

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Diplomová práce

**Antivirotické účinky biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů v
kombinaci s imunomodulačními látkami proti viru klíšťové
encefalitidy**



Autor: Bc. Jan Černý

Vedoucí práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Místo a rok vypracování: České Budějovice, 2019

Černý J., 2019: Antivirotické účinky biologicky aktivních látek z přírodních zdrojů v kombinaci s imunomodulačními látkami proti viru klíšťové encefalitidy. [Antiviral effect of biologically active substances from nature in combination with immunomodulatory substances against tick-borne encephalitis virus., Mgr. Thesis, in Czech.] – 81 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this study is focused on substances from the nature as a potential treatment against tick-borne encephalitis virus. The research of this master thesis can be divided into two sections. The first one is about chosen derivatives of adamantane, their cytotoxic effect on neuron cell lines and the determination of their antiviral properties *in vitro*. For these purposes was used the combination of MTT assay, plaque titration assay and one-step qRT-PCR. The second part of this work verified the capability of chosen stilbenes to prolong the life of BALB/c mice which were infected by tick-borne encephalitis virus.

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

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

V Českých Budějovicích dne 1. prosince 2019

.....

Jan Černý

Na této stránce bych rád poděkoval především RNDr. Jánovi Štěrbovi, Ph.D. za jeho vedení, užitečné rady a připomínky po celou dobu práce v laboratoři. Mé díky patří také členům laboratoře za pomoc a přátelské prostředí, zejména Mgr. Martinovi Sellingerovi za skvělé seznámení s novými metodami, Mgr. Haně Maškové za sdílení nabytých zkušeností se stilbeny a Mgr. Zuzaně Vavruškové za spolupráci při *in vivo* pokusech. V neposlední řadě také děkuji rodině a kamarádům za podporu při studiu. Speciální poděkování patří kamarádům Mgr. Petrovi Kozlovi za pomoc při vyhodnocování dat ve statistice a Mgr. Daně Skálové za korekturu této práce.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Arboviry	1
1.2 Flaviviry	2
2. Virus klíšťové encefalitidy	5
2.1 VKE z pohledu epidemiologie	8
2.2 Molekulární struktura VKE	9
2.3 Patogeneze KE.....	11
2.4 Klinická manifestace KE	12
2.5 Imunitní odpověď hostitele na VKE	13
2.6 Laboratorní diagnostika VKE	14
2.7 Možnosti léčby KE a vakcinace proti VKE.....	14
3. Antivirotika	15
3.1 Adamantan a jeho deriváty	16
3.2 Stilbeny	19
4. Cíle práce	22
5. Materiály a metody	23
5.1 Buněčné linie	23
5.2 Příprava roztoků vybraných derivátů adamantanu	23
5.3 Ověření cytotoxicity u vybraných derivátů adamantanu	24
5.4 Plaková titrace	25
5.5 Ověření antivirotického účinku u derivátů adamantanu na přežívání buněk infikovaných VKE	26
5.6 Analýza virové replikace u buněk kultivovaných společně s vybranými deriváty adamantanu	28
5.7 Ověření antivirotického účinku u vybraných stilbenů na přežívání pokusných myší infikovaných VKE.....	30
5.8 Zpracování výsledků	32
6. Výsledky	33
6.1 Test cytotoxicity u vybraných derivátů adamantanu	33
6.2 Ověření antivirotického účinku u vybraných derivátů adamantanu na přežívání buněk infikovaných VKE	39
6.3 Měření virové nálože vně buněk metodou plakové titrace.....	45

6.4 Měření virové nálože uvnitř buněk metodou qRT-PCR	48
6.5 Ověření antivirotického účinku u vybraných stilbenů na přežívání pokusných myší infikovaných VKE	51
7. Diskuze	55
8. Závěr	62
9. Seznam citované literatury	64

Literární přehled

1 Úvod

1.1 Arboviry

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) patří mezi flaviviry, které jsou součástí skupiny arbovirů. Tento název pochází z anglického slova *arthropod-borne virus*. Za několik posledních desetiletí došlo k rozpoznání nových infekčních agens, případně k rozšíření stávajících patogenů do oblastí, kde se dříve nevyskytovaly (Bengis a kol., 2004). Většina nových infekčních agens jsou tzv. zoonózy, což znamená, že mohou nakazit zvíře i člověka (Jones a kol., 2008). Lidé bývají zpravidla koneční hostitelé, protože v mnoha případech umírají na danou infekci z této skupiny virů. Z tohoto důvodu nakažené zvíře více ohrožuje život člověka, než by tomu bylo v opačném případě (Bengis a kol., 2004). Majorita nově objevených a geograficky šířících se zoonóz patří právě mezi arboviry. Pro tyto viry je charakteristické, že hostitele (obratlovce) infikuje tzv. vektor (členovec). Jako vektor obvykle slouží komáři, klíšťata, písečné mouchy, pakomáři atd. K replikaci virových částic dochází uvnitř tkáně specifického vektoru. Hostitel (zvíře či člověk) je poté nakažen prostřednictvím slin, když se vektor živí jeho krví (Pfeffer a Dobler, 2010).

Replikační strategie arbovirů zahrnuje tři komponenty: samotný virus, vektor a obratlovce, mezi nimiž panuje složitý vztah. V dané lokalitě se musí vyskytovat hostitel, který je vnímavý k určitému viru a vektor, pro něhož je hostitel zdrojem potravy. Dále je nutné, aby virus způsobil dostatečně vysokou virémii u hostitele a mohlo dojít k infekci vektoru, jenž poté nakazí dalšího hostitele. K trvalé cirkulaci viru musí být splněny výše zmíněné podmínky v dostatečném počtu, a to na stejném místě ve stejný čas (Kuno a Chang, 2005). Nicméně například nedávný výskyt západonilské horečky v Americe nebo v České republice (oblast Moravy), Chikungunya (čti: čikunguňa) viru v Itálii nebo Usutu viru v Rakousku dokazují, že naše moderní společnost vykazuje jisté slabiny vůči arbovirům (Sutherst, 2004; Weaver a Reisen, 2010; Rudolf a kol., 2017). V některých případech lze zavlečení viru lehce odhalit, jako tomu bylo u Chikungunya viru v Itálii, kterého tam roku 2007 importoval viremický cestovatel z Indie (World Health Organization, 2007). Na druhou stranu výskyt viru západonilské horečky v Americe nebyl doposud zcela objasněn (Lanciotti a kol., 1999). Obecně lze předpokládat, že k zavlečení viru dochází dvěma mechanismy.

První možností je již zmiňovaný import člověkem nebo zvířetem s dostatečně vysokým titrem viru v krvi, druhou je pak import infekčním vektorem. Zatímco import pomocí vektoru, především komáry, je dobře známý a v mnoha zemích přísně pozorovaný, riziku obchodování se zvířaty zatím nebyla věnována příliš velká pozornost (Marano a kol., 2007).

Mezi arboviry patří celkem sedm čeledí, které u lidí způsobují symptomy podobné chřipce, encefalitidy nebo vážné hemoragické horečky a jsou to: *Peribunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Asfarviridae* a pro tuto práci nejdůležitější *Flaviviridae*.

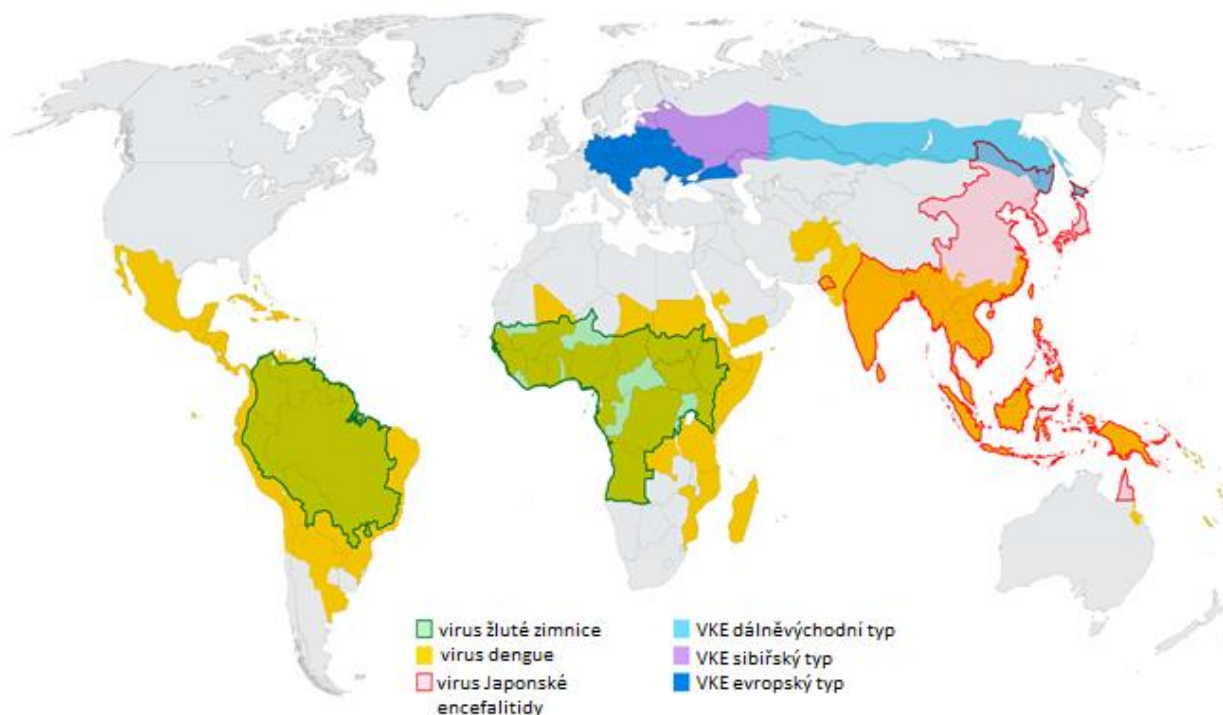
1.2 Flaviviry

Viry čeledi *Flaviviridae* (flaviviry) jsou velice zajímavou skupinou virů, neboť oproti ostatním virovým čeledím jsou poměrně heterogenní. Ačkoli jsou řazeny do stejné čeledi, je zde například poměrně velká diverzita vektorů a hostitelů. Z medicínského hlediska je pak zajímavé, že viry této čeledi u lidí způsobují širokou škálu patogenezí, od asymptomatického průběhu onemocnění až po život ohrožující hemoragické horečky. Jako příklad flavivirů lze uvést virus Zika, virus žluté zimnice, Usutu virus, virus horečky dengue, virus Japonské encefalitidy nebo v našich zeměpisných šířkách dobře známý virus klíšťové encefalitidy (Holbrook, 2017).

Viry této čeledi (rod *Flavivirus*) jsou zejména infekční pro savce, patogenita byla nejlépe popsána u člověka (Heinz a Stiasny, 2012). Podle vektoru je lze dále dělit na tři velké skupiny: viry přenášené klíšťaty, viry přenášené komáry a ty zbývající, kde není známý vektor. Flaviviry přenášené klíšťaty jsou si monofyleticky (společný předek a jeho potomci) velice příbuzné a tvoří jeden serokomplex, navzdory tomu, že jednotliví zástupci způsobují velmi odlišné klinické projevy. Naproti tomu flaviviry přenášené komáry tvoří heterogenní skupinu, skládající se z mnoha serokomplexů, kupříkladu: serokomplex viru Japonské encefalitidy, serokomplex viru žluté zimnice, serokomplex viru horečky dengue, aj. Z fylogenetických studií vyplývá, že flaviviry vznikly zhruba před 100 000 lety a k rozdělení podle vektoru (klíštěte nebo komára) pak došlo před 40 000 lety (Pettersson a Fiz-Palacios, 2014). Na základě serologických testů byly flaviviry původně řazeny do čeledi *Togaviridae*, avšak dle pozdějších molekulárních metod a odhalení jejich replikační strategie roku 1984

vznikla samostatná čeleď *Flaviviridae* (Westaway a kol., 1985). Postupem času se vymezení od togavirů ukázalo jako správné, protože další studie prokázaly značné odlišnosti v genomu flavivirů, struktuře virionu i jejich biologii. Dokonce byly objeveny flaviviry, které nevyužívají ve svém cyklu hostitele nebo jsou výhradně specifické ke hmyzu (nalezené pouze v komárech) (Blitvich a Firth, 2015).

Mnozí zástupci flavivirů patří k předním patogenům, jež ohrožují lidskou populaci, neboť se vyskytují v místech hustého osídlení (viz Obr. 1) a jsou původcem řady vážných chorob. Zjednodušeným pohledem se mohou flaviviry přenášené komáry rozdělit do dvou skupin dle vektoru. Prvním jsou komáři rodu *Culex*, přenášející viry spadající do serokomplexu viru Japonské encefalitidy a obecně neurotropní viry. Druhý vektor představují komáři rodu *Aedes*, kterým je připisována blízká asociace s viscerotropními anebo hemoragickými chorobami. Relativně nedávno však bylo při epidemii viru Zika v Americe (vektor *Aedes aegypti*) doloženo, že i komáři rodu *Aedes* mohou přenášet tuto závažnou infekci, která je schopna způsobit četné neurologické vady lidského plodu. V současnosti tedy vyvstává otázka, zdali by například virus horečky dengue také nemohl ohrozit plod či samotnou ženu počas gravidity (Malhotra a kol., 2006). Flaviviry přenášené klíšťaty způsobují u lidí značné množství vážných onemocnění, jež jsou typicky spojována s neurologickými symptomy, ale v minulosti byly již také zaznamenány případy, kdy takto nakažené osoby trpěly hemoragickou horečkou (Charrel a kol., 2001).



Obr. 1: Geografická distribuce vybraných flavivirů (zapůjčeno a upraveno z Holbrook, 2017).

Rozmanitost vektorů, klinické projevy infekcí a široká geografická distribuce dělají z flavivirů bezpochyby velice zajímavé viry pro výzkum, obzvláště když je bráno v potaz, že většina lidí napříč světem žije právě v endemických oblastech osídlených těmito viry (viz Obr. 1). Vzhledem k tomu, že v moderní společnosti je prakticky naprostá svoboda pohybu, existuje zde reálná obava ze vzniku nových epidemií, což zdůrazňuje potřebu tyto viry nadále studovat nejen v laboratořích, ale i v terénu (Holbrook, 2017).

Následující stránky budou věnovány viru klíšťové encefalitidy, který je stěžejní pro tuto práci. V kapitolách bude podrobně rozebrána struktura virionu či jeho replikační strategie, jež je u všech flavivirů téměř stejná.

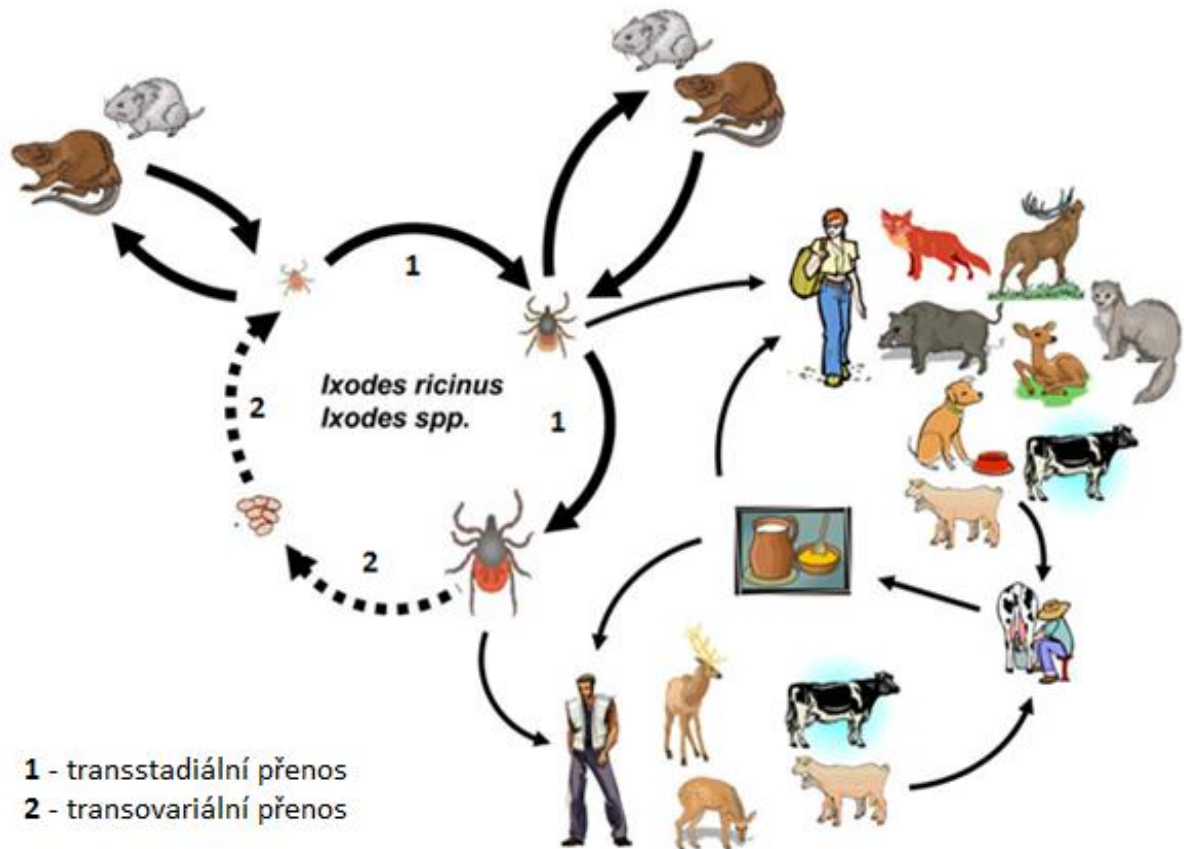
2 Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy (VKE), neboli v angličtině *tick-borne encephalitis virus* (TBEV), způsobuje chorobu zvanou klíšťová encefalitida (KE). Tato infekce je příčinou potenciálně fatálních neurologických onemocnění u lidí žijících především v Evropě a Asii (Gritsun a kol., 2003 a). Geografická distribuce VKE je vyobrazena na Obr. 1 odstíny modré barvy.

Klíšťová encefalitida byla poprvé objevena roku 1932 v tehdejším Sovětském svazu, kde se u několika lesních dělníků vyskytly vážné neurologické symptomy neznámého původu. O čtyři roky později, tedy roku 1936, Sovětský svaz vyslal na dané místo skupinu vědců, kteří měli za úkol zjistit původ a příčinu onemocnění. Během této expedice klíšťové encefalidě podleli také někteří badatelé, samotný výzkum však přinesl kýžené ovoce a jako vektor bylo určeno klíšťe *Ixodes persulcatus*. Následující rok jiný tým identifikoval jako původce choroby virus, který byl pojmenován „Far-Eastern encephalitis virus“, v českém jazyce znám jako VKE dálněovýchodní typ (Silber a Soloviev, 1946). V Evropě a západní části Ruska se objevovalo stejné onemocnění s méně dramatickým průběhem. Nakonec bylo prokázáno, že se jedná o téměř totožné patogeny, jež byly později pojmenovány jako VKE evropského a sibiřského typu (Smorodintsev, 1958). Ke stěžejnímu odhalení původce nákazy došlo na území tehdejšího Československa, kde v důsledku konzumace nepasterizovaného mléka a z něj připravených produktů od infikovaných zvířat propukla epidemie (Smorodintsev a kol., 1941). Dnes je již dobře známo, že VKE evropského typu je přenášen klíšťem *I. ricinus*, kdežto sibiřský a dálněovýchodní typ klíšťem *I. persulcatus*. V odborné literatuře se nyní běžně používají zkratky TBEV-Eu (evropský typ), TBEV-Sib (sibiřský typ) a TBEV-FE (dálněovýchodní typ) (Fauquet a kol., 2005).

Životní cyklus VKE (viz Obr. 2) spadá do obecného vzorce arbovirů, který již byl popsán v kapitole 1.1. Konkrétněji zahrnuje menší hlodavce, vektora, který se na nich živí – *I. ricinus* nebo *I. persulcatus*, a typ viru dle příslušné lokality. Větší savci, včetně člověka, jsou spíše náhodní hostitelé. V přirozeném prostředí se VKE udržuje mechanismy, které lze rozdělit na vertikální a horizontální. Hlavním vertikálním mechanismem je transstadiální přenos, jinými slovy každé následující stádium klíšťe (larva, nymfa i dospělec) zůstává infekční. Druhou možností je přenos transovariální, tedy přenos viru z infikované samičky

na vajíčka. Transovariálnímu přenosu však není přisuzována velká důležitost (Slovák a kol., 2014).



Obr. 2: Grafické znázornění životního cyklu VKE (zapůjčeno a upraveno z Pfeffer a Dobler, 2010).

Horizontální typ je zastoupen tzv. co-feedingem, kdy infekce je přenesena prostřednictvím slin mezi klíšťaty, která se na hostiteli krmí v těsné blízkosti (viz Obr. 3). Pokud se co-feedingu účastní velké množství jedinců, může to mít pro hostitele fatální důsledky (velká ztráta krve a smrt, vyšší riziko KE) (Randolph, 2011). Z hlediska VKE je strategicky výhodné, aby se co-feedingu účastnila všechna vývojová stádia klíštěte pro pozdější zvýšení efektivity vertikálního přenosu a infekci více hostitelů. Mimo jiného účinnost horizontálního mechanismu závisí i na teplotě prostředí. Například nymfy *I. ricinus* začínají být aktivní při nižších teplotách než larvy. Výzkumy dokládají, že při rychlejším oteplování během jara vzrůstá počet VKE pozitivních klíšťat (Pfeffer a Dobler, 2010).



Obr. 3: Dospělé samice *I. ricinus* živící se na myšici křovinné – příklad co-feedingu (Mansfield a kol., 2009).

TBEV-FE je ze zmíněných třech typů nejvíce agresivní. Prodromální stádium infekce je v celku nenápadné, poté náhle dochází k rapidní manifestaci nemoci. Nakažená osoba trpí vysokou horečkou, myalgií, bolestmi hlavy, fotofobií a v důsledku poškození mozku různým stupněm paralýzy. Mortalita u tohoto typu je znepokojivě vysoká, udává se 20-40 %. Přeživší pacienti mají do konce života postencefalitické komplikace připomínající těžkou poliomyelitidu (paralýza, atrofie svalstva krku a dýchacích svalů) (Clarke a Casals, 1965; Růžek a kol., 2010).

Infekce typem TBEV-Eu nemá tak dramatický průběh jako TBEV-FE. Většina případů je asymptomatická a nakažení lidé vůbec nezaregistrují jakýkoliv průběh infekce. Relativně malé procento případů vykazuje subklinické příznaky (Gritsun, 2003). Plně rozvinutá infekce je zpravidla dvoufázová. V první fázi jsou pozorovány příznaky podobné chřipce (myalgie, nauzea, febrilní stav, únava). V literatuře se udává, že zhruba u 65 % postižených nemoc dále neprogrduje. V druhé fázi je typická vysoká horečka, encefalitida či encefalomeningitida. Pouze 1-2 % nakažených osob na tuto infekci umírá, postencefalitické potíže se projevují u 35-58 % pacientů po akutní infekci, především u starších lidí (Růžek a kol., 2010; Bogovic a kol., 2010).

Na pomezí výše popsaných typů leží TBEV-Sib, jehož průběh je středně závažný, s úmrtností kolem 3 %. Symptomy choroby jsou prakticky totožné jako u TBEV-FE a TBEV-Eu. TBEV-Sib je považován za hlavního původce chronických KE, které je schopen vyvolat u vyšších primátů i poloopic (Pogodina a kol., 1981). Dvoufázový průběh onemocnění je pozorován jen u 20 % případů (Růžek, 2015). Podrobnější charakteristice patogeneze a klinické manifestace KE bude věnována samostatná kapitola.

2.1 VKE z pohledu epidemiologie

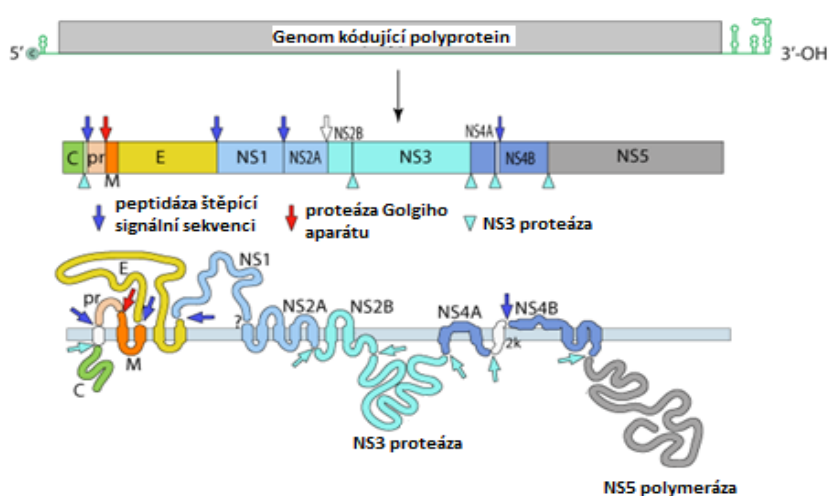
Na území Evropy byl pozorován vzrůstající trend morbidity KE, například mezi roky 1974 a 2003 byl zaznamenán nárůst nemocnosti o 400 % (Suess, 2008). Dalším pozorovaným jevem je šíření VKE směrem na sever do Skandinávie, tudíž i do vyšších nadmořských výšek (Jääskeläinen a kol., 2006; Danielová a kol., 2006). Oznámené případy infekce VKE pochází dokonce i z Norska (Csángó a kol., 2004).

Mezi lety 1990 a 2007 bylo ročně v průměru hlášeno 8 755 případů klíšťové encefalitidy na území Evropy a Ruska, což je oproti minulosti značný nárůst, neboť od roku 1976 do 1989 to bylo pouze 2 755 případů ročně. Tento vzestup může být způsoben expanzí klíšťat do nových oblastí v důsledku klimatických, sociálních a politických či dalších změn (Suess, 2008). Nicméně morbidita KE vykazuje kolísavý charakter v závislosti na čase a oblasti. Pokud se mezi sebou porovnají dvě desetiletí 1991-2000 a 2001-2010, lze pozorovat nárůst morbidity o 144 % ve střední Evropě (Česká republika, Německo, Polsko a Švýcarsko), zatímco v Pobaltí (Estonsko, Litva, Lotyšsko) byl zaznamenán pokles o 65 % (Kunze, 2012). Oproti tomu na Sibiři (25,6 milionů obyvatel) je největší incidence klíšťové encefalitidy na světě. V roce 1996 zde bylo 10 298 případů, roku 2007 se počet snížil na 3 098. Čím byl tento pokles zapříčiněn, není zcela jasné, ale s určitostí ho nelze připsat vakcinaci. Ačkoliv je v Rusku bezkonkurenčně největší počet osob postižených klíšťovou encefalitidou, tak Česká republika se řadí na přední příčky v případě incidence v Evropě. V Česku je hlášeno 400-1000 infikovaných osob s klinickými příznaky ročně (Růžek a kol., 2008). Pro porovnání v roce 2012 bylo v Evropě průměrně zaregistrováno 2 605 onemocnění, tedy na Česko připadá 15-38 % (Kunze, 2012). Obecně platí, že virulence VKE klesá od východu na západ (Gritsun, 2003 a).

2.2 Molekulární struktura VKE

Z virologického a epidemiologického hlediska se VKE řadí mezi patogeny přenášené klíšťaty, jež jsou nebezpečné zejména pro savce. V téže skupině se nachází také geneticky a antigenně příbuzné viry, zahrnující například virus Omské hemoragické horečky, virus Langat, virus hemoragické horečky Alkhurma, virus horečky Kyasanurského lesa, virus Powassan, virus Karshi, aj. (Gritsun a kol., 2003 a; Calisher, 1988). Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, flaviviry přenášené klíšťaty tvoří jeden serokomplex.

Flaviviry obecně jsou sférické viry s lipidovým obalem o velikosti 40-60 nm, jejichž genom se skládá z pozitivní jednovláknové RNA molekuly ((+)ssRNA), která v průměru dosahuje velikosti 11 kb. Na 5' konci je navázaná methylová čepička, 3' polyadenylový konec chybí (Wengler a kol., 1978). Funkčně 5' čepička slouží ke stabilizaci a translaci mRNA (Furuichi a Shatkin, 2000). RNA obsahuje pouze jeden čtecí rámec, tzv. open reading frame (ORF), kódující tři strukturální proteiny – C protein potřebný k tvorbě virové kapsidy, prekurzor membránového proteinu (prM), z něhož posttranslační úpravou vzniká membránový protein M a glykoprotein E, který se podílí na tvorbě obalu virionu. Dále je zde kódováno sedm nestrukturních proteinů – NS1 (glykoprotein, důležitý pro RNA replikaci), NS2A (funkce neznámá) a NS2B (komponent proteázy), NS3 (proteáza, helikáza, NTPáza), NS4A (nejspíše pomáhá formovat replikační komplex), NS4B (funkce neznámá) a NS5 (RNA-dependentní RNA polymeráza) (Gritsun, 2003). Oba konce genomu obsahují nekódující oblasti (Chambers a kol., 1990 a). Na Obr. 4 je zobrazeno obecné schéma uspořádání genomu, které platí pro všechny flaviviry včetně VKE.



Obr. 4: Schéma genomu flavivirů (převzato a upraveno z Hulo a kol., 2010).

K některým z výše jmenovaných virových proteinů je známo více informací. Obalový glykoprotein E je tvořen dvěma rovnocennými podjednotkami zanořujícími se do obalu virové membrány. Na vnější straně dimerů vyčnívají části glykoproteinu, na které se mohou vázat protilátky. Zbytek proteinu E je pro protilátky nepřístupný, neboť je zanořen v membráně (Rey a kol., 1995). Glykoprotein E funguje jako hlavní antigenní determinanta pro tvorbu protilátek. Transmembránová část E proteinu je důležitá pro složení obalu virionu (Orlinger a kol., 2006). Další vlastností tohoto proteinu je tvorba rekombinantních subvirových částic (RSP) s prM zanořeným do membrány váčků, k jejichž skládání dochází v endoplasmatickém retikulu (ER). Prekurzor proteinu M v tomto případě pravděpodobně plní funkci podobnou chaperonům při sbalování obalového proteinu E. Částice RSP procházejí stejnou sekreční dráhou jako nové viriony. RSP usnadnily pochopení, jakým způsobem virus opouští buňku a díky své dobré imunogenitě by mohly být využity k vakcinaci (Lorenz a kol., 2003). NS3 protein flavivirů disponuje více funkcemi, C-terminální doména vykazuje NTPázovou i helikázovou aktivitu (Wengler a Wengler., 1991). N-terminální doména NS3 proteinu v komplexu s NS2B funguje jako proteáza, která štěpí translatovaný polyprotein na jednotlivé funkční produkty (Chambers a kol., 1990 b). C-terminální doména proteinu NS5 slouží jako RNA-dependetní RNA polymeráza a oblast N-konce methyluje 5' čepičku, tedy se jedná o methyltransferázu (Egloff a kol., 2002).

Laboratorní pokusy prokázaly důležitou roli nízkého pH při vstupu a výstupu VKE z buňky (Stadler a kol., 1997). Během první fáze replikačního cyklu musí virus adherovat k cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. Této interakce se účastní glykoprotein E a příslušný buněčný receptor (Kroschewski a kol., 2003). Virus je transportován do cytoplazmy receptory zprostředkovanou endocytózou skrze membránové váčky (vchlípeniny plazmatické membrány). Nízké pH uvnitř endozomu mění konformaci glykoproteinů E z dimerů na trimery. Tím dojde k fúzi obalové membrány viru s membránou endozomu, což má za následek uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy, kde následuje její rozpadnutí a uvolnění virové RNA. Tyto procesy iniciují replikaci virového genomu. Jelikož virová RNA je ss pozitivní polarity, může ihned sloužit jako templát pro translaci virového polyproteinu pomocí ribozomů buňky (Mansfield a kol., 2009). Nově nasyntetizované polyproteiny jsou štěpeny na jednotlivé funkční proteiny prostřednictvím virových i buněčných proteáz. Virový protein NS5 (RNA-dependetní RNA polymeráza)

komplementárně přepisuje (+)ssRNA viru na negativní kopii genomu ((-)ssRNA), která slouží jako předloha pro nové kopie virového genomu (Chu a Westaway, 1985). Během syntézy polyproteinů jsou povrchové bílkoviny prM a E translokovány do lumen ER a posttranslačně upraveny proteázou hostitelské buňky na jednotlivé produkty. Na cytoplasmatické straně ER vznikají nové nukleokapsidy skládáním kapsomer (C proteinů) s virovou RNA. Nukleokapsidy pučí do lumen ER a při tomto procesu získávají membránový obal se zakomponovanými povrchovými proteiny prM a E (Chambers a kol., 1990 a). Na konci tohoto procesu vznikají nezralé viriony, obsahující na svém povrchu heterodimery složené z prM a E, které jsou neinfekční (Lorenz a kol., 2002; Elshuber a kol., 2003). Nezralé viriony jsou poté transportovány pomocí vnitřní sekretorické dráhy buňky k vnitřní straně cytoplasmatické membrány. V kyselém prostředí vezikulu trans-Golgiho aparátu hostitelská proteáza furin štěpí prM na protein M, což vede k maturaci viru (Stadler a kol., 1997). Tato úprava tedy podmiňuje vznik zralých virionů, kteří na svém povrchu obsahují proteiny M a homodimery proteinu E. Infekční zralé viriony jsou uvolňovány po fúzi transportního vezikulu s cytoplasmatickou membránou, tzv. exocytózou (Wengler a Wengler, 1989).

2.3 Patogeneze KE

Nejvíce infekcí VKE se objevuje po kousnutí klíštětem, méně často pak po konzumaci nepasterizovaného mléka z infikovaného zvířete (Dumpis a kol., 1999). Při infekci klíštětem se nejprve virus replikuje v místě inokulace a místních spádových uzlinách lymfatického systému (Albrecht, 1968). VKE byl objeven také v Langerhansových buňkách epidermis, které nejspíše využívá k expanzi do lymfatických uzlin. Pomnožení viru v těchto místech vede ke vzniku tzv. primární virémie, během níž je infikováno mnoho extraneurálních tkání. Samostatná primární virémie přetrvává pouze pár dní. Skrze lymfatické cévy jsou viriony transportovány do krevního řečiště. Hematogenní rozsev VKE umožňuje infekci dalších orgánů, především retikuloendoteliálního systému (slezina, játra, kostní dřeň), rozvíjí se sekundární virémie. Primární a sekundární virémie se částečně překrývají (Haglund a Günther, 2003). K překonání hematoencefalické bariéry může dojít v obou fázích virémie, což má za následek napadení centrálního nervového systému (CNS), kde virová replikace způsobuje zánět, cytolýzu neuronů a jejich dysfunkci (Dumpis a kol., 1999). Infekce CNS byla

u lidí dobře zdokumentována, nicméně doposud není zcela uspokojivě popsán mechanismus, jak se z akutní non-fatální infekce stává život ohrožující až letální stav (Toporkova a kol., 2008).

Většina „wild-type“ kmenů VKE způsobuje při experimentální inokulaci (intrakraniálně či periferně) typickou neuropatogenezi, která obvykle končí smrtí zvířete. V některých případech dochází k persistenci viru, jejímž následkem jsou postupné degenerativní změny v CNS. Histologicky lze pozorovat neuronofágii, zřetelnou proliferaci gliových buněk a granulomy spojené s encefalitidou (Mandl, 2005).

2.4 Klinická manifestace KE

Klinická manifestace KE byla již v medicíně velmi dobře zdokumentována a zahrnuje poměrně širokou škálu symptomů. Některé příznaky mohou být především pro laiky nepříznivě zavádějící, protože připomínají chřipku. Obzvláště v České republice bývá termín chřipka čteně zaměňován s běžným nachlazením, tudíž ze skutečné chřipky lidé nemají obavu. Základní charakteristika průběhu onemocnění již byla naznačena ke konci kapitoly 2. Prakticky veškeré infekce lze základně rozdělit na akutní či chronické a není tomu jinak ani v případě KE.

Akutní KE charakteristicky doprovází encefalické symptomy zhruba u poloviny pacientů (Haglund a Günther, 2003). Rozmezí příznaků počíná lehčí meningitidou konče velmi těžkou meningioencefalomyelitidou (zánět mozkových blan, mozku a míchy), která se rozvíjí po remisi horečky (5-10 dní). U těžce zasažených pacientů mohou nastat změny vědomí a symptomy připomínající postpoliomyelitický syndrom. Akutní febrilní stav během první fáze (1-7 dní) je způsoben přítomností VKE v krvi (virémie), poté následuje asymptomatické období (2-10 dnů). Druhá fáze koreluje s překonáním hematoencefalické bariéry a invazí do CNS (Kleiter a kol., 2007; Gritsun a kol., 2003 a). Pomocí moderních zobrazovacích technik, například magnetické resonance (MRI), lze pozorovat léze v daných oblastech mozku (Marjelund a kol., 2004).

Chronická forma KE bývá spojována s infekcí VKE sibiřského subtypu a dělí se na dvě podformy. U první varianty se jedná o následky akutní fáze, které se mohou vyvinout až po letech od klíštěcího kousnutí. Postižené osoby trpí Koževnikovo epilepsií, progresivní

neuritidou plexu ramen, laterální a disperzní sklerózou, syndromem připomínajícím Parkinsonovu chorobu a postupující atrofii svalů. Fyzické poškození těla často doprovází i duševní poškození, případně smrt. Druhá forma chronické KE je typická hyperkinezi a epileptoidním syndromem. Hyperkineze se objevuje opakovaně, v průběhu akutní fáze KE se může frekvence zvýšit, nebo přetrvává v podobě Koževnikovo epilepsie (Gritsun a kol., 2003 b).

2.5 Imunitní odpověď hostitele na VKE

Krátce po objevení se neurologických symptomů (míněno u člověka), lze v cerebrospinální tekutině (CSF) pozorovat leukocytózu. Leukocyty jsou především zastoupeny CD4+ T-lymfocyty, v menším množství pak CD8+ T-lymfocyty. Dále se zde vyskytuje malý počet B-lymfocytů a NK buněk (Holub a kol., 2002). V době pozorování neuroinfekce jsou detekovatelné VKE specifické protilátky v CSF i krevním séru. Hladina protilátek třídy IgM dosahuje maximální hodnoty kolem třetího týdne od počátku neurologických příznaků, zatímco protilátky třídy IgG se tvoří se zpožděním, s maximem kolem šestého týdne (Günther a kol., 1997). Po prodělání infekce lze IgM protilátky detekovat po dobu několika měsíců, oproti tomu IgG perzistují po celý život jedince a poskytují ochranu při reinfekci (Holzmann, 2003).

Nedávné práce zkoumaly roli virových proteinů v odpovědi imunitního systému hostitele proti VKE. NS5 protein funguje jako antagonist interferonu a je schopen inhibovat interferony stimulovanou signalizaci JAK-STAT dráhy tím, že zablokuje fosforylaci STAT1. Výsledně nemohou být exprimovány geny zajišťující antivirovou obranu (Best a kol., 2005; Werme a kol., 2008). Mnohé výzkumy identifikovaly určité cytokiny v séru a CSF pacientů s KE, které mají klíčovou roli pro vznik zánětu. Pacienti měli zvýšené hodnoty tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukinu 1 (IL-1) a interleukinu 6 (IL-6) v séru. TNF- α a IL-1 působí synergicky na mediátory zánětlivé reakce, jinými slovy podporují vznik zánětu. Úroveň hladiny těchto cytokinů klesá během prvního týdne hospitalizace (pacienti bývají přijati do nemocnice po objevení se neurologických symptomů), v důsledku zvýšení IL-10 (inhibitor syntézy cytokinů) (Atrasheuskaya a kol., 2003). V CSF byl zaznamenán pouze

drobný nárůst hladiny interferonu γ (IFN- γ) v porovnání s jinými virovými infekcemi, jako například u viru herpes simplex 2, kde je IFN- γ výrazně upregulován (Glimåker a kol., 1994).

Rozvoj imunitní odpovědi hostitele v mozkové tkáni však přispívá k destrukci neuronů. Z tohoto úhlu pohledu KE spadá také do imunopatologických chorob. V průběhu zánětlivé reakce CD8+ T-lymfocyty poškozují neurony, což může mít pro pacienta fatální důsledky (Růžek a kol., 2009).

2.6 Laboratorní diagnostika VKE

Klinické symptomy KE sdílí i jiné neurologické choroby, například encefalitida zapříčiněná herpesviry. Z tohoto důvodu musí klinik k diagnóze využít také laboratorní vyšetření (Holzmann, 2003). V dnešní době lze již diagnózu určit ante mortem (sérum, CSF) i post mortem (tkáň) různými laboratorními technikami. Mezi metody zahrnující izolaci a průkaz virové RNA patří PCR techniky, které dokáží prokázat přítomnost viru ještě před pozorováním neurologických příznaků, jmenovitě: kvantitativní RT-PCR (průkaz přítomnosti VKE a změření virové nálože) a multiplex RT-PCR (určení subtypu VKE) (Saksida a kol., 2005; Růžek a kol., 2007; Schwaiger a Cassinotti, 2003). Rozvoj humorální imunitní odpovědi umožňuje stanovit VKE detekcí specifických protilátek (třída IgM a IgG). Většina laboratoří dnes využívá metodu ELISA. V krvi lze prokázat VKE specifické protilátky třídy IgM po objevení se nespecifických symptomů, tedy až po uplynutí inkubační doby (4-28 dní). V CSF se protilátky třídy IgM tvoří zhruba s týdenním zpožděním. Hladina protilátek třídy IgM se začne po šesti týdnech snižovat v séru i CSF. Na druhou stranu VKE specifické protilátky třídy IgG dosahují maxima právě v oněch šesti týdnech (Günther a kol., 1997). Imunochemické metody mají však svá úskalí, například v Japonsku může být VKE zaměněn kvůli zkřížené reaktivitě s virem Japonské encefalitidy při serologických testech a totožných symptomech onemocnění (Takashima a kol., 1997).

2.7 Možnosti léčby KE a vakcinace proti VKE

Veškerá snaha o cílenou léčbu KE byla doposud marná. Jedinou možností, jak pacientům ulevit, je symptomatická a podpůrná léčba, zahrnující paracetamol, aspirin

anebo další nesteroidní protizánětlivé látky. V některých těžkých případech lékaři indikují kortikosteroidy, navzdory nespecifickým a vedlejším účinkům. Součástí léčby je udržování homeostáze a dostatečná hydratace pacienta. Pacienti s těžkou infekcí CNS jsou důkladně monitorováni. Při rapidním rozvoji kóma či neuromuskulární paralýzy je nutná okamžitá intubace a podání nitrožilní výživy (Dumpis a kol., 1999).

Jediná spolehlivá obrana před KE je prevence ve formě aktivní vakcinace, která poskytuje ochranu proti všem kmenům VKE se spolehlivostí až 99 % (Heinz a kol., 2007). Momentálně je na trhu dostupných hned několik vakcín obsahujících inaktivovaný virus VKE. Jedná se o rakouské vakcíny FSME-IMMUN a FSME-IMMUN Junior od firmy Baxter, německé Encepur Adults a Encepur Children (firma Novartis) a dvě ruské. Evropské vakcíny jsou vyráběny z kmenů Neudorfel (Rakousko) a K23 (Německo), zatímco ruské využívají VKE dálněvýchodního typu, konkrétně kmen 205 a Sofjin (Charrel a kol., 2004; Leonova a kol., 2007).

3. Antivirotika

Retrospektivním pohledem napříč lidskou civilizací byla příčinou úmrtí miliónů lidí po celém světě virová onemocnění, což vedlo k naléhavé potřebě nalézt nějakou obranu vůči těmto intracelulárním parazitům (De Clercq, 2004). První úspěch antivirové léčby nastal roku 1963, kdy bylo oficiálně představeno vůbec první antivirotikum – idoxuridin (De Clercq, 1997). Léky, které vykazují účinnost proti virovým onemocněním, se obecně nazývají antivirotika. Od té doby byly objeveny či záměrně vyvinuty mnohé antivirotické látky pro klinické potřeby. Mezi lety 1963 a 2016 bylo formálně schváleno pouze 90 antivirotik k léčbě 9 infekčních onemocnění, navzdory tomu, že v odborné literatuře bylo navrženo tisíce různých látek schopných inhibice virové replikace (De Clercq a Li, 2016).

Schválená antivirotika mohou být rozdělena do tří skupin podle toho, kterou část replikačního cyklu viru inhibují (viz Tab. 1). Antivirové léky ovlivňující penetraci působí na procesy spojené s průnikem virionu do buňky, jako je adsorpce viru na povrch hostitelské buňky, inhibice endocytózy či uvolnění virové RNA do cytoplazmy. Antivirotika inhibující replikační proces působí na syntézu virové mRNA a integraci virového genomu do genomu

hostitelské buňky. Poslední skupina antivirotik zabraňuje vyplavení nových virionů, a to buď blokadou jejich sestavení, nebo opuštění z hostitelské buňky (Švihovec a kol., 2018).

Tab. 1: Replikace viru a mechanismus účinku protivirotických léků (Švihovec a kol., 2018).

Penetrace	penetrace a přilnutí	inhibice receptoru	enfuvirtid, maravirok
		imunoglobuliny	IgG
	odpláštění	inhibice kanálového M2 proteinu	amantadin
Replikace	inhibice transkripce a translace	antisense oligonukleotid	fomivirsen
		inhibice DNA/RNA syntézy	ribavirin
		inhibice DNA polymerázy	aciklovir, lamivudin
		inhibice reverzní transkriptázy	zidovudin, abakavir
		inhibice integráz	raltegravir, dolutegavir
		inhibice translace virové mRNA	interferony
	inhibice posttranslačních kroků	inhibice proteáz	ritonavir, lopinavir
	léčiva u onemocnění HCV	nová přímo působící antivirotika (*)	simeprevir, sofosbuvir
nepřímo působící antivirotika		interferony, ribavirin	
Vyplavení	inhibice neuraminidáz		zanamivir, oseltamivir

*Inhibitory NS3/4A proteáz, NS5B nukleosidové inhibitory RNA polymerázy, inhibitory proteinu NS5A

Významnou osobností při objevu nových antivirových léků byl český chemik prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc. (*1936 – †2012), jeden z předních přírodovědců 20. století. Díky tomuto muži je dnes známá celá řada antivirových léků užívaných k léčbě HIV/AIDS, hepatitidy B a virů herpes simplex.



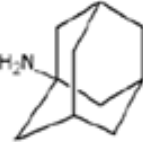
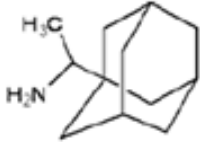
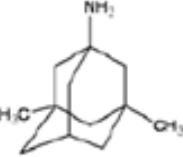

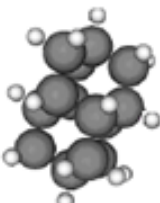

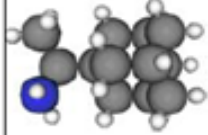
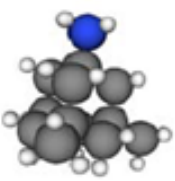
3.1 Adamantan a jeho deriváty

V současnosti je na trhu k dispozici celá řada antivirových léků. Nicméně boj s virovými infekcemi a hledání vhodných léků, s minimálními vedlejšími účinky, zůstává stále výzvou na poli biologie, chemie, farmacie i medicíny. Hlavními problémy v antivirotické terapii jsou

rychlá mutace virů a nesprávné zacházení s léky, které vedou ke vzniku lékových resistencí (Basarić a kol., 2014).

Adamantan patří mezi skupinu látek zvanou diamantoidy a též je základním zástupcem těchto sloučenin. Objeven byl roku 1933 v hodonínské ropě chemiky Landou a Macháčkem (Fort a Schleyer, 1964). Adamantan je vysoce stabilní, symetrický tricyklický hydrokarbon s židličkovou konformací cyklohexanu (viz Tab. 2), systematicky pojmenován tricyklo[3.3.1.1.^{3,7}]dekan. Z makroskopického hlediska se jedná o bezbarvou látku tvořící krystalky se zápachem kafru (Mansoori, 2007).

Tab. 2: Sumární vzorec a 3D struktura adamantanu, diamantanu, amantadinu, rimantadinu a memantinu (zapůjčeno a upraveno z: Xue a Mansoori, 2010).

Adamantan	Diamantan	Amantadin	Rimantadin	Memantin
$C_{10}H_{16}$	$C_{14}H_{20}$	$C_{10}H_{17}N$	$C_{11}H_{20}N$	$C_{12}H_{21}N$
				
				

Adamantan a diamantan jsou nejjednoduššími diamantoidy. Díky svým vazebným místům (šest a více) našly využití především jako stavební bloky v nanotechnologii, polymerní chemii, farmacii, aj. Amantadin a rimantadin jsou deriváty adamantanu používané k antivirotické léčbě (Xue a Mansoori, 2010). Memantin bývá indikován pacientům s Alzheimerovým syndromem (Reisberg a kol., 2003).

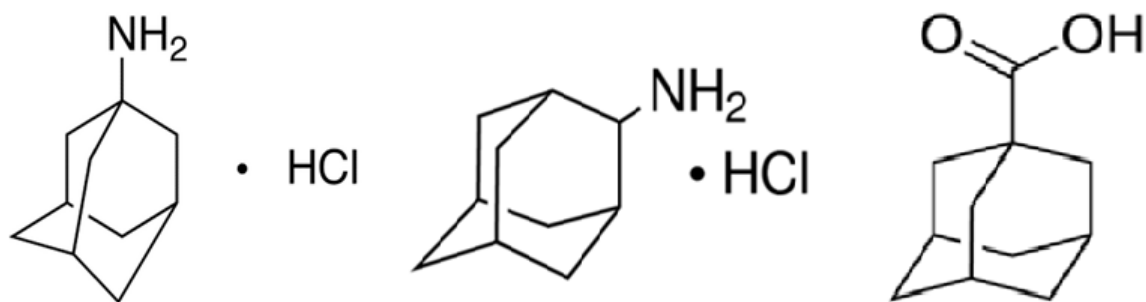
Ve farmakologickém průmyslu si deriváty adamantanu získaly značnou pozornost svými unikátními vlastnostmi. Struktura adamantanového motivu zvyšuje hydrofobitu, čímž jim usnadňuje translokaci přes fosfolipidové membrány buněk. (Papanastasiou a kol.,

2014). Deriváty adamantanu mají širokou farmakologickou aktivitu, například antibakteriální (Aigami a kol., 1975), antimykotickou (Kadi a kol., 2007), antivirotickou (Kolocouris a kol., 1994), trypanocidní (Papanastasiou a kol., 2008), atd. V literatuře je uvedeno, že v některých případech přítomnost adamantanového skeletu dokonce zvyšuje účinnost léčiva a zároveň snižuje jeho toxicitu (Zurabishvili a kol., 2011).

Amantadin a rimantadin byli v minulosti indikováni při léčbě chřipky typu A. Na trhu jsou tyto látky distribuované pod svým licenčním označením Symmetrel® a Flumadin®. Dle dostupné literatury byla cílová struktura těchto léků zdokumentována pouze u chřipky, kde účinkovaly jako blokátory M2 iontových kanálů, které jsou důležité pro sloučení virové membrány s membránou buňky. Nicméně v dnešní době se již aplikace nedoporučuje, neboť došlo k mutaci genu kódující M2 kanály. Kvůli této změně ve struktuře M2 proteinu se již amantadin a rimantadin nejsou schopni na M2 kanály vázat. Jinými slovy virus chřipky typu A se stal vůči těmto lékům resistantní. Navíc u některých pacientů byly pozorovány vážné gastrointestinální a neurologické vedlejší účinky (Rosenberg a Casarotto, 2010; Eyer a Hruška, 2013). Ačkoli je amantadin primárně antivirotikum, byl u něj také zjištěn pozitivní účinek při léčbě Parkinsonovy choroby (Chakrabarti a kol., 1976) – přesný mechanismus účinku v tomto případě není známý (Švihovec a kol., 2018).

Po perorálním podání se amantadin snadno absorbuje z gastrointestinálního traktu. Více než polovina léku je navázána na bílkoviny krevní plazmy a menší množství se váže ve svalové tkáni. Více než 90 % dávky je vyloučeno v nezměněném stavu renální filtrací, pouze 5-10 % podléhá acetylaci. Biologický poločas představuje 9-15 hodin, u starších osob 24-29 hodin. Dochází také k exkreci do mateřského mléka (Švihovec a kol., 2018).

V této práci byl zkoumán účinek amantadinu, 2-aminoadamantan hydrochloridu a kyseliny adamantankarboxylové (viz Obr. 5).



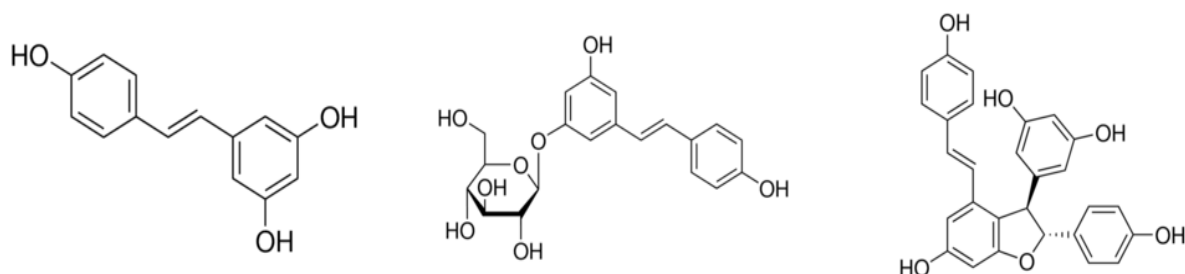
Obr. 5: Strukturální vzorce derivátů adamantanu použitých v této práci. Zleva: amantadin, 2-aminoadamantan hydrochlorid, kyselina adamantankarboxylová (obrázky byly převzaty z webových stránek distributora SIGMA-ALDRICH®, <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>).

3.2 Stilbeny

Plody vinné révy obsahují mnoho sekundárních metabolitů. Zejména obsažení polyfenolů je po kvantitativní i kvalitativní stránce značné. Jedná se o flavonoidy a ne-flavonoidy (fenolové kyseliny, lignany a stilbeny) (Flamini, 2003). Různorodost těchto fytochemikálií je závislá na odrůdě vinné révy, okolním prostředí a způsobu pěstování. Mimo přímého dopadu na kvalitu hroznů, mají tyto látky také pozitivní účinky na lidské zdraví. Z tohoto důvodu jsou vinné extrakty využívány ve farmaceutickém, potravinovém a nutričním průmyslu (He a Giusti, 2010).

Stilbeny jsou fytoalexiny (nízkomolekulární antimikrobiální látky, syntetizovány v rostlině při infekci) přirozeně se vyskytující v požitelných rostlinách, kupříkladu v borůvkách, zelenině či oříšcích, avšak nejznámější jsou u vinné révy (*Vitis vinifera*) (Li a kol., 2013; Manach a kol., 2004). Obecně platí, že jejich obsah se zvyšuje během dozrávání, avšak každý druh *V. vinifera* syntetizuje jiné množství (Gatto a kol., 2008). Tyto sloučeniny, především resveratrol, jsou včetně ostatních polyfenolů považovány za zdraví prospěšné při konzumaci vína (nápoje). Mezi hlavní stilbeny vinné révy patří cis- a trans-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben), piceid (resveratrol-3-O-β-D-glukopyranosid), piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilben) a viniferin (dimer resveratrolu). Glykosylace stilbenů je klíčová pro prodloužení biologické poločasu v buňkách, antimykotickou aktivitu a ochranu

před oxidací (Bavaresco a kol., 2002; Vitrac a kol., 2005). Pro tuto práci byl důležitý resveratrol, piceid a ϵ -viniferin (viz Obr. 6) při *in vivo* testech na pokusných myších.



Obr. 6: Strukturní vzorce stilbenů použitých v této práci. Zleva: resveratrol, piceid a ϵ -viniferin (obrázky byly převzaty z webových stránek distributora SIGMA-ALDRICH®, <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>).

Z biologického hlediska byl doposud nejlépe prostudován resveratrol, z tohoto titulu bude blíže popsán v následujících odstavcích. Přírodně se vyskytuje ve formě *cis*- a *trans*-izomerů. Nicméně *cis*-resveratrol je velmi nestabilní a po působení světla dochází k přesmyku na jeho *trans*-formu. Tuto látku lze rozpustit ve vodě jen ve velmi omezeném množství, na druhou stranu v polárních rozpouštědlech jako etanol či dimethyl sulfoxid (DMSO) se rozpouští lépe. (Pandey a Rizvi, 2009). Předchozí studie naznačily až zázračné účinky resveratrolu – prodloužení délky života (u myší), regulace hladiny lipidů, profylaxe tumorů a virových infekcí (Shankar a Srivastava, 2007). Resveratrol působí také jako antioxidant, neboť vychytává volné kyslíkové radikály (Gülçin, 2010).

Biodostupnost resveratrolu v ovoci je poměrně nízká kvůli omezené rozpustnosti ve vodě. Avšak při konzumaci vína (nápoje) se jeho plasmatická hladina zvýší díky lepší rozpustnosti v etanolu. Biologický poločas je pak prodloužen vazbou na albumin (Weiskirschen a Weiskirschen, 2016). Játra vychytávají resveratrol z krve, kde je biotransformován na glukuronidy (Wenzel a Somoza, 2005). Potraviny obsahující resveratrol tedy dokáží jeho koncentraci v plazmě ovlivnit, záleží však na druhu potraviny a úrovně metabolismu jedince (Gambini a kol., 2015).

Resveratrol může indukovat apoptózu pomocí upregulace nebo downregulace celé řady genů zodpovídajících za buněčný cyklus. V případě některých buněčných linií byla pozorována inhibice proliferace v G1 a G1/S fázi. Protizánětlivá funkce spočívá v inhibici aktivity jaderného faktoru kappa B (NF-κB), cyklooxygenázy 2 a tím produkci prostaglandinů (Shankar a Srivastava, 2007; Gambini a kol., 2015). Antivirotická aktivita byla demonstrována proti mnoha lidským i zvířecím virům. Většina studií se shoduje, že antioxidační efekt resveratrolu nemá přímý vliv na virovou replikaci, více je kladen důraz na inhibici syntézy virových proteinů či penetraci virionu do hostitelské buňky (Campagna a Rivas, 2010; Yang a kol., 2015).

Piceid, neboli méně často užívaný název polydatin, je hned po resveratrolu druhým nejvíce obsaženým stilbenem ve *V. vinifera* (Romero-Pérez a kol., 1999). Stejně jako resveratrol, i piceid vykazuje mnohé zdraví prospěšné účinky. Byl u něj pozorován neuroprotektivní efekt v důsledku snížení oxidativního stresu (Gao a kol., 2016), antibakteriální a protizánětlivý vliv. Při pokusech bylo zjištěno, že na bakterie účinkuje bakteriostaticky. Zánětlivá reakce je mírněna snížením aktivace drah Toll-like receptorů 2 a NF-κB (Jiang a kol., 2017).

ε-viniferin taktéž vykazuje biologickou aktivitu. V posledních letech byl zkoumán jako potencionální lék proti rotavirové enteritidě (akutní průjemové onemocnění). Průjem vzniká kvůli nadměrnému otevření chloridových kanálů střevního epitelu, čímž dochází ke ztrátám vody a tvorbě sekretu. ε-viniferin je schopen tyto kanály uzavřít (Yu a kol., 2018). Další účinky jsou podobné jako u piceidu a resveratrolu.

4 Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zdali vybrané látky z řad diamantoidů a stilbenů dokáží inhibovat replikaci VKE *in vivo*. Tento cíl zprvu zahrnoval seznámení se s problematikou týkající se VKE a osvojení si zásad sterilní práce v prostředí laboratoře s režimem BSL-2. Dalším krokem byla manipulace s buněčnými liniemi, VKE a pokusnými myši. Provedení vlastních pokusů lze rozdělit do následujících bodů.

Práce s vybranými deriváty adamantanu:

- Otestovat, při které koncentraci vybrané deriváty adamantanu způsobí cytopatický efekt (LC_{50}) u zvolených buněčných linií pomocí MTT testu.
- Zjistit, zdali vybrané deriváty adamantanu zmírní či zcela zabraní poškození vybraných buněčných linií kultivovaných spolu s VKE a určit, zdali látky mají profylaktický či terapeutický účinek.
- V případě slibných výsledků z *in vitro* testů na buněčných liniích přikročit k *in vivo* pokusům na laboratorních myších.

Práce s vybranými stilbeny:

- Navázat na bakalářskou (Mašková, 2016) a diplomovou práci (Mašková, 2018), kde autorka již základní *in vitro* pokusy na buněčných liniích provedla. Zahájit *in vivo* testy na pokusných myších s vybranými stilbeny o určité koncentraci a sledovat délku přežití.

5 Materiály a metody

5.1 Buněčné linie

Pro základní výzkum cytotoxicity látek a následující pokusy s VKE byly použity následující buněčné linie: medulloblastomová (DAOY HTB-186), neuroblastomová (SK-N-SH) a glioblastomová linie (U373). Byly vybrány linie neurálního původu, protože právě tyto VKE napadá a nejvíce poškozuje.

Buněčné linie byly kultivovány v jedné vrstvě v kultivačních lahvích při 37 °C s 5 % CO₂ atmosférou. DAOY HTB-186 a SK-N-SH byly kultivovány v živném médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) od firmy Biosera, zatímco U373 v IMDM médiu (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) od firmy Lonza. Pro kultivaci se používala média s obsahem 10 % BOFES (bovine fetal serum), 1 % L-glutamin a 1 % směs antibiotik: penicilin G (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) – vše od firmy Biowest. Všechny buněčné linie byly pasážovány dvakrát týdně pomocí trypsinu (0,02 % trypsin + 0,02 % EDTA v PBS). Jakákoliv manipulace s buněčnými liniemi byla prováděna v aseptickém prostředí laminárního boxu, který byl vždy dezinfikován 70 % etanolem a vysvícen 20 minut UV světlem.

Plakové titrace byly provedeny s buňkami PS (porcine kidney stable) pocházejících z prasečí ledviny. Tato buněčná linie byla kultivována při 37 °C v L-15 médiu (Leibovitz's L-15 Medium) s obsahem 3 % PTS (prekolostrální telecí sérum), 1 % směs antibiotik: penicilin G (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) a 1 % L-glutamin – vše od firmy Biowest. Pro plakové titrace byly použity tyto buňky, protože již byly osvědčenou a zavedenou součástí této metody.

5.2 Příprava roztoků vybraných derivátů adamantanu

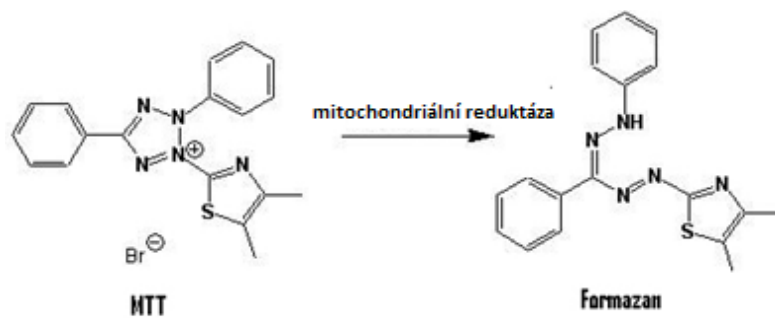
Na výše popsaných buněčných liniích byla nejprve zkoumána cytotoxicita u vybraných derivátů adamantanu – amantadin hydrochlorid, 2-aminoadamantan hydrochlorid a kyselina adamantankarboxylová. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 20 mg dané látky v 1 ml 100 % DMSO (Lachner) a rozaliquován. Jednotlivé alikvóty byly uchovávány při -80 °C, ze kterých byly pro každý pokus připraveny čerstvé roztoky s příslušným médiem o požadované koncentraci. V první sérii pokusů byla koncentrace

látek 500 ng/ml a dále ředěna dvojkovou řadou do 3,9 ng/ml s konstantní koncentrací 0,0025 % DMSO. V druhé sérii byla koncentrace navýšena na 100 µg/ml a taktéž ředěna dvojkovou řadou do 0,78 µg/ml s konstantní koncentrací 0,5 % DMSO. V obou sériích tedy bylo celkem 8 roztoků o různé koncentraci od každé látky. Před aplikací byly roztoky přefiltrovány přes mikrofiltr s póry o velikosti 0,22 µm.

5.3 Ověření cytotoxicity u vybraných derivátů adamantanu

První den byly buňky nasazeny ve 100 µl média na 96-jamkový panel, určený pro buněčné kultury, s ohledem na jejich velikost a rychlost dělení. Na základě pokusů byla stanovena koncentrace $7 \cdot 10^4$ buněk/ml u DAOY HTB-186 a U373. V případě SK-N-SH byla koncentrace $25 \cdot 10^4$ buněk/ml. Množství buněk obsažených v 1 ml zásobní suspenze bylo určeno pomocí 0,5 % trypanové modře a Bürkerovy komůrky. Po napipetování do panelu byly buňky ponechány přes noc adherovat ke dnu jamek při 37 °C s 5 % CO₂ atmosférou. Následující den bylo ke 100 µl média s buňkami přidáno 100 µl čerstvého média s deriváty adamantanu tak, aby výsledná koncentrace v jamkách byla od 500 ng/ml (v druhé sérii 100 µg/ml) a dále dvojkovou řadou do 3,9 ng/ml (v druhé sérii 0,78 µg/ml). V každé jamce bylo 0,0025 % DMSO (u druhé série 0,5 % DMSO). Jako negativní kontrola sloužily buňky ošetřené médiem s obsahem 0,0025 % DMSO (u druhé série 0,5 % DMSO). Všechny koncentrace od každé látky byly testovány v triplikátech, stejně tak v triplikátu byla i negativní kontrola. Jako BLANK byly nasazené buňky, jež byly usmrceny 50 % DMSO (také v triplikátu). Po změření byla průměrná hodnota absorbance BLANKu odečtena od všech ostatních naměřených absorbancí.

Po čtyřech dnech od ošetření látkami byla měřena viabilita buněk pomocí MTT testu. Tato metoda byla vyvinuta pro velmi rychlé určení růstu a životaschopnosti savčích buněk (Denizot a Lang, 1986). Principem metody je redukce rozpustného MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na ve vodě nerozpustné krystalky formazanu mitochondriálním dýchacím řetězcem a dalšími elektron-transportními systémy uvnitř buněk (viz Obr. 7). Množství formazanu je posléze možné spektrofotometricky analyzovat, čímž je určen relativní počet živých buněk ve vzorku. Tento test bývá obvykle používán pro měření cytotoxicity či buněčné proliferace (Siewerts a kol., 1995).



Obr. 7: Schéma přeměny rozpustného MTT na formazan pomocí mitochondriální reductázy (Brescia a Banks, 2009).

MTT byl zakoupen od firmy SIGMA-ALDRICH®. Do každé jamky se vzorky bylo přidáno 10 μ l roztoku MTT o koncentraci 5 mg/ml ve sterilním PBS (0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH= 7,4) a ponecháno v inkubátoru 2 hodiny. Poté byl obsah jamek odsán a nahrazen 100 μ l 100 % DMSO. Před vlastním měřením byl panel (překrytý alobalem) umístěn 15 minut na třepačku, aby se formazan v DMSO řádně rozpustil. Následně byla změřena absorbance pomocí přístroje Synergy H1 microplate reader (Biotek) při 570 nm s použitím programu Gen 5 (Biotek). Hodnoty absorbance triplikátů byly zprůměrovány a porovnány vůči negativní kontrole.

5.4 Plaková titrace

Pro infekci buněčných linií byl zvolen jeden z více virulentních kmenů evropského typu – Hypr (Wallner a kol., 1996). Virus byl obdržen ve formě mozkového homogenátu. Alikvóty homogenátu byly skladovány při -80 °C, z nichž se připravovaly virové suspenze pro testy. Tyto pracovní suspenze nesměly být použity více jak třikrát, neboť při každém rozmrazení se lehce snižoval titer viru.

Koncentrace pracovních virových suspenzí byla zjišťována metodou plakové titrace. Touto metodou lze určit počet virových částic v 1 ml vzorku, respektive počet plakovitých jednotek (PFU – plaque forming units) na 1 ml (de Madrid a Porterfield, 1969). Tento test byl uskutečněn s buněčnou linií PS (porcine kidney stable). Testovaný vzorek virové suspenze byl naředěn desítkovou řadou v L-15 médiu (Leibovitz L-15

Medium), obsahujícího 3 % PTS (prekolostrální telecí sérum), směs 1 % antibiotik (penicilin G (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml)) a 1 % L-glutamin. Takto připravené vzorky byly napipetovány do 24-jamkového panelu a k nim bylo přidáno 300 µl suspenze PS buněk o koncentraci $3 \cdot 10^5$ buněk/ml. Poté byly panely inkubovány 4 hodiny při 37 °C v 0,5 % CO₂ atmosféře. Následně bylo aplikováno celkem 400 µl roztoku složeného z 1,5 % karboxymethylcelulózy (CMC) v L-15 médiu s přidavkem 3 % PTS, 1 % antibiotik a 1 % L-glutaminu a opět inkubováno při 37 °C v 0,5 % CO₂ atmosféře po dobu 5 dní. Roztok CMC fungoval jako pokrývka izolující jednotlivá infikovaná místa.

Po 5 dnech byly plaky zviditelněny pomocí barvení. Panel byl promyt 0,9 % NaCl a obarven naftalenovou černí (1 g naftalenové černi; 62,5 ml 96 % kyseliny octové; 13,6 g octanu sodného, doplněno na 1 l destilované vody). Po uplynutí 45-60 minut se panely propláchly vodou, nechaly uschnout a jednotlivé plaky mohly být odečteny. Plaky (neobarvená místa) vznikly cytolýzou v důsledku virové replikace, pozadí tvořily obarvené buňky. V závislosti na ředění bylo dopočítáno množství PFU/ml v původním vzorku.

Stejným postupem byla měřena koncentrace virových částic uvolněných do média odebraného po třech dnech kultivace buněk s vybranými deriváty adamantanu a VKE, tak jak je popsáno v kapitole 5.6.

5.5 Ověření antivirotického účinku u vybraných derivátů adamantanu na přežívání buněk infikovaných VKE

V těchto testech bylo zkoumáno, zdali vybrané deriváty adamantanu dokáží úplně, nebo alespoň částečně zabránit poškození neuronů. Látky byly aplikovány ve třech variantách: I. VKE současně s látkami; II. Látky, den poté VKE; III. VKE, den poté látky. Účelem těchto variant bylo zjistit, jestli mají substance profylaktický či terapeutický efekt. Na základě přechozích pokusů bylo pracováno s koncentracemi látek 100 µg/ml a dále dvojkovým ředěním až do 0,78 µg/ml.

Tab. 3: Schéma jednotlivých variant pokusů infekce a aplikace derivátů adamantanu.

Varianta	1. den	2. den	3. den	4. den	5. den	6. den
I.	nasazení b.	látky + infekce	inkubace	inkubace	MTT	-
II.	nasazení b.	látky	infekce	inkubace	inkubace	MTT
III.	nasazení b.	infekce	látky	inkubace	inkubace	MTT

První den pracovního postupu byl u všech variant stejný. Buněčné linie byly nasazeny na 96-jamkový panel, jak je popsáno v kapitole 6.3. Hlavní rozdíl mezi variantami se odehrál 2. a 3. den (červený rámeček).

I. Varianta (VKE současně s látkami): V tomto testu byly druhý den k nasazeným buňkám přidány ve 100 μ l média látky a také virus (kmen Hypr) v koncentraci 1 MOI (multiplicity of infection, neboli 1 virion na 1 buňku). Panel s látkami a infekcí byl poté inkubován 2 hodiny při 37 °C v 5 % CO₂ atmosféře. Následně byl obsah jamek šetrně odebrán a promyt 200 μ l sterilního PBS. Po odsátí PBS bylo k buňkám přidáno 200 μ l média s látkami o požadované koncentraci a opět inkubováno. Pátý den byly triplikáty změřeny MTT testem.

II. Varianta (látky, den poté VKE): V tomto případě bylo druhý den k buňkám přidáno 100 μ l média s látkami o výsledné koncentraci od 100 μ g/ml do 0,78 μ g/ml a ponecháno 24 h inkubovat. Třetí den byly buněčné linie infikovány kmenem Hypr (1 MOI), po dvou hodinách promyty sterilním PBS a inkubovány spolu s látkami o požadované koncentraci v 200 μ l média. Šestý den byl proveden MTT test.

III. Varianta (VKE, den poté látky): Tato varianta probíhala obdobně, jako varianta předchozí, s tím rozdílem, že druhý den byly buňky infikovány, promyty a uloženy do inkubátoru se 100 μ l čistého média. Následující den bylo přidáno 100 μ l média s látkami. Výsledná koncentrace látek byla stejná, jako v předešlých dvou variantách. Šestý den následoval MTT test.

Veškeré vzorky, včetně kontrol, byly testovány v triplikátech. Ve všech jamkách s látkami bylo 0,5 % DMSO. Při těchto pokusech byla použita dvojí kontrola – pozitivní a negativní. Jako negativní kontrola sloužily buňky, ke kterým bylo přidáno 0,5 % DMSO a stejné množství mozkového homogenátu bez viru. Pozitivní kontrola sloužila k ověření aktivity viru. Naměřené hodnoty byly odečítány vůči negativní kontrole.

5.6 Analýza virové replikace u buněk kultivovaných společně s vybranými deriváty adamantanu

První částí tohoto experimentu bylo zjistit množství virionů uvolněných do média z buněk infikovaných VKE, které byly kultivovány s vybranými deriváty adamantanu, tak, aby bylo možné ověřit, jestli mají látky profylaktický či terapeutický účinek. Tento pokus byl demonstrován na buněčné linii DAOY HTB-186 a podle dané varianty byly přidávány látky naředěné v 1 ml média. Buňky byly nasazeny v 1 ml média o koncentraci $1,2 \cdot 10^5$ buněk/ml na 24-jamkový panel. Výsledná koncentrace látek ve vzorcích byla 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Šestý den pokusu byly odebrány vzorky média a zmrazeny při -80°C . Následně byla změřena kvantita virových částic pomocí plakové titrace, jenž je popsána v kapitole 5.4. Veškeré vzorky, včetně kontrol, byly provedeny v triplikátech. Výsledky této části pokusu odrážely skutečnost, zdali látky ovlivňovaly penetraci virionů do buněk či uvolňování nových virionů z buněk.

Druhá část pokusu měla za úkol zjistit relativní množství virové RNA uvnitř buněk, což naznačovalo, jestli byly látky schopné ovlivnit její replikaci. Šestý den pokusu byly buňky zbaveny veškerého média, promyty 1 ml PBS a rozvolněny v 500 μl RNA Blue (Top-Bio). Takto připravené vzorky byly zmrazeny při -80°C . Následně byla z buněk izolována virová RNA dle pokynů dodavatele RNA Blue. Se vzorky bylo pracováno v digestoři, přičemž veškeré nástroje, včetně pracovní plochy, byly ošetřovány přípravkem RNase Killer (SIGMA-ALDRICH®), aby nedošlo ke znehodnocení vzorků všudypřítomnými RNázami. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μl chloroformu, poté byly silně protřepány na vortexu po dobu alespoň 15 vteřin a ponechány inkubovat 5 min při laboratorní teplotě. Následovala 10 min centrifugace při 12 000 x g, 4°C . Centrifugací vznikly dvě fáze, mezi nimiž se nacházela interfáze, kde horní vodní fáze obsahující RNA byla přenesena do nové zkumavky. RNA byla precipitována přidáním 250 μl isopropylalkoholu, vzorek byl inkubován 10 min při 4°C a poté centrifugován 12 000 x g, 10 min, 4°C . Následně byl odstraněn supernatant a přidán 1 ml 75 % etanolu. Vzorek byl důkladně protřepán a centrifugován 5 min 12 000 x g, 4°C . Po odstranění supernatantu byl vzorek vysušen na vzduchu a RNA byla rozpuštěna v DEPC H_2O (voda ošetřená diethylpyrokarbonátem, který inaktivuje RNázy). Koncentrace izolované virové RNA ve vzorcích byla změřena pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen) a uchována při -80°C .

Relativní množství virové RNA ve vzorcích bylo změřeno metodou jedнокrokové kvantitativní RT-PCR (one-step qRT-PCR). Tato metoda zprvu zahrnuje přeložení virové jednořetězcové RNA do komplementárního dvouřetězcového hybridu RNA/DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy, která poté slouží jako templát pro kvantitativní polymerázovou řetězcovou reakci (q-PCR). Tento test byl proveden pomocí kitu KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR od firmy Kapa Biosystem. Složení tzv. mastermix roztoku je uvedeno níže v Tab. 4. Virová RNA byla kvantifikována pomocí primerů (Generi Biotech) komplementárních k obalovému proteinu E: E01 F (GCAGCCAGATGCCCAACAATGG) a E01 R (TCTTTTTGCCTCACAAGCCGCCT). Jako kontrola sloužily primery pro housekeeping gen HPRT: HPRT F (TGACACTGGCAAACAATGCA) a HPRT R (GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT).

Tab. 4: Složení mastermix roztoku pro qRT-PCR.

složka	objem (μl)
2 x KAPA SYBR FAST Master Mix	7,5
primer Forward E01 F/HPRT F	0,45
primer Reverse E01 R/HPRT R	0,45
50 x KAPA RT Mix	0,3
DEPC H ₂ O	2,3
příslušný vzorek RNA	4

K jednotlivým mastermix roztokům byly přidány příslušné vzorky RNA o koncentraci 20 ng/μl. Veškeré vzorky, včetně kontrol, byly zpracovány v triplicátech. Jako negativní kontrola sloužil mastermix roztok bez virové RNA. Vlastní qRT-PCR reakce byla provedena na přístroji LightCycler® 480 (ROCHE Life Sciences), v jehož softwaru byly nastaveny parametry reakce dle Tab. 5. Po skončení programu byly získány hodnoty C_t (threshold cycle). Tyto hodnoty odpovídají danému cyklu, ve kterém přístroj započal detekovat fluorescenci nad práhem pozadí. Pomocí C_t hodnot bylo vypočteno relativní množství RNA vzhledem k referenčnímu genu HPRT.

Tab. 5: Nastavené parametry pro jednokrokovou qRT-PCR.

cyklus	teplota (°C)	čas	počet cyklů
reverzní transkripce	42	10 min	
inaktivace enzymů	95	5 min	
denaturace	95	5 s	40
nasednutí primerů	60	30 s	
melting analýza	95		

5.7 Ověření antivirotického účinku u vybraných stilbenů na přežívání pokusných myší infikovaných VKE

Cílem *in vivo* pokusů bylo zjistit, zdali vybrané látky z řad stilbenů dokáží pokusné myši ochránit před infekcí VKE nebo tuto infekci vyléčit. Testovanými látkami byly resveratrol, piceid a ϵ -viniferin.

Pokusnými zvířaty byly myši, pocházející z inbredního kmene BALB/c (AnLab). Všechny myši byly samice sataré 5-6 týdnů v době dodání. Myši byly umístěny v infekčním zvěřinci, jenž je součástí BSL-2 laboratoře Katedry medicínské biologie (Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta). Pokusná zvířata byla umístěna po čtyřech kusech do IVC systému (individually ventilated cages). Ve zvěřinci byla udržována teplota 20-26 °C s vlhkostí vzduchu 40-70 %. Také zde byla dodržována naprostá bezhlučnost, až na nezbytné úkony. Pokusná zvířata měla uměle řízenou fotoperiodu 12 hodin světlo/ 12 hodin tma. Myši byly krmeny kompletní výživou ve formě granulí (sterilní) *ad libitum*. K pití měli k dispozici destilovanou vodu, okyselenou HCl (pH = 3), *ad libitum* – před podáním vždy vysterilizována v autoklávu. K přestýlání byla užívána dřevěná štěpka s nízkým stupněm prašnosti, tepelně sterilizována spolu s IVC klecí. Ve zvěřinci bylo udržováno velmi čisté prostředí pravidelným úklidem pomocí přípravku Incidin Liquid.

Pokus byl uskutečněn týden po dodání myší, čímž byl minimalizován stresový faktor, který byl způsoben převozem zvířat. První série pokusů byla provedena ve dvou variantách (viz Tab. 6). V první variantě byly myším injikovány látky současně s VKE, zatímco v druhé variantě byly injikovány samotné látky a až následující den infekce. Piceid (SIGMA-ALDRICH®) a viniferin (Molecula) byly aplikovány v množství 12,5 μ g na 1 g hmotnosti myši,

resveratrol (AppliChem) pak v množství 1,56 µg na 1 g myši. Látky byly rozpuštěny v DMSO 100 %, ředěny ve sterilním PBS na požadovanou koncentraci a přefiltrovány přes mikrofiltr (0,22 µm póry). Mimo stilbenů byl sledován také vliv myšího IFN-β (R&D System), ať už samotného nebo jako podpůrnou substanci ke stilbenům, který byl aplikován v dávce 150 000 IU/myš. Infekce byla provedena VKE kmenem Hypr – 1000 PFU/myš. Kontrolní skupinu tvořily myši, jímž bylo injikováno sterilní PBS a VKE. Všem myším bylo intraperitoneálně (*i. p.*) aplikováno celkem 200 µl daného roztoku s konstantním množstvím DMSO 1,56 %. Injekce probíhaly ve spolupráci s Mgr. Zuzanou Vavruškovou. Následně byly myši kontrolovány dvakrát denně a zapisován jejich stav – zdravá, apatická, paralýza, smrt. Z praktických důvodů je ve vyhodnocení sledován pouze počet živých myší za daný den.

Tab. 6: Znázornění pokusných skupin ve dvou variantách v *in vivo* testech první série.

Varianta	
I. Látky + infekce	II. Látky/infekce
PBS + DMSO + VKE	
PIC + VKE	PIC/VKE
RSV + VKE	RSV/VKE
VIN + VKE	VIN/VKE
IFN + VKE	IFN/VKE
PIC + IFN + VKE	PIC + IFN/VKE
RSV + IFN + VKE	RSV + IFN/VKE
VIN + IFN + VKE	VIN + IFN/VKE

V Tabulce 6 jsou znázorněny jednotlivé pokusné skupiny, celkem jich bylo 15. Každá skupina čítala 8 pokusných myší. PIC – piceid, RSV – resveratrol, VIN – viniferin, IFN – myší interferon β.

V druhé sérii testů byly stilbeny aplikovány ve vyšší koncentraci ve třech variantách (viz Tab. 7). Na začátku pokusu byly myši 8-9 týdnů staré samice. Množství piceidu činilo 50 µg/g myši, resveratrolu 5 µg/g myši a viniferinu 25 µg/g myši, ostatní zůstalo nezměněno. Všem myším bylo intraperitoneálně (*i. p.*) aplikováno celkem 200 µl daného roztoku s konstantním množstvím DMSO 6,25 %.

Tab. 7: Znázornění pokusných skupin ve třech variantách v *in vivo* testech druhé série.

Varianta		
I. Látky + infekce	II. Látky/infekce	III. Infekce/látky
PBS + DMSO + VKE		
PIC + VKE	PIC/VKE	VKE/PIC
RSV + VKE	RSV/VKE	VKE/RSV
VIN + VKE	VIN/VKE	VKE/VIN
IFN + VKE	IFN/VKE	VKE/IFN
PIC + IFN + VKE	PIC + IFN/VKE	VKE/PIC + IFN
RSV + IFN + VKE	RSV + IFN/VKE	VKE/RSV + IFN
VIN + IFN + VKE	VIN + IFN/VKE	VKE/VIN + IFN

V Tabulce 7 jsou znázorněny jednotlivé pokusné skupiny, celkem jich tedy bylo 22. Každá skupina čítala 8 pokusných myší. PIC – piceid, RSV – resveratrol, VIN – viniferin, IFN – myší interferon β .

5.8 Zpracování výsledků

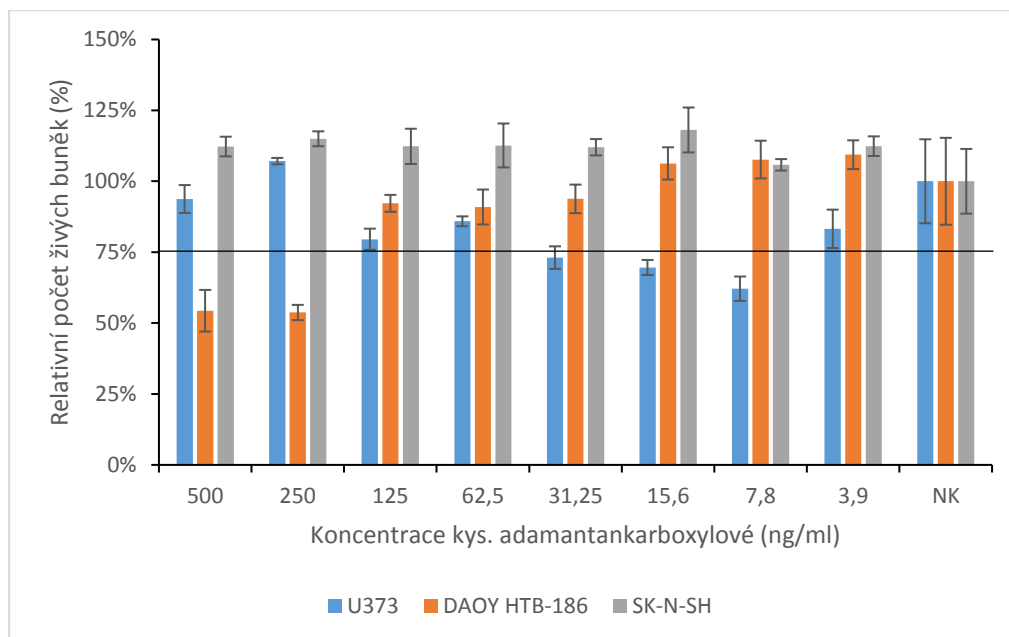
Výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel (součást programového balíku Office 365). V tomto programu byly provedeny výpočty ze získaných dat během pokusů, jejich odečtení od kontrolních vzorků a vytvořeny příslušné grafy. Uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako průměr hodnot triplikátů \pm směrodatná odchylka. Přeživací pokus myší byl vyhodnocen v programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software), kde byla stanovena střední doba přežití jednotlivých pokusných skupin.

6 Výsledky

6.1 Test cytotoxicity u vybraných derivátů adamantanu

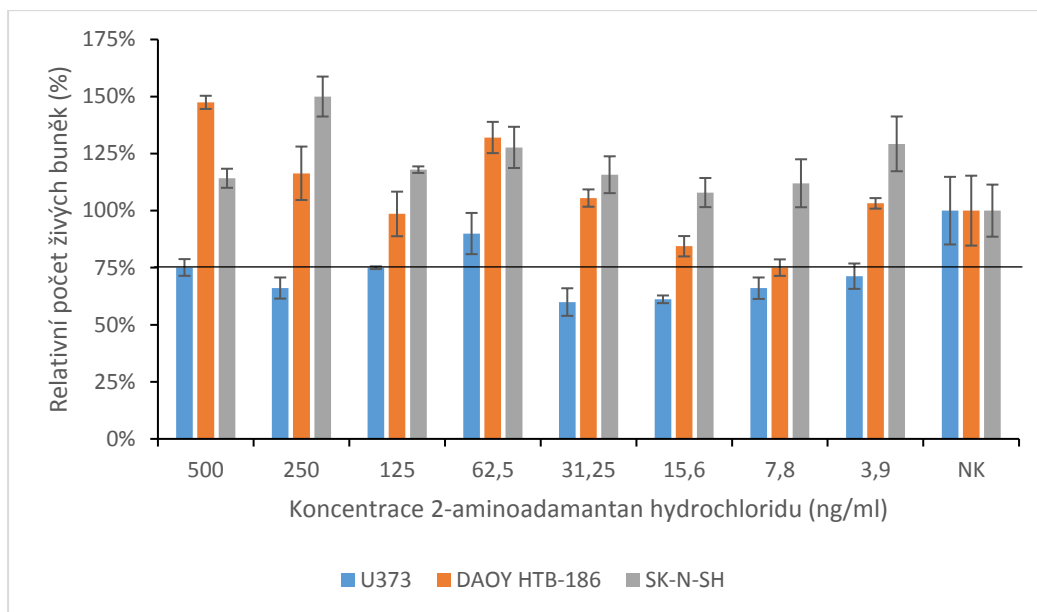
Účelem těchto testů bylo zjistit, jestli vybrané deriváty adamantanu jsou toxické pro zvolené buněčné linie a určit maximální možnou koncentraci látek, se kterou by bylo možné dále pracovat. Testovanými látkami byly amantadin, 2-aminoadamantan hydrochlorid a kyselina adamantankarboxylová, jejichž případná cytotoxicita byla zkoumána na buněčných liniích nervového původu – U373, SK-N-SH a DAOY HTB-186. Zprvu bylo pracováno s maximální koncentrací 500 ng/ml. Tato koncentrace byla zvolena na základě bakalářské práce (Vokurka, 2016), neboť autor ve své práci pozoruje cytotoxicitu derivátů adamantanu již při této koncentraci, měření prováděl pomocí průtokové cytometrie. V mé práci byly vzorky měřeny biochemickou metodou – MTT test, v níž se stanovuje absorbance biotransformovaného formazanu (viz kapitola 5.3). Hodnoty absorbancí triplicátů byly převedeny na procenta, zprůměrovány a odečteny vůči negativní kontrole (NK), která představovala 100 %. K jednotlivým průměrům byla dopočítána také směrodatná odchylka (viz grafy). Pokud byla hodnota absorbance vzorku menší než 75 % (hranice stanovena autorem) v porovnání s kontrolou, považovali jsme koncentraci látky za toxickou pro danou buněčnou linii. Nicméně zpravidla bývá pro látky určována LC_{50} , neboli taková koncentrace látky, která zabije právě 50 % buněk. Následující grafy (Obr. 8, 9, 10) znázorňují relativní množství živých buněk užitých linií v závislosti na koncentraci aplikované látky v rozmezí od 3,9 do 500 ng/ml.

Obrázek 8 naznačuje cytotoxicitu kys. adamantankarboxylové u buněčné linie DAOY HTB-186 při koncentraci 500 a 250 ng/ml, kde relativní viability buněk dosahuje hodnoty 54 %. Cytotoxický efekt lze pozorovat také u linie U373 při koncentracích 31,25; 15,6 a 7,8 ng/ml. Buněčná linie SK-N-SH snáší testovanou látku při daných koncentracích velmi dobře.



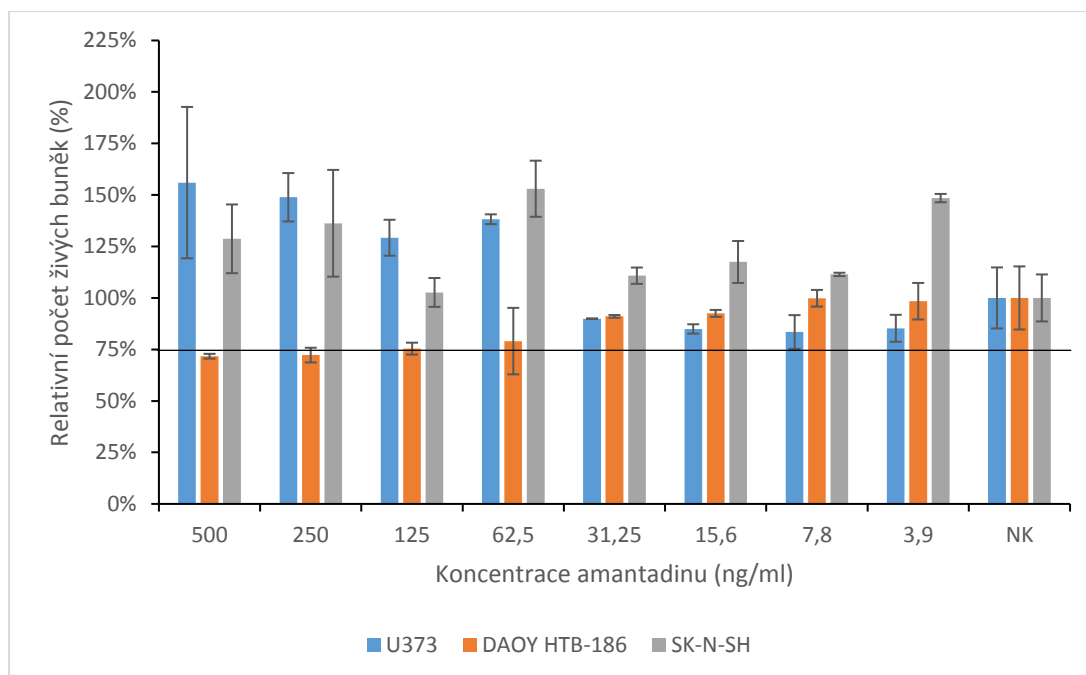
Obr. 8: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci kyseliny adamantankarboxylové od koncentrace 3,9 do 500 ng/ml.

Z Obrázku 9 lze vyčíst, že 2-aminoadamantan hydrochlorid má cytotoxický efekt na neurony U373 při všech užitých koncentracích, tedy relativní viabilita buněk je $\leq 75\%$, kdy nejnižší naměřená hodnota byla 60% vůči NK při koncentracích 31,25 a 15,6 ng/ml. V případě linie DAOY HTB-186 je pozorován cytotoxický efekt látky při koncentraci 7,8 ng/ml (75% viabilních buněk). Linie SK-N-SH nebyla testovanou látkou ovlivněna ve smyslu cytotoxicity.



Obr. 9: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu od koncentrace 3,9 do 500 ng/ml.

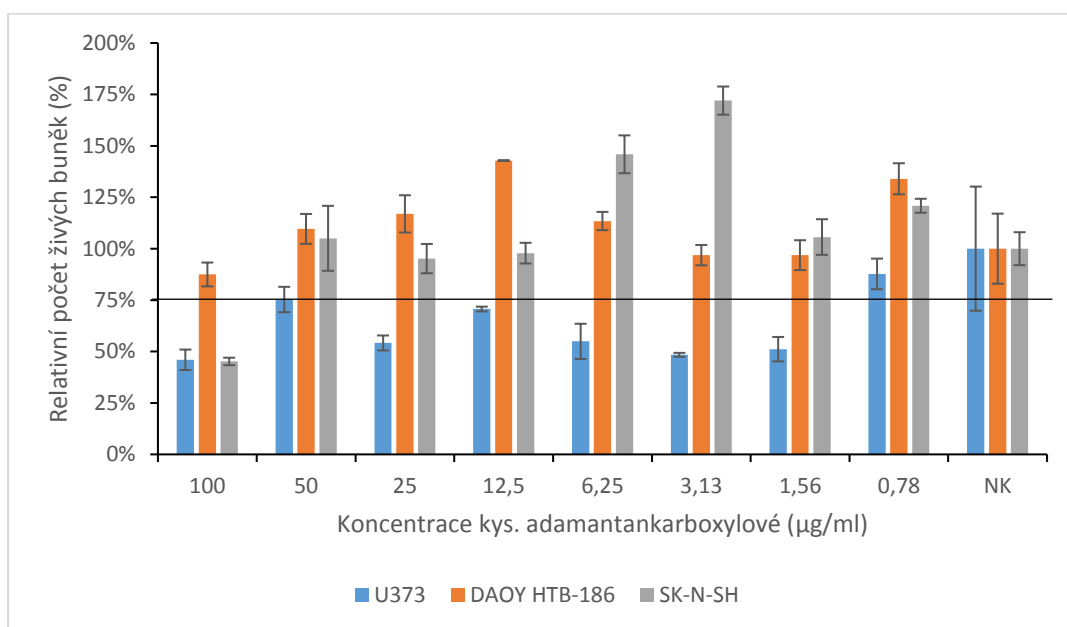
Graf na Obrázku 10 dokazuje cytotoxický efekt amantadinu od koncentrace 125 do 500 ng/ml u linie DAOY HTB-186. Hodnoty linií SK-N-SH a U373 se viditelně pohybovaly nad stanovenou hranicí 75 %.



Obr. 10: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci amantadinu od koncentrace 3,9 do 500 ng/ml.

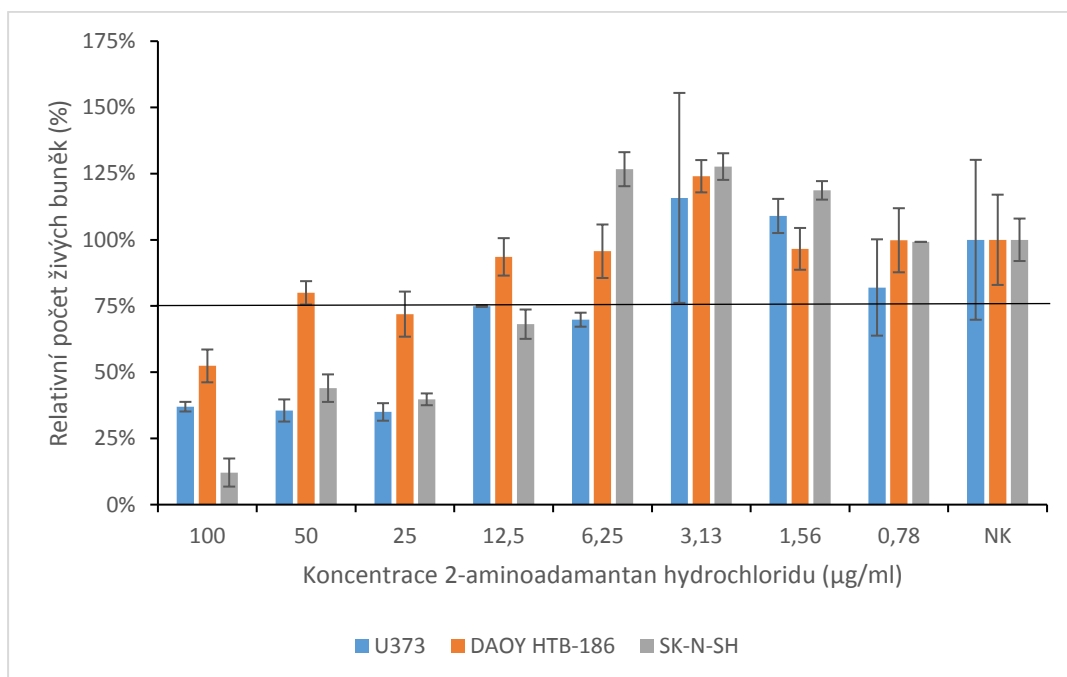
Testy s koncentracemi látek od 3,9 do 500 ng/ml neprokázaly výrazný cytotoxický efekt ani u jedné z buněčných linií. V důsledku toho nebylo možné stanovit LC_{50} pro jednotlivé látky v závislosti na relativní viabilitě vybraných buněk nervového původu. Na tomto základě byla zvýšena koncentrace látek od 0,78 do 100 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky pokusů s těmito koncentracemi jsou graficky znázorněny na Obrázcích 11, 12 a 13. Na grafech lze pozorovat trend, kde se vzrůstající koncentrací substancí dochází ke snižování relativního počtu živých buněk. Získanými hodnotami byla proložena přímka, z jejíž rovnice bylo dopočítáno LC_{50} pro jednotlivé látky a buněčné linie (viz Tab. 8).

Z Obrázku 11 je zřejmý cytotoxický efekt kys. adamantankarboxylové především u buněčné linie U373. Pro tuto linii byla vypočítána $LC_{50} = 101,38 \mu\text{g/ml}$, přestože klesající trend hodnot není zcela patrný. U SK-N-SH se objevil největší pokles procenta viabilních buněk při maximální zvolené koncentraci, přičemž $LC_{50} = 93 \mu\text{g/ml}$. Linie DAOY HTB-186 snáší testovanou látku nejlépe, kde $LC_{50} = 163,76 \mu\text{g/ml}$. Nicméně LC_{50} u této linie byla získána extrapolací pomocí matematického výpočtu a bylo by vhodné ji experimentálně ověřit.



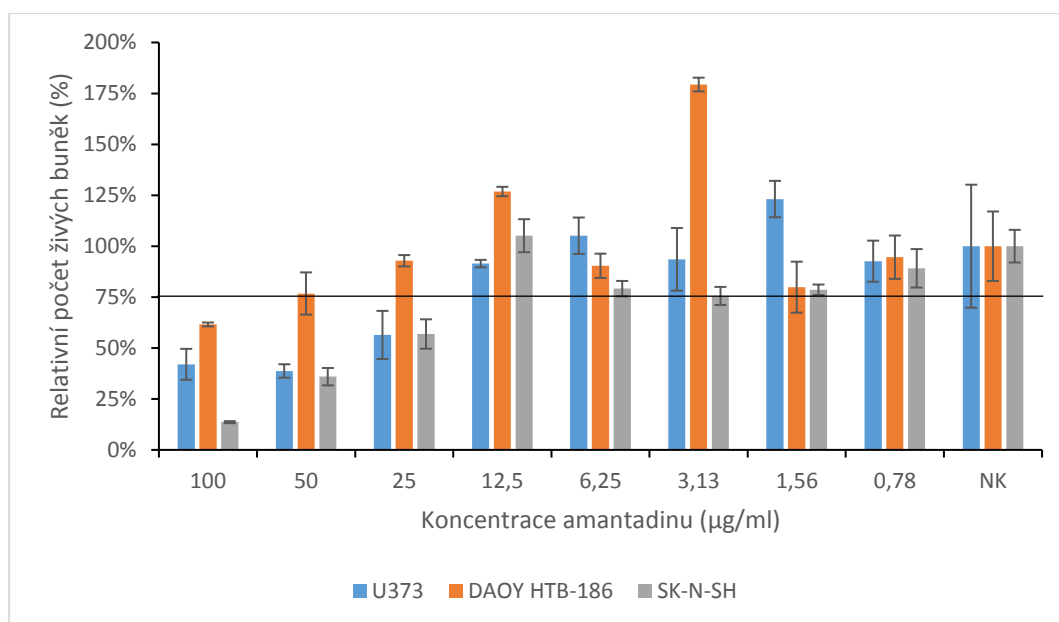
Obr. 11: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci kyseliny adamantankarboxylové od koncentrace 0,78 do 100 $\mu\text{g/ml}$.

Na Obrázku 12 je grafické znázornění relativní viability buněk po aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu, z něhož lze vyčíst, že pro buněčné linie U373 a SK-N-SH je tato látka více toxická, než pro linii DAOY HTB-186. Proložení přímkou skrze získané hodnoty bylo spočteno: LC_{50} (U373) = 52,48 $\mu\text{g/ml}$; LC_{50} (DAOY HTB-186) = 98,84 $\mu\text{g/ml}$; LC_{50} (SK-N-SH) = 47,7 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 12: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu od koncentrace 0,78 do 100 $\mu\text{g/ml}$.

Následující graf na Obrázku 13 vyobrazuje relativní viabilitu neurálních linií po aplikaci amantadinu při daných koncentracích. Tato látka, stejně jako jí podobný 2-aminoadamantan hydrochlorid, působí toxicky především u linie U373 (LC_{50} = 66,49 $\mu\text{g/ml}$) a SK-N-SH (LC_{50} = 49,86 $\mu\text{g/ml}$). Také v případě linie DAOY HTB-186 se naměřené hodnoty podobají těm z předešlého grafu, přičemž LC_{50} u této linie byla 108,68 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 13: Relativní viabilita vybraných buněčných linií po aplikaci amantadinu od koncentrace 0,78 do 100 µg/ml.

Tab. 8: LC₅₀ pro jednotlivé buněčné linie a látky.

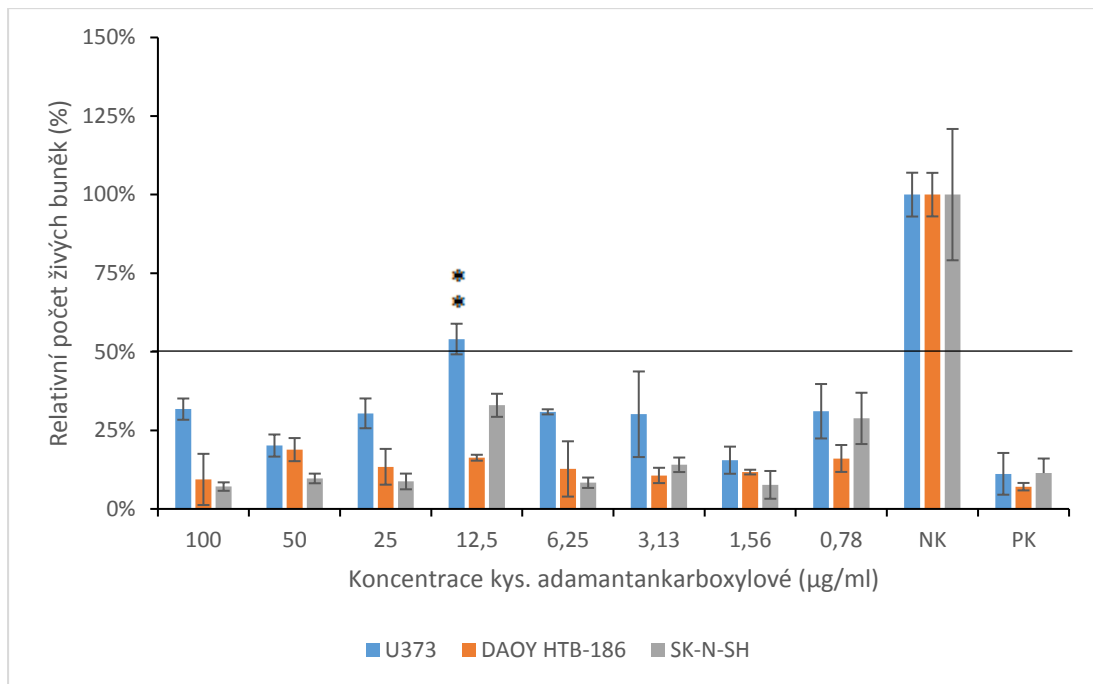
	kys. adamantankarboxylová	2-aminoadamantan hydrochlorid	amantadin
U373	101,38 µg/ml	52,48 µg/ml	66,49 µg/ml
DAOY HTB-186	163,76 µg/ml	98,84 µg/ml	108,68 µg/ml
SK-N-SH	93 µg/ml	47,7 µg/ml	49,86 µg/ml

Tabulka 8 nabízí souhrn vypočítaných hodnot LC₅₀ u jednotlivých buněčných linií a látek. Ze získaných dat je zřejmý nejnižší cytotoxický vliv kyseliny adamantankarboxylové pro všechny tři zkoumané neurální linie. Dále lze vyčíst, že testované substance nejlépe toleruje linie DAOY HTB-186. Cytotoxicita vzájemně si velmi blízkých derivátů adamantanu: amantadin a 2-aminoadamantan hydrochlorid, byla podobná.

6.2 Ověření antivirotického účinku u vybraných derivátů adamantanu na přežívání buněk infikovaných VKE

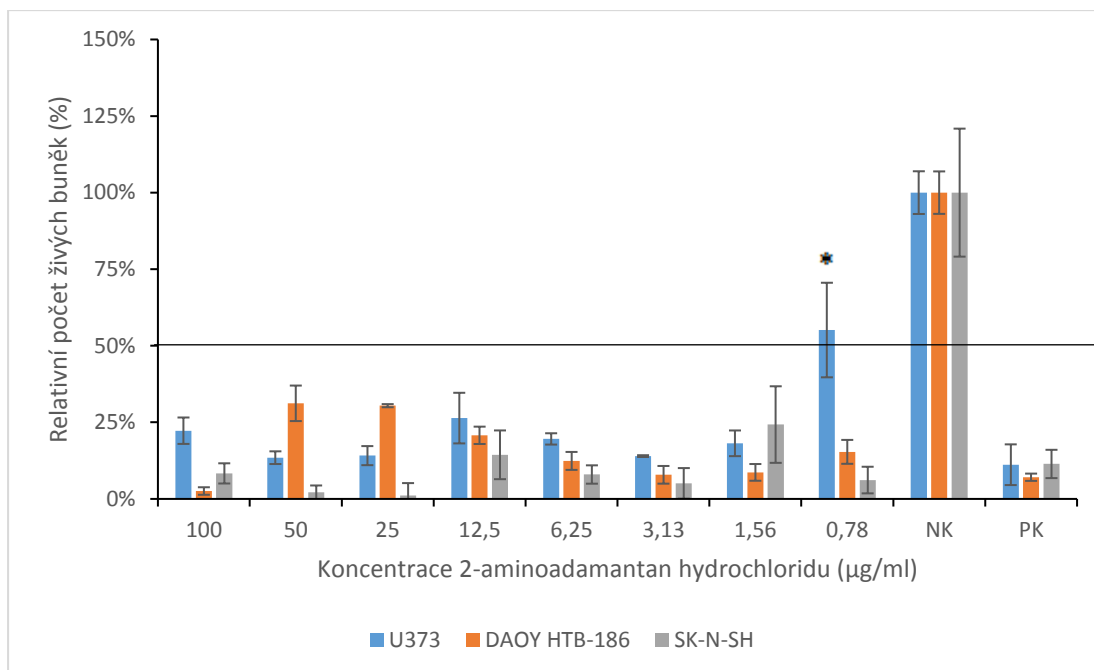
Cílem této části práce bylo zjistit, zdali amantadin, kys. adamantankarboxylová či 2-aminoadamantan dokáží inhibovat replikaci VKE a tím zachránit buněčné linie. Na základě předchozích výsledků bylo pracováno s koncentrací látek od 100 µg/ml a dále dvojkovou řadou až do 0,78 µg/ml. Buňky byly infikovány kmenem Hypr v koncentraci 1 MOI. Látky byly testovány ve třech variantách (viz kapitola 5.5) pro případný profylaktický nebo terapeutický efekt. Měření bylo opět prováděno pomocí kolorimetrického MTT testu. Vyhodnocení probíhalo obdobně jako při cytotoxických testech, procentuální průměry triplikátů byly odečteny vůči negativní kontrole. Při těchto testech navíc figurovala také pozitivní kontrola (PK), což byly infikované buňky ošetřené DMSO 0,5 %. Pokud relativní množství živých buněk při dané koncentraci převyšovalo hodnotu PK, znamenalo to, že látka pomáhá buňkám přežít infekci a čím blíže byla NK, tím efektivnější látka byla. Ideálním případem by byl vzorek, který se rovná 100 %. Nicméně za úspěch byla považována i hranice EC₅₀, neboli taková koncentrace látky, při které přežije alespoň 50 % infikovaných buněk vůči NK. V případě, že relativní počet živých buněk dosahoval hodnoty EC₅₀ při dané koncentraci, byl tento výsledek ověřen provedením statistické analýzy rozdílu a příslušné pozitivní kontroly. K analýzám byl použit jednocestný test rozkladu variance (one-way ANOVA) s proměnou relativního množství živých buněk při dané koncentraci (relativní množství živých buněk/pozitivní kontrola). Pro objasnění rozdílů mezi hladinami faktoru byl použit post-hoc Dunnettův test (Lepš a Šmilauer, 2016).

Nejdříve byla zkoumána I. varianta, tedy aplikace látek spolu s VKE. Výsledky těchto testů jsou na Obrázcích 14, 15 a 16. Při aplikaci kys. adamantankarboxylové s VKE (viz Obr. 14) se nejlépe dařilo neuronům U373, kde koncentrace 12,5 µg/ml zachránila 54 % buněk. Stejná koncentrace nejlépe zabránila cytopatickému efektu u SK-N-SH, přežilo 33 % neuronů. U DAOY HTB-186 nebyl zaznamenán výrazný zachraňující efekt.



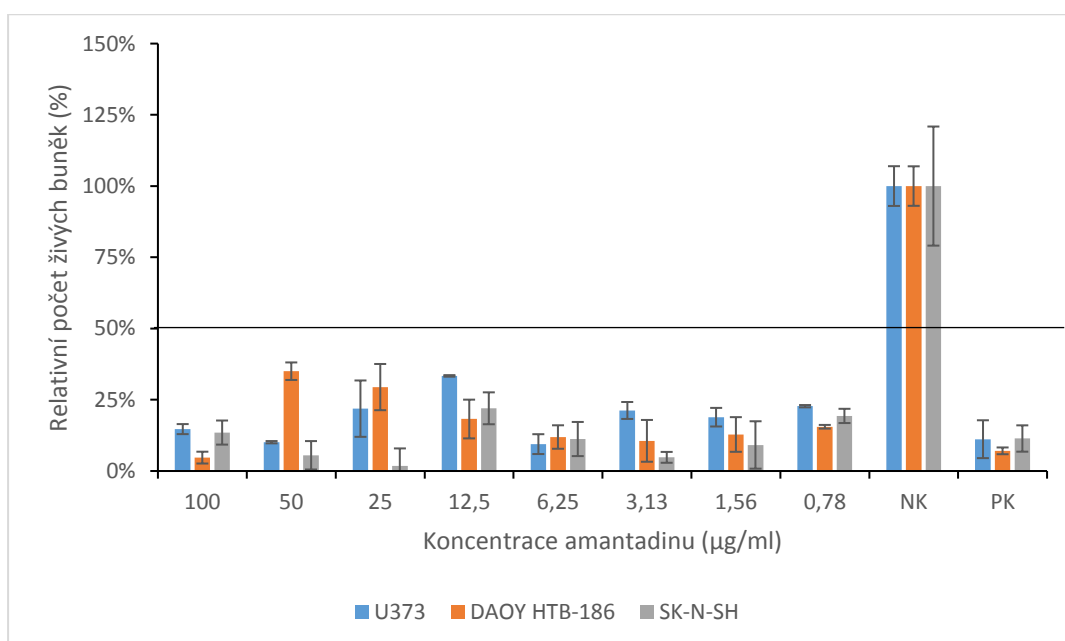
Obr. 14: Relativní viabilita buněk při aplikaci kys. adamantankarboxylové současně s infekcí. Hladina signifikance vzhledem k PK: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $F_{1,3} = 59,11$ (one-way ANOVA, Dunnet post-hoc test).

Obrázek 15 znázorňuje relativní viabilitu buněk při aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu současně s VKE. Glioblastomová linie nejlépe odolávala cytopatickému efektu při 0,78 µg/ml. Linie DAOY HTB-186 prospívala nejlépe při 50 a 25 µg/ml, avšak EC_{50} nebylo dosaženo ani při jedné z použitých koncentrací. Kýženého výsledku se nepodařilo dosáhnout ani u buněčné linie SK-N-SH.



Obr. 15: Relativní viabilita buněk při aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu současně s infekcí. Hladina signifikance vzhledem k PK: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $F_{1,4} = 20,53$ (one-way ANOVA, Dunnet post-hoc test).

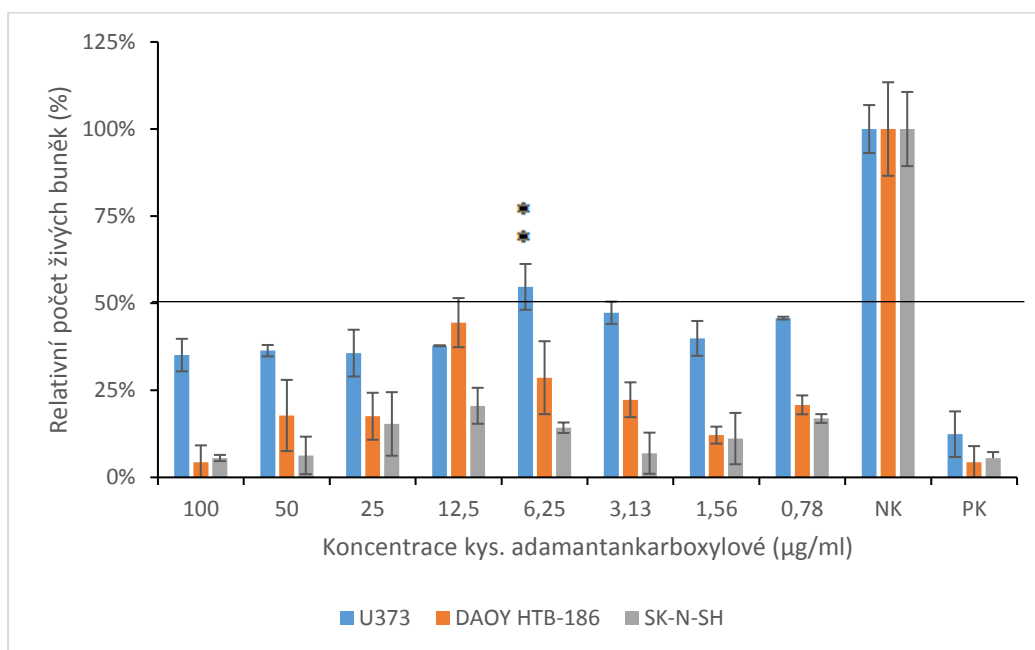
Po aplikaci amantadinu spolu s infekcí (Obr. 16) se nepodařilo ani u jedné buněčné linie prokázat EC_{50} při daných koncentracích.



Obr. 16: Relativní viabilita buněk při aplikaci amantadinu současně s infekcí.

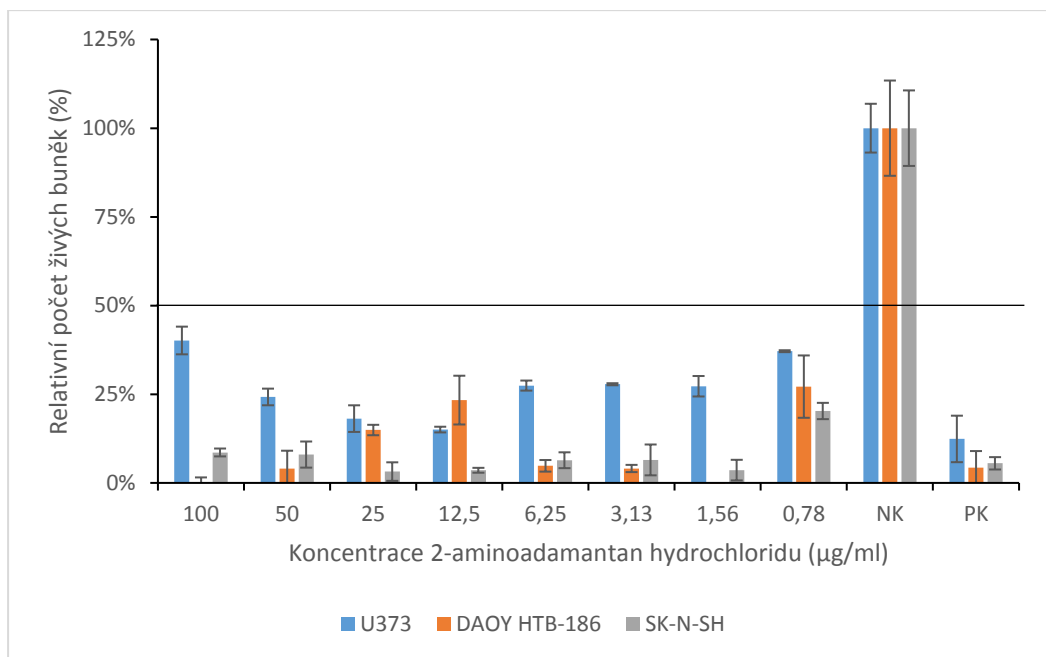
Dále byla testována II. varianta, kdy se k buňkám přidaly deriváty adamantanu a následující den byly neurony infikovány VKE. Byla očekávána vyšší nebo alespoň podobná relativní viabilita buněk v porovnání s první variantou (viz Obr. 14-16). Výsledky testů II. varianty jsou na obrázcích 17, 18 a 19.

Graf na Obrázku 17 znázorňuje relativní viabilitu buněk při aplikaci kys. adamantankarboxylové a následující den infekce VKE. Protektivní účinek látky lze pozorovat zejména u linie U373, kde při koncentraci 6,25 $\mu\text{g/ml}$ přežilo 55 % buněk. Hranice EC_{50} téměř dosáhla také linie DAOY HTB-186 při koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (44 % buněk). U buněk SK-N-SH nebyl zaznamenán profylaktický efekt zkoumané látky.

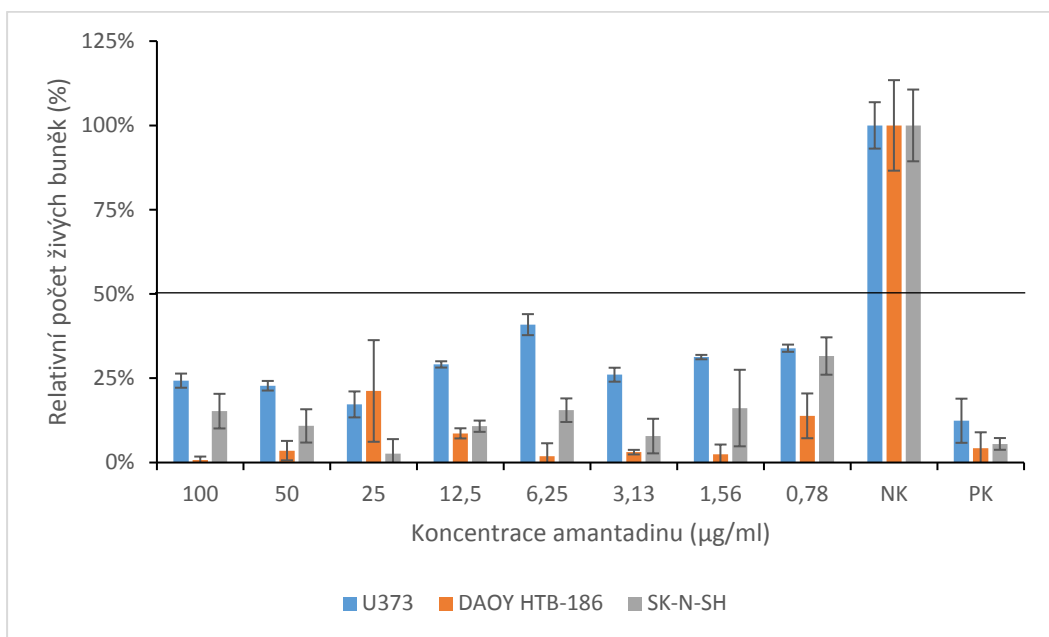


Obr. 17: Relativní viabilita buněk při aplikaci kys. adamantankarboxylové, následující den infekce. Hladina signifikance vzhledem k PK: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $F_{1,4} = 62,28$ (one-way ANOVA, Dunnet post-hoc test).

Ačkoli jsou na Obrázcích 18 a 19 patrné vyšší hodnoty relativní viability buněk oproti PK, tak hranice EC_{50} nebylo dosaženo ani u jedné z buněčných linií při všech testovaných koncentracích vybraných derivátů adamantanu.

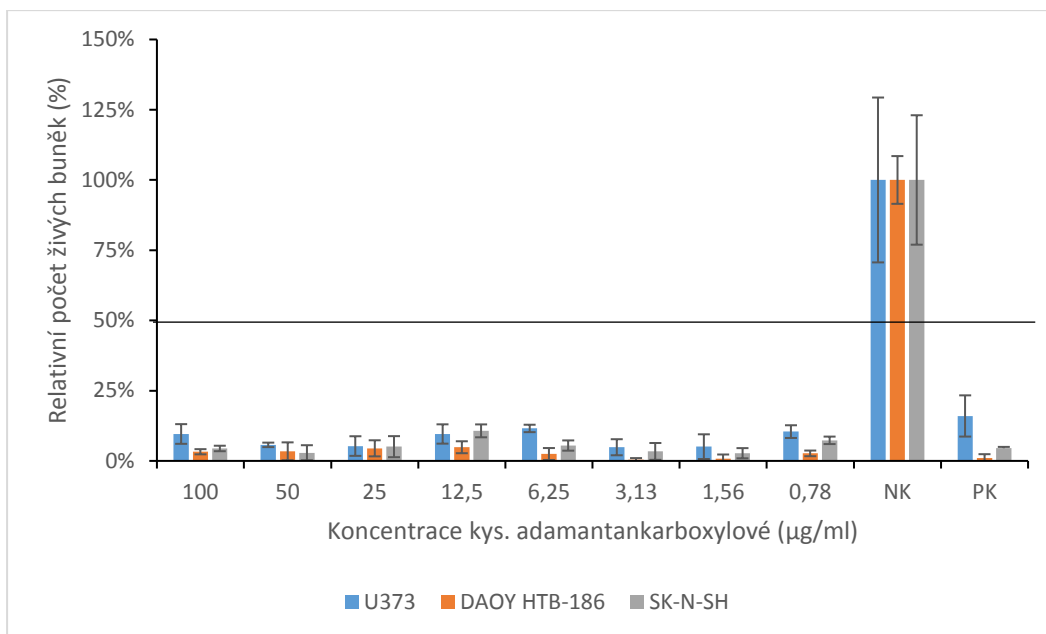


Obr. 18: Relativní viabilita buněk při aplikaci 2-aminoadamantan hydrochloridu, následující den infekce.

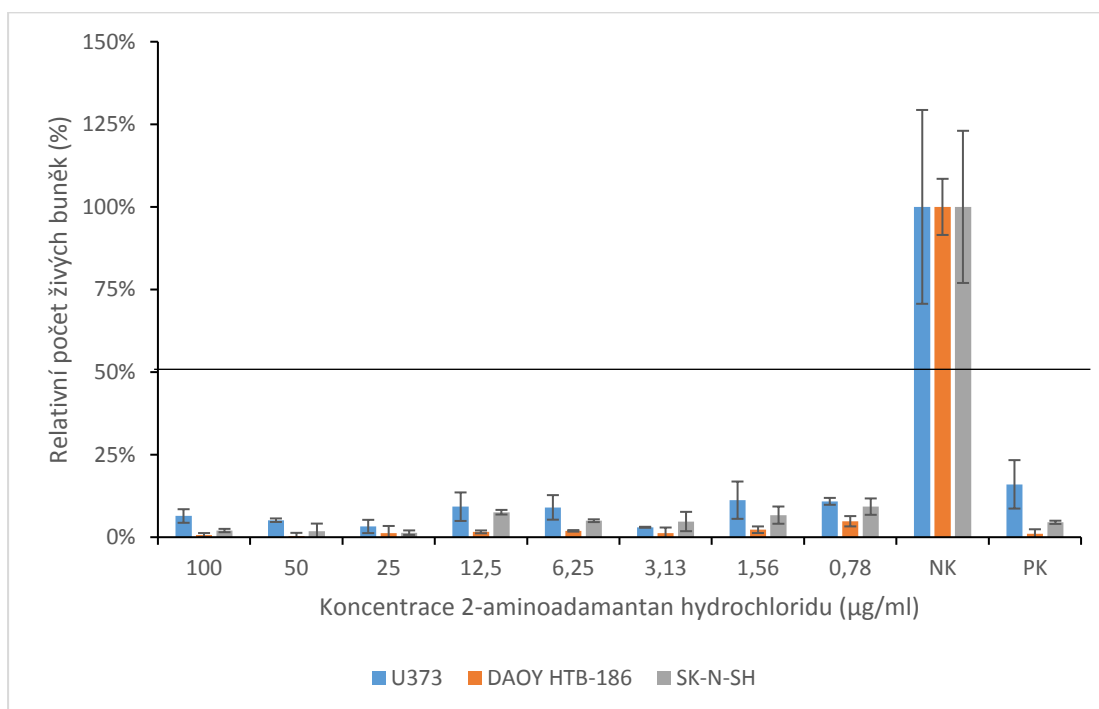


Obr. 19: Relativní viabilita buněk při aplikaci amantadinu, následující den infekce.

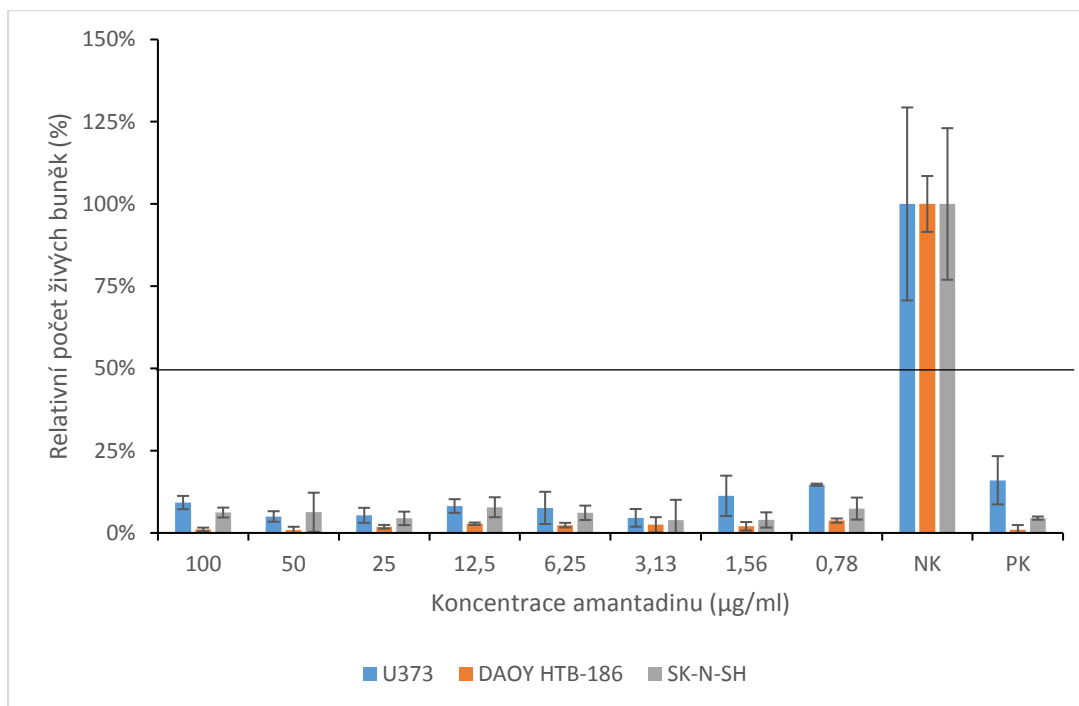
Poslední testovaná III. varianta – infekce neurálních buněk a následující den ošetření deriváty adamantanu. Výsledky na Obrázcích 20-22 dokazují prakticky nulový terapeutický efekt testovaných látek u vybraných buněčných liniích infikovaných VKE.



Obr. 20: Relativní viabilita buněk při infekci VKE, následující den aplikace kys. adamantankarboxylové.



Obr. 21: Relativní viabilita buněk při infekci VKE, následující den aplikace 2-aminoadamantan hydrochloridu.



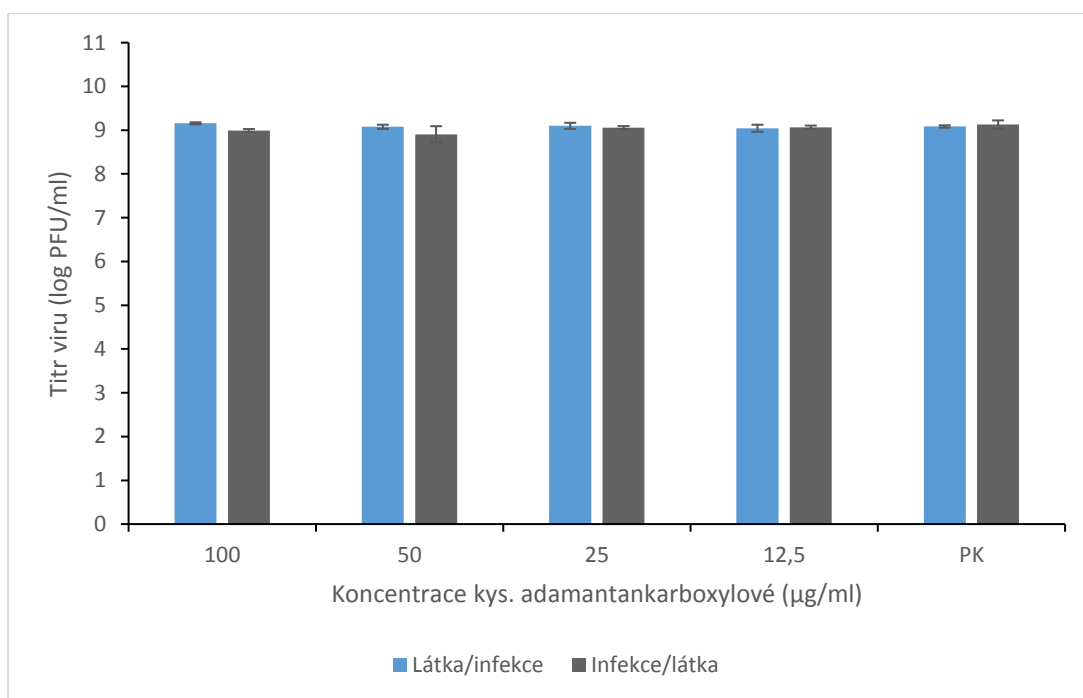
Obr. 22: Relativní viabilita buněk při infekci VKE, následující den aplikace amantadinu.

6.3 Měření virové nálože vně buněk metodou plakové titrace

Tyto testy pokračovaly v ověřování antivirotického účinku vybraných derivátů adamantanu. V kapitole 6.2 byla měřena relativní viabilita infikovaných buněk pomocí MTT testu, tedy zdali látky pomáhají buňkám přežít infekci VKE. V této části práce bylo úkolem zjistit, jestli kys. adamantankarboxylová, 2-aminoadamantan hydrochlorid či amantadin mohou svojí přítomností v kultivačním médiu inhibovat mechanismus penetrace virionů do buněk nebo uvolnění nových virionů z buněk. K tomuto účelu byla využita metoda plakové titrace, pomocí níž byl stanoven titr viru v kultivačním médiu. Na základě předchozích pokusů s cytotoxicitou látek a relativní viabilitou buněk, bylo rozhodnuto použít buněčnou linii DAOY HTB-186 a látky o koncentraci 100; 50; 25; 12,5 µg/ml, protože u této linie byla pozorována nejlepší relativní viabilita v závislosti na koncentraci vybraných derivátů adamantanu. Buňky byly opět infikovány VKE kmenem Hypr o koncentraci 1MOI ve dvou variantách – Varianta I: Aplikace látek, poté infekce; Varianta II: Infekce, poté aplikace látek. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky ošetřené virem s DMSO 0,5 %, vůči kterým byly vzorky porovnávány. Vše bylo provedeno v triplikátech za konstantního množství DMSO 0,5 %. Po

dokončení plakové titrace vzorků a odečtení plaků bylo spočítáno množství PFU/ml dle ředění daného vzorku. Pro lepší přehlednost byly výsledky převedeny do dekadického logaritmu. Příslušné triplikáty byly zprůměrovány a vypočtena jejich směrodatná odchylka. Finální výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázcích 23-25.

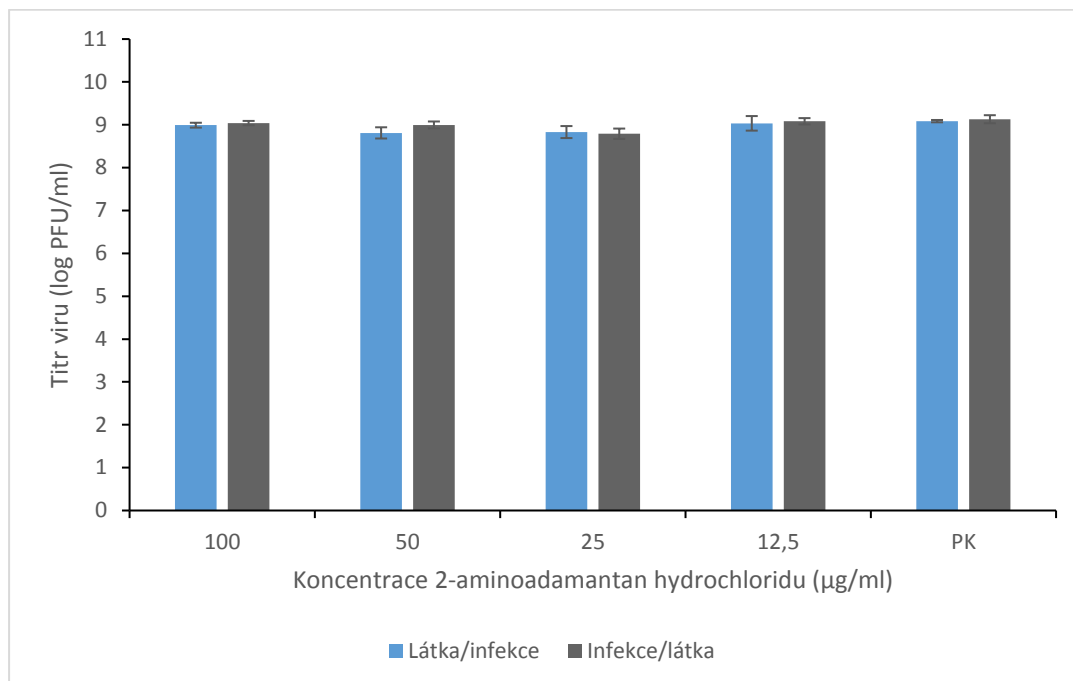
Obr. 23 popisuje množství viru ve vzorku v závislosti na koncentraci kyseliny adamantankarboxylové. Podle získaných dat je zjevné, že titry viru jsou v obou variantách prakticky shodné s příslušnou kontrolou, nezávisle na koncentraci látky. Jinými slovy tato látka při daných koncentracích není schopna inhibovat mechanismus penetrace virionů do buněk či jejich opuštění z buněk, a to ani v jedné z testovaných variant.



Obr. 23: Množství viru ve vzorku při dané koncentraci kys. adamantankarboxylové aplikované ve dvou variantách s příslušnými kontrolami.

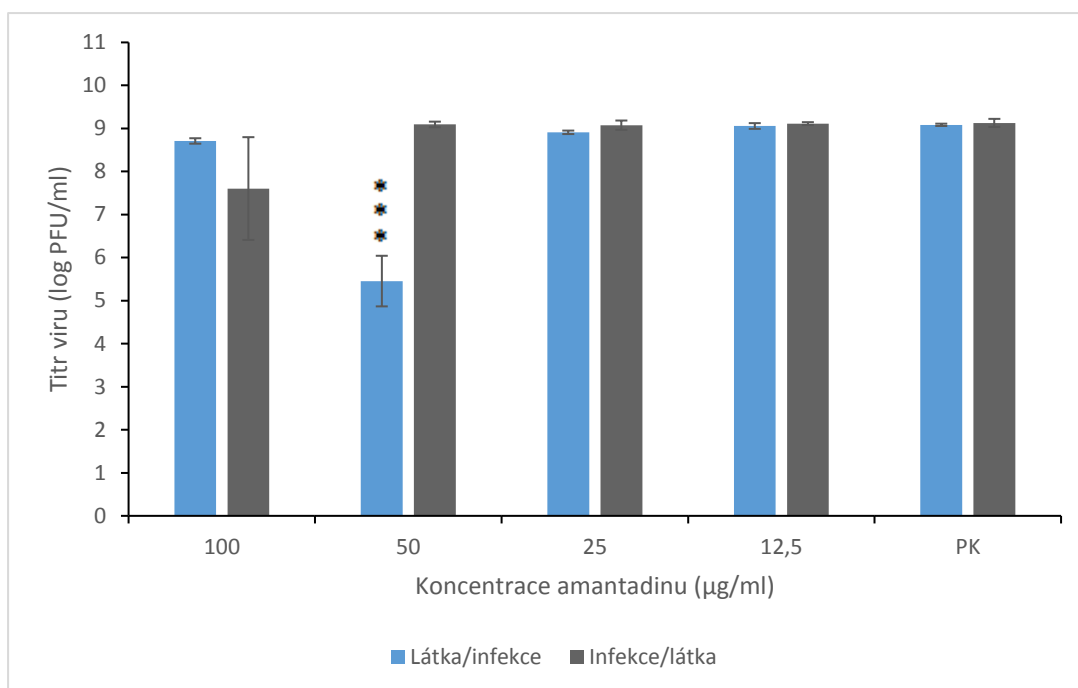
Na Obrázku 24 lze pozorovat množství viru ve vzorku při daných koncentracích 2-aminoadamantan hydrochloridu. V tomto případě nastal obdobný výsledek, jako na

předchozím grafu, tedy taktéž se nepodařilo prokázat profylaktickou či terapeutickou účinnost tohoto derivátu adamantanu.



Obr. 24: Množství viru ve vzorku při dané koncentraci 2-aminoadamantan hydrochloridu aplikovaného ve dvou variantách s příslušnými kontrolami.

Obr. 25 graficky znázorňuje množství viru ve vzorkách v závislosti na amantadinu aplikovaného v uvedených koncentracích před infekcí nebo po infekci VKE. Pokud byla testovaná látka aplikována při koncentracích 25 a 12,5 µg/ml, nebyla pozorována výrazná změna titru viru oproti kontrolám u obou variant. Zajímavého výsledku bylo dosaženo při aplikaci amantadinu o koncentraci 50 µg/ml den před infekcí, přičemž statistická analýza jednocestného rozkladu variance (one-way ANOVA) prokázala nižší titr viru ve vzorku oproti kontrole. Z tohoto výsledku vyplývá, že amantadin při koncentraci 50 µg/ml vykazoval profylaktický účinek vůči VKE u buněk DAOY HTB-186. Dále je na grafu vidět pokles množství viru ve vzorku při koncentraci látky 100 µg/ml ve variantě, kdy byla látka aplikována den po infekci. Vzhledem k předchozímu testu, vyobrazenému na Obrázku 22 a směrodatné odchylce tohoto průměru (triplikátu), se autor domnívá, že se jedná spíše o chybu, navíc statistická analýza taktéž neprokázala rozdíl vůči PK. Nicméně tuto domněnku by bylo vhodné ověřit.



Obr. 25: Množství viru ve vzorku při dané koncentraci amantadinu aplikovaného ve dvou variantách s příslušnými kontrolami. Hladina signifikance vzhledem k PK: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $F_{1,4} = 114,06$ (one-way ANOVA).

6.4 Měření virové nálože uvnitř buněk metodou qRT-PCR

Zatímco předchozí kapitola 6.3 pojednává o množství virových partikulí obsažených v médiu, tak tato část práce ověřuje titer viru uvnitř buněk. Respektive je sledováno relativní množství virové RNA obsažené uvnitř buněk, které přežily infekci VKE, v závislosti na koncentraci látky. K tomuto účelu byla zvolena jednokroková qRT-PCR. Vzorky buněk, potažmo RNA, pocházely z experimentu popsaného v kapitole 5.6. Vzhledem k mýlce autora, kdy extrahovaná RNA ze čtvrtiny vzorků nedopatřením rozpustil v nadbytku DEPC H_2O , ztrátě chloridu litného v laboratoři (pomocí něhož by byla RNA znovu precipitována), kontaminaci boxů pro přípravu master mix roztoků a finanční i časové náročnosti bylo relativní množství virové RNA stanoveno pouze u buněk ošetřených amantadinem

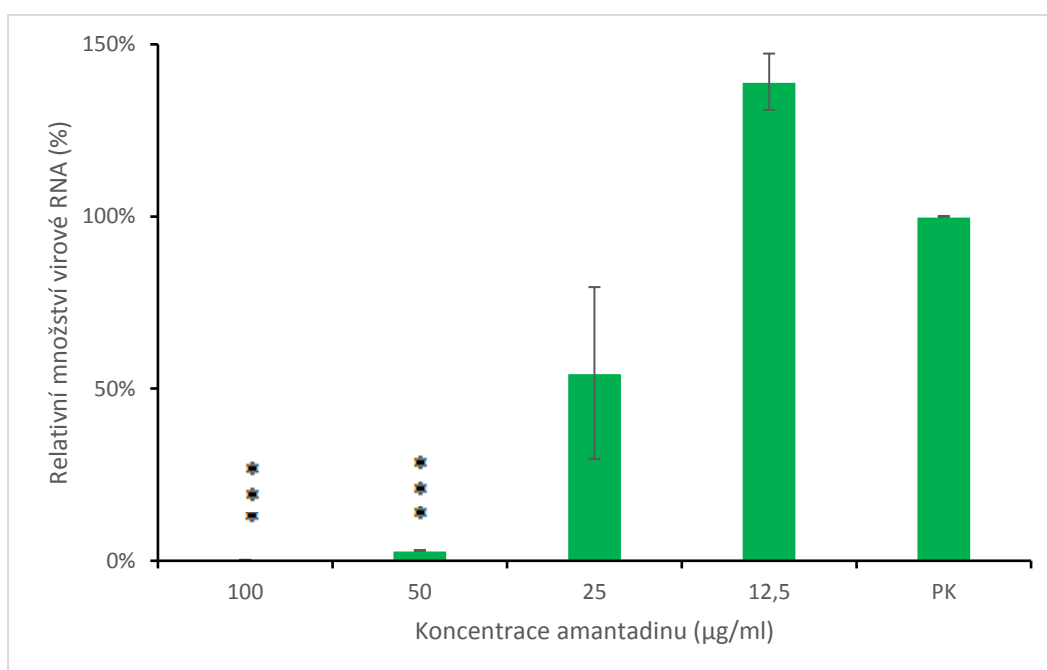
(koncentrace 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/ml}$) s DMSO 0,5 % jeden den před infekcí VKE. Byly vybrány právě tyto vzorky, protože dle výsledků plakové titrace docházelo k průkaznému snížení titru viru (viz Obr. 25) pouze v této variantě. Výtěžek extrakce RNA z těchto vzorků je zaznamenán v Tab. 9. Před samotnou jedнокrokovou qRT-PCR byly vzorky nařaděny na koncentraci 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Tab . 9: Koncentrace extrahované RNA ze vzorků v 25 μl DEPC H_2O .

koncentrace amantadinu ($\mu\text{g/ml}$)	koncentrace RNA ve vzorku ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
100	131
100	105
100	163
50	261
50	120
50	313
25	166
25	292
25	129
12,5	235
12,5	150
12,5	199
PK	208
PK	253
PK	203

Po dokončení qRT-PCR byly získány hodnoty C_t pro virovou RNA a referenční gen HPRT. Porovnáním těchto hodnot bylo získáno relativní množství virové RNA v jednotlivých vzorkách metodou $\Delta\Delta-C_t$. Při této metodě je relativní množství virové RNA odečteno vzhledem k referenčnímu genu HPRT. Získané hodnoty byly porovnány vůči pozitivní kontrole, což byly buňky ošetřené DMSO 0,5 % a VKE. Výsledky těchto analýz jsou níže vyobrazeny na Obr. 26.

Dle předchozích výsledků na Obr. 19 a 25 nebyla očekávána zásadní změna relativního množství virové RNA uvnitř buněk vůči PK, avšak tento test ukázal překvapivé výsledky. Z Obrázku 26 je na první pohled patrný rozdíl mezi testovanými vzorky a pozitivní kontrolou. U přeživších buněk DAOY HTB-186, ošetřených amantadinem při daných koncentracích jeden den před infekcí VKE, byl zaznamenán prokazatelný pokles relativního množství virové RNA vůči PK při koncentraci látky 100 µg/ml (0 %) a 50 µg/ml (3 %). K viditelnému poklesu hodnoty došlo také u koncentrace 25 µg/ml (55 %), ta však byla již statisticky neprůkazná. Naopak ke zvýšení relativního množství virové RNA vůči PK došlo u koncentrace 12,5 µg/ml (139 %).



Obr. 26: Relativní množství virové RNA uvnitř buněk v závislosti na koncentraci amantadinu. Hladina signifikance vzhledem k PK: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $F(100)_{1,4} = 2988012$, $F(50)_{1,4} = 16170$ (one-way ANOVA).

6.5 Ověření antivirotického účinku u vybraných stilbenů na přežívání pokusných myší infikovaných VKE

Předešlé kapitoly pojednávaly o inhibici replikace VKE pomocí vybraných derivátů adamantanu. Bohužel testy neprokázaly příliš velkou účinnost těchto látek, což by potenciálních léků proti tomuto viru, proto bylo od *in vivo* testů opuštěno. Mezitím Mgr. Hana Mašková dospěla při obdobných *in vitro* pokusech se stilbeny k velmi slibným výsledkům (viz Mašková, 2018). Z tohoto důvodu byly *in vivo* testy na myších navrženy na základě práce této autorky.

Pokusy s laboratorními myšmi byly provedeny celkem ve dvou sériích (viz kapitola 5.7). V obou sériích byly myším aplikovány vybrané stilbeny, konkrétně: piceid (PIC), resveratrol (RSV) a ϵ -viniferin (VIN). Doplňující testovanou látkou byl myší IFN- β , ať už samostatně, nebo v kombinaci se stilbeny. V první sérii byly testované látky injikovány v následujících dávkách – PIC a VIN 12,5 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši; RSV 1,56 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši. Infekce byla provedena VKE kmenem Hypr (1000 PFU/myš). Určitým pokusným skupinám byl aplikován IFN- β (150 000 IU/myš). Po injekcích byly myši kontrolovány dvakrát denně a průběh infekce řádně zaznamenáván. Pro zjednodušení interpretace výsledků jsou uvedeny pouze živé myši za daný den (viz Tab. 10). Kontrolní skupinu tvořily infikované myši ošetřené PBS + 1,56 % DMSO (stejně množství DMSO bylo injikováno i ostatním skupinám). Sledovanou proměnou byla střední doba přežití dané skupiny, neboli taková doba, kdy žije právě 50 % testovaných subjektů.

V druhé sérii *in vivo* testů přibyla varianta, kde byla předem injikována infekce a až následující den látky. Tato varianta sloužila k ověření, zdali by vybrané stilbeny mohly být použity pro terapeutické účely. Látky byly tentokrát aplikovány o vyšší dávce – RSV 5 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši; PIC 50 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši a VIN 25 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši. Množství interferonu a VKE byly aplikovány stejně jako v první sérii. Kontrolní skupinu tvořily nakažené myši ošetřené PBS + 6,25 % DMSO (stejně množství DMSO bylo injikováno i ostatním skupinám). Výsledky druhé série *in vivo* pokusů jsou zaznamenány v Tab. 11.

Tab. 10: Množství živých myší v jednotlivých skupinách za daný den v první sérii.

	d. p. i.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	střední doba přežití (dny)
kontrola	PBS + DMSO + VKE	8	7	3	1	0	0	0	0	0	0	0	9
I. varianta	RSV + VKE	8	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	9
	PIC + VKE	8	5	4	2	0	0	0	0	0	0	0	9,5
	VIN + VKE	8	8	5	1	0	0	0	0	0	0	0	10
	IFN + VKE	8	8	7	4	1	1	1	1	1	1	1	10,5
	RSV+ IFN + VKE	8	8	8	4	2	0	0	0	0	0	0	10,5
	PIC + IFN + VKE	8	8	7	3	2	1	0	0	0	0	0	10
	VIN + IFN + VKE	8	8	6	2	0	0	0	0	0	0	0	10
II. varianta	RSV, následující den VKE	8	8	8	7	5	2	0	0	0	0	0	12
	PIC, následující den VKE	8	8	8	8	2	0	0	0	0	0	0	11
	VIN, následující den VKE	8	8	8	5	3	2	0	0	0	0	0	11
	IFN, následující den VKE	8	8	8	7	6	2	1	1	1	1	1	12
	RSV + IFN, následující den VKE	8	8	8	6	5	3	0	0	0	0	0	13
	PIC + IFN, následující den VKE	8	8	8	7	7	2	2	0	0	0	0	14
	VIN + IFN, následující den VKE	8	8	8	8	5	3	1	0	0	0	0	12

Tabulka 10 představuje počet živých myší za daný den v jednotlivých skupinách první série. Prvních sedm dní po infekci nedošlo k úhynu zvířete ani v jedné pokusné skupině. Sedmý den po infekci se začaly objevovat známky onemocnění (rozčepýřená srst, apatie). V kontrolní skupině zemřely téměř všechny myši devátý a desátý den. V těchto dnech byla zaznamenána také vysoká mortalita v první variantě, především u skupin ošetřených pouze stilbeny. Nicméně většina laboratorních zvířat již trpěla symptomy pokročilé klíšťové encefalitidy – apatie, částečná či úplná paralýza. Ke kritickému zvratu došlo jedenáctý den po infekci, kdy zemřela poslední myš kontrolní skupiny a taktéž drtivá většina myší ve skupinách první varianty. Ze střední doby přežití pak vyplývá, že aplikace látek současně s infekcí VKE prakticky neprodlužuje délku života testovaných subjektů.

Naproti tomu injekce vybraných stilbenů den před infekcí (II. varianta) myším prokazatelně poskytovala protektivní účinek proti VKE. Piceid v kombinaci s interferonem prodlužoval střední dobu přežití skupiny dokonce o 5 dní v porovnání s kontrolou. Obecně stilbeny společně s IFN, aplikované den před infekcí, průměrně prodlužovaly dobu přežití o 4 dny, samotné látky pak o 2 dny vůči kontrole.

Tab. 11: Množství živých myši v jednotlivých skupinách za daný den v druhé sérii.

	d. p. i.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16. - 23.	střední doba přežití (dny)
kontrola	PBS + DMSO + VKE	8	8	8	3	1	0	0	0	0	0	0	0	8
I. varianta	RSV + VKE	8	8	7	2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
	PIC + VKE	8	7	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	VIN + VKE	8	8	8	7	3	2	2	1	1	1	1	1	9
	IFN + VKE	8	8	8	7	5	2	1	1	1	1	1	1	10
	RSV+ IFN + VKE	8	8	8	6	4	3	2	2	2	1	1	1	9,5
	PIC + IFN + VKE	8	8	8	6	3	1	0	0	0	0	0	0	9
	VIN + IFN + VKE	8	8	8	6	6	4	3	3	3	3	3	3	10,5
II. varianta	RSV, následující den VKE	8	8	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	PIC, následující den VKE	8	8	8	5	1	1	1	1	1	1	1	1	9
	VIN, následující den VKE	8	8	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	IFN, následující den VKE	8	8	8	8	7	6	6	6	6	6	6	6	-
	RSV + IFN, následující den VKE	8	8	8	7	7	7	7	5	5	5	5	5	-
	PIC + IFN, následující den VKE	8	8	8	6	4	4	3	2	2	2	2	2	10
	VIN + IFN, následující den VKE	8	8	8	7	4	2	2	2	2	2	2	2	9,5
III. varianta	VKE, následující den RSV	8	8	8	6	2	0	0	0	0	0	0	0	9
	VKE, následující den PIC	8	8	8	5	3	0	0	0	0	0	0	0	9
	VKE, následující den VIN	8	8	8	5	2	0	0	0	0	0	0	0	9
	VKE, následující den IFN	8	8	7	6	5	1	1	0	0	0	0	0	10
	VKE, následující den RSV + IFN	8	8	8	7	3	2	2	1	1	1	1	1	9
	VKE, následující den PIC + IFN	8	8	8	4	2	1	1	1	1	1	1	1	8,5
	VKE, následující den VIN + IFN	8	8	7	7	3	1	0	0	0	0	0	0	9

Tabulka 11 znázorňuje jednotlivé pokusné skupiny ve třech variantách druhé série. Prvních pět dní po infekci nezemřela žádná laboratorní myš. Pátý den se začaly projevovat známky infekce. Šestý den došlo k jednomu úmrtí ve skupině, která byla ošetřena PIC s VKE. Následující den byla zaregistrována nízká mortalita u dalších pěti skupin, zatímco myši v kontrolní skupině opět zemřely až osmý a devátý den po infekci. Desátý den po infekci zemřela poslední myš kontrolní skupiny, stejně tak infekci VKE podlehly téměř všechny myši i v ostatních skupinách. Nejlépe se dařilo pokusným zvířatům v druhé variantě, jež byla ošetřena samotným IFN nebo v kombinaci s RSV. Dvanáctý až dvacátý třetí den po infekci již nedocházelo k žádným změnám v počtu myší.

Při porovnání střední doby přežití je patrné, že stilbeny nemají terapeutický účinek proti VKE (III. varianta). Aplikace látek a interferonu současně s VKE (I. varianta) prodloužila střední dobu přežití průměrně o 2 dny vůči kontrole. Za zmínku stojí skupina „VIN + IFN + VKE“, kde na konci testu bylo zdravých 37,5 % pokusných zvířat. Nejvíce zajímavý výsledek se vyskytoval ve druhé variantě reprezentující profylaxi, neboť při injekci samotného interferonu nebo v kombinaci s RSV na konci pokusu bylo zdravých více než 50 % myší. Z tohoto důvodu nebylo u těchto skupin ani možné vypočítat střední dobu přežití. Nicméně indikace samotného IFN k profylaxi je poněkud nevhodná kvůli nespecifickým škodlivým účinkům. Aplikace pouze stilbenů při těchto koncentracích způsobovala u myší vyšší mortalitu oproti první sérii. Nejspíše se zde uplatňoval výraznější toxický vliv látek.

7 Diskuze

V současné době neexistuje přímá efektivní léčba pro arbovirové infekce napadající centrální nervovou soustavu. Výjimkou není ani virus klíšťové encefalitidy z čeledi *Flaviviridae*, který způsobuje četné neurologické potíže u lidí žijících na území Eurasie (Pfeffer a Dobler, 2010). Například v rozmezí let 1991-2010 bylo v Rusku a Evropě hlášeno celkem 169 292 nemocných, z toho 58 451 (35 %) připadá na Evropu. Nicméně pokud se tento časový úsek rozdělí na dvě období: 1991-2000 a 2001-2010, lze jejich porovnáním sledovat, že morbidita KE má kolísavý charakter v závislosti na časové periodě a území. V Pobaltí (Estonsko, Litva, Lotyšsko) byl zaznamenán pokles nemocných o 65 % a v Rusku o 46 %. Na druhé straně jsou však alarmující čísla ze států střední Evropy (Česká republika, Německo, Polsko a Švýcarsko), kde byla nemocnost navýšena o 144 %. V severních zemích (Norsko, Finsko, Švédsko) došlo k 99 % vzestupu morbidity (Kunze, 2012), navíc v minulosti se ve Skandinávii VKE ani nevyskytoval (Hall a kol., 2010). Přestože existují spolehlivé vakcíny proti VKE, tak například v České republice dosahuje proočkovanost populace pouze 16 %. Pokud se u nakažené osoby plně rozvine KE, jsou k dispozici stále jen podpůrné a symptomatické postupy léčby, tudíž prognóza pro pacienta není příznivá (Heinz a kol., 2013). Tato čísla zdůrazňují potřebu VKE i nadále studovat a hledání nových léků stojí za investování finančních prostředků.

Látky testované na buněčných liniích v této práci se řadí mezi diamantoidy, což je skupina sloučenin odvozených od adamantanu, který byl poprvé objeven v hodonínské ropě chemiky Landou a Macháčkem (Fort a Schleyer, 1964). Adamantan a jeho deriváty si získaly svou pozornost v mnoha odvětvích, nicméně v souvislosti s touto prací je důležitý jejich farmakologický profil. U derivátů adamantanu byl prokázán antibakteriální (Aigami a kol., 1975), antimykotický (Kadi a kol., 2007), antivirotický (Kolocouris a kol., 1994), trypanocidní (Papanastasiou a kol., 2008) a Parkinson zmírňující (Chakrabarti a kol., 1976) účinek. V této práci byl konkrétně zkoumán antivirotický vliv amantadinu, 2-aminoadamantan hydrochloridu a kyseliny adamantankarboxylové. Amantadin, komerčně Symmetrel®, byl donedávna využíván při léčbě chřipky typu A, kde blokoval M2 iontové kanály a tím znemožňoval průnik virionu do buňky (Basarić a kol., 2014). Ačkoli u chřipky typu A vznikla k amantadinu resistance díky mutaci genu M2 kanálů, byla u něj prokázána schopnost

inhibovat replikaci viru hepatitidy C (VHC) (Smith, 1997). Jiná studie dokládá antivirotický efekt této látky proti viru horečky dengue (Koff a kol., 1980). VHC i virus horečky dengue patří do čeledi *Flaviviridae*, stejně jako virus klíšťové encefalitidy (Yudin a kol., 2018). Proto bylo rozhodnuto vyzkoušet antivirotický účinek amantadinu také proti VKE.

Pro *in vitro* pokusy bylo nutné zvolit vhodný pokusný materiál. Na základě známých informací byly zvoleny buněčné linie neurálního původu, neboť právě ty VKE nejvíce poškozují svým replikačním cyklem, v důsledku čehož postižené osoby trpí neuropatologickými komplikacemi (Dumpis a kol., 1999). Jmenovitě byla použita medulloblastomová (DAOY HTB-186), glioblastomová (U373) a neuroblastomová (SK-N-SH) linie. Prvním cílem bylo ověřit cytotoxicitu vybraných derivátů adamantanu pro výše zmíněné neurony. Jako hraniční hodnota byla zvolena LC_{50} pro jednotlivé buněčné linie a substance. Jinými slovy je to taková koncentrace látky, která zabije právě 50 % buněk. Na základě bakalářské práce (Vokurka, 2016) bylo zprvu pracováno s maximální koncentrací látek 500 ng/ml a dále dvojkovým ředěním až do 3,9 ng/ml, neboť tento autor pozoroval cytotoxicitu některých derivátů adamantanu u linie U373 již při těchto koncentracích. Cytotoxicitu látek sledoval pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda je bezpochyby velice zajímavá a přínosná, nicméně se nehodí pro kvantifikaci celého vzorku, jelikož vyhodnocuje předem nastavený počet eventů (buněk), tedy jen část vzorku. Navíc samotné vyhodnocení je oproti jiným metodám do jisté míry subjektivní kvůli tzv. gateování (Penka a Tesařová, 2011). V této práci byly buňky kultivovány spolu s látkami o požadované koncentraci čtyři dny, poté proběhlo změření relativního množství přežívajících neuronů pomocí biochemické metody – MTT test. Tento test je založen na schopnosti buněk metabolizovat ve vodě rozpustné MTT na krystalky formazanu, jež jsou rozpustné v organickém rozpouštědle (např. DMSO). Velkou předností této metody je rychlost a možnost analyzovat více vzorků současně (omezení je dáno parametry spektrofotometru). MTT test byl vyvinut k určení cytotoxicity látek či buněčné proliferace u savčích buněk, navíc je již ověřen několika desítkami let v praxi (Sieuwerts a kol., 1995). Výsledky testů s koncentrací látek od 3,9 do 500 ng/ml neprokázaly výrazný cytotoxický efekt ani u jedné z buněčných linií. Vzhledem k tomu, že relativní množství buněk nekleslo pod hranici 50 %, tak nebylo možné získanými hodnotami proložit přímkou, pomocí jejíž rovnice by byla dopočítána LC_{50} pro jednotlivé látky u vybraných neuronů. Tudíž koncentrace vybraných látek byla zvýšena od

0,78 do 100 µg/ml. Získaná data z těchto testů podporovala předchozí tvrzení, že koncentrace 3,9 až 500 ng/ml nezahrnovala cytotoxickou mez LC_{50} u vybraných buněčných linií. Kupříkladu v práci (Koff a kol., 1980) nepozorovali cytotoxicitu amantadinu u opičích leukocytů LLC-MK2 ani při koncentraci 100 µg/ml. Na druhou stranu jiný vědecký tým pozoroval cytotoxický efekt amantadinu při koncentraci ≥ 20 µg/ml u hepatocytární linie Huh 7 (Steinmann a kol., 2007). V této práci byla určena LC_{50} testovaných látek pro vybrané neurony následně: kys. adamantankarboxylová – $U373_{LC50} = 101,38$ µg/ml; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 163,76$ µg/ml; SK-N-SH $_{LC50} = 93$ µg/ml; 2-aminoadamantan hydrochlorid – $U373_{LC50} = 52,48$ µg/ml; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 98,84$ µg/ml; SK-N-SH $_{LC50} = 47,7$ µg/ml; amantadin – $U373_{LC50} = 66,49$ µg/ml; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 108,68$ µg/ml; SK-N-SH $_{LC50} = 49,86$ µg/ml.

Dalším krokem bylo zjistit, zdali vybrané deriváty adamantanu dokáží zcela či částečně ochránit buněčné linie před infekcí VKE. Látky byly opět aplikovány od koncentrace 100 µg/ml a dále dvojkovým ředěním do 0,78 µg/ml s konstantním množstvím 0,5 % DMSO. DMSO je ve farmakologii běžně užívané organické rozpouštědlo, které buňky dokáží tolerovat až do 10 % (Da Violante a kol., 2002). Látky byly testovány celkem ve třech variantách (viz kapitola 6.5). Účelem bylo ověřit, jestli látky účinkují profylakticky či terapeuticky. S ohledem na cílovou strukturu amantadinu, známou u viru chřipky, byl očekáván spíše profylaktický účinek látek (Eyer a Hruška, 2013). Jako hranice účinnosti byla zvolena EC_{50} , neboli taková koncentrace substance, která zabrání cytopatickému efektu u alespoň 50 % buněk vůči negativní kontrole. Triplikáty byly měřeny pomocí MTT testu třetí den po infekci a přidání látek. Pro prvotní orientaci byly látky aplikovány společně s VKE (kmen Hypr) v koncentraci 1 MOI. Amantadin se při této variantě ukázal jako neúčinný dle předdefinovaných měřítek, zatímco kys. adamantankarboxylová při koncentraci 12,5 µg/ml zachránila 54 % buněk U373. S větším rozptylem dat byl také prokázán účinek 2-aminoadamantan hydrochloridu při koncentraci 0,78 µg/ml, kde přežilo 55 % neuronů U373. Dále byly substance aplikovány ve variantě odpovídající profylaxi, tedy první den látky a následující den infekce. V této variantě bylo hodnoty EC_{50} dosaženo pouze u kys. adamantankarboxylové při koncentraci 6,25 µg/ml u buněk U373 (55 %). V poslední variantě byl testován terapeutický účinek, tedy první den infekce a následující den aplikace látek, který byl prakticky nulový u všech vybraných derivátů adamantanu.

Dále bylo ověřeno, zdali jsou vybrané adamantany schopné ovlivnit penetraci virionů do buněk či opuštění virionů z buněk. K tomuto účelu byla využita metoda plakové titrace, pomocí níž se stanovuje množství plakotvorných jednotek na jeden mililitr (de Madrid a Porterfield, 1969). Stejná metoda byla využita např. v práci (Moser a kol., 2018), kde byl určován titer viru Zika (rod *Flavivirus*) u savčích a komářích buněk. U látek bylo opět testováno, jestli působí profylakticky či terapeuticky, přičemž byly aplikovány o koncentraci 100; 50; 25 a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ s DMSO 0,5 %. Na základě cytotoxických testů byl tento pokus demonstrován na buněčné linii DAOY HTB-186, protože právě u této linie byla pozorována nejlepší relativní viabilita buněk v závislosti na koncentraci látek (viz Tab. 8). Buňky byly opět infikovány VKE kmenem Hypr o koncentraci 1 MOI a kultivovány stejným způsobem jako při určování relativní viability buněk infikovaných VKE. Jako pozitivní kontrola sloužily infikované buňky ošetřené DMSO 0,5 %, vůči které byly získané hodnoty porovnávány. K průkaznému snížení titru viru v médiu došlo pouze ve variantě reprezentující profylaxi u amantadinu při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. V jiné práci bylo prokázáno, že stejná koncentrace amantadinu účinně inhibuje replikaci viru dengue (Koff a kol., 1980).

Další test sloužil ke zjištění, zdali vybrané deriváty adamantanu mohou ovlivnit míru replikace virové RNA uvnitř přeživších buněk. Data byla obdržena pomocí metody jedнокrokové qRT-PCR. Vzorky virové RNA pocházely z buněk, u nichž byl určován titer viru v kultivačním médiu. Vzhledem ke komplikacím zmíněných v kapitole 6.4 bylo určeno relativní množství virové RNA pouze u varianty reprezentující profylaxi při daných koncentracích amantadinu. Získaná data z qRT-PCR byla přepočtena metodou $\Delta\Delta\text{-C}_t$, čímž bylo zjištěno relativní množství virové RNA ve vzorkách. Metoda $\Delta\Delta\text{-C}_t$ bývá z pravidla využita v případě, kdy je relativní množství RNA určováno vůči referenčnímu housekeeping genu (Livak a Schmittgen, 2001). Na základě předchozích výsledků nebyl očekáván zásadní rozdíl mezi relativním množstvím virové RNA ve vzorkách ošetřených amantadinem a v PK. Nicméně test přinesl překvapivé výsledky, kde u přeživších buněk ošetřených amantadinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, bylo v porovnání s PK prokazatelně 0 % virové RNA a při 50 $\mu\text{g/ml}$ to byly 3 %. Pokles relativního množství virové RNA nastal také u koncentrace amantadinu 25 $\mu\text{g/ml}$, ten však již nebyl statisticky průkazný. Tyto výsledky naznačují, že u buněk, které přežily infekci VKE, dochází ke snížení exprese virové RNA v závislosti na koncentraci amantadinu, ale nemá zásadní vliv na množství virionů uvolněných do média.

Novější studie dokládají, že schopnost amantadinu inhibovat replikaci VHC byla původně mylná. Badatelé Jubin a kol. (2000) testovali amantadin proti VHC při různých koncentracích, avšak ani při vysoké koncentraci 100 µg/ml nepozorovali žádnou účinnost. Nicméně při velmi vysokých koncentracích 200 a 400 µg/ml byla zaznamenána snížená replikace VHC, která dle slov autorů byla zapříčiněna nespecifickou inhibicí či toxicitou. Další práce potvrzuje, že amantadin skutečně nezpůsobuje specifickou inhibici replikace VHC (Steinmann a kol., 2007). Tato práce také nepotvrdila dostatečný profylaktický či terapeutický efekt amantadinu a dalších dvou derivátů adamantanu proti VKE, jenž je stejně jako VHC z čeledi *Flaviviridae*.

Ačkoli v současnosti stále chybí oficiální lék při boji s KE, tak výzkumy naznačují slibné účinky například u následujících přípravků: ivermectin (Mastrangelo a kol., 2012), thymalin a leukinferon (Krylova a Leonova, 2001) či aplikace univerzálního antivirového přípravku Panavir, který doposud nebyl v rámci Evropské unie registrován (Litvin a kol., 2009). Minulý rok se českému týmu podařilo prokázat účinnost Arbidolu, což je lék proti chřipce registrovaný pouze na území Ruska a Číny (Haviernik a kol., 2018). Další látky inhibující replikaci VKE spadají do skupiny stilbenů, jejichž účinnost *in vitro* potvrdila ve své magisterské práci Mgr. Hana Mašková (Mašková, 2018). Na základě práce této autorky byly vybrané stilbeny ověřeny proti VKE *in vivo*.

Stilbeny jsou přírodní látky ze skupiny polyfenolů, které se v posledních letech dostaly do středu zájmu mnohých vědců díky svým pozitivním účinkům na lidské zdraví. Byl u nich kupříkladu zjištěn antibakteriální, antikancerogenní, antiparazitární, kardioprotektivní, zánět zmírňující či pro tuto práci nejdůležitější antivirotický účinek (Xia a kol., 2010). V přírodě najdeme stilbeny především ve vinné révě (*V. vinifera*). Hlavními zástupci stilbenů jsou resveratrol, piceid a viniferin, kteří byli zkoumáni v této práci proti VKE *in vivo*. Například u resveratrolu byl prokázán antivirotický účinek proti viru horečky dengue, jenž je stejně jako VKE součástí čeledi *Flaviviridae* (Zainal a kol., 2017).

V první sérii byly vybrané stilbeny aplikovány *i. p.* společně s imunomodulační látkou (myším IFN-β) ve dvou variantách (viz Tab. 10). Myši byly infikovány VKE kmenem Hypr (1000 PFU/myš) a ošetřeny látkami o následující dávce: PIC a VIN 12,5 µg/1g myši; RSV 1,56 µg/1g myši. Určitým skupinám byl injikován IFN-β (150 000 IU/myš). Laboratorní zvířata

začala umírat osmý až devátý den po infekci VKE kmenem Hypr, což koreluje s dostupnou literaturou (Wallner a kol., 1996). Poslední myš v kontrolní skupině uhynula 11. den po infekci. V tomtéž dni zemřela i většina myší v I. variantě ošetřených stilbeny (případně IFN- β) současně s infekcí. Porovnáním středních dob přežití jednotlivých skupin se střední dobou přežití kontrolní skupiny, byl pozorován zanedbatelný účinek stilbenů proti VKE v této variantě. Na druhou stranu, myši ve II. variantě, kterým byly injikovány látky den před infekcí, prospívaly o poznání lépe, obzvláště myši ošetřené stilbeny společně s interferonem. Střední doba přežití u myší ošetřených samotnými stilbeny byla v průměru prodloužena o dva dny v porovnání s kontrolou. V kombinaci s interferonem byla pak střední doba přežití prodloužena o 4 dny. Ke zvýšení viability myší po aplikaci RSV bylo například dosaženo také v práci (Chen a kol., 2019) při infekci virem způsobující Aujeszkyho chorobu. Obdobný výsledek byl taktéž publikován v práci (Palamara a kol., 2005), kde RSV při profylaxi výrazně prodlužoval délku života myší infikovaných virem chřipky typu A.

V druhé sérii *in vivo* pokusů byly vybrané polyfenoly injikovány *i. p.* společně s imunomodulační látkou ve třech variantách (viz Tab. 11). První a druhá varianta zůstala stejná jako u první série. Třetí variantu tvořily skupiny myší, které byly jeden den před aplikací stilbenů (případně IFN- β) nakaženy VKE pro ověření terapeutického účinku těchto látek. V této sérii byly látky aplikovány o vyšší dávce: RSV 5 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši; PIC 50 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši a VIN 25 $\mu\text{g}/1\text{g}$ myši. Příslušným skupinám byl spolu s látkou injikován IFN- β (150 000 IU/myš) a všechny myši byly infikovány VKE kmenem Hypr (1000 PFU/myš). Kontrolní skupinu tvořily nakažené myši ošetřené PBS + DMSO 6,25 %. Stejně množství DMSO bylo aplikováno i ostatním myším ve všech variantách. První úmrtí (1 myš) bylo pozorováno 6. den po infekci u skupiny ošetřené PIC a VKE zároveň. Následující den zemřely myši ošetřené RSV + VKE (1 myš); RSV, poté infekce (2 myši); VIN, poté infekce (1 myš); Infekce, poté IFN (1 myš) a Infekce, poté VIN + IFN (1 myš). Myši v kontrolní skupině uhynuly 8. a 9. den po infekci, což se shoduje s předchozí sérií testů a dostupnou literaturou (Wallner a kol., 1996). Desátý den po infekci zemřela poslední myš kontrolní skupiny, stejně tak byla pozorována vysoká mortalita u ostatních skupin ve všech variantách, kromě zvířat v druhé variantě ošetřených samotným IFN nebo v kombinaci s RSV.

Při porovnání prvních variant (látky + VKE) mezi první a druhou sérií, tak nelze pozorovat zásadní rozdíl u středních dob přežití jednotlivých skupin. Z toho vyplývá, že

aplikace stilbenů o vyšší dávce společně s VKE nezlepšuje průběh infekce. Nicméně při porovnání skupin „VIN+IFN+VKE“, tak v první sérii zemřela poslední myš 11. den po infekci, zatím co v druhé sérii bylo na konci pokusu (23. den po infekci) stále zdravých 37,5 % zvířat. Porovnáním druhých variant mezi první a druhou sérií testů, je zřejmá vyšší mortalita při injikaci látek den před infekcí. Průměrná doba přežití je u druhé série zkrácena v průměru o 3 dny vůči první sérii. Nejspíše se zde uplatňovala vyšší toxicita substancí, navíc Mgr. Hana Mašková ve své magisterské práci zjistila, že pokud jsou aplikovány stilbeny společně s IFN, tak dochází ke snížení relativní viability buněk oproti samotné aplikaci stilbenů (Mašková, 2018). Na druhou stranu byl u druhé série pozorován velmi zajímavý výsledek u skupin, kterým byl aplikován samotný IFN či v kombinaci s RSV. Na konci pokusu bylo v těchto skupinách zdravých více než 50 % myší. Z tohoto důvodu u nich ani nebylo možné určit průměrnou dobu přežití. Bohužel samotný interferon není vhodný k profylaxi díky svým škodlivým vedlejším účinkům, mezi něž zprvu patří například: únava, horečka, zimnice, myalgie, ztráta hmotnosti, nauzea, porucha pozornosti a spánku; později se objevuje například: útlum kostní dřeně, četné infekce, autoimunitní choroby, vážné psychiatrické poruchy (Renault a Hoofnagle, 1989). Terapeutický účinek stilbenů (III. varianta) nebyl při *in vivo* testech druhé série dokázán, tudíž tyto vybrané látky se pro léčbu infekce VKE jeví jako nevhodné.

8 Závěr

Část práce s vybranými deriváty adamantanu:

- ✓ Cytotoxický efekt LC_{50} u vybraných derivátů adamantanu byl pro buněčné linie U373, SK-N-SH a DAOY HTB-186 prokázán biochemickou MTT metodou při koncentraci látek od 0,78 do 100 $\mu\text{g/ml}$. Pro jednotlivé buněčné linie a látky byla LC_{50} určena následovně: kys. adamantankarboxylová – $U373_{LC50} = 101,38 \mu\text{g/ml}$; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 163,76 \mu\text{g/ml}$; SK-N-SH $_{LC50} = 93 \mu\text{g/ml}$; 2-aminoadamantan hydrochlorid – $U373_{LC50} = 52,48 \mu\text{g/ml}$; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 98,84 \mu\text{g/ml}$; SK-N-SH $_{LC50} = 47,7 \mu\text{g/ml}$; amantadin – $U373_{LC50} = 66,49 \mu\text{g/ml}$; DAOY HTB-186 $_{LC50} = 108,68 \mu\text{g/ml}$; SK-N-SH $_{LC50} = 49,86 \mu\text{g/ml}$.
- ✓ V závislosti na relativní viabilitě buněk infikovaných VKE byl profylaktický účinek u vybraných derivátů adamantanu pozorován pouze u buněčné linie U373, kde při aplikaci kys. adamantankarboxylové o koncentraci 6,25 $\mu\text{g/ml}$ přežívalo 53 % buněk, čímž dosáhly předem stanovené hranice EC_{50} . V případě aplikace látek současně s infekcí VKE tatož buněčná linie dosahovala hodnoty EC_{50} u kys. adamantankarboxylové při koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$ a 2-aminoadamantan hydrochloridu při koncentraci 0,78 $\mu\text{g/ml}$. Terapeutický účinek látek nebyl prokázán ani u jedné z testovaných látek při daných koncentracích pro vybrané buněčné linie.
- ✓ Virová nálož v kultivačním médiu u infikovaných buněk DAOY HTB-186 byla prokazatelně nižší pouze v případě aplikace amantadinu o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ den před infekcí VKE.
- ✓ Test jedнокrokové qRT-PCR prokázal signifikantní pokles relativního množství virové RNA u přeživších buněk DAOY HTB-186 ošetřených amantadinem o koncentraci 100 a 50 $\mu\text{g/ml}$ jeden den před infekcí.

Část práce s vybranými stilbeny:

- ✓ Při *in vivo* pokusech byl prokázán profylaktický účinek vybraných stilbenů aplikovaných v následující dávkách: PIC a VIN 12,5 µg/1g myši; RSV 1,56 µg/1g myši. Průměrná doba života byla v průměru prodloužena o 2 dny. Pokud byly látky aplikovány společně s myším IFN-β, tak došlo k prodloužení průměrné doby života dokonce o 4 dny.
- ✓ Samotné stilbeny injikované den před infekcí neprodlužují průměrnou dobu života u pokusných zvířat při těchto dávkách: RSV 5 µg/1g myši; PIC 50 µg/1g myši a VIN 25 µg/1g myši.
- ✓ Na konci *in vivo* pokusu bylo zdravých více než 50 % myši ošetřených IFN-β v kombinaci s RSV o dávce 5 µg/1g myši.
- ✓ Nebyl prokázán terapeutický účinek vybraných stilbenů při následujících dávkách: RSV 5 µg/1g myši; PIC 50 µg/1g myši a VIN 25 µg/1g myši.

9 Seznam citované literatury

Albrecht, P. (1968). Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. In *Current topics in microbiology and immunology* (pp. 44-91). Springer, Berlin, Heidelberg.

Aigami, K., Inamoto, Y., Takaishi, N., Hattori, K., Takatsuki, A., & Tamura, G. (1975). Biologically active polycycloalkanes. 1. Antiviral adamantane derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(7), 713-721.

Atrasheuskaya, A. V., Fredeking, T. M., & Ignatyev, G. M. (2003). Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 131(1), 148-154.

Bavaresco, L., Fregoni, M. A. R. I. O., Trevisan, M. A. R. C. O., Mattivi, F., Vrhovsek, U., & Falchetti, R. (2002). The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, 41(3), 133-136.

Basarić, N., Sohora, M., Cindro, N., Mlinarić-Majerski, K., De Clercq, E., & Balzarini, J. (2014). Antiproliferative and antiviral activity of three libraries of adamantane derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 347(5), 334-340.

Bengis, R. G., Leighton, F. A., Fischer, J. R., Artois, M., Morner, T., & Tate, C. M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Revue scientifique et technique-office international des epizooties*, 23(2), 497-512.

Best, S. M., Morris, K. L., Shannon, J. G., Robertson, S. J., Mitzel, D. N., Park, G. S., Boer, E., Wolfenbarger, J. B., & Bloom, M. E. (2005). Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology*, 79(20), 12828-12839.

Blitvich, B., & Firth, A. (2015). Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*, 7(4), 1927-1959.

Bogovic, P., Lotric-Furlan, S., & Strle, F. (2010). What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 246-250.

Brescia, P., & Banks, P. (2009). Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT. *Inc. USA*, 1-3.

Calisher, C. H. (1988). Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virologica*, 32(5), 469-478.

Campagna, M., & Rivas, C. (2010). Antiviral activity of resveratrol. *Biochem Soc Trans* 1 February 2010; 38 (1): 50-53.

Chakrabarti, J. K., Hotten, T. M., Sutton, S., & Tupper, D. E. (1976). Adamantane and protoadamantanealkanamines as potential anti-Parkinson agents. 10. *Journal of Medicinal Chemistry*, 19(7), 967-969.

Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990 a). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews in Microbiology*, 44(1), 649-688.

Chambers, T. J., Weir, R. C., Grakoui, A., McCourt, D. W., Bazan, J. F., Fletterick, R. J., & Rice, C. M. (1990 b). Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(22), 8898-8902.

Charrel, R. N., Zaki, A. M., Attoui, H., Fakeeh, M., Billoir, F., Yousef, A. I., de Chesse, R., De Micco, P., Gould, E. A., & de Lamballerie, X. (2001). Complete coding sequence of the Alkhurma virus, a tick-borne flavivirus causing severe hemorrhagic fever in humans in Saudi Arabia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(2), 455-461.

Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V., Frolova, T. V., Gould, E. A., Gritsun, T. S., Heinz, F. X., Labuda, M., Lashkevich, V. A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D. V., Mandl, C. W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V. S. & de Lamballerie, X. (2004). Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12), 1040-1055.

Chen, M., Chen, X., Song, X., Muhammad, A., Jia, R., Zou, Y., Yin, L., Li, L., He, C., Ye, G., Lv, Lv, C., Zhang, W. & Yin, Z. (2019). The immune-adjuvant activity and the mechanism of resveratrol on pseudorabies virus vaccine in a mouse model. *International Immunopharmacology*, 76, 105876.

Chu, P. W. G., & Westaway, E. G. (1985). Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*, 140(1), 68-79.

Clarke, D. H., & Casals, J. (1965). Arboviruses; Group B, In "Viral and Rickettsial infection of man" 4th ed., Eds. Horsfall, FL Jr. and I. Tamm.

Csángó, P. A., Blakstad, E., Kirtz, G. C., Pedersen, J. E., & Czettel, B. (2004). Tick-borne encephalitis in southern Norway. *Emerging Infectious Diseases*, 10(3), 533.

Danielová, V., Rudenko, N., Daniel, M., Holubová, J., Materna, J., Golovchenko, M., & Schwarzová, L. (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 48-53.

Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J. C., & Arnaud, P. (2002). Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1600-1603.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.

De Clercq, E. (1997). In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 674-693.

De Clercq, E. (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(9), 704.

De Clercq, E., & Li, G. (2016). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 695-747.

de Madrid, A. T., & Porterfield, J. S. (1969). A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(1), 113.

Dumpis, U., Crook, D., & Oksi, J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28(4), 882-890.

Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO journal*, 21(11), 2757-2768.

Elshuber, S., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Mandl, C. W. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus FN1. *Journal of General Virology*, 84(1), 183-191.

Eyer, L., & Hruška, K. (2013). Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis. *Veterinarni Medicina*, 58(6).

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.

Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(4), 218-250.

Fort, R. C., & Schleyer, P. V. R. (1964). Adamantane: consequences of the diamondoid structure. *Chemical Reviews*, 64(3)

Furuichi, Y., & Shatkin, A. J. (2000). Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Advances in Virus Research*, 50, 135-184.

Glimåker, M., Olcén, P., & Andersson, B. (1994). Interferon- γ in cerebrospinal fluid from patients with viral and bacterial meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 26(2), 141-147.

Gao, Y., Chen, T., Lei, X., Li, Y., Dai, X., Cao, Y., Ding, Q., Lei, X., Li, T. & Lin, X. (2016). Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 5481-5488.

Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F. & Velasco, R. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11773-11785.

Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J. & Borrás, C. (2015). Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

Gritsun, T. S. (2003). Lashkevich VA. Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57, 129-146.

Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A. (2003 a). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57(1-2), 129-146.

Gritsun, T. S., Frolova, T. V., Zhankov, A. I., Armesto, M., Turner, S. L., Frolova, M. P., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (2003 b). Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of Virology*, 77(1), 25-36.

Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.

Günther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Sköldenberg, B., & Forsgren, M. (1997). Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clinical and Diagnostic Virology*, 8(1), 17-29.

Haglund, M., & Günther, G. (2003). Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, 21, S11-S18.

Hall, O., Eriksson, H., Nolskog, P., & Bergström, T. (2010). The emergence and spread of tick-borne encephalitis virus in scandinavia. In *ASPRS 2010 Annual Conference (American Society for Photogrammetry and Remote Sensing)*. ASPRS.

Haviernik, J., Štefánik, M., Fojtíková, M., Kali, S., Tordo, N., Rudolf, I., Hubálek, Z., Eyer, L. & Růžek, D. (2018). Arbidol (Umifenovir): a broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne Flaviviruses. *Viruses*, 10(4), 184.

Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2012). Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, 30(29), 4301-4306.

Heinz, F. X., Stiasny, K., Holzmann, H., Grgic-Vitek, M., Kriz, B., Essl, A., & Kundi, M. (2013). Vaccination and tick-borne encephalitis, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 69.

He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.

Heinz, F. X., Holzmann, H., Essl, A., & Kundi, M. (2007). Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25(43), 7559-7567.

Holbrook, M. R. (2017). Historical perspectives on flavivirus research. *Viruses*, 9(5), 97.

Holub, M., Klučková, Z., Beran, O., Aster, V., & Lobovská, A. (2002). Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 106(5), 302-308.

Holzmann, H. (2003). Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 21, S36-S40.

Hulo, C., De Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2010). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39, D576-D582.

Jääskeläinen, A. E., Tikkakoski, T., Uzcátegui, N. Y., Alekseev, A. N., Vaheri, A., & Vapalahti, O. (2006). Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1568.

Jiang, K. F., Zhao, G., Deng, G. Z., Wu, H. C., Yin, N. N., Chen, X. Y., Qui, C. W. & Peng, X. L. (2017). Polydatin ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice via inhibiting TLR2-mediated activation of the p38 MAPK/NF- κ B pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(2), 211.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990.

Jubin, R., Murray, M. G., Howe, A. Y. M., Butkiewicz, N., Hong, Z., & Lau, J. Y. N. (2000). Amantadine and rimantadine have no direct inhibitory effects against hepatitis C viral protease, helicase, ATPase, polymerase, and internal ribosomal entry site-mediated translation. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 331-334.

Kadi, A. A., El-Brollosy, N. R., Al-Deeb, O. A., Habib, E. E., Ibrahim, T. M., & El-Emam, A. A. (2007). Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1, 3, 4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1, 3, 4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(2), 235-242.

Kleiter, I., Jilg, W., Bogdahn, U., & Steinbrecher, A. (2007). Delayed humoral immunity in a patient with severe tick-borne encephalitis after complete active vaccination. *Infection*, 35(1), 26-29.

Koff, W. C., Elm, J. L., & Halstead, S. B. (1980). Inhibition of dengue virus replication by amantadine hydrochloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(1), 125-129.

Kolocouris, N., Foscolos, G. B., Kolocouris, A., Marakos, P., Pouli, N., Fytas, G., ... & De Clercq, E. (1994). Synthesis and antiviral activity evaluation of some aminoadamantane derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37(18), 2896-2902.

Kroschewski, H., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Mandl, C. W. (2003). Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 308(1), 92-100.

Krylova, N. V., & Leonova, G. N. (2001). Comparative in vitro study of the effectiveness of various immunomodulating substances in tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii*, 46(1), 25-28.

Kuno, G., & Chang, G. J. J. (2005). Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 608-637.

Kunze, U. (2012). Tick-borne encephalitis (TBE): an underestimated risk... still: report of the 14th annual meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW-TBE). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(3), 197-201.

Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, E., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T. & Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*, 286(5448), 2333-2337.

Leonova, G. N., Ternovoi, V. A., Pavlenko, E. V., Maistrovskaya, O. S., Protopopova, E. V., & Loktev, V. B. (2007). Evaluation of vaccine Encepur® Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*, 25(5), 895-901.

Lepš, J., & Šmilauer, P. (2016). *Biostatistika*. Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Li, C., Feng, J., Huang, W. Y., & An, X. T. (2013). Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 523-531.

Litvin, A. A., Ratnikova, L. I., & Deriabin, P. G. (2009). Preclinical and clinical studies of the efficacy of Panavir in therapy for tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii*, 54(3), 26-32.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 76(11), 5480-5491.

Lorenz, I. C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. (2003). Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *Journal of virology*, 77(7), 4370-4382.

Malhotra, N., Chanana, C., & Kumar, S. (2006). Dengue infection in pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 94(2), 131-132.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Mandl, C. W. (2005). Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research*, 111(2), 161-174.

Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T. (2009). Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, *90*(8), 1781-1794.

Mansoori, G. A. (2007). Diamondoid molecules. *Advances in Chemical Physics*, *136*, 207-258.

Marano, N., Arguin, P. M., & Pappaioanou, M. (2007). Impact of globalization and animal trade on infectious disease ecology. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(12), 1807.

Marjelund, S., Tikkakoski, T., Tuisku, S., & Räsänen, S. (2004). Magnetic resonance imaging findings and outcome in severe tick-borne encephalitis. Report of four cases and review of the literature. *Acta Radiologica*, *45*(1), 88-94.

Mastrangelo, E., Pezzullo, M., De Burghgraeve, T., Kaptein, S., Pastorino, B., Dallmeier, K., de Lamballerie, X., Neyts, J., Hanson, A. M., Frick, D. N., Bolognesi, M. & Milani, M. (2012). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(8), 1884-1894.

Mašková, H. (2016). Potenciální antimikrobiální účinky vybraných přírodních látek. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.

Mašková, H. (2018). Antivirotické účinky stilbenoidů proti klíšťaty přenášeným patogenům *in vivo*. Diplomová práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.

Moser, L. A., Boylan, B. T., Moreira, F. R., Myers, L. J., Svenson, E. L., Fedorova, N. B., Pickett, B. E. & Bernard, K. A. (2018). Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(11), e0006880.

Orlinger, K. K., Hoenninger, V. M., Kofler, R. M., & Mandl, C. W. (2006). Construction and mutagenesis of an artificial bicistronic tick-borne encephalitis virus genome reveals an essential function of the second transmembrane region of protein E in flavivirus assembly. *Journal of Virology*, 80(24), 12197-12208.

Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Ciriolo, M. R., & Garaci, E. (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *Journal of Infectious Diseases*, 191(10), 1719-1729.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

Papanastasiou, I., Tsotinis, A., Kolocouris, N., Prathalingam, S. R., & Kelly, J. M. (2008). Design, synthesis, and trypanocidal activity of new aminoadamantane derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(5), 1496-1500.

Papanastasiou, I., Tsotinis, A., Kolocouris, N., Nikas, S. P., & Vamvakides, A. (2014). New aminoadamantane derivatives with antiproliferative activity. *Medicinal Chemistry Research*, 23(4), 1966-1975.

Penka, M., & Tesařová, E. (2011). a kolektiv, Hematologie a transfuzní lékařství I. *Hematologie*, Grada Publishing, as, Praha.

Pettersson, J. H. O., & Fiz-Palacios, O. (2014). Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *Journal of General Virology*, 95(9), 1969-1982.

Pfeffer, M., & Dobler, G. (2010). Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*, 3(1), 35.

Pogodina, V. V., Malenko, G. V., Fokina, G. I., Levina, L. S., Koreshkova, G. V., Rzhakhova, O. E., Bochkovo, N. G. & Mamonenko, L. L. (1981). Persistence of tick-borne encephalitis virus in monkeys. II. Effectiveness of methods used for virus detection. *Acta virologica*, 25(6), 344-351.

Randolph, S. E. (2011). Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2(4), 179-182.

Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341.

Renault, P. F., & Hoofnagle, J. H. (1989). Side effects of alpha interferon. In *Seminars in Liver disease* (Vol. 9, No. 04, pp. 273-277). © 1989 by Thieme Medical Publishers, Inc..

Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375(6529), 291.

Romero-Pérez, A. I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R. M., & de la Torre-Boronat, M. C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1533-1536.

Rosenberg, M. R., & Casarotto, M. G. (2010). Coexistence of two adamantane binding sites in the influenza A M2 ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13866-13871.

Rudolf, I., Betášová, L., Blažejová, H., Venclíková, K., Straková, P., Šebesta, O., Mendel, J., Bakonyi, T., Schaffner, F., Nowotny, N. & Hubálek, Z. (2017). West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasites & Vectors*, 10(1), 452.

Růžek, D., Šťastná, H., Kopecký, J., Golovljova, I., & Grubhoffer, L. (2007). Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 144(1-2), 133-137.

Růžek, D., Gritsun, T. S., Forrester, N. L., Gould, E. A., Kopecký, J., Golovchenko, M., Rudenko, N. & Grubhoffer, L. (2008). Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 374(2), 249-255.

Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T. S., Gould, E. A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J. & Grubhoffer, L. (2009). CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology*, 384(1), 1-6.

Růžek, D., Dobler, G., & Mantke, O. D. (2010). Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(4), 223-232.

Růžek, D. (2015). *Klíšťová encefalitida*. Grada Publishing.

Saksida, A., Duh, D., Lotrič-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M., & Avšič-Županc, T. (2005). The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, 33(4), 331-335.

Schwaiger, M., & Cassinotti, P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*, 27(2), 136-145.

Shankar, S., Singh, G., & Srivastava, R. K. (2007). Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*, 12(12), 4839-54.

Silber, L. A., & Soloviev, V. D. (1946). Far Eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalitis. *American Review of Soviet Medicine*.

Siewewerts, A. M., Klijn, J. G., Peters, H. A., & Foekens, J. A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 33(11), 813-824.

Slovák, M., Kazimírová, M., Siebenstichová, M., Ustaníková, K., Klempa, B., Gritsun, T., Gould, E. A. & Nuttall, P. A. (2014). Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(6), 962-969.

Smith, J. P. (1997). Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Digestive Diseases and Sciences*, 42(8), 1681-1687.

Smorodintsev, A. A. (1958). Tick-borne spring-summer encephalitis. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en Virologie Medicale*, 1, 210-247.

Smorodintsev, A. A., Kagan, N. W., Levkovitsch, E. N., & Dankovskij, N. L. (1941). Experimenteller und epidemiologischer Beitrag zur aktiven Immunisierung gegen die Frühling-Sommer-Zeckenencephalitis. *Archives of Virology*, 2(1), 1-25.

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., & Votava, M. (2018). *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

Stadler, K., Allison, S. L., Schlich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, 71(11), 8475-8481.

Steinmann, E., Whitfield, T., Kallis, S., Dwek, R. A., Zitzmann, N., Pietschmann, T., & Bartenschlager, R. (2007). Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus. *Hepatology*, 46(2), 330-338.

Sutherst, R. W. (2004). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 136-173.

Suess, J. (2008). Tick-borne encephalitis in Europe and beyond—the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*, 13(26), 18916.

Takashima, I., Morita, K., Chiba, M., Hayasaka, D., Sato, T., Takezawa, C., Igarashi, A., Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. & Hashimoto, N. (1997). A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 1943-1947.

Toporkova, M. G., Aleshin, S. E., Ozherelkov, S. V., Nadezhdina, M. V., Stephenson, J. R., & Timofeev, A. V. (2008). Serum levels of interleukin 6 in recently hospitalized tick-borne encephalitis patients correlate with age, but not with disease outcome. *Clinical & Experimental Immunology*, 152(3), 517-521.

Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J. C., Mérillon, J. M. & Teissédre, P. L. (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5664-5669.

Vokurka, R. (2016). Potenciální antivirotické účinky derivátů přírodních látek proti viru klíšťové encefalitidy. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.

Wallner, G., Mandl, C. W., Ecker, M., Holzmann, H., Stiasny, K., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1996). Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 77(5), 1035-1042.

Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328-345.

Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2016). Resveratrol: how much wine do you have to drink to stay healthy?. *Advances in Nutrition*, 7(4), 706-718.

Wengler, G., & Wengler, G. (1991). The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*, 184(2), 707-715.

Wengler, G., Wengler, G., & Gross, H. J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*, 89(2), 423-437.

Wenzel, E., & Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 472-481.

Werme, K., Wigerius, M., & Johansson, M. (2008). Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cellular Microbiology*, 10(3), 696-712.

Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K. & Trent, D. W. (1985). *Flaviviridae*. *Intervirology*, 24(4), 183-192.

World Health Organization. (2007). Outbreak and spread of chikungunya. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 82(47), 409-415.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646.

Xue, Y., & Mansoori, G. A. (2010). Self-assembly of diamondoid molecules and derivatives (MD simulations and DFT calculations). *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 288-303.

Yang, T., Li, S., Zhang, X., Pang, X., Lin, Q., & Cao, J. (2015). Resveratrol, sirtuins, and viruses. *Reviews in Medical Virology*, 25(6), 431-445.

Yu, B., Jiang, Y., Zhang, B., Yang, H., & Ma, T. (2018). Resveratrol dimer trans- ϵ -viniferin prevents rotaviral diarrhea in mice by inhibition of the intestinal calcium-activated chloride channel. *Pharmacological Research*, 129, 453-461.

Yudin, N. S., Barkhash, A. V., Maksimov, V. N., Ignatieva, E. V., & Romaschenko, A. G. (2018). Human genetic predisposition to diseases caused by viruses from *Flaviviridae* family. *Molecular Biology*, 52(2), 165-181.

Zainal, N., Chang, C. P., Cheng, Y. L., Wu, Y. W., Anderson, R., Wan, S. W., Chen, C. L., Ho, T. S., AbuBakar, S. & Lin, Y. S. (2017). Resveratrol treatment reveals a novel role for HMGB1 in regulation of the type 1 interferon response in dengue virus infection. *Scientific Reports*, 7, 42998.

Zurabishvili, D. S., Lomidze, M. O., Trapaidze, M. V., & Samsoniya, S. A. (2011). Adamantyl-1 and Adamantyl-2 Imidazoles and Benzimidazoles. Methods of Synthesis, Properties and Biological Activity. *ChemInform*, 42(4), no-no.

Webové zdroje:

https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species

<https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>