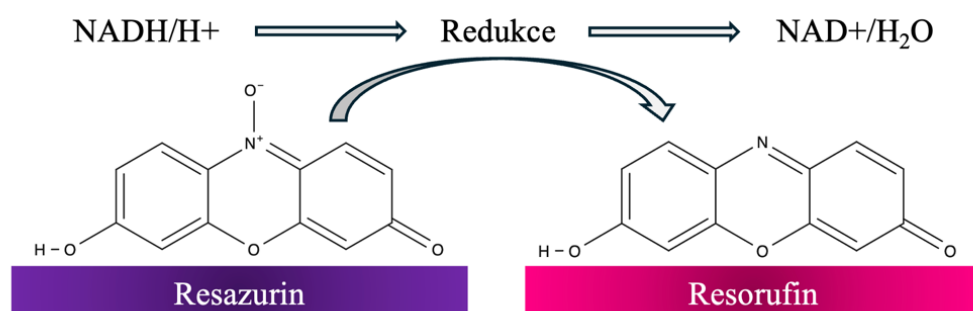
Experimenty jsme prováděli na liniích parazitů *Trypanosoma evansi* a *Trypanosoma brucei*. U parazita *Trypanosoma brucei* jsme použili dvě různá životní stádia. Prvním stádiem bylo stádium muší, jindy také označované jako procyklická forma (PF), v jeho původní geneticky nepozměněné (wild type; wt) formě. U tohoto stádia jsme pak rozlišovali dva způsoby kultivace, jedna linie rostla v prostředí média s glukózou (+ glukóza) a druhá linie v prostředí média bez glukózy (- glukóza). Procyklické kultury *T. brucei* jsme sterilně inkubovali při 27 °C, linii bez glukózy navíc na třepací plošině. Média jsme pro procyklické kultury využívali dvě, konkrétně SDM-79 pro formu metabolizující glukózu a SDM-80 pro formu v prostředí bez glukózy. Obě média mají identická složení, liší se pouze množstvím glukózy, dále jsme k nim přidávali 10 % FBS (fetální bovinní sérum) jakožto zdroj živin. U média SDM-80 byl přidán 50 mM N-acetylglukosamin tedy aminosacharid, který blokuje glukózové přenašeče. Tím zajišťuje, že buňka nepřijme zbytkovou glukózu z FBS. Počty buněk PF v kultuře se pohybovaly v rozmezí $1 \cdot 10^6$ – $2 \cdot 10^7$ buněk/ml.

Druhým použitým stádiem parazita *Trypanosoma brucei* bylo krevní stádium (bloodstream form; BF). U tohoto stádia jsme použili jak wt formu, tak několik geneticky modifikovaných linií, které byly vytvořeny předchozími členy laboratoře. Použité mutantní formy se vyznačovaly absencí genu pro metabolicky významný protein, čímž se staly závislejšími na námi sledovaném typu mechanismu tvorby mitochondriálního membránového potenciálu pomocí ATP syntázy. Prvním mutantem byla linie *T. brucei* BF s provedeným double knockoutem (dKO) genu pro sukcinyl-CoA-syntetázu (ScoAs), enzymem důležitým při procesu produkce ATP pomocí substrátové fosforylace. Z této formy byly využity dvě mutované kultury značené jako B1 a B2. Tyto formy dále označujeme jako ScoAs dKO B1 a ScoAs dKO B2. Dalším mutantem byla forma AAC dKO, tedy linie s odstraněným genem pro ATP přenašeč (ADP/ATP carrier, AAC). U parazita *Trypanosoma evansi* jsme používali wt formu, kterou v textu dále označujeme dyskinetoplastovou, DK. Krevní stádium *T. brucei* a *T. evansi* jsme inkubovali při 37 °C v médiu HMI-11 s přidaným 10 % FBS. BF a DK vyžadují vyšší přísun oxidu uhličitého (+ 5 % CO₂), z tohoto důvodu měly inkubační nádoby povoleny víčka a nacházely se v horizontální poloze (pro zvýšení povrchu vstřebání). Počty buněk BF a DK jsme udržovali v rozmezí $1 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ buněk/ml.

2.2 Esej na měření cytotoxického vlivu (Alamar blue assay)

Alamar blue assay je častá laboratorní metoda umožňující nalézt hodnotu IC₅₀ sledované látky. IC₅₀ tedy maximální poloviční inhibiční koncentrace (half maximal inhibitory concentration) slouží jako ukazatel míry inhibičních schopností chemikálie. Je proto často využívaným údajem ve farmakologické analýze a odpovídá koncentraci chemikálie, při níž je 50 % zkoumané buněčné populace metabolicky inaktivní či usmrcená. Principem metody Alamar blue assay je měření fluorescence, kterou vykazují metabolicky aktivní buňky, jež jsou schopny metabolizovat speciální nefluorescentní barvivo resazurin na fluorescentní resorufin (Vieira-da-Silva & Castanho, 2023).

Resazurin je pro buňky netoxické barvivo ze skupiny fenazinů (konkrétně jeho hydroxyderivát se systematickým názvem dle IUPAC: 7-hydroxy-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-on), které díky svému nepolárnímu charakteru snadno prostupuje cytoplazmatickou membránou (Rampersad, 2012). Molekula resazurinu je sensitivní na redukční kapacitu buňky, neboť má díky kladně nabitému dusíku tendenci podléhat redukci. Redukce dusíku probíhá v metabolicky aktivní buňce, a to za pomoci vodíků z kofaktorů, které se uplatňují při metabolických procesech (např. buněčném dýchání...). Z resazurinu vzniká redukcí resorufin, což je forma vykazující vyšší fluorescence než resazurin. Díky tomu jsme schopni zobrazit metabolizující (případně živé) buňky (Obr. 10).



Obrázek 10 Přeměna resazurinu na resorufin (struktura sloučenin vytvořena s pomocí MolView)

Naše měření spočívalo v tvorbě ředících řad, kdy jsme se snažili stanovit koncentraci látky, při které jsou buňky schopny redukovat resazurin na resorufin a při které již nikoliv. Z dobře narostlé kultury jsme odebrali dané množství buněk (Tab. 1).

Kultura	Množství buněk v jedné jamce
<i>Trypanosoma brucei</i> PF	$1 \cdot 10^5$ buněk
<i>Trypanosoma brucei</i> BF	$1 \cdot 10^3$ buněk
<i>Trypanosoma evansi</i>	$5 \cdot 10^3$ buněk

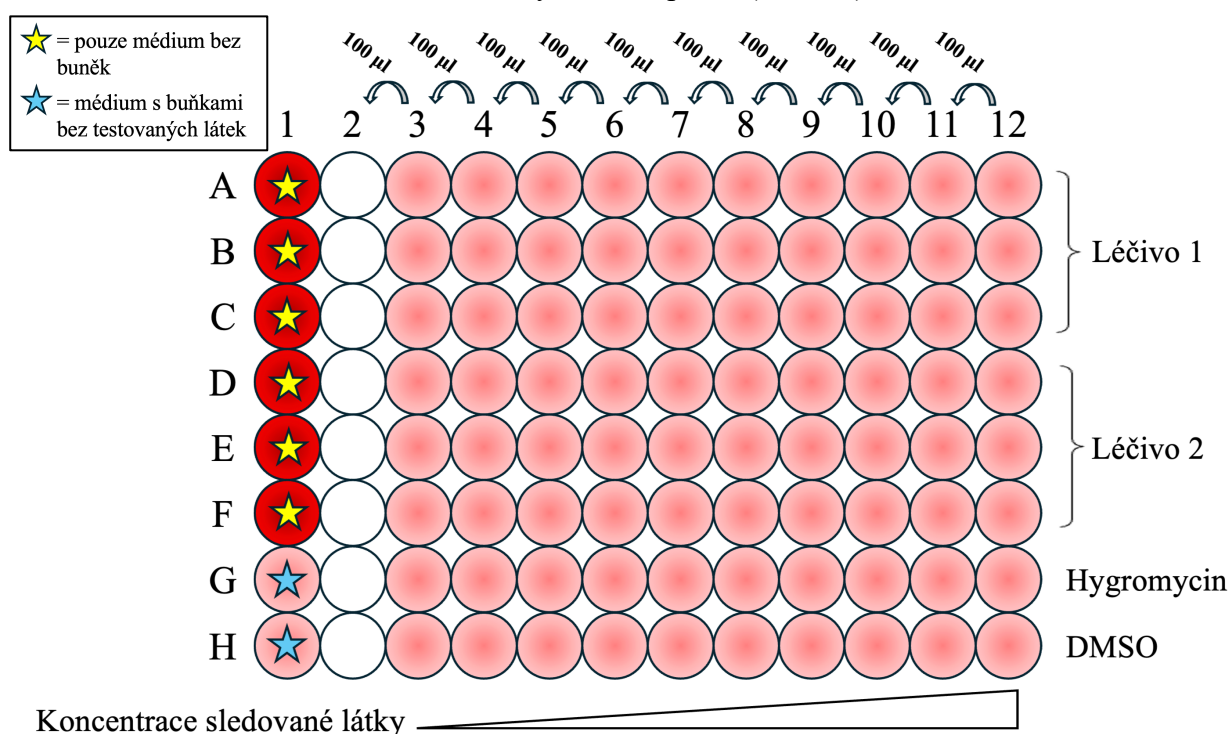
Tabulka 1 Množství buněk v jedné jamce

Samotné ředící řady jsme tvořili ve sterilním prostředí na 96jamkové destičce (12 sloupců x 8 řad). Destičku jsme rozdělili na několik horizontálních a vertikálních částí (Obr. 11). Horizontálně se jednalo o dvě skupiny látek, přičemž každá byla v triplikátu (řádky A – C a D – F) a kontroly. Naše kontroly zahrnovaly hygromycinovou kontrolu funkčnosti metody (řádek G) a kontrolu rozpouštědla DMSO (dimethylsulfoxid) pro příslušné látky (řádek H). Vertikálně jsme destičku rozdělili na 1. sloupec s kontrolami a 2. – 12. sloupce s ředícími řadami. Samotný 1. sloupec se skládal z kontrol média v jamkách A – F a kontrol nezávadnosti kultury v jamkách G a H.

Do destičky jsme za pomoci multikanálové pipety a sterilního korýtka napipetovali jednotlivé složky:

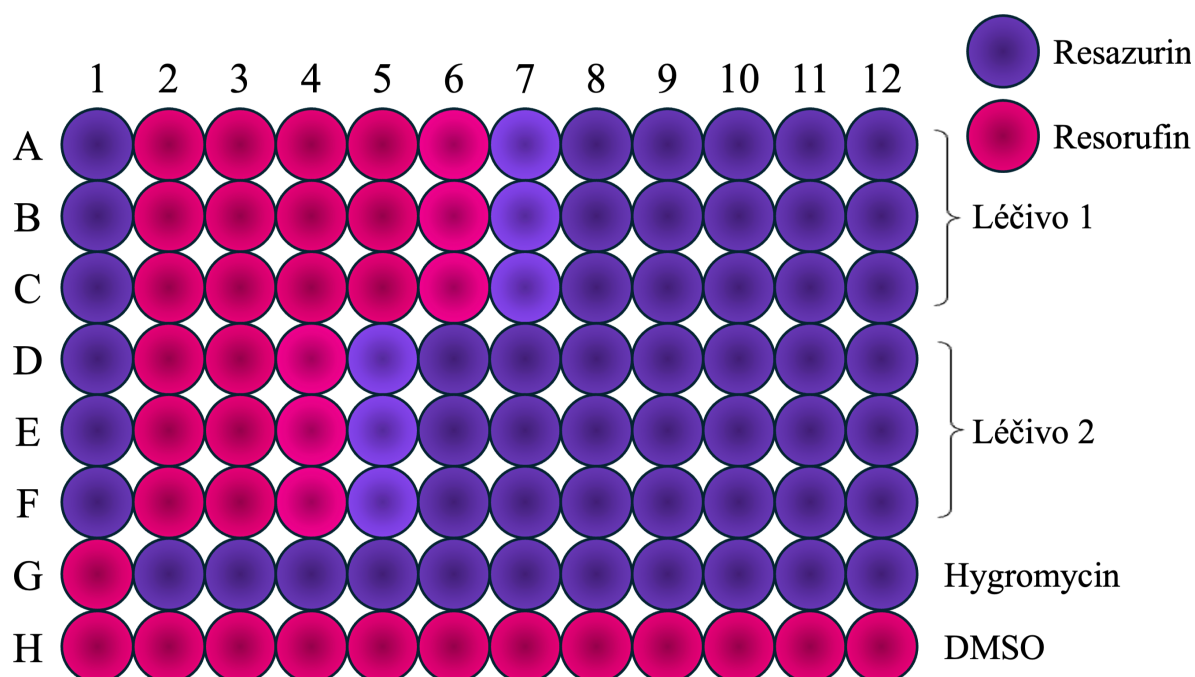
- ⇒ do 1. sloupce (A – F) 200 μ l média
- ⇒ do 2. – 11. sloupce (A – H) a do 1. sloupce (G – H) 100 μ l média
- ⇒ do 12. sloupce (A – H) objem média, který se odvíjel od objemu požadované přidávané látky, neboť jsme doplňovali na jamku na celkový objem 200 μ l
- ⇒ do 12. sloupce (A – H) objem látky, který se odvíjel požadované koncentrace látky

Po napipetování médií a látek jsme prováděli ředění (1:1) multikanálovou pipetou zprava doleva. Během ředění bylo vždy odebráno 100 μ l směsi z předchozí jamky vyšší koncentrace, přidáno ke 100 μ l média, promícháno a opět odpipetováno dál stejným způsobem. Vznikla tak destička s řadami koncentrací, které rostly zleva doprava (Obr. 11).



Obrázek 11 Příprava ředících řad

Po přípravě destičky s ředíciemi řadami a kontrolami bylo do všech jamek (kromě 1. sloupce A – F) přidáno 100 μ l připravené kultury. Kulturu jsme nejprve ze zkumavky přelili do sterilního korýtka a z něj pipetovali multikanálovou pipetou od 2. sloupce směrem k 12. Po napipetování jsme destičku s buňkami vložili do vlhčené komůrky a nechali ji 48 hodin inkubovat ve specifických podmínkách pro dané stádium. Následně jsme do každé jamky pomocí sterilního korýtka a multikanálové pipety přidali 20 μ l resazurinu ($1 \times$ PBS pH = 7.3, resazurin sodium salt 0,5 mM) a opět buňky nechali inkubovat 24 hodin. Destičku jsme následně změřili ve fluorimetru SparkInfinite (TECAN) při fluorescenční excitační vlnové délce v rozmezí 540-570 nm a fluorescenční emisní vlnové délce 580-610 nm. K vyhodnocení a zpracování dat byl použit software GraphPad Prism. Resazurin i resorufin mají odlišné barvy, proto je přechod patrný i pohledem (Obr. 12).



Obrázek 12 Očekávaný vzhled destičky před měřením fluorescence

2.3 Měření mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi$ pomocí TMRE

U látek bedaquilin a venturicidin A jsme zkoumali jejich vliv na membránový mitochondriální potenciál buněk trypanosom (BF, PF, DK). TMRE (tetremethyrrhodamin ethylester) je fluorescenční indikátor užívaný pro zjišťování membránového potenciálu buněk. Molekula TMRE vykazuje lipofilní charakter a díky kladnému náboji je schopna přecházet přes membránu do mitochondrie, která je polarizována záporně. Ochota přecházet přes membránu závisí na hodnotě mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi$, který je klíčový pro správnou funkci mitochondrie. Více polarizovaná mitochondrie (s vyšším negativním membránovým potenciálem) akumuluje velké množství TMRE, což zvyšuje intenzitu fluorescence. Naopak mitochondrie poškozená či inhibovaná nemůže vytvářet membránový potenciál o stejné velikosti jako mitochondrie zdravá, a proto TMRE pohlcuje méně.

Vzorky pro měření jsme odebrali z wt či mutantní kultury (kontrola) a také z kultury indukovaných sledovanou látkou v různých koncentracích IC₅₀, a to v koncentraci 2x IC₅₀ a 5x IC₅₀. Rozpětí různých IC₅₀ bylo nutné pro relativní srovnání možných změn $\Delta\Psi$. Kromě těchto 3 vzorků jsme pro nastavení přístroje potřebovali vzorek kultury buněk ničím nebarvených ani neindukovaných a vzorek kultury s přidaným TMRE a FCCP (carbonyl cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon). FCCP slouží jako protonofor, tedy transportuje protony přes membránu mitochondrie, čímž ničí veškerý $\Delta\Psi$. Tyto dva vzorky jsme odebrali z wt, či mutantní kultury.

Z každé kultury jsme sklídili $5 \cdot 10^6$ buněk. Všechny vzorky buněk jsme stočili (1300xg, 10 min, pokojová teplota RT), oddělili odstředěné médium od sedimentovaných buněk a následně obarvili resuspendováním v 1 ml homogenního roztoku příslušného média (k nebarveným jsme přidali pouze 1 ml média bez TMRE) s TMRE o 60 nM koncentraci. Barvení TMRE probíhalo za omezeného přístupu světla, neboť TMRE je fotosenzitivní. Kontrolní kultura s uměle sníženým membránovým potenciálem měla v tomto kroku ještě přidáno FCCP (finální koncentrace 20 μ M) a buňky jsme nechali inkubovat na 30 minut v příslušných podmínkách na základě stádia (PF: 27 °C, BF + DK: 37 °C). Po 30minutové inkubaci jsme přenesli 200 μ l kultury do 1 ml 1xPBS (pH = 7,4) připraveného ve FACS zkumavce. Veškeré měření jsme prováděli v biologickém triplikátu. Následně jsme vzorky analyzovali průtokovou cytometrií Canto FACS v PE filtru, přičemž excitační vlnová délka byla 550 nm a emisní vlnová délka 575 nm. Každý analyzovaný vzorek obsahoval měření 10 000 eventů/buněk.

2.4 Měření životnosti buněk s použitím PI

Touto metodou jsme byli schopni změřit relativní zastoupení živých a mrtvých buněk v populacích kultur. Tyto kultury byly indukovány v různých koncentracích látek, jež jsme sledovali při měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE (jednalo se o bedaquilin a venturicidin A). Měření poměru mrtvých a živých buněk sloužilo jako měření doplňující k metodě zjišťování $\Delta\Psi$ pomocí TMRE.

Propidium jodid (PI) slouží jako indikátor mrtvých buněk, přesněji řečeno buněk s porušenou plazmatickou membránou. Molekula PI vykazuje polární charakter, a to především díky kvartérním amoniovým skupinám, jež se vyskytují ve struktuře. Z tohoto důvodu molekula není schopna prostupovat přes membránu. V případě, že je membrána porušena (smrt buňky), se může barvivo včlenit mezi dusíkaté báze nukleových kyselin a emitovat měřitelnou fluorescenci. Díky tomu vykazují mrtvé buňky fluorescenci, zatímco živé nikoli (Rosenberg et al., 2019).

Vzorky pro měření jsme podobně jako při měření $\Delta\Psi$ odebrali z kultur neindukovaných a indukovaných sledovanou látkou v různých koncentracích 2x a 5x IC₅₀. Pro nastavení přístroje bylo nutné opět použít vzorek buněk nebarvených a vzorek buněk usmrcených. K usmrcení buněk jsme použili digitonin, tedy steroidní glykosid, který zcela permeabilizuje cytoplazmatickou membránu a buňku lyzuje.

Před přípravou vzorků se sledovanými látkami jsme si připravili vzorek mrtvých buněk. Buňky jsme stočili (1500xg, 10 min, RT) a lyzovali v 100 μ l 10mM homogenního roztoku PBS (pH = 7,4) s koncentrací digitoninu 6 μ M. Následně jsme buňky vortexovali po dobu 10 sekund a nechali lyzát stát. Před stáčením buněk jsme vytvořili zásobní roztok 1xPBS (pH = 7,4) o koncentraci PI 1 μ g/ml. Z každé kultury jsme sklídili $5 \cdot 10^6$ buněk (1500xg, 10 min, RT) a odlili odstředěné médium. Sedimentované buňky a předem připravený vzorek s usmrcenými buňkami jsme resuspendovali v 1 ml připraveného roztoku PBS + PI (s výjimkou nebarvených buněk, které jsme resuspendovali v 1 ml PBS bez přidaného PI). Poté jsme buňky nechali inkubovat po dobu 5 minut volně na pracovní ploše za pokojové teploty. Po inkubaci jsme ze vzorku přenesli 1 ml do 1 ml 1xPBS (pH = 7,4) napipetovaného ve FACS zkumavce. Následně jsme vzorky analyzovali průtokovou cytometrií Canto FACS v PE-A kanále stejně jako vzorky při měření $\Delta\Psi$. Pro analýzu jsme použili měření z 10 000 eventů/buněk. Experimenty jsme prováděli v biologickém triplicátu.

2.5 Stanovení $\Delta\Psi$ s využitím Safraninové eseje

Další metodou pro měření $\Delta\Psi$ byla Safraninová esej fungující na principu fluorometrie. Tato metoda funguje na principu měření fluorescence mitochondrií, které byly uvolněny z buněk permeabilizovaných digitoninem. Tuto fluorescenci způsobuje Safranin O, který se v závislosti na různé hladině $\Delta\Psi$ kumuluje v mitochondriích.

Safranin O se díky své struktuře, ve které je přítomna amoniiová skupina, chová jako kation, a tudíž má tendenci interagovat se záporně nabitými strukturami. V našem případě se jedná o vnitřní membránu mitochondrie. Při měření stimulujeme mitochondrii, což způsobí její polarizaci a zvýšení hodnoty $\Delta\Psi$, čímž dojde k větší akumulaci Safraninu O ve vnitřní membráně. Molekuly Safraninu O ve vyšších koncentracích agregují, mění strukturu a dochází tak k utlumení signálu fluorescence (tzv. quenching) (Figueira et al., 2012). Nižší signál fluorescence tedy měříme u mitochondrií s vysokou hodnotou $\Delta\Psi$, a naopak vysoký signál fluorescence měříme u inhibovaných mitochondrií s nižší hodnotou $\Delta\Psi$.

K experimentu jsme do zkumavky odebrali $2 \cdot 10^6$ buněk dané kultury, které jsme stočili (1400xg, 10 min, RT) a resuspendovali v 1 ml ANT (Adenine Nucleotide Translocase) pufru (Tab. 2) s přidaným MgCl_2 o koncentraci 1,5 mM. Následně jsme vzorek přenesli do Eppendorff zkumavky a nechali buňky stočit (1100xg, 7 min, RT). Během točení jsme do kyvety pro měření vložili magnetické míchadlo a napipetovali 2 ml ANT pufru o pH 7,25 s přidaným MgCl_2 . Dále jsme přidali 5 μM Safranin O a digitonin, jehož koncentrace byla pro BF a DK 4 μM a pro PF 8 μM . Roztok jsme následně ve fluorimetru homogenizovali. Po dekantování odstředěného média jsme buňky resuspendovali 2 ml homogenního roztoku z kyvety, čímž došlo k permeabilizaci buněk (pomocí digitoninu) a uvolnění mitochondrií. V našem experimentu jsme dále mitochondrie z permeabilizovaných buněk stimulovali pomocí ATP a následně přidávali sledovanou látku, tedy bedaquilin nebo venturicidin A. Pro srovnání mechanismu účinku jsme jako kontroly použili chemikálie oligomycin, který mitochondrii inhibuje zablokováním ATP syntázy a chemikálie FCCP a SF6847, které fungují jako protonofory, tedy přenášejí protony skrze membránu, čímž ruší $\Delta\Psi$.

Složka pufru	Finální koncentrace
<i>KCl</i>	8 mM
<i>NaCl</i>	10 mM
<i>Glukonát sodný</i>	110 mM
<i>HEPES</i>	10 mM
<i>K₂HPO₄</i>	10 mM
<i>EGTA (K⁺)</i>	0,015 mM
<i>BSA</i>	0,5 mg/ml
<i>Mannitol</i>	10 mM

Tabulka 2 Složení ANT pufru (Adenine Nucleotide Translocase buffer)

3 VÝSLEDKY

3.1 Resazurinová esej na měření cytotoxického vlivu (Alamar blue assay)

Pomocí eseje na měření cytotoxicity jsme stanovili IC₅₀ téměř všech zkoumaných chemikálií. Pro reprezentaci míry spolehlivosti dat získaných jednotlivými měřeními se používá statistická hodnota zvaná koeficient determinace (R^2). Koeficient determinace v našem případě udává kvalitu, s jakou naměřená data reprezentuje křivka regrese. Jinými slovy vyjadřuje míru věrohodnosti dat a reproducibilitu měření, neboť jsme R^2 zjišťovali v rámci biologických triplicátů každé látky. Naměřené hodnoty, u kterých odpovídá R^2 rovno nebo vyšší 0,97, je možno považovat za velmi reprodukcibilní (Northumbria University, 2. 1. 2025).

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Přidaný objem látky	Objem média	Výsledná koncentrace ve 12. jamce (s přidanou kulturou)
<i>Bedaquilin</i>	40 mM	5 µl	195 µl	500 µM
<i>Proguanil</i>	40 mM	5 µl	195 µl	500 µM
<i>Epicatechin</i>	40 mM	5 µl	195 µl	500 µM
<i>Catechin</i> +	40 mM	10 µl	190 µl	1000 mM
<i>Catechin</i> ±	40 mM	10 µl	190 µl	1000 mM
<i>Venturicidin A</i>	100 µM	2 µl	198 µl	500 nM
<i>Hygromycin</i>	25 mg/ml	2 µl	198 µl	0,125 mg/ml

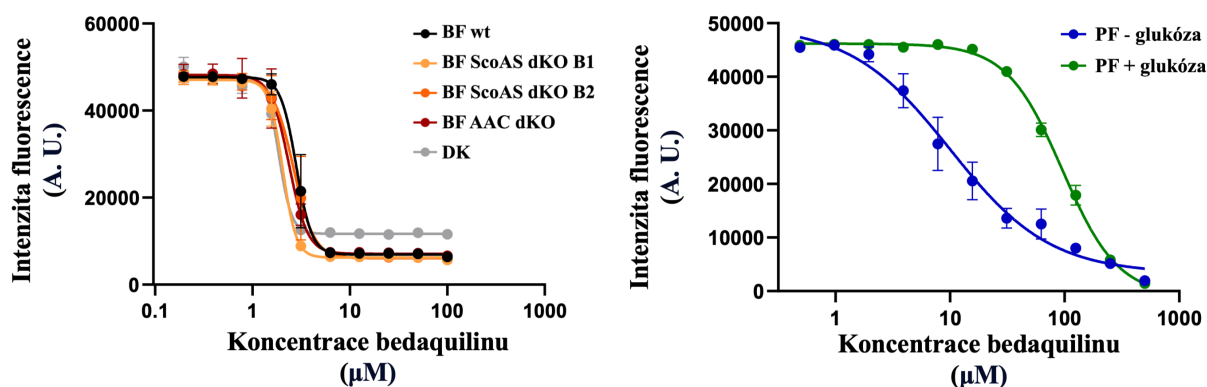
Tabulka 3 Přehled látek pro přípravu destičky

3.1.1 Resazurinová esej – bedaquilin

Pro látku bedaquilin jsme stanovili hodnoty IC₅₀ s vysokou věrohodností u všech linií PF, BF i DK. U procyklického stádia, kde jsme se pohybovali s naměřenými IC₅₀ v řádech desítek µM (Tab. 4), vidíme rozdíl mezi změřenými hodnotami IC₅₀ pro formu kultivovanou v médiu s glukózou a formu v médiu bez glukózy. Glukóza v médiu slouží jako podpůrný zdroj energie v případě, že oxidativní fosforylace není schopna dodat dostatečné množství ATP. Je tudíž logické, že u forem v médiu s glukózou je IC₅₀ 10x vyšší než u formy v médiu bez glukózy (Obr. 13 vpravo). U krevních forem a DK jsme IC₅₀ naměřili v řádech jednotek µM ukazující na fakt, že bedaquilin je potentní inhibitor. Tím, že IC₅₀ hodnoty nebyly rozdílné u testovaných mutantů, můžeme také usoudit, že efekt bedaquilinu není přímo napojen na mitochondriální substrátovou fosforylaci krevních forem (Taleva et al., 2023).

Bedaquilin (µM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC ₅₀	95,45	10,04	2,806	2,363	2,035	2,633	1,856
R^2	0,9974	0,976	0,9922	0,9843	0,9958	0,9769	0,9941

Tabulka 4 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro bedaquilin



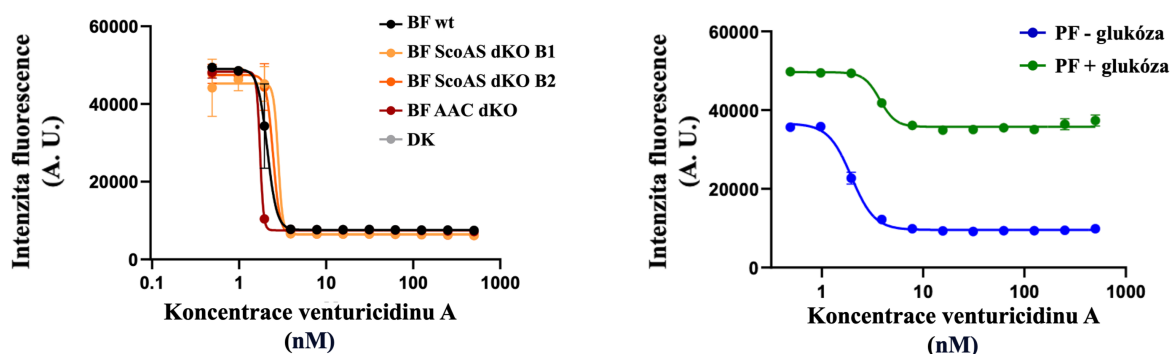
Obrázek 13 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí u bedaquilinu

3.1.2 Resazurinová esej – venturicidin A

IC₅₀ venturicidinu A jsme stanovili u všech stádií s výjimkou DK (Tab. 5) . V tomto případě by měření nemělo smysl, neboť DK nevyužívají F₀ podjednotku ATP syntázy, jež venturicidin A inhibuje (Hauser et al. 2024). Hodnoty IC₅₀ s vysokým R² se pohybovaly v řádech jednotek nM. Účinek venturicidinu A na jednotlivá stádia byl podobný a naměřené rozdíly zanedbatelné (Obr. 14 vlevo).

Venturicidin A (nM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC ₅₀	3,733	1,959	1,869	1,736	2,81	2,45	–
R ²	0,9776	0,9953	0,9358	0,9989	0,9827	0,9917	–

Tabulka 5 Výsledné hodnoty resazurinové esej pro venturicidin A (–...měření neprovedeno)



Obrázek 14 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí u venturicidinu A

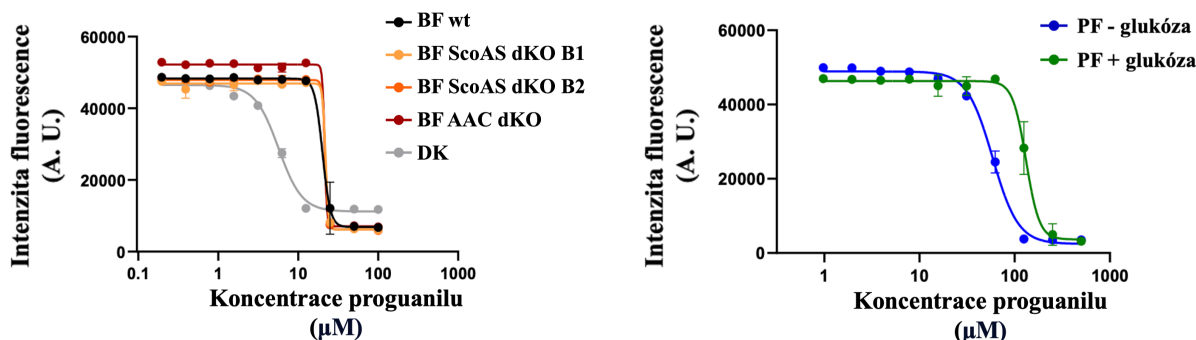
3.1.3 Resazurinová esej – proguanil

IC₅₀ pro proguanil jsme stanovili pro všechna stádia (Tab. 6). U procyklických stádií, kde se IC₅₀ pohybovalo v řádech desítek až stovek μM, byl opět patrný očekávaný rozdíl mezi formou rostoucí v médiu s glukózou a bez glukózy. Krevní formy se svými IC₅₀ hodnotami navzájem

markantně nelišily, avšak u DK je z křivky i dat patrná výraznější citlivost na proguanil (Obr. 15 vlevo). DK byly zhruba 4x citlivější než BF.

Proguanil (μM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC ₅₀	131,6	58,64	20,1	21,39	21,97	21,76	5,666
R ²	0,9807	0,995	0,9892	0,9989	0,9961	0,9988	0,9927

Tabulka 6 Výsledné hodnoty resazurinové esej pro proguanil



Obrázek 15 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí pro proguanil

3.1.4 Resazurinová esej – catechin (+), catechin (±), epicatechin (-)

V resazurinové esejí jsme dále testovali látky catechin (+), catechin (±) a epicatechin (-). Změřené hodnoty IC₅₀ se pohybovaly v μM koncentrací, avšak tyto hodnoty již hraničí s rozpustností zkoumaných látek, což snižuje R² jednotlivých měření. Inhibice buněk byla patrná pouze ve vyšších koncentracích zkoumané látky (Obr. 16). Vzhledem k nemožnosti spolehlivého stanovení IC₅₀ této skupiny chemikálií, jsme se rozhodli dále v analýze cytotoxického účinku těchto látek a zjišťování jejich potenciálních cílů v buňce nepokračovat (Tab. 7, 8 a 9).

Catechin ± (μM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC ₅₀	*	392,2	*	–	–	–	126,5
R ²	*	0,9919	*	–	–	–	0,8159

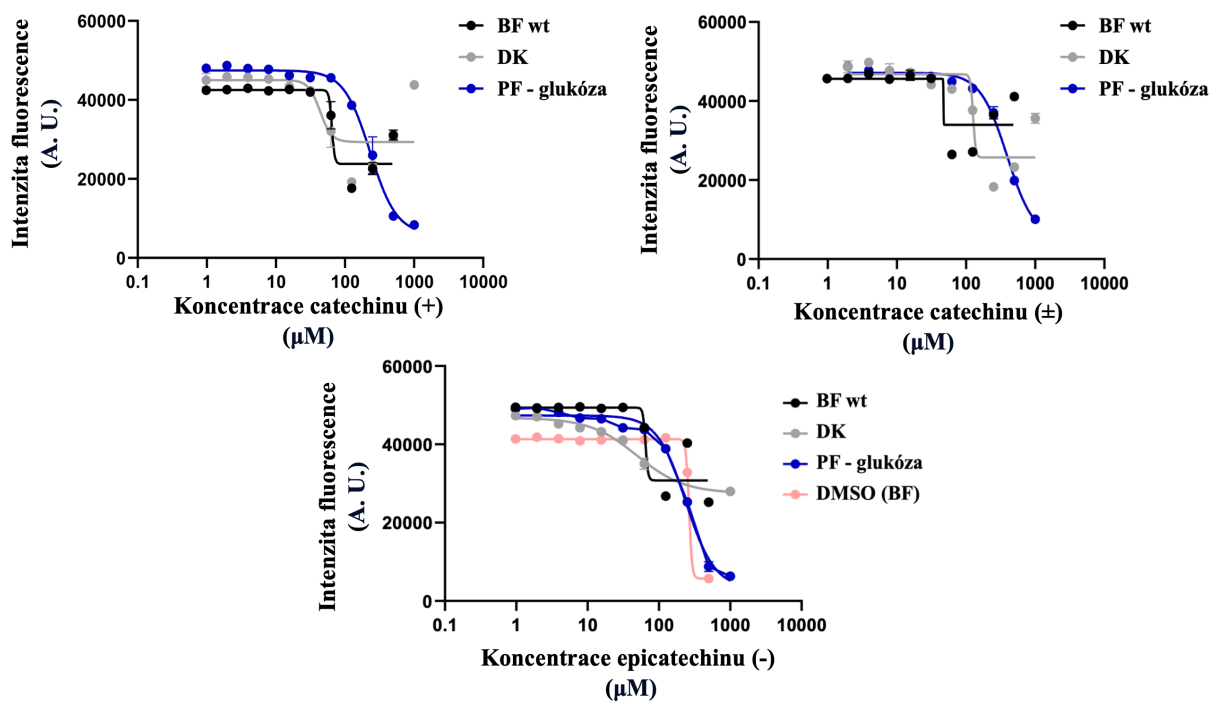
Tabulka 7 Výsledné hodnoty resazurinové esej pro catechin ± (–...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R²)

Catechin + (μM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC ₅₀	*	231,1	64,41	–	–	–	43,31
R ²	*	0,9882	0,8694	–	–	–	0,6228

Tabulka 8 Výsledné hodnoty resazurinové esej pro catechin + (–...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R²)

Epicatechin - (μM)							
	<i>T. brucei</i>						<i>T. evansi</i>
	Procyklická forma PF		Krevní forma BF				Dyskinetoplastida DK
	+ glukóza	- glukóza	Wt	AAC	ScoAS B1	ScoAS B2	Wt
IC50	*	238,6	65,03	—	—	—	49,26
R^2	*	0,99	0,8318	—	—	—	0,9801

Tabulka 9 Výsledné hodnoty resazurinové esej pro epicatechin - (...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R^2)



Obrázek 16 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí pro catechin +, catechin $\pm$ a epicatechin -

3.2 Vliv testovaných látek na $\Delta\Psi$ v souvislosti s životaschopností buněk

Měření mitochondriálního membránového potenciálu $\Delta\Psi$ jsme prováděli 2 metodami se zacílením na dvě sledované látky, a to venturicidin A a bedaquilin.

První zahrnovala metodu s použitím TMRE jako fluorescenčního indikátoru $\Delta\Psi$ a doplňující měření životaschopnosti buněk s použitím PI. Pro možnost zkoumání a vzájemného srovnání jsme se rozhodli měřit buňky v násobcích zjištěné účinné hodnoty IC50 (Tab. 10). Při měření jsme tak vzájemně srovnávali buňky nevystavené sledované látce, buňky ve 2x zvýšené zjištěné koncentraci IC50 a buňky vystavené 5x zvýšené koncentraci IC50. Při tomto vzájemném porovnávání jsme prováděli měření v triplicátech a následně statistickým párovým t-testem zjistili hodnotu signifikance p. Ta vyjadřuje statistickou významnost rozdílu mezi naměřenými daty. Přesněji p vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou lze sledovaná data prohlásit za nulovou hypotézu, tedy s jakou pravděpodobností nenacházíme rozdílnost mezi sledovanými daty (Simply Psychology, 29.1.2023). Hodnotu p popisujeme zkratkovou symbolikou nad svorkou vždy pro 2 měření (Tab. 10).

Zkratková symbolika	Hodnota p	Statistická významnost
ns	$p > 0,05$	rozdíl naměřených hodnot je statisticky nevýznamný (non-significant)
*	$p \leq 0,05$	rozdíl naměřených hodnot je statisticky významný
**	$p \leq 0,01$	rozdíl naměřených hodnot je statisticky velmi významný
****	$P \leq 0,0001$	obrovská statistická významnost, téměř žádná šance nulové hypotézy

Tabulka 10 Vysvětlivky grafických symbolů statistické významnosti při párovém porovnávání

Druhá metoda, safraninová esej, nám byla nápomocná k posouzení mechanismu inhibice ATP syntázy sledovanými látkami. Toto srovnání jsme provedli s využitím známého substrátu ATP a inhibitorů ATP syntázy, jejichž působení se projevuje změnou polarizace mitochondriální membrány (Tab. 11). Pro vyšší výpovědní hodnotu této metody jsme testovali různé variace ATP, inhibitorů a sledovaných látek. Každé měření jsme prováděli v biologickém triplicátu a ve výsledcích uvádíme reprezentativní graf.

Látka	Vliv na ATP syntázu, mitochondrii	Projev v grafu	Finální koncentrace
<i>ATP</i>	Hydrolyticky rozkládaný substrát, polarizace	Pokles signálu	1 mM
<i>Oligomycin</i>	Inhibitor blokující c-ring (F_0 část), depolarizace	Zvýšení signálu	10 $\mu\text{g/ml}$
<i>SF6847</i> (<i>protonofor</i>)	Inhibitor rušící $\Delta\Psi$ přenosem protonů, depolarizace	Zvýšení signálu	250 nM

Tabulka 11 Látky využívané v Safraninových esejích a jejich finální koncentrace

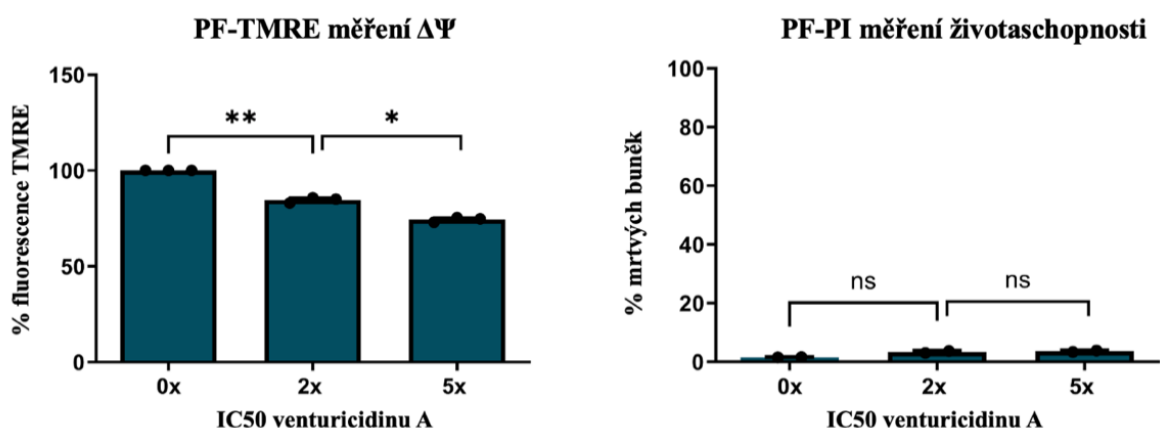
3.2.1 Měření TMRE a PI s venturicidinem A

Pouze u procyklické a krevní formy *T. brucei* jsme měřili membránový potenciál pomocí TMRE a životaschopnost buněk při inkubaci s venturicidinem A ve vyšší koncentraci, než IC50 venturicidinu A. Pro DK by toto měření bylo bezpředmětné, neboť podle dostupné literatury (Hauser et al., 2024) venturicidin A inhibuje F_0 část ATP syntázy trypanosom, kterou dyskinetoplastické buňky postrádají.

Sledovaná látka		1x IC50	2x IC50	5x IC50
Venturicidin A	BF	1,9 nM	3,8 nM	9,5 nM
	PF (bez glukózy)	2 nM	4 nM	10 nM

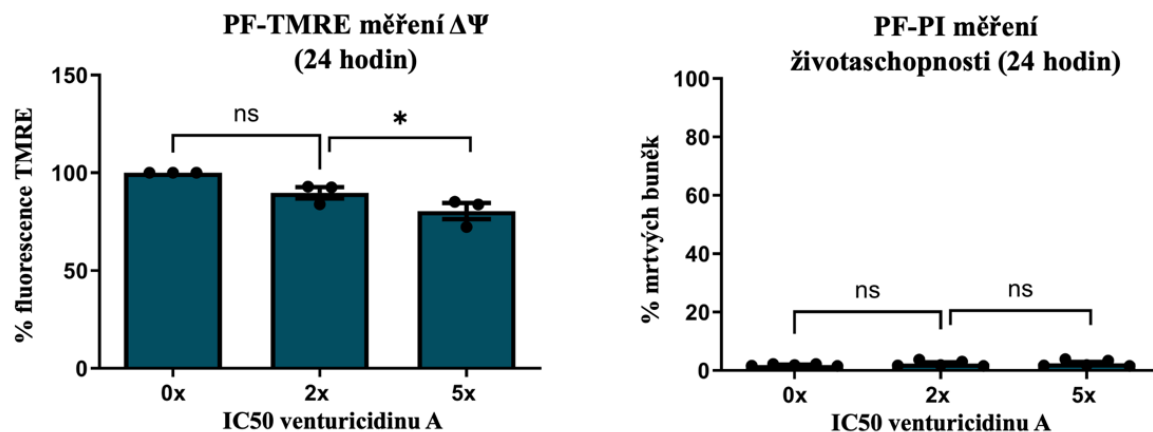
Tabulka 12 Přehled koncentrací IC50 použitých při měření s TMRE a PI s venturicidinem A

U procyklického stádia jsme pomocí TMRE mohli pozorovat statisticky signifikantní pokles $\Delta\Psi$ již po osmihodinové inkubaci s venturicidinem A (Obr. 17 vlevo), avšak úmrtnost buněk zůstávala v navyšujících se koncentracích IC50 nízká a neměnila se (Obr. 17 vpravo).



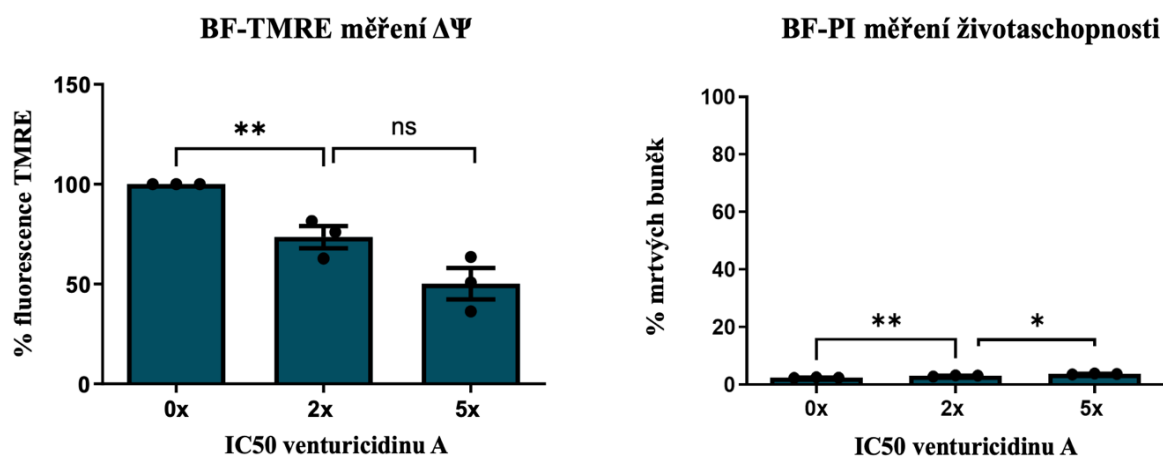
Obrázek 17 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s venturicidinem A)

Při navýšení inkubační doby PF s venturicidinem A na 24 hodin jsme nepozorovali výrazné změny oproti sledování při osmihodinové inkubaci (Obr. 18). Stále docházelo k mírnému, i když statisticky významnému poklesu membránového potenciálu, aniž by byla ovlivněna životaschopnost buněk. Toto pozorování je zajímavé, neboť v případě že by venturicidin A ovlivňoval pouze ATP syntázu, očekávali bychom spíše hyperpolarizaci membrány, jelikož PF formy využívají oxidativní fosforylaci. Naměřený mírný pokles membránového potenciálu naznačuje, že tato látka může také mírně ovlivňovat další metabolické dráhy, které jsou propojeny s tvorbou membránového potenciálu u tohoto stádia.



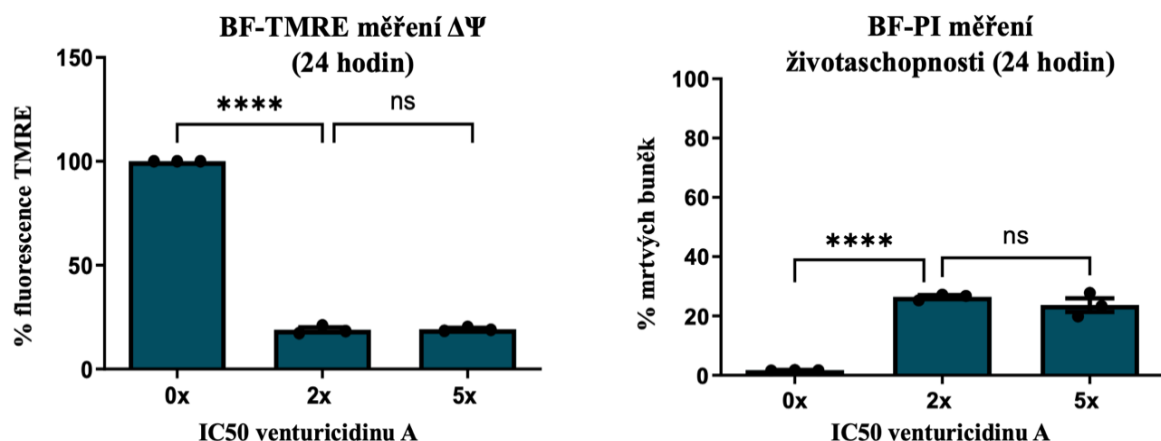
Obrázek 19 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s venturicidinem A)

Po osmihodinové inkubaci krevních forem s venturicidinem A jsme pozorovali signifikantní pokles $\Delta\Psi$. V koncentraci 5x IC50 činil $\Delta\Psi$ zhruba 50 % původní hodnoty fluorescence neindukovaných buněk (Obr. 19 vlevo), přesto ale došlo jen k mírnému, byť statisticky významnému nárůstu podílu mrtvých buněk ve sledované kultuře, a to z 3 % v 0x IC50 na 6 % ve 2x IC50 (Obr. 19 vpravo).



Obrázek 18 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s venturicidinem A)

Po navýšení inkubační doby na 24 hodin s venturicidinem A byl patrný okamžitý silný pokles $\Delta\Psi$ zhruba o 70 % původní hodnoty $\Delta\Psi$ již v 2x IC50 (Obr. 20 vlevo). Tento drastický pokles se projevil i vyšší úmrtností buněk (Obr. 20 vpravo). Tyto výsledky potvrzují původní hypotézu, že venturicidin A inhibuje ATP syntázu a u krevních forem způsobuje pokles membránového potenciálu, jenž má za následek smrt buňky.

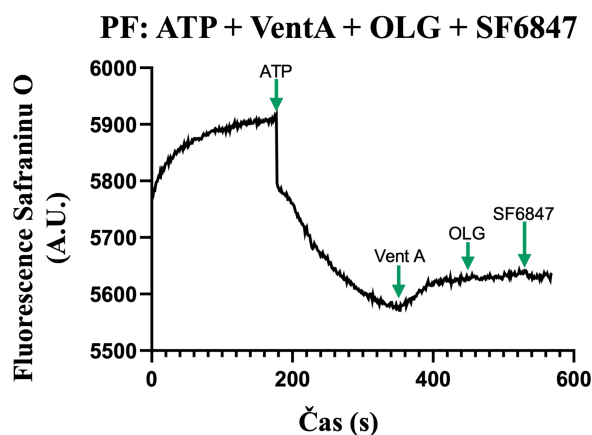


Obrázek 20 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s venturicidinem A)

3.2.2 Měření Safraninové esej s venturicidinem A

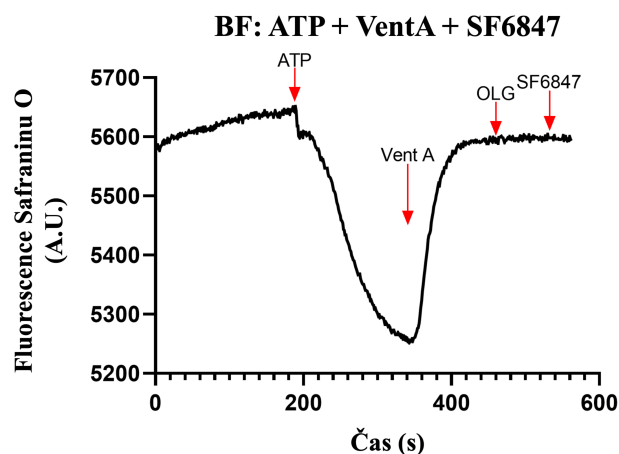
Venturicidin A je znám svou afinitou k c-ringu v F_0 podjednotce ATP syntázy, čímž ji inhibuje. Naše výsledné křivky získané Safraninovou esejí pro venturicidin A reprezentují látku, která má vliv na $\Delta\Psi$ a specificky ovlivňuje ATP syntázu. Výsledky měření venturicidinu A tak byly esenciální pro porovnání jeho účinku na $\Delta\Psi$ a účinku bedaquilinu na $\Delta\Psi$.

Z měření PF Safraninovou esejí vyplývá, že po přidání ATP proběhla prudká polarizace membrány mitochondrie (Obr. 21). Po přidání venturicidinu A (5x IC50, 10 nM) nedošlo k očekávanému snížení $\Delta\Psi$. Protože žádnou depolarizaci nevyvolalo ani přidání kontroly oligomycinu či SF6847, nemůžeme na základě této esej vyvodit žádné závěry o funkci venturicidinu A na mitochondriální membránový potenciál *in vitro* u tohoto stádia. Tento výsledek byl zaznamenán ve všech třech měření.



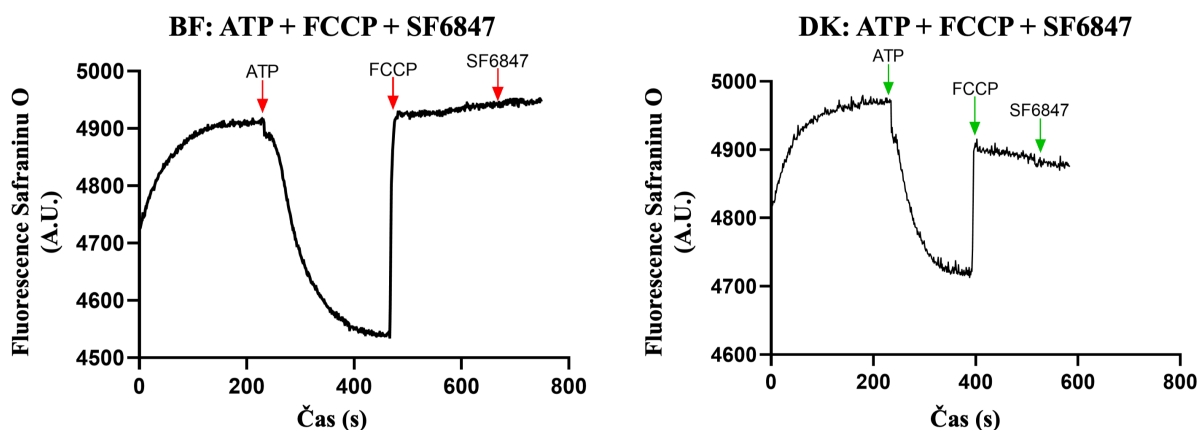
Obrázek 21 Safraninová esej PF – ATP + VentA (venturicidin A) + OLG (oligomycin) + SF6847

Po polarizaci BF mitochondrií pomocí ATP při Safraninové esej způsobilo přidání venturicidinu A (finální koncentrace 5x IC50, 9,5 nM) kompletní depolarizaci mitochondriální membrány, kterou dále již nebyl schopen dále depolarizovat ani oligomycin nebo SF6847 (Obr. 22).



Obrázek 22 Safraninová esej BF – ATP + VentA (venturicidin A) + OLG (oligomycin) + SF6847

Stejný trend v křivce jako venturicidin A jevil i protonofor FCCP. Jednalo se tak o další kontrolu podporující výsledky z jiných publikací, že venturicidin A narušuje F_o část ATP syntázy a zabraňuje tak udržování $\Delta\Psi$ tímto enzymem. Po Safraninové esejí s FCCP (finální koncentrace 100 μM u DK i BF) jsme u obou forem v grafu pozorovali depolarizaci a snížení $\Delta\Psi$ (Obr. 23).



Obrázek 23 Safraninová esej BF a DK – ATP + FCCCP + SF6847

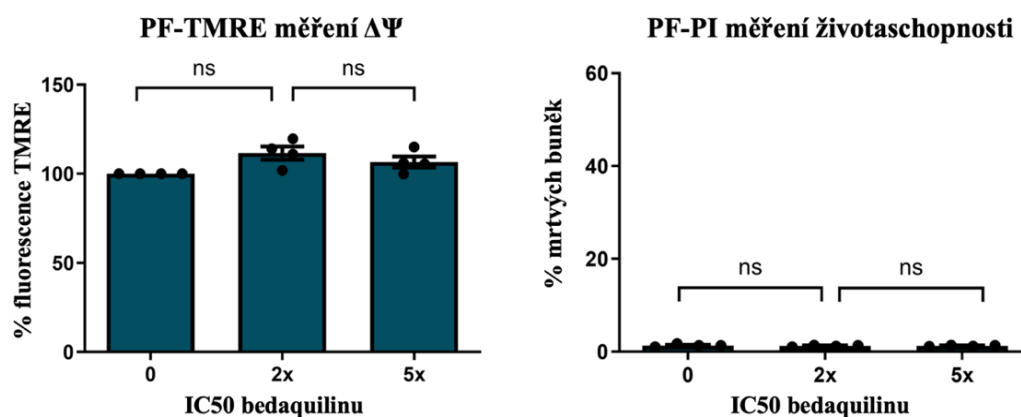
3.2.3 Měření TMRE a PI s bedaquilinem

Pro tato měření jsme použili buňky PF, BF i DK. Pro přidání DK buněk jsme se rozhodli, protože jen jeden z předpokládaných mechanismů funkce bedaquilinu cílí na F_0 podjednotku ATP syntázy. Pokud by došlo ke změně membránového potenciálu, naznačovalo by to jiný mechanismus než blokaci rotace F_0 části.

Sledovaná látka		1x IC50	2x IC50	5x IC50
<i>Bedaquilin</i>	BF	3 μ M	6 μ M	15 μ M
	PF (bez glukózy)	10 μ M	20 μ M	50 μ M
	DK	2 μ M	4 μ M	10 μ M

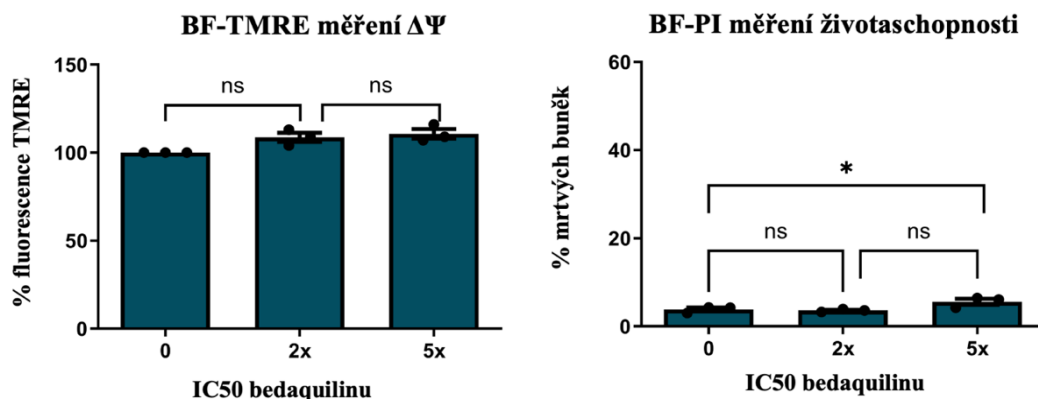
Tabulka 13 Přehled koncentrací IC50 použitých při měření s TMRE a PI s bedaquilinem

Po osmihodinové inkubaci procyklického stádia *T. brucei* s bedaquilinem nebyl patrný rozdíl v hodnotě $\Delta\Psi$ mezi populacemi s rozdílnými násobky IC50 (Obr. 24 vlevo). Ač zvýšení membránového potenciálu nebylo statisticky průkazné, mírné navýšení poukazuje na možnost, že bedaquilin ovlivňuje funkci ATP syntázy, která u PF forem využívá $\Delta\Psi$ k tvorbě ATP a její inhibice by měla způsobit hyperpolarizaci membrány (Hiero-Yap et al., 2021). V souladu s nízkým vlivem bedaquilinu na $\Delta\Psi$, esej určená ke zjištění zastoupení mrtvých vs. živých buněk prokázala to, že ani ve vyšších koncentracích sledované látky nedochází k usmrcení trypanosom (Obr. 24 vpravo).



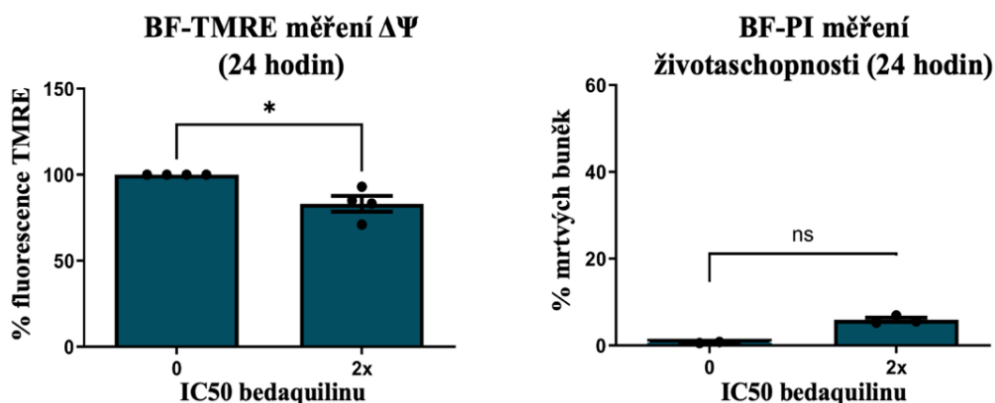
Obrázek 24 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem)

Pro krevní stádium *T. brucei* nebyla taktéž patrná změna $\Delta\Psi$ mezi populací neinkubovanou s bedaquilinem a populací s 5x IC50 koncentrací bedaquilinu (Obr. 25 vlevo). PI esej životaschopnosti buněk nám ukázala drobný nárůst buněk usmrcených v koncentraci 5x IC50. Měření opět proběhlo po 8hodinové inkubaci s bedaquilinem (Obr. 25 vpravo).



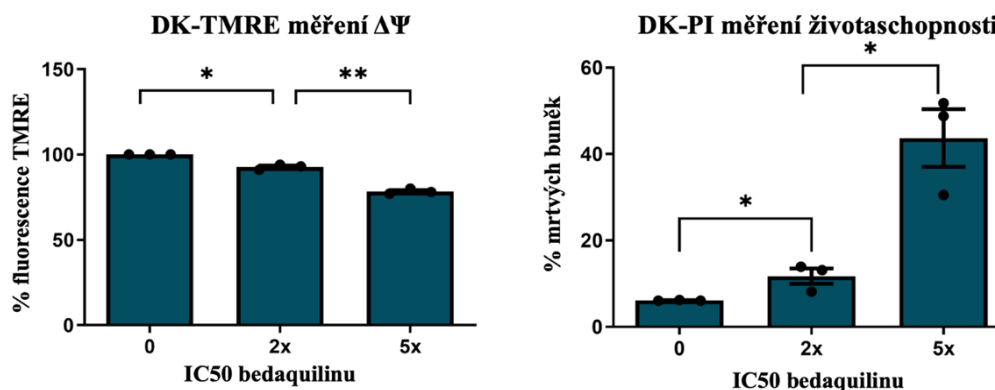
Obrázek 25 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem)

Vzhledem ke skutečnosti, že ATP syntáza aktivně přispívá k tvorbě $\Delta\Psi$ u BF, a z důvodu spotřeby bedaquilinu, která byla u BF výrazně nižší než u PF, jsme se rozhodli prodloužit dobu inkubace na 24 hodin pouze u BF. Po prodloužení inkubační doby jsme zaznamenali statisticky průkazný pokles $\Delta\Psi$, a to již v koncentraci 2x IC50 (Obr. 26 vlevo). Esej PI prokázala zvýšenou úmrtnost v koncentraci 2x IC50 (Obr. 26 vpravo). Měření v 5x IC50 nemohlo být uskutečněno z důvodu toho, že všechny buňky v dané kultuře byly již mrtvé. V průběhu inkubace došlo i k drastické změně morfologie, kdy se paraziti rozpadli, nebo vytvářeli malé kulovité útvary, se kterými nebylo možné esej uskutečnit. Tento výsledek poukazuje na možnost, že bedaquilin inhibuje ATP syntázu, ale až při vyšších koncentracích a delším působení.



Obrázek 26 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s bedaquilinem)

Posledním měřenou formou s TMRE a PI byla DK, tedy *T. evansi*. Zde jsme po 8hodinové inkubaci s bedaquilinem pomocí TMRE zaznamenali mírný pokles $\Delta\Psi$ (Obr. 27 vlevo) a zároveň vysokou úmrtnost buněk ve vyšších koncentracích IC50 (Obr. 27 vpravo).

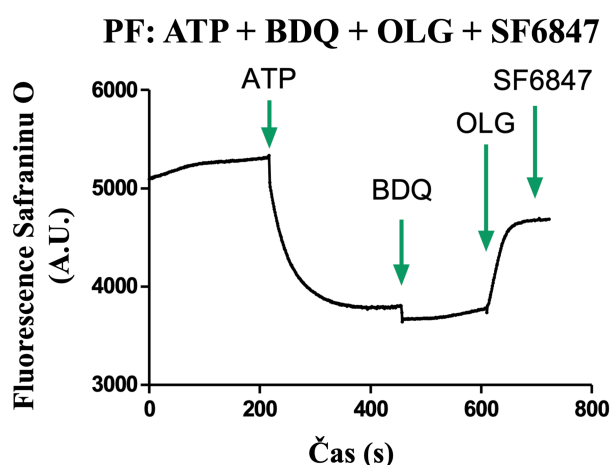


Obrázek 27 Výsledek DK měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem)

3.2.4 Měření Safraninové esej s bedaquilinem

Následující Safraninové esej provedené pro buňky PF, BF a DK sloužily ke srovnání účinku bedaquilinu na $\Delta\Psi$.

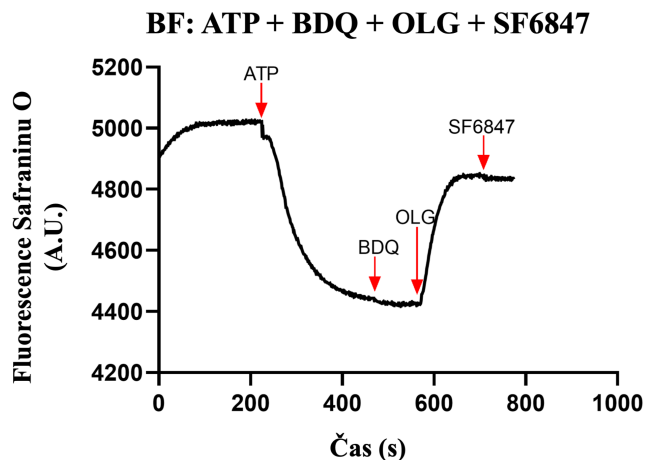
Safraninová esej za přítomnosti ATP nám umožnila pozorovat v grafu typickou polarizaci, a tudíž pokles signálu, vyvolaný převrácením aktivity ATP syntázy, která za těchto podmínek rozkládá ATP za vzniku $\Delta\Psi$. Po přidání bedaquilinu (finální koncentrace 5x IC50, tj. 50 μM) jsme nepozorovali výrazné změny. Avšak přidáním oligomycinu, došlo pravděpodobně k zástavě rotace ATP syntázy, a tím i k patrné depolarizaci membrány, což můžeme pozorovat i v grafu (Obr. 28). Měření jsme ukončili přidáním SF6847. Safraninová esej ukázala, že bedaquilin se nejspíše neváže na c-ring ATP syntázy procyklického stádia *T. brucei* obdobně jako inhibitor oligomycin. V kombinaci s měřeními pomocí TMRE a PI usuzujeme, že bedaquilin neovlivňuje přímo ATP syntázu procyklického stádia *T. brucei* a jeho cytotoxicita může být způsobená inhibicí jiných buněčných funkcí.



Obrázek 28 Safraninová esej – PF + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847

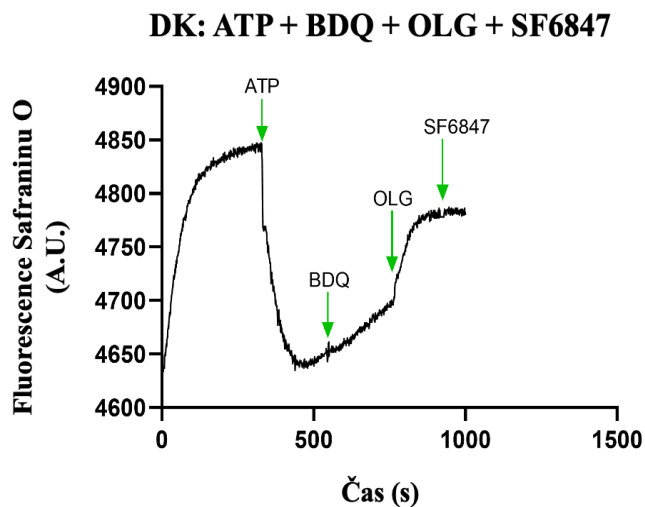
Výsledky měření krevní formy s bedaquilinem byly velmi podobné výsledkům měření procyklického stádia. Přidání ATP vyvolalo polarizaci mitochondriální membrány. Bedaquilin (finální koncentrace 5x IC50, 15 μM) výšku $\Delta\Psi$ neovlivnil, ač oligomycin membránu zcela

viditelně depolarizoval (Obr. 29). Všechna měření byla opět ukončena SF6847, který už neměl další aditivní efekt.



Obrázek 29 Safraninová esej – BF + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847

Při měření DK Safraninovou esejí byla patrná pozvolná depolarizace po přidání bedaquilinu (finální koncentrace 5 x IC₅₀, 10 μM). Depolarizaci taktéž ukázal oligomycin, což je zajímavým zjištěním vzhledem k tomu, že DK forma nemá F_o část ATP syntázy. Nejspíše i v absenci podjednotek formující protonový pór má oligomycin vliv na hydrolýzu ATP prostřednictvím ATP syntázy (Obr. 30).



Obrázek 30 Safraninová esej – DK + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847

4 ZÁVĚR A DISKUZE

Resazurinovým testem jsme byli schopni stanovit hodnoty IC₅₀ u většiny sledovaných látek. Při testování skupiny catechinů a epicatechinů jsme IC₅₀ nebyli schopni určit z důvodu nízké účinnosti těchto látek na životaschopnost buněk a limitu rozpustnosti látek v rozpouštědle DMSO, které je při vyšších koncentracích také toxické pro buňky trypanosom. Nabízí se tak možnost měření opakovat s jiným rozpouštědlem, v němž by rozpustnost sledovaných látek byla vyšší, a samotné rozpouštědlo by neovlivňovalo životaschopnost buněk. Nalezení toho rozpouštědla bude ovšem obtížné, neboť například ethanol, aprotické rozpouštědlo podobné jako DMSO, sice umožňuje vyšší rozpustnost sledovaných látek, ale na buňky působí negativním vlivem již při ředění 1:40 (pozorování v laboratoři). Dále bychom v ideálním případě provedli měření všech forem diastereoizomerů catechinu a epicatechinu, které by díky sterickým odlišnostem měly mít odlišný mechanismus působení (Acin-Perez et al., 2023). Z důvodu komerční nedostupnosti některých těchto látek však tyto experimenty nebylo možno uskutečnit. Konkrétně se jedná o formy epicatechin (+) a catechin (-), který jsme testovali jako směs s catechinem (+).

IC₅₀ hodnoty jsme úspěšně určili pro bedaquilinu, proguanil a venturicidinu A u veškerých buněčných linií. Dále se nám podařilo spolehlivě určit odlišnou senzitivitu vůči antiparazitickým látkám u *T. evansi* a jednotlivých forem a buněčných linií *T. brucei*. Očekávané rozdíly jsme také detekovali mezi procyklickými formami, které rostly v médiu bez glukózy a s glukózou, kde se rozdíly pohybovaly až v řádu desítek. Tento rozdíl v naměřených hodnotách je důsledkem různé závislosti trypanosom na tvorbě ATP oxidativní fosforylací za různých kultivačních podmínek (Coustou et al., 2008). Dále jsme se v této práci pokusili rozklíčovat rozdíly IC₅₀ mezi různými stádii trypanosom a jednotlivými liniemi pomocí esejí na určování membránového potenciálu. Těmito experimenty jsme zkoumali látky venturicidin A a bedaquilin. U obou těchto látek byla vyslovena hypotéza, že cílí na ATP syntázu, tedy enzym, který v každém životním stádiu trypanosom ovlivňuje $\Delta\Psi$ různými způsoby. Na měření $\Delta\Psi$ jsme použili dvě nezávislé metody, které zkoumají membránový potenciál *in vitro* (Safranin O) či *in vivo* (TMRE).

Venturicidin A byl již v literatuře popsán jako potenciální inhibitor ATP syntázy (Hauser et al., 2024). Tato publikovaná studie ukázala, že inkubace krevních forem *Trypanosoma brucei* s venturicidinem A má za následek snížení $\Delta\Psi$, neboť se látka váže na c-ring F₀ části ATP syntázy. Výsledky tohoto článku se nám povedlo replikovat za použití ekvivalentních metod. Drobné odlišnosti hodnot IC₅₀ změřených pro Venturicidinu A mohly být způsobené různými kultivačními médii trypanosom a jinými buněčnými liniemi (BF *Trypanosoma b. brucei* 427, IC₅₀: 1,87 nM vs. BF *T. b. brucei* 2T1, IC₅₀: 21,49 ± 1,13 nM).

Za použití obou esejí jsme také ukázali, že i přes negativní vliv bedaquilinu na buňky parazita *Trypanosoma brucei*, není inhibice způsobena ovlivněním $\Delta\Psi$. Měřením $\Delta\Psi$ s využitím Safraninu O jsme prokázali, že bedaquilin u trypanosom nejspíše nefunguje ani jako inhibitor ATP syntázy, ani jako protonofor, neboť výsledky měření ukázaly rozdílné chování v porovnání se známým protonoforem FCCP. Zjištěné výsledky a signifikantně vysoké hodnoty

IC50 bedaquilinu u trypanosom od hodnot u jiných organismů, mohou nasvědčovat absenci vazebného místa pro inhibici. Tato možnost je více než pravděpodobná, neboť ATP syntáza u trypanosom je unikátní hned z několika aspektů (Gahura et al., 2021). Nejen, že se velmi odlišuje svým proteinovým složením v porovnání s ostatními organismy, ale dokonce má schopnost reverze v průběhu životního cyklu trypanosomy. Tento jev, jehož paralelu nenacházíme u jiných organismů, vidáme pouze v krátkých intervalech, kdy se organismy ocitnou v prostředí s nízkým obsahem kyslíku (hypoxie či anoxie) a potřebují krátkodobě udržet membránový potenciál (Acin-Perez et al., 2023; Chinopoulos et al., 2010). Abychom mohli zjistit, zda je odlišná struktura ATP syntáz *Trypanosoma brucei* (Gahura et al., 2021) a *Mycobacteria tuberculosis* (Guo et al., 2021) důvodem pro tak signifikantní rozdíly v efektivitě bedaquilinu, je třeba provést strukturální modelaci a porovnání ATP syntáz obou organismů. Protože tato modelace naprosto přesahuje časovou dotaci pro tento projekt a je třeba kvalifikovaného odborníka, bude v blízké době navázána spolupráce s Laboratoří evoluce makromolekulárních komplexů na Biologickém centru AV ČR pod vedením Mgr. Ondřeje Gahury, Ph.D. Po získání těchto poznatků, bude tato středoškolská odborná práce základem pro vědeckou publikaci o mechanismu fungování aktivní látky v léčivu Sirturo a předloží možné strukturní prerekvizity pro efektivní látky inhibující ATP syntázu u medicínsky důležitého parazita *Trypanosoma brucei*.

5 POUŽITÁ LITERATURA

ACIN-PEREZ, Rebeca; BENINCÁ, Cristiane; FERNANDEZ DEL RIO, Lucia; SHU, Cynthia; BAGHDASARIAN, Siyounch et al. Inhibition of ATP synthase reverse activity restores energy homeostasis in mitochondrial pathologies. Online. *The EMBO Journal*. 2023, roč. 42, č. 10. ISSN 0261-4189. Dostupné z: <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111699>. [cit. 2025-03-17].

BARRETT, Michael P; VINCENT, Isabel M; BURCHMORE, Richard JS; KAZIBWE, Anne JN a MATOVU, Enock. Drug Resistance in Human African Trypanosomiasis. Online. *Future Microbiology*. 2011, roč. 6, č. 9, s. 1037-1047. ISSN 1746-0913. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/fmb.11.88>. [cit. 2025-04-02].

BURKI, Fabien; ROGER, Andrew J.; BROWN, Matthew W. a SIMPSON, Alastair G.B. The New Tree of Eukaryotes. Online. *Trends in Ecology & Evolution*. 2020, roč. 35, č. 1, s. 43-55. ISSN 01695347. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>. [cit. 2025-03-21].

BRIDGES, Hannah R.; JONES, Andrew J. Y.; POLLAK, Michael N. a HIRST, Judy. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. Online. *Biochemical Journal*. 2014, roč. 462, č. 3, s. 475-487. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/BJ20140620>. [cit. 2025-03-17].

CAYLA, Mathieu; ROJAS, Federico; SILVESTER, Eleanor; VENTER, Frank a MATTHEWS, Keith R. African trypanosomes. Online. *Parasites & Vectors*. 2019, roč. 12, č. 1. ISSN 1756-3305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3355-5>. [cit. 2025-03-16].

CHINOPOULOS, Christos a ADAM-VIZI, Vera. Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2010, roč. 1802, č. 1, s. 221-227. ISSN 09254439. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.008>. [cit. 2025-04-03].

COUSTOU, Virginie; BIRAN, Marc; BRETON, Marc; GUEGAN, Fabien; RIVIÈRE, Loïc et al. Glucose-induced Remodeling of Intermediary and Energy Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei*. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, roč. 283, č. 24, s. 16342-16354. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M709592200>. [cit. 2025-04-03].

DESQUESNES, Marc; HOLZMULLER, Philippe; LAI, De-Hua; DARGANTES, Alan; LUN, Zhao-Rong et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. Online. *BioMed Research International*. 2013, roč. 2013, s. 1-22. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/194176>. [cit. 2025-03-16].

DEWAR, Caroline E.; MACGREGOR, Paula; COOPER, Sinclair; GOULD, Matthew K.; MATTHEWS, Keith R. et al. Mitochondrial DNA is critical for longevity and metabolism of

transmission stage *Trypanosoma brucei*. Online. *PLOS Pathogens*. 2018, roč. 14, č. 7. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007195>. [cit. 2025-03-16].

DURÃO, Raquel; RAMALHETE, Cátia; MADUREIRA, Ana Margarida; MENDES, Eduarda a DUARTE, Noélia. Plant Terpenoids as Hit Compounds against Trypanosomiasis. Online. *Pharmaceuticals*. 2022, roč. 15, č. 3. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15030340>. [cit. 2025-03-16].

FIGUEIRA, Tiago R.; MELO, Daniela R.; VERCESI, Aníbal E. a CASTILHO, Roger F. Safranine as a Fluorescent Probe for the Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential in Isolated Organelles and Permeabilized Cells. Online. In: PALMEIRA, Carlos M. a MORENO, António J. (ed.). *Mitochondrial Bioenergetics*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, s. 103-117. ISBN 978-1-61779-381-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_7. [cit. 2025-03-16].

GAHURA, Ondřej; HIERRO-YAP, Carolina a ZÍKOVÁ, Alena. Redesigned and reversed: architectural and functional oddities of the trypanosomal ATP synthase. Online. *Parasitology*. 2021, roč. 148, č. 10, s. 1151-1160. ISSN 0031-1820. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0031182021000202>. [cit. 2025-03-22].

GAO, Jiang-Mei; QIAN, Zheng-Yu; HIDE, Geoff; LAI, De-Hua; LUN, Zhao-Rong et al. Human African trypanosomiasis: the current situation in endemic regions and the risks for non-endemic regions from imported cases. Online. *Parasitology*. 2020, roč. 147, č. 9, s. 922-931. ISSN 0031-1820. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0031182020000645>. [cit. 2025-03-16].

GUO, Hui; COURBON, Gautier M.; BUELER, Stephanie A.; MAI, Juntao; LIU, Jun et al. Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. Online. *Nature*. 2021, roč. 589, č. 7840, s. 143-147. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3004-3>. [cit. 2025-04-03].

HAUSER, Dennis A.; KAISER, Marcel; MÄSER, Pascal; ALBISETTI, Anna a ODOM JOHN, Audrey. Venturicidin A affects the mitochondrial membrane potential and induces kDNA loss in *Trypanosoma brucei*. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2024, roč. 68, č. 7, s. e01671-23. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aac.01671-23>. [cit. 2025-03-17].

HIERRO-YAP, Carolina; ŠUBRTOVÁ, Karolína; GAHURA, Ondřej; PANICUCCI, Brian; DEWAR, Caroline et al. Bioenergetic consequences of FoF1–ATP synthase/ATPase deficiency in two life cycle stages of *Trypanosoma brucei*. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2021, roč. 296. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100357>. [cit. 2025-03-16].

HURST, W Jeffrey; KRAKE, Susann H; BERGMEIER, Stephen C; PAYNE, Mark J; MILLER, Kenneth B et al. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. Online. *Chemistry Central Journal*. 2011, roč. 5, č. 1. ISSN 1752-153X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-53>. [cit. 2025-03-17].

KENNEDY, Peter G.E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. Online. *Journal of Clinical Investigation*. 2004, roč. 113, č. 4, s. 496-504. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI21052>. [cit. 2025-03-16].

KUEMMERLE, Andrea; SCHMID, Caecilia; BERNHARD, Sonja; KANDE, Victor; MUTOMBO, Wilfried et al. Effectiveness of Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy (NECT) in T. b. gambiense second stage sleeping sickness patients in the Democratic Republic of Congo: Report from a field study. Online. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2021, roč. 15, č. 11. ISSN 1935-2735. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009903>. [cit. 2025-04-03].

LAMOUR, Nadia; RIVIÈRE, Loïc; COUSTOU, Virginie; COOMBS, Graham H.; BARRETT, Michael P. et al. Proline Metabolism in Procyclic Trypanosoma brucei Is Down-regulated in the Presence of Glucose. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, roč. 280, č. 12, s. 11902-11910. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M414274200>. [cit. 2025-03-16].

MATTHEWS, Keith R. The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. Online. *Journal of Cell Science*. 2005, roč. 118, č. 2, s. 283-290. ISSN 1477-9137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.01649>. [cit. 2025-03-16].

NEUPANE, Prashant; BHUJU, Sudina; THAPA, Nita a BHATTARAI, Hitesh Kumar. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. Online. *Biomolecular Concepts*. 2019, roč. 10, č. 1, s. 1-10. ISSN 1868-503X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>. [cit. 2025-03-16].

RAMBERSAD, Sephra N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. Online. *Sensors*. 2012, roč. 12, č. 9, s. 12347-12360. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s120912347>. [cit. 2025-03-16].

ROSENBERG, Merilin; AZEVEDO, Nuno F. a IVASK, Angela. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42906-3>. [cit. 2025-03-16].

SARATHY, Jickky Palmae; GRUBER, Gerhard a DICK, Thomas. Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. Online. *Antibiotics*. 2019, roč. 8, č. 4. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040261>. [cit. 2025-03-16].

SCHNAUFER, Achim; CLARK-WALKER, G Desmond; STEINBERG, Alodie G a STUART, Ken. The F₁-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. Online. *The EMBO Journal*. 2005, roč. 24, č. 23, s. 4029-4040. ISSN 02614189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600862>. [cit. 2025-03-16].

SEED, John Richard a WENCK, Mary Anne. Role of the long slender to short stumpy transition in the life cycle of the african trypanosomes. Online. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2003, roč. 2, č. 1. ISSN 1475-9292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-3>. [cit. 2025-03-16].

SMITH, Terry K.; BRINGAUD, Frédéric; NOLAN, Derek P. a FIGUEIREDO, Luisa M. Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle. Online. *F1000Research*. 2017, roč. 6. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://doi.org/10.12688/f1000research.10342.2>. [cit. 2025-03-16].

ŠUBRTOVÁ, Karolína; PANICUCCI, Brian; ZÍKOVÁ, Alena a SCHNAUFER, Achim. ATPaseTb2, a Unique Membrane-bound FoF1-ATPase Component, Is Essential in Bloodstream and Dyskinetoplastic Trypanosomes. Online. *PLOS Pathogens*. 2015, roč. 11, č. 2. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004660>. [cit. 2025-03-16].

TALEVA, Gergana; HUSOVÁ, Michaela; PANICUCCI, Brian; HIERRO-YAP, Carolina; PINEDA, Erika et al. Mitochondrion of the *Trypanosoma brucei* long slender bloodstream form is capable of ATP production by substrate-level phosphorylation. Online. *PLOS Pathogens*. 2023, roč. 19, č. 10. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011699>. [cit. 2025-04-02].

VAN DEN ABEELE, J.; CLAES, Y.; VAN BOCKSTAELE, D.; LE RAY, D. a COOSEMANS, M. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. Online. *Parasitology*. 1999, roč. 118, č. 5, s. 469-478. ISSN 0031-1820. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0031182099004217>. [cit. 2025-03-16].

VIEIRA-DA-SILVA, Beatriz a CASTANHO, Miguel A. R. B. Resazurin Reduction-Based Assays Revisited: Guidelines for Accurate Reporting of Relative Differences on Metabolic Status. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 5. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28052283>. [cit. 2025-03-16].

VIJAYASURYA; GUPTA, Swadha; SHAH, Smit a PAPPACHAN, Anju. Drug repurposing for parasitic protozoan diseases. Online. In: *Clinical Application of Repurposed Drugs*. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, 2024, s. 23-58. ISBN 9780443241147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2024.05.001>. [cit. 2025-04-02].

WHITEHOUSE, David G.; MAY, Benjamin a MOORE, Anthony L. Respiratory Chain and ATP Synthase. Online. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2019. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95732-5>. [cit. 2025-03-16].

6 INTERNETOVÉ ZDROJE

TRYANOSOMOSIS (Sleeping Disease, Nagana). The Cattle Site [online]. Dostupné z: <https://www.thecattlesite.com/diseaseinfo/249/trypanosomosis-sleeping-disease-nagana> [cit. 1. 3. 2025].

TRYANOSOMIASIS, Human African (Sleeping Sickness). World Health Organization [online]. Dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)) [cit. 1. 3. 2025].

Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation: Substrates and Products, General Features of the Pathway. Jack Westin [online]. Dostupné z: <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/oxidative-phosphorylation/electron-transport-chain-and-oxidative-phosphorylation-substrates-and-products-general-features-of-the-pathway> [cit. 16. 3. 2025].

Sirturo – European public assessment report (EPAR). European Medicines Agency [online]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/sirturo> [cit. 9. 3. 2025].

Coefficient of Determination (R-Squared). Newcastle University [online]. Dostupné z: <https://www.ncl.ac.uk/webtemplate/ask-assets/external/maths-resources/statistics/regression-and-correlation/coefficient-of-determination-r-squared.html> [cit. 2. 1. 2025].

P-Value Definition, Interpretation & Examples. Simply Psychology [online]. Dostupné z: <https://www.simplypsychology.org/p-value.html> [cit. 29. 1. 2025].

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Statistika zaznamenaných případů HAT – Afrika 2017 (přeloženo a převzato z Gao et al. 2020).....	9
Obrázek 2 Vizuální porovnání DAPI barvení DNA u jednotlivých trypanosom (vlevo signál z jádra a kinetoplastu <i>T. brucei</i> ; vpravo odlišené jádro <i>T. evansi</i> bez kinetoplastu), vizuální porovnání provedeno pomocí Fluorescent microscope (Axioplan 2 imaging Universal microscope, Zeiss, Oberkochen, Německo) s CCD kamerou (Olympus DP73).....	10
Obrázek 3 Životní cyklus <i>T. brucei</i> a změna stádií při přechodech mezi mušimi a savčími hostiteli (převzato a upraveno z Durão et al., 2022)	11
Obrázek 4 Schéma energetického metabolismu procyklického stádia <i>T. brucei</i> (převzato z Lamour et al., 2005).....	12
Obrázek 5 Metabolismus krevního stádia <i>T. brucei</i> získávající veškeré ATP glykolýzou (převzato Smith et al., 2017)	12
Obrázek 6 Proces oxidativní fosforylace na vnitřní membráně mitochondrie (převzato a upraveno, jackwestin.com). Komplexy dýchacího řetězce tvořící mitochondriální membránový potenciál a ATP syntáza využívající tento potenciál k tvorbě ATP.....	14
Obrázek 7 Modifikace ATP syntáz u muší a krevní formy <i>Trypanosoma brucei</i> a u parazita <i>Trypanosoma evansi</i> (převzato a upraveno z Šubrtová et al., 2015).....	15
Obrázek 8 Schéma působení bedaquilinu na ATP syntázu parazita <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 1) působení jako ionofor 2) zastavení rotace vazbou na c-ring 3) zastavení rotace vazbou na F ₁ část (převzato a přeloženo Sarathy et al., 2019).....	16
Obrázek 9 Struktura catechinů (cis uspořádání vyznačeno růžově) a epicatechinů (trans uspořádání vyznačeno modře) (převzato a upraveno z Hurst et al., 2011)	17
Obrázek 10 Přeměna resazurinu na resorufin (struktura sloučenin vytvořena s pomocí MolView)	19
Obrázek 11 Příprava ředících řad.....	20
Obrázek 12 Očekávaný vzhled destičky před měřením fluorescence.....	21
Obrázek 13 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí u bedaquilinu.....	26
Obrázek 14 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí u venturicidinu A	26
Obrázek 15 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí pro proguanil.....	27
Obrázek 16 Měření intenzity fluorescence resazurinovou esejí pro catechin +, catechin ± a epicatechin -	28
Obrázek 17 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s venturicidinem A)	30
Obrázek 18 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s venturicidinem A)	31
Obrázek 19 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s venturicidinem A)	31
Obrázek 20 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s venturicidinem A)	32
Obrázek 21 Safraninová esej PF – ATP + VentA (venturicidin A) + OLG (oligomycin) + SF6847	32

Obrázek 22 Safraninová esej BF – ATP + VentA (venturicidin A) + OLG (oligomycin) + SF6847	33
Obrázek 23 Safraninová esej BF a DK – ATP + FCCP + SF6847	33
Obrázek 24 Výsledek PF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem).....	34
Obrázek 25 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem)	35
Obrázek 26 Výsledek BF měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (24hodinová inkubace s bedaquilinem).....	35
Obrázek 27 Výsledek DK měření $\Delta\Psi$ pomocí TMRE a doplňující měření životaschopnosti buněk s PI (8hodinová inkubace s bedaquilinem).....	36
Obrázek 28 Safraninová esej – PF + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847	36
Obrázek 29 Safraninová esej – BF + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847	37
Obrázek 30 Safraninová esej – DK + ATP + BDQ (bedaquilin) + OLG (oligomycin) + SF6847	37

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Množství buněk v jedné jamce.....	19
Tabulka 2 Složení ANT pufru (Adenine Nucleotide Translocase buffer)	24
Tabulka 3 Přehled látek pro přípravu destičky.....	25
Tabulka 4 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro bedaquilin	25
Tabulka 5 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro venturicidin A (–...měření neprovedeno)	26
Tabulka 6 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro proguanil	27
Tabulka 7 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro catechin ± (–...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R^2)	27
Tabulka 8 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro catechin + (–...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R^2)	27
Tabulka 9 Výsledné hodnoty resazurinové eseje pro epicatechin - (–...měření neprovedeno; *...hodnoty nelze považovat za spolehlivé z důvodu nízkého R^2)	28
Tabulka 10 Vysvětlivky grafických symbolů statistické významnosti při párovém porovnávání	29
Tabulka 11 Látky využívané v Safraninových esejích a jejich finální koncentrace	29
Tabulka 12 Přehled koncentrací IC ₅₀ použitých při měření s TMRE a PI s venturicidinem A	30
Tabulka 13 Přehled koncentrací IC ₅₀ použitých při měření s TMRE a PI s bedaquilinem	34